



**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ**



## **ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ**

Τομέας Σύνθεσης και Ανάπτυξης Βιομηχανικών  
Διαδικασιών (IV)

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ:**

**ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ  
*Fusarium oxysporum* ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ**

**ΠΑΠΑΔΑΤΟΥ ΣΤΑΥΡΟΥΛΑ**

**Υπεύθυνος καθηγητής : ΧΡΙΣΤΑΚΟΠΟΥΛΟΣ ΠΑΥΛΟΣ**

**ΑΘΗΝΑ, Οκτώβριος 2011**



## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Με την ολοκλήρωση της εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσοι συνέβαλλαν στην διεκπεραίωση της.

Θα ήθελα, καταρχήν, να απευθύνω τις ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα καθηγητή της εργασίας μου, αναπληρωτή καθηγητή του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, κύριο Χριστακόπουλο Παύλο, που με την καθοδήγηση του και τις πολύτιμες συμβουλές τους συνεισέφερε ουσιαστικά στην ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κύριο Δημήτρη Κέκο και τον καθηγητή κύριο Φραγκίσκο Κολίση που μου έδωσαν την δυνατότητα να δουλέψω στο εργαστήριο καθώς επίσης και τον λέκτορα κύριο Ευάγγελο Τόπακα για τις συμβουλές του στην συγγραφή της μελέτης.

Θερμά ευχαριστώ επίσης οφείλω στον Υποψήφιο Διδάκτορα Θωμά Πάσχο, για τη συνεργασία του καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας. Η βοήθεια του, οι γνώσεις του και οι συμβουλές του ήταν καθοριστικές για την ομαλή ολοκλήρωσή της.

Ευχαριστώ, επίσης, όλους του Υποψήφιους Διδάκτορες και τους ανθρώπους του εργαστηρίου βιοτεχνολογίας που με υποδέχτηκαν φιλικά και ήταν πάντα πρόθυμοι να συνεργαστούν και να βοηθήσουν.

Τέλος, επιθυμώ να εκφράσω τις εγκάρδιες ευχαριστίες μου στην οικογένειά μου για την αρωγή και την συμπαράστασή τους καθ' όλη την διάρκεια διεξαγωγής της μελέτης αυτής.

# Περιεχόμενα

Περίληψη.....	1
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	2
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Βιοαιθανόλη .....	3
1.1 Εισαγωγή .....	3
1.2 Βιομάζα και βιοκαύσιμα .....	4
1.3 Βιοαιθανόλη .....	5
1.4 Προοπτικές βιοαιθανόλης.....	7
1.5 Βιοαιθανόλη και περιβάλλον .....	8
1.6 Η παρούσα κατάσταση στην παραγωγή βιοαιθανόλης .....	9
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Παραγωγή βιοαιθανόλης .....	12
2.1 Βιομετατροπή σακχαρούχων και αμυλούχων υποστρωμάτων.....	12
2.2 Τεχνολογίες παραγωγής αιθανόλης .....	13
2.3 Ο μύκητας <i>Fusarium oxysporum</i> .....	15
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Επιδράσεις των αλκοολών και της βιοαιθανόλης στους ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς .....	18
3.1 Ανάπτυξη και μορφολογία κυττάρων .....	18
3.2 Συστήματα μεταφοράς.....	19
3.3 Διαπερατότητα και δομή μεμβράνης.....	20
3.4 Λιπιδική σύσταση.....	22
3.5 Μηχανισμοί παρεμπόδισης της ζύμωσης παρουσία αιθανόλης.....	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Ουσίες που αυξάνουν την ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών παρουσία αιθανόλης.....	26
4.1 Ουσίες που συμβάλλουν στη σταθεροποίηση της κυτταρικής μεμβράνης .....	27
4.1.1 Ακόρεστα λιπαρά οξέα .....	28
4.1.2 Εργοστερόλη.....	30
4.1.3 Αμινοξέα .....	31
4.1.4 Ινοσιτόλη και ενεργότητα του ενζύμου $H^+$ - ΑΤΡάση.....	32

4.2 Ουσίες που συμβάλλουν στη σταθεροποίηση ή επιδιόρθωση των αφυδατωμένων από την αιθανόλη πρωτεϊνών .....	34
4.2.1 Τρεχαλόζη .....	34
4.2.2 Πρωτεΐνες θερμικού σοκ (HSPs).....	37
4.3 Βελτιστοποίηση της σύστασης των θρεπτικών συστατικών.....	37
Πειραματικό Μέρος .....	39
Υλικά και μέθοδοι .....	40
Αποτελέσματα – Συζήτηση.....	43
Μελέτη ανάπτυξη του μύκητα <i>Fusarium oxysporum</i> σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις αιθανόλης.....	43
Μελέτη ζύμωσης του μύκητα <i>Fusarium oxysporum</i> σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις αιθανόλης.....	49
Μελέτη βελτίωσης της ανθεκτικότητας του μύκητα <i>Fusarium oxysporum</i> στην αιθανόλη κατά την ανάπτυξη και τη ζύμωση.....	57
Συμπεράσματα – Προτάσεις .....	70
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	72

## Περίληψη

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο βιοτεχνολογίας, της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου από τον Ιανουάριο του 2011 έως και τον Σεπτέμβριο του 2011, στο πλαίσιο του μαθήματος «Βιοτεχνολογία και Περιβάλλον». Σκοπός της εργασίας ήταν η μελέτη της μεταβολικής ενεργότητας του μύκητα *Fusarium oxysporum* παρουσία αιθανόλης, καθώς και η βελτίωση της ανθεκτικότητας του στην αιθανόλη με την προσθήκη ουσιών.

Η μελέτη της ανάπτυξης του μύκητα έγινε με αρχικές συγκεντρώσεις αιθανόλης μεταξύ 0% και 6% w/v και ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε γλυκόζη συγκέντρωσης 2% w/v. Από τα πειράματα προέκυψε το πρωταρχικό συμπέρασμα της ισχυρής παρεμπόδισης της αιθανόλης κατά την ανάπτυξη σε αερόβιες συνθήκες του μύκητα *F.oxysporum* και στο ρυθμό ανάπτυξης. Επίσης, φάνηκε ότι συγκέντρωση αρχικής αιθανόλης 6% w/v προκαλεί μείωση στην παραγωγή τελικής βιομάζας κατά 90%.

Η μελέτη της παρεμπόδισης της ζύμωσης από την αιθανόλη πραγματοποιήθηκε με αρχικές συγκεντρώσεις αιθανόλης μεταξύ 0% και 6% w/v με υπόστρωμα γλυκόζη συγκέντρωσης 2% και 4% w/v. Παρατηρήθηκε ότι η παρεμπόδιση της αιθανόλης κατά τη ζύμωση είναι πιο έντονη από αυτήν της ανάπτυξης. Για υπόστρωμα γλυκόζη συγκέντρωσης 2% w/v, αρχική συγκέντρωση αιθανόλης 4% w/v προκαλεί μείωση της καθαρής παραγωγής αιθανόλης κατά 84%, ενώ για μεγαλύτερες αρχικές συγκεντρώσεις αιθανόλης, ο μεταβολισμός των κυττάρων του μύκητα πρακτικά σταματά.

Κατά τη μελέτη της βελτίωσης της ανθεκτικότητας των κυττάρων στην αιθανόλη, προέκυψαν τα συμπεράσματα ότι οι ουσίες ινοσιτόλη και εργοστερόλη καταφέρνουν να εισέλθουν στο μεταβολισμό των κυττάρων και να αυξήσουν τη βιωσιμότητα και την τελική παραγωγή βιομάζας των κυττάρων. Αντίθετα, η τρεχαλόζη δεν «προστατεύει» το μύκητα από τις επιδράσεις της αιθανόλης. Τέλος, καμία ουσία δεν αυξάνει την ανθεκτικότητα του μύκητα *F.oxysporum* κατά τη ζύμωση.

## **ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Βιοαιθανόλη

## 1.1 Εισαγωγή

Οι δύο μεγάλες προκλήσεις που αντιμετωπίζει σήμερα η ανθρωπότητα είναι η κλιματική αλλαγή και η ενεργειακή ασφάλεια.

Αφενός, όσον αφορά στην κλιματική αλλαγή, η συνεχής χρήση των φυσικών καυσίμων (πετρέλαιο, άνθρακας ή φυσικό αέριο) έτσι ώστε να καλυφθεί η παγκόσμια ζήτηση ενέργειας, έχει οδηγήσει σε αυξημένες συγκεντρώσεις του διοξειδίου του άνθρακα (CO<sub>2</sub>) στην ατμόσφαιρα και κατ' επέκταση στην παγκόσμια αύξηση της θερμοκρασίας [Yu et al., 2003; Demirbas et al., 2004]. Συγκεκριμένα, η καύση των συμβατικών καυσίμων είναι υπεύθυνη για το 73% της παραγωγής του CO<sub>2</sub>, που αποτελεί το σημαντικότερο αέριο του θερμοκηπίου (Α.Θ. ή GHG) [Wildenborg and Lokhorst, 2005]. Η επιτυχής αντιμετώπισή της κλιματικής αλλαγής απαιτεί πολιτικές που προωθούν την αειφόρο ανάπτυξη και εγγυώνται ένα βιώσιμο αύριο για τις επόμενες γενιές.

Αφετέρου, αναφορικά με την ενεργειακή ασφάλεια, η εξάντληση των αποθεμάτων των κλασικών παραγωγικών πηγών, καθώς και η εξάρτηση ολόκληρων χωρών από συγκεκριμένα μονοπώλια που εμπορεύονται πετρέλαιο ή φυσικό αέριο αποτελούν αιτίες εντάσεων ή ειρήνης. Γι αυτό και η ενεργειακή ισορροπία αποτελεί βασική παράμετρο ευημερίας και ανάπτυξης. Επομένως, η επίτευξη της ενεργειακής ασφάλειας επιβάλλει εφαρμογή ενεργειακής πολιτικής με αξιοποίηση του ενεργειακού πλούτου της κάθε χώρας, την προώθηση των ανανεώσιμων πηγών ενέργειας και την εξοικονόμηση ενέργειας σε όλες τις ιδιωτικές και δημόσιες δραστηριότητες.

Με γνώμονα την αντιμετώπιση των προκλήσεων αυτών, έχει παρουσιαστεί τις τελευταίες δεκαετίες τεράστιο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη μεθόδων που θα μετριάσουν την εξάρτηση των χωρών από τα συμβατικά καύσιμα και θα συμβάλλουν παράλληλα στη μείωση των αερίων του θερμοκηπίου [Lombardi, 2003]. Ένα μεγάλο μέρος της τρέχουσας προσπάθειας εστιάζεται στα ακόλουθα: (i) μείωση της κατανάλωσης ενέργειας, (ii) αύξηση της αποδοτικότητας της ενεργειακής μετατροπής ή αξιοποίησή της, (iii) χρήση καυσίμων με μικρότερη περιεκτικότητα σε άνθρακα, (iv) ενίσχυση των φυσικών δεξαμενών για το CO<sub>2</sub> και (v) συλλογή και αποθήκευση



του CO<sub>2</sub>. Η μείωση της χρήσης των φυσικών καυσίμων θα μείωνε αρκετά το ποσό του παραχθέντος CO<sub>2</sub>, καθώς επίσης και θα μείωνε τα επίπεδα των ρύπων [Demirbas, 2006]. Δεδομένου ότι η ανησυχία για την παγκόσμια θέρμανση αυξάνεται, σε συνδυασμό με τη συνεχή αύξηση των τιμών των συμβατικών καυσίμων (κυρίως του πετρελαίου και του φυσικού αερίου) αλλά και την εξάντληση των αποθεμάτων τους, η αναζήτηση των ανανεώσιμων και μη συμβατικών πηγών ενέργειας που συμβάλλουν καθοριστικά ώστε να απεξαρτηθούμε από τις κλασικές παραγωγικές πηγές, ενώ ταυτόχρονα παράσχει λύσεις για την προστασία του περιβάλλοντος υπόσχεται μία νέα και βιώσιμη οικονομικά πλατφόρμα [Oliveria et al., 2005].

## **1.2 Βιομάζα και Βιοκαύσιμα**

Η βιομάζα αποτελεί μια ανανεώσιμη μορφή ενέργειας, γνωστή στον άνθρωπο εδώ και πάρα πολλά χρόνια. Με τον όρο βιομάζα ονομάζουμε οποιοδήποτε υλικό προέρχεται από ζωντανούς οργανισμούς, ενώ ειδικότερα η βιομάζα για ενεργειακούς σκοπούς, περιλαμβάνει κάθε τύπο οργανικής ύλης που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή στερεών, υγρών και/ή αέριων βιοκαυσίμων. Η αξιοποίηση της βιομάζας για παραγωγή ενέργειας παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα καθώς είναι υλικό ανεξάντλητο και έχει μηδενικό ισοζύγιο διοξειδίου του άνθρακα, συνεπώς δεν συνεισφέρει στο φαινόμενο του θερμοκηπίου. Επιπλέον, οι τεχνολογίες παραγωγής ενέργειας από βιομάζα έχουν πολλαπλές θετικές επιδράσεις τόσο στο περιβάλλον όσο και κοινωνικο-οικονομικά οφέλη. Σήμερα, οι εφαρμογές της βιομάζας ως ανανεώσιμη πηγή ενέργειας βρίσκονται σε διάφορους τομείς της οικονομίας, με κυριότερο αυτόν της παραγωγής βιοκαυσίμων. Στις αναπτυγμένες χώρες υπάρχει μια αυξημένη τάση προς την υιοθέτηση των σύγχρονων τεχνολογιών και αποδοτικών μετατροπών βιοενέργειας, χρησιμοποιώντας μια σειρά βιοκαυσίμων, τα οποία γίνονται ανταγωνιστικά ως προς το κόστος με τα φυσικά καύσιμα [Puhan et al., 2005].

Τα βιοκαύσιμα αναφέρονται ως υγρά ή αέρια καύσιμα που έχουν παραχθεί από βιομάζα. Μια ποικιλία καυσίμων μπορεί να παραχθεί από τις πηγές βιομάζας συμπεριλαμβανομένων των υγρών καυσίμων, όπως η αιθανόλη, η μεθανόλη, το βιοντήζελ, και των αέριων καυσίμων, όπως το υδρογόνο και το μεθάνιο. Τα υγρά βιοκαύσιμα χρησιμοποιούνται κυρίως σαν καύσιμα κίνησης, αλλά μπορούν επίσης να τροφοδοτήσουν τις μηχανές ή τις κυψέλες καυσίμου για την παραγωγή ηλεκτρικής

ενέργειας. Υπάρχουν διάφοροι λόγοι που τα βιοκαύσιμα θεωρούνται ως σημαντικές τεχνολογίες και από τις αναπτυσσόμενες αλλά και από τις βιομηχανικές χώρες [Demirbas, 2007]. Τα πλεονεκτήματα των βιοκαυσίμων είναι τα ακόλουθα: (α) είναι εύκολα διαθέσιμα από τις κοινές πηγές βιομάζας, (β) δε διαταράσσουν τον κύκλο του διοξειδίου του άνθρακα (γ) είναι βιοδιασπώμενα και (δ) είναι φιλικά προς το περιβάλλον [Purpan, 2002].

### 1.3 Βιοαιθανόλη

Η βιοαιθανόλη ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ) είναι ένα υγρό βιοκαύσιμο υψηλής ενεργειακής περιεκτικότητας, καθαρότερο περιβαλλοντικά από τη βενζίνη και μπορεί να παραχθεί από διάφορα αποθεματικά υλικά βιομάζας και τεχνολογίες μετατροπής. Η βιοαιθανόλη είναι ένα ελκυστικό εναλλακτικό καύσιμο επειδή είναι ένας ανανεώσιμος πόρος και η χρήση του μειώνει την κατανάλωση ακατέργαστου πετρελαίου και κατ' επέκταση την περιβαλλοντική ρύπανση [Lang et al., 2001].

Η χρήση της βιοαιθανόλης ως καύσιμο έχει μια τόσο μακρά ιστορία όσο και το ίδιο το αυτοκίνητο. Ο πρώτος που αναφέρθηκε στη χρήση της αιθανόλης σαν καύσιμο ήταν ο ιδρυτής της συνώνυμης αυτοκινητοβιομηχανίας, Χένρι Φόρντ, το 1890. Τα μίγματα αιθανόλης καυσίμων είναι επιτυχώς χρησιμοποιήσιμα σε όλους τους τύπους οχημάτων και μηχανών που λειτουργούν με βενζίνη. Με τις κρίσεις του πετρελαίου της δεκαετίας του '70, η αιθανόλη καθιερώθηκε ως εναλλακτικό καύσιμο [Balat, 2005]. Το 1975, μόνο  $76 \cdot 10^3$  λίτρα βιομηχανικής αιθανόλης παρήχθησαν από ζύμωση συγκρινόμενη με  $7.95 \cdot 10^6$  λίτρα αιθανόλης από σύνθεση [Akpan et al., 2005]. Τη δεκαετία του '80, η χρήση της βιοαιθανόλης παγκοσμίως αυξήθηκε σημαντικά.

Η χρήση της βιοαιθανόλης ως βιοκαύσιμο παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα τόσο σε περιβαλλοντικό όσο και σε πολιτικο-οικονομικό επίπεδο. Καταρχάς, μπορεί να συμβάλλει στη μείωση της ρύπανσης του περιβάλλοντος ελαττώνοντας κυρίως τις εκπομπές διοξειδίου του άνθρακα. Επίσης, όπως και όλα τα βιοκαύσιμα, μειώνει την εξάρτηση από το πετρέλαιο, συμβάλλοντας έτσι στην ασφάλεια του ενεργειακού εφοδιασμού. Επιπλέον, σε σύγκριση με τη βενζίνη, η βιοαιθανόλη έχει έναν υψηλό αριθμό οκτανίου, ευρύτερα όρια ευφλεκτότητας, υψηλότερη ταχύτητα φλόγας και υψηλότερες θερμοότητες εξάτμισης. Αυτές οι ιδιότητες επιτρέπουν μια υψηλότερη αναλογία συμπίεσης και έναν πιο σύντομο χρόνο ανάφλεξης οι οποίες οδηγούν στα

θεωρητικά πλεονεκτήματα αποδοτικότητας σε μια εσωτερική μηχανή [Balat, 2007]. Τέλος, η αιθανόλη έχει μια υψηλή περιεκτικότητα σε οξυγόνο που υπονοεί μικρότερη ποσότητα απαραίτητης πρόσθετης ουσίας. Το αυξημένο ποσοστό του οξυγόνου επιτρέπει μια καλύτερη οξείδωση των υδρογονανθράκων της βενζίνης με την επακόλουθη μείωση των εκπομπών του μονοξειδίου του άνθρακα και των αρωματικών ενώσεων [Thomas and Kwong, 2001].

Στα μειονεκτήματα της βιοαιθανόλης περιλαμβάνονται η χαμηλότερη ενεργειακή πυκνότητα από αυτή της βενζίνης (η βιοαιθανόλη έχει 66% της ενέργειας από αυτή που έχει η βενζίνη), η δυνατότητα οξείδωσης, η χαμηλή φωτεινότητα φλόγας, η χαμηλότερη πίεση ατμού (που καθιστά τις κρύες ενάρξεις των μηχανών δυσκολότερες), η δυνατότητα ανάμιξης με το νερό, και η τοξικότητα στα οικοσυστήματα [MacLean and Lave , 2003]. Το σημαντικότερο όμως μειονέκτημα της βιοαιθανόλης είναι ότι για την παραγωγή της χρησιμοποιούνται γεωργικά προϊόντα που είτε έχουν υψηλό κόστος, είτε χρησιμοποιούνται ανταγωνιστικά για την παραγωγή τροφίμων.

#### **Πίνακας 1.** Χρήση βιοαιθανόλης ως καύσιμο

<b>Χώρα</b>	<b>Υλικό</b>	<b>Ποσοστό αιθανόλης στο μίγμα βενζίνης %v/v</b>
Βραζιλία	Ζαχαροκάλαμο	24
Ηνωμένες Πολιτείες	Καλαμπόκι	10
Καναδάς	Καλαμπόκι, σιτάρι, κριθάρι	7.5-10
Κολομβία	Ζαχαροκάλαμο	10
Ισπανία	Σιτάρι, Κριθάρι	-
Γαλλία	Ζαχαρότευτλο, σιτάρι, καλαμπόκι	-
Σουηδία	Σιτάρι	5
Κίνα	Σιτάρι, καλαμπόκι	
Ινδία	Ζαχαροκάλαμο	5
Ταϊλάνδη	Ζαχαροκάλαμο, ρύζι	10

**Πηγή:** Murray, 2005; Berg, 2004.

Η παραγωγή αιθανόλης έχει αυξηθεί μέσω της εφαρμογής ερευνητικών και βιομηχανικών προγραμμάτων σε πολλές χώρες τα τελευταία χρόνια (Πίνακας 1). Όλο

και σημαντικότερο ποσοστό της αγροτικής παραγωγής στρέφεται στα βιοκαύσιμα στα πλαίσια μιας προσπάθειας μείωσης των εισαγωγών πετρελαίου και μείωσης της ατμοσφαιρικής ρύπανσης. Περίπου το 9% της αιθανόλης παράγεται συνθετικά, και έτσι το υπόλοιπο 91% της παγκόσμιας παραγωγής της αιθανόλης βασίζεται στη ζύμωση [Wheeler et al., 1991]. Τέλος, να σημειωθεί ότι το 73% της παραχθείσας αιθανόλης παγκοσμίως αντιστοιχεί στην αιθανόλη καυσίμων, το 17% στην αιθανόλη ποτοποιίας και το 10% στη βιομηχανική αιθανόλη.

#### **1.4 Προοπτικές βιοαιθανόλης**

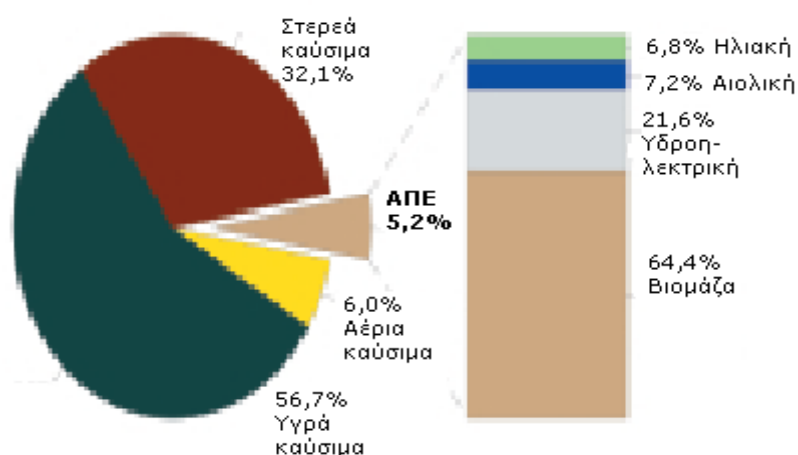
Σε πολλές χώρες, η αιθανόλη χρησιμοποιείται ως πρόσθετη ουσία στη βενζίνη. Συγκεκριμένα, η Βραζιλία και οι Ηνωμένες Πολιτείες έχουν επενδύσει σημαντικούς πόρους στη χρησιμοποίηση των μιγμάτων της αιθανόλης και της βενζίνης ως καύσιμο για τα μηχανοκίνητα οχήματα (με εσωτερική μηχανή). Η περιβαλλοντική επίδραση της χρησιμοποίησης των μιγμάτων αιθανόλης-βενζίνης εξαρτάται από το πραγματικό κλάσμα της αιθανόλης στο μίγμα. Ένα μίγμα καυσίμων με 10% αιθανόλη προσφέρει μείωση των εκπομπών των αερίων του θερμοκηπίου (GHG), βελτιώνοντας την απόδοση της ενέργειας, με το μειονέκτημα του αυξημένου κινδύνου και τη δριμύτητα μόλυνσης του εδάφους και των υπόγειων νερών. Η αύξηση του ποσοστού της αιθανόλης σε 85% μειώνει τις εκπομπές GHG, αλλά μπορεί να προκαλέσει σημαντική ατμοσφαιρική ρύπανση υπό τη μορφή NO<sub>x</sub> και οργανικών ενώσεων [Niven, 2005].

Μια άλλη πιθανή μελλοντική χρήση της βιοαιθανόλης για να παρέχει «πράσινα» καύσιμα μεταφορών είναι ο καταλυτικός ατμός που ανασχηματίζεται για την παραγωγή H<sub>2</sub>. Πολλοί θεωρούν το υδρογόνο μια μελλοντική πηγή ενέργειας, ειδικά για τον τομέα των μεταφορών και τις φορητές συσκευές [Jacobson et al., 2005]. Η μετατροπή της βιοαιθανόλης σε υδρογόνο είναι σημαντική για δύο κυρίως λόγους. Αρχικά, η άμεση καύση της αιθανόλης που χρησιμοποιείται για τη μεταφορά υπολογίζεται να έχει μια απόδοση σε ενέργεια περίπου 20%, ενώ χρησιμοποιώντας το υδρογόνο σε μία κυψέλη καυσίμου έχει μια απόδοση σε ενέργεια μέχρι και 60% [Larminie and Dicks, 2005]. Επομένως, ακόμα κι αν η μετατροπή της αιθανόλης σε υδρογόνο απαιτεί κάποια ενεργειακή εισαγωγή, μπορεί να ληφθεί περισσότερο από 50% της ενέργειας από τη φωτοσύνθεση από ότι ως ηλεκτρική ενέργεια από τον αυτοθερμικό ανασχηματισμό της αιθανόλης [Deluga et al., 2004]. Αφετέρου, το

ακριβότερο βήμα στη χρησιμοποίηση της βιοαιθανόλης άμεσα ως καύσιμο είναι η αφαίρεση του νερού. Αντιθέτως, για τη μετατροπή της βιοαιθανόλης σε υδρογόνο, δεν είναι απαραίτητο να αφαιρεθεί το νερό, καθιστώντας έτσι τη διαδικασία φθηνότερη. Η αιθανόλη μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί άμεσα σε μία κυψέλη καυσίμου. Εντούτοις, η αποδοτικότητα της τρέχουσας άμεσης κυψέλης καυσίμου αιθανόλης είναι αρκετά ανεπαρκής [Lamy et al., 2001]

### 1.5 Βιοαιθανόλη και περιβάλλον

Το πρωτόκολλο του Κιότο που συντάχθηκε το 1997, σε συμφωνία με την σύμβαση για το περιβάλλον που επικυρώθηκε το 1992 στο Ρίο ντε Τζανέιρο (United Nations Framework Convention on Climate), θέτει σαν στόχους την προώθηση της χρήσης ανανεώσιμων πηγών ενέργειας παγκοσμίως και τη μείωση της εκπομπής των αερίων που συμβάλλουν στο φαινόμενο του θερμοκηπίου, ειδικά του CO<sub>2</sub>, από τις ανεπτυγμένες χώρες [Ρήγας 2003]. Μάλιστα, η Ευρωπαϊκή Ένωση, το 2003 όρισε ότι τα κράτη μέλη πρέπει να έχουν εξασφαλίσει ένα ελάχιστο ποσοστό βιοκαυσίμων και άλλων ανανεώσιμων καυσίμων στην αγορά τους: 2% μέχρι 31 Δεκεμβρίου 2005 και 5.75% μέχρι 31 Δεκεμβρίου 2010 [Murphy and McCarthy 2005]. Η αύξηση της διείσδυσης της βιοαιθανόλης στο ενεργειακό ισοζύγιο εις βάρος άλλων ρυπογόνων καυσίμων συμβάλλει στη μείωση των εκπομπών των αερίων που προκαλούν το φαινόμενο του θερμοκηπίου.



**Εικόνα 1.** Συμμετοχή των ανανεώσιμων πηγών ενέργειας στο ενεργειακό ισοζύγιο της Ελλάδας (πρωτογενής διάθεση έτους 2000). Πηγή: ΚΑΠΕ

Η ατελής καύση των ορυκτών καυσίμων έχει σαν αποτέλεσμα την εκπομπή αερίων που συνεισφέρουν στον σχηματισμό αιθαλομίχλης. Επιπλέον, η εξαγωγή, η επεξεργασία και η καύση των ορυκτών καυσίμων έχει σαν αποτέλεσμα τη μόλυνση του αέρα, του νερού και του εδάφους, γεγονός που τα καθιστά επικίνδυνα για το περιβάλλον και τη δημόσια υγεία [Zaldivar et al.2001]. Αντιθέτως, η αιθανόλη είναι λιγότερη πτητική και έχει χαμηλή φωτοχημική αντιδραστικότητα με την ατμόσφαιρα, και έτσι ο σχηματισμός αιθαλομίχλης μπορεί να είναι μικρότερος. Η αιθανόλη έχει πολύ μικρή τοξικότητα, συγκριτικά με άλλα καύσιμα, και είναι εύκολα βιοδιασπώμενη στο νερό και στο έδαφος, ελαττώνοντας τις καταστρεπτικές συνέπειες τυχόν διαρροών συγκριτικά με τα ορυκτά καύσιμα [Gnansounou et al. 2005].

Με τη χρήση της βιοαιθανόλης επιτυγχάνεται μείωση των εκπομπών διοξειδίου του άνθρακα κατά 60-90% σε σχέση με τη βενζίνη. Επιπλέον, το CO<sub>2</sub> που απελευθερώνεται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και της καύσης, ανακυκλώνεται από τα φυτά μέσω της φωτοσύνθεσης [Zaldivar et al.2001]. Η μηδαμινή ύπαρξη του θείου στα βιοκαύσιμα συμβάλλει σημαντικά στον περιορισμό των εκπομπών του διοξειδίου του θείου που είναι υπεύθυνο για την όξινη βροχή [Roehrer 2001].

Τα μειονεκτήματα της αιθανόλης ως καύσιμο είναι η αύξηση της εκπομπής αλδεύδων, ιδιαίτερα της ακεταλδεύδης, που είναι 2-4 φορές χαμηλότερη στις εκπομπές της βενζίνης [Zaldivar et al.2001], καθώς και η αύξηση κατά 10% στην εκπομπή οξειδίων του αζώτου. Ωστόσο, η χρήση καταλύτη ή κάποια μικρή τροποποίηση μπορεί να περιορίσει αυτές τις εκπομπές [Roehrer 2001].

## **1.6 Η παρούσα κατάσταση στην παραγωγή βιοαιθανόλης**

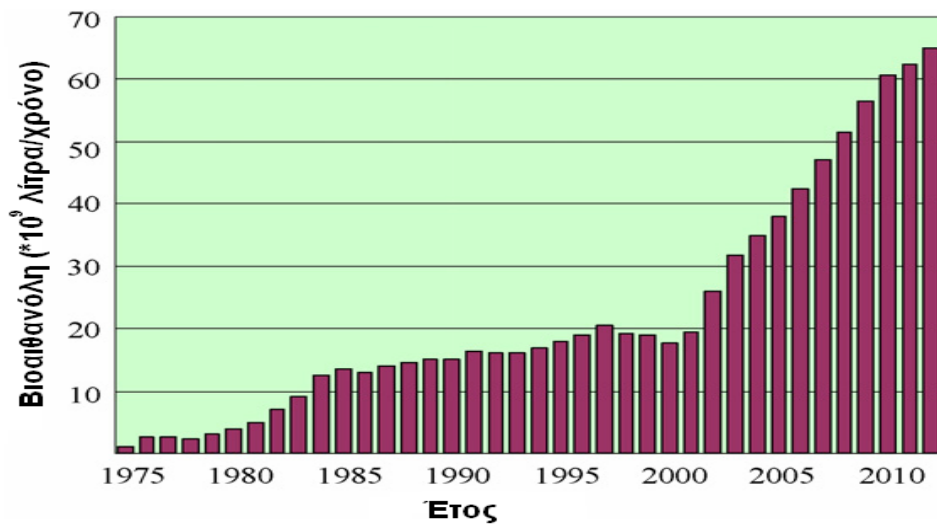
Το 2006, η παγκόσμια παραγωγή της βιοαιθανόλης έφθασε τα 13.5 δισεκατομμύρια γαλόνια, πάνω από τα 12.1 δισεκατομμύρια γαλόνια του 2005 [Renewable Fuels Association (RFA), 2007]. Η βιοαιθανόλη αποτελεί αυτήν την περίοδο περισσότερο από το 94% της παγκόσμιας παραγωγής βιοκαυσίμων, με περίπου το 60% της παγκόσμιας παραγωγής βιοαιθανόλης να προέρχεται από το ζαχαροκάλαμο και το 40% από άλλες συγκομιδές [Dufey, 2006].

Προβλέπεται ότι η παραγόμενη βιοαιθανόλη θα μπορέσει να αντικαταστήσει το 32% της παγκόσμιας κατανάλωσης βενζίνης (353 δισεκατομμύρια λίτρα) όταν χρησιμοποιείται σαν πρόσθετο στο καύσιμο E85 (85% βιοαιθανόλη). Επιπλέον, η

βιοαιθανόλη που παράγεται από τα λιγνινοκυτταρινούχα υπολείμματα, μπορεί ενδεχομένως να παραγάγει 458 TWh της ηλεκτρικής ενέργειας (περίπου 3.6% της παγκόσμιας ηλεκτρικής παραγωγής) και 2.6 EJ ( $10^{18}$  J) του ατμού [Kim and Dale, 2004].

Στις Ηνωμένες Πολιτείες, το 90% της βιοαιθανόλης προέρχεται από το καλαμπόκι [Oliveria et al., 2005]. Σήμερα, περίπου το 2% των συνολικών καυσίμων μεταφοράς καλύπτονται από τη βιοαιθανόλη στις Ηνωμένες Πολιτείες. Το αμερικανικό Τμήμα Ενέργειας έχει θέσει έναν στόχο αντικατάστασης του 30% των καυσίμων μεταφοράς με τη βιοαιθανόλη και το βιοντήζελ από το 2025 [Ragauskas et al., 2006]. Η βιοαιθανόλη της Βραζιλίας παράγεται από το ζαχαροκάλαμο, όπου το περισσότερο χρησιμοποιείται εσωτερικά αντικαθιστώντας το 40% της κατανάλωσης βενζίνης και περίπου το 20% εξάγεται στις Ηνωμένες Πολιτείες, στην ΕΕ και σε άλλες αγορές [Greenergy International Limited, 2007]. Η Βραζιλία και οι Ηνωμένες Πολιτείες γενικά μπορούν να θεωρηθούν ως οι παγκόσμιοι ηγέτες, αφού αποτελούν μαζί περίπου το 70% της παγκόσμιας παραγωγής βιοαιθανόλης.

Η πιθανή απαίτηση για τη βιοαιθανόλη ως καύσιμο για τη μεταφορά στις χώρες της ΕΕ, μελετήθηκε βάσει της οδηγίας 2003/30/EC, και υπολογίστηκε σε περίπου 6 δισεκατομμύρια λίτρα το 2006 και 12.7 δισεκατομμύρια λίτρα το 2010 [Zarzycki and Polska, 2007]. Στην Ευρώπη, το υλικό τροφοδοσίας που χρησιμοποιείται για τη βιοαιθανόλη είναι κυρίως σίτος, σακχαρότευτλο και απόβλητα από τη βιομηχανία κρασιού [Larsson, 2006]. Η έκταση που χρησιμοποιούταν για την καλλιέργεια τεύτλων στην Ευρώπη για την παραγωγή ζάχαρης ήταν περίπου 2.55 εκατομμύρια εκτάρια το 1999 και 2.14 εκατομμύρια εκτάρια (15% λιγότερο) το 2005. Ως αποτέλεσμα της πρόσφατης μεταρρύθμισης του καθεστώτος αγοράς ζάχαρης της ΕΕ, η περιοχή θα μειώσει τη χρησιμοποιούμενη έκταση σε 1.30 εκατομμύρια εκτάρια το 2015 [Zarzycki and Polska, 2007].



**Εικόνα 2.** Παγκόσμια παραγωγή βιοαιθανόλης. Πηγή: Boukis et al., 2008.

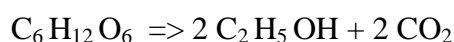


## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Παραγωγή βιοαιθανόλης

### 2.1 Βιομετατροπή σακχαρούχων και αμυλούχων υποστρωμάτων

Η βασικότερη μέθοδος παραγωγής αιθανόλης είναι η μικροβιακή ζύμωση διαλύματος σακχάρων σε αιθανόλη και αποτελεί το 93% της παγκόσμιας παραγωγής, με τη χημική σύνθεση από προϊόντα πετρελαίου να ακολουθεί (7%), ενώ η θερμοχημική διεργασία προς παραγωγή αιθανόλης δεν χρησιμοποιείται βιομηχανικώς. Ως πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοαιθανόλης μπορούν να χρησιμοποιηθούν σακχαρούχα, κυτταρινούχα και αμυλούχα φυτά (σιτάρι, καλαμπόκι, σόργο, τεύτλα και άλλα). Ο κύριος τρόπος παραγωγής της είναι η ζύμωση των αμυλούχων – σακχαρούχων συστατικών για την παραγωγή αιθανόλης κι ο διαχωρισμός της από τα υπόλοιπα συστατικά με απόσταξη. Οι ζύμες είναι οι ασφαλέστεροι και οι πιο αποτελεσματικοί μικροοργανισμοί για τη ζύμωση γλυκόζης, καθώς και άλλων εξοζών, και για αυτό το λόγο επιλέγονται για τη βιομηχανική παραγωγή αιθανόλης [Aristidou and Penttilä 2000]. Διάφορα είδη ζυμών όπως οι *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces uvarum* (*carlsbergensis*), *Schizosaccharomyces pombe*, τα είδη *Kluyveromyces*, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ανάλογα με τη σύσταση της πρώτης ύλης. Η βέλτιστη μετατροπή των σακχάρων απαιτεί ένα στέλεχος ζύμης με μεγάλη αντοχή στην αιθανόλη, αφού η τελευταία παρεμποδίζει την μικροβιακή ανάπτυξη και κατ' επέκταση τη ζύμωση [Roehrer 2001].

Οι ζύμες, όπως και οι μύκητες, μετατρέπουν τις εξόζες σε αιθανόλη και σε διοξείδιο του άνθρακα μέσα από το μονοπάτι της γλυκόλυσης (μονοπάτι EMP), όπως παρουσιάζεται στην επόμενη αντίδραση [Singh and Kumar 1991]:

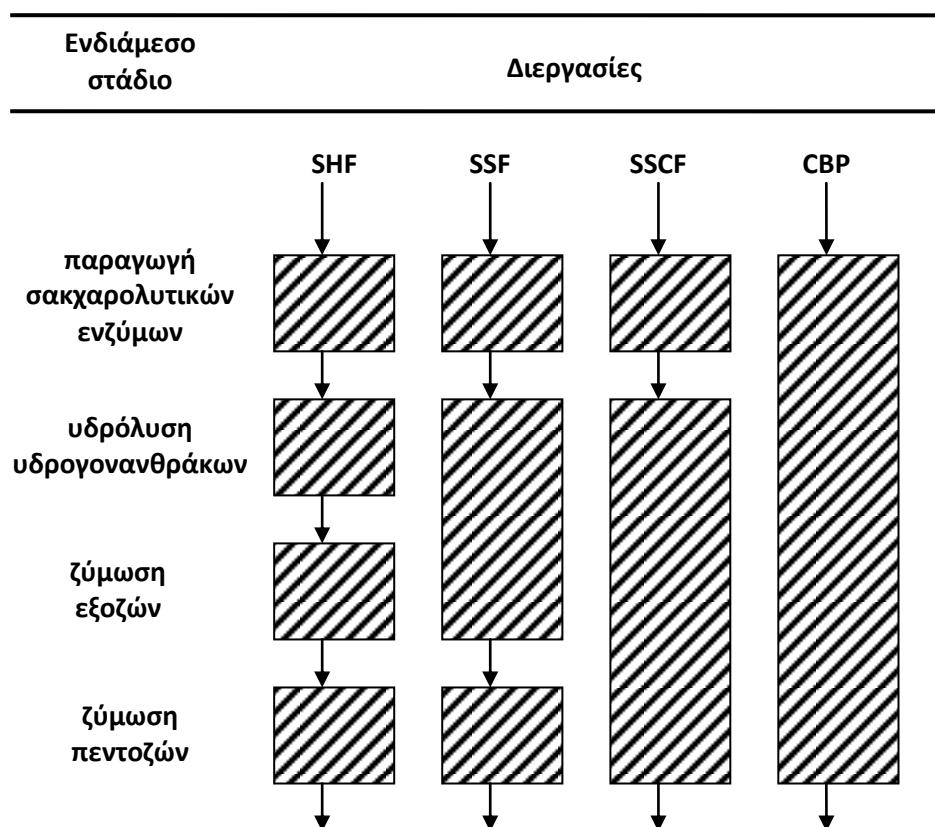


Με υπόστρωμα τη γλυκόζη, η θεωρητική απόδοση αιθανόλης είναι 0.51 g/g και η απόδοση ανάπτυξης 0.12 g/g. Συνήθως κατά τη ζύμωση παράγονται και υποπροϊόντα, όπως γλυκερίνη, ηλεκτρικό οξύ και οξικό οξύ, με αποτέλεσμα η πραγματική απόδοση να ανέρχεται στο 90%-95% της θεωρητικής. Οι βέλτιστες τιμές θερμοκρασίας και pH για τη ζύμη είναι 30°-35°C και 4-6, αντίστοιχα [Roehrer 2001, Shuler and Kargi 2005]. Η παραγωγή αιθανόλης πραγματοποιείται υπό αναερόβιες συνθήκες, ωστόσο πολύ μικρές συγκεντρώσεις οξυγόνου (0.05-0.10 mm Hg) (μικροαερόβιες συνθήκες)

πρέπει να παρέχονται στο διάλυμα για την βιοσύνθεση πολυακόρεστων λιπιδίων και τη διατήρηση κυτταρικών διεργασιών. Μεγαλύτερες συγκεντρώσεις οξυγόνου έχουν σαν αποτέλεσμα την αύξηση της κυτταρικής βιομάζας σε βάρος της παραγωγής αιθανόλης.

## 2.2 Τεχνολογίες παραγωγής αιθανόλης

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει έντονη ερευνητική δραστηριότητα για την παραγωγή βιοαιθανόλης από λιγνοκυτταρινούχες πρώτες ύλες. Η διεργασία βιομετατροπής της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας σε αιθανόλη περιλαμβάνει τέσσερα διαφορετικά στάδια: την παραγωγή σακχαρολυτικών ενζύμων (κυτταρινάσες και ημικυτταρινάσες), την υδρόλυση των υδρογονανθράκων που περιέχονται στη βιομάζα σε απλούστερα σάκχαρα, τη ζύμωση των εξοζών (γλυκόζη, μαννόζη και γαλακτόζη) και τη ζύμωση των πεντοζών (ξυλόζη και αραβινόζη) [Lynd et al 2002]. Ανάλογα με το βαθμό που αυτά τα στάδια αλληλοσυνδέονται, διακρίνονται οι παρακάτω τεχνολογίες παραγωγής αιθανόλης:



Εικόνα 3. Τεχνολογίες παραγωγής αιθανόλης [Lynd et al. 2002]

Παρακάτω θα αναλυθούν οι σημαντικότερες εξ' αυτών:

- **Ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση** (Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF) **και ταυτόχρονη σακχαροποίηση και συμμεταβολισμός** (Simultaneous Saccharification and Cofermentation, SSCF)

Η ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση συγχωνεύει την υδρόλυση της κυτταρίνης και τη ζύμωση των εξοζών σε ένα στάδιο, ενώ η παραγωγή σακχαρολυτικών ενζύμων και η ζύμωση των πεντοζών που προκύπτουν από την υδρόλυση της ημικυτταρίνης πραγματοποιούνται σε δύο επιπρόσθετα ξεχωριστά στάδια. Με τη ταυτόχρονη σακχαροποίηση και τον συμμεταβολισμό, πραγματοποιείται η παραγωγή σακχαρολυτικών ενζύμων, και σε ένα δεύτερο στάδιο διεξάγεται η υδρόλυση της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης και η ζύμωση των προϊόντων τους για την παραγωγή αιθανόλης [Lynd et al. 2002].

Συγκριτικά με την ξεχωριστή υδρόλυση και ζύμωση (SHF), η οποία περιλαμβάνει τέσσερα ξεχωριστά στάδια και τέσσερις διαφορετικούς βιοκαταλύτες, η ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση έχει τα ακόλουθα πλεονεκτήματα: (1) αύξηση του ρυθμού υδρόλυσης, λόγω μετατροπής των σακχάρων που παρεμποδίζουν την δράση των κυτταρινάσων (2) μικρότερες απαιτήσεις σε ένζυμα (3) μεγαλύτερη παραγωγή προϊόντος (4) μείωση της χρονικής διάρκειας της διεργασίας (5) μικρότερος κίνδυνος μόλυνσης του μέσου καλλιέργειας από ανεπιθύμητους μικροοργανισμούς λόγω της παρουσίας της αιθανόλης (6) μείωση στο κόστος επένδυσης λόγω χρήσης μικρότερου αριθμού αντιδραστήρων [Zaldivar et al.2001, Sun and Cheng 2002, Szczodrak and Fiedurek 1995, Ballesteros et al.2004]. Ωστόσο, είναι απαραίτητος ένας συμβιβασμός όσον αφορά τη θερμοκρασία που θα διεξαχθεί η σακχαροποίηση και η ζύμωση της κυτταρίνης [Ballesteros et al. 2004].

- **Άμεση μικροβιακή μετατροπή** (Direct Microbial Conversion, DMC ή Consolidated Bioprocessing, CBP)

Με τη μέθοδο αυτή, όλα τα απαραίτητα στάδια βιομετατροπής του κυτταρινούχου υλικού σε αιθανόλη, δηλαδή η παραγωγή των σακχαρολυτικών ενζύμων (κυτταρινάσες, ημικυτταρινάσες), η υδρόλυση του υποστρώματος σε απλούστερα

σάκχαρα (πεντόζες και εξόζες) και η ζύμωση αυτών των σακχάρων σε αιθανόλη, πραγματοποιούνται σε ένα μόνο στάδιο.

Η βασική διαφορά της άμεσης μικροβιακής μετατροπής από τις προηγούμενες μεθόδους είναι η απουσία ξεχωριστού σταδίου για την παραγωγή σακχαρολυτικών ενζύμων, γεγονός που έχει σαν αποτέλεσμα την απαλοιφή του κόστους που σχετίζεται με αυτό το στάδιο. Σε αντίθεση με τις άλλες μεθόδους, ολόκληρη η ποσότητα της πρώτης ύλης είναι διαθέσιμη για την παραγωγή υδρολυτικών ενζύμων. Υπάρχει ακόμα η δυνατότητα χρήσης κυτταρινασών με μεγάλη ειδική ενεργότητα και είναι εφικτή η συνέργια ενζύμου-μικροοργανισμού. Το αποτέλεσμα είναι η αύξηση του ρυθμού υδρόλυσης και η περαιτέρω μείωση του κόστους επένδυσης λόγω μείωσης του όγκου του αντιδραστήρα. Επιπλέον, με τη μέθοδο αυτή μπορεί να επιτευχθεί μεγαλύτερη παραγωγή του επιθυμητού προϊόντος, καθώς και βελτίωση της σταθερότητας των καλλιεργειών και των στελεχών που χρησιμοποιούνται [Lynd et al. 2002, Lynd et al.2005]

Η χρήση του μύκητα *Fusarium oxysporum* στην άμεση μικροβιακή μετατροπή παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, αφενός λόγω της ικανότητας του μύκητα να παράγει το απαραίτητο σύστημα ενζύμων για την υδρόλυση λιγνοκυτταρινούχων υποστρωμάτων και αφετέρου λόγω της ικανότητας του να ζυμώνει κατευθείαν το υπόστρωμα σε αιθανόλη.

### **2.3 Ο μύκητας *Fusarium oxysporum***

Η βιομετατροπή των κυτταρινούχων υλικών σε αιθανόλη με τις συμβατικές μεθόδους περιλαμβάνει αρχικά την ενζυμική υδρόλυση των υδρογονανθράκων σε απλούστερα σάκχαρα και στη συνέχεια, τη ζύμωση αυτών των σακχάρων σε αιθανόλη. Μια εναλλακτική προσέγγιση είναι η άμεση μικροβιακή μετατροπή, στην οποία ένας ή περισσότεροι μικροοργανισμοί πραγματοποιούν ταυτόχρονη παραγωγή σακχαρολυτικών ενζύμων, υδρόλυση και ζύμωση στον ίδιο βιοαντιδραστήρα. Μερικά μικροβιακά είδη όπως ο *Neurospora crassa* και ο *Fusarium oxysporum* έχουν την ικανότητα να ζυμώνουν την κυτταρίνη απευθείας σε αιθανόλη [Christakopoulos et al.1989].

Η ταξινόμηση των μυκήτων που ανήκουν στο γένος *Fusarium* είναι η εξής: Eukaryota (Υπερβασίλειο), Fungi (Βασίλειο), Ascomycota (Φύλο), Pezizomycotina

(Υποφύλο), Sordariomycetes (Κλάση), Hypocreomycetidae (Υποκλάση), Hypocreales (Τάξη), Fusarium (Γένος), *Fusarium oxysporum* (Είδος) [NCBI].



**Εικόνα 4:** Ο μύκητας *Fusarium oxysporum*

Το στέλεχος *Fusarium oxysporum* F3, που έχει απομονωθεί από το κύμινο, παράγει ένα ευρύ φάσμα κυτταρινασών και ημικυτταρινασών σε βυθισμένη ζύμωση, χρησιμοποιώντας σαν πηγή άνθρακα διάφορα λιγνοκυτταρινούχα υλικά. Το στέλεχος αυτό έχει την εξαιρετική ιδιότητα να μετατρέπει κατευθείαν την κυτταρίνη και τη ξυλάνη σε αιθανόλη. Συνεπώς, αν χρησιμοποιηθεί ο *F. oxysporum* για την παραγωγή αιθανόλης από βιομάζα, δεν είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί ξεχωριστή ενζυμική υδρόλυση της λιγνοκυτταρινούχου πρώτης ύλης, αφού ο μύκητας αυτός μπορεί να παράγει όλα τα αναγκαία ένζυμα [Panagiotou et al. 2005δ, Panagiotou et al. 2005γ, Panagiotou et al.2003].

Διάφοροι φυσικοί παράγοντες όπως το pH, η θερμοκρασία και οι συνθήκες αερισμού επηρεάζουν σημαντικά την παραγωγή αιθανόλης από τον *Fusarium oxysporum*. Η μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης έχει πραγματοποιηθεί σε τιμές pH 5.5 και 6, για αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες καλλιέργειας αντίστοιχα. Το pH για την αναερόβια καλλιέργεια, είναι επίσης βέλτιστο για την ενεργότητα της β-γλυκοζιδάσης, που έχει βρεθεί ότι είναι το ένζυμο κλειδί για την άμεση μετατροπή της κυτταρίνης από το *F.oxysporum* F3 (αναστέλλει την παρεμπόδιση από την κελλοβιόζη). Η επίδραση της θερμοκρασίας στην παραγωγή αιθανόλης εξαρτάται από το στέλεχος που χρησιμοποιείται. Συγκεκριμένα, για το στέλεχος F3, έχει βρεθεί ότι η βέλτιστη θερμοκρασία για την παραγωγή ενζύμων είναι 30°C και για την παραγωγή αιθανόλης με υπόστρωμα κυτταρίνη υπό αναερόβιες συνθήκες είναι 34°C. Οι συνθήκες αερισμού παίζουν επίσης πολύ σημαντικό ρόλο. Επειδή οι μύκητες δεν αναπτύσσονται υπό αναερόβιες συνθήκες και η αιθανόλη δεν παράγεται υπό αερόβιες

συνθήκες, συνήθως αναπτύσσεται πρώτα ο μικροοργανισμός αερόβια και στη συνέχεια, τα μυκήλια τοποθετούνται σε ημιαναερόβιες συνθήκες για την παραγωγή αιθανόλης [Singh and Kumar 1991, Christakopoulos et al.1989].

Μειονεκτήματα της χρήσης του μύκητα *F.oxysporum* στην παραγωγή αιθανόλης είναι ο χαμηλός ρυθμός μετατροπής της κυτταρίνης, καθώς και ο σχηματισμός σημαντικών ποσοτήτων οξικού οξέος σαν παραπροϊόν [Panagiotou et al. 2005, Panagiotou and Christakopoulos 2004].

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Επιδράσεις των αλκοολών και της βιοαιθανόλης στους ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς**

Η βέλτιστη μετατροπή των σακχάρων προς παραγωγή βιοαιθανόλης απαιτεί στελέχη με μεγάλη αντοχή, αφού η τελευταία παρεμποδίζει τη μικροβιακή ανάπτυξη και κατ' επέκταση τη ζύμωση (Roacher 2001). Η επίδραση των αλκοολών στους αιθανολοπαραγωγούς μικροοργανισμούς και οι μηχανισμοί παρεμπόδισής της αποτελούν θέμα ερευνών εδώ και δεκαετίες. Οι βασικές επιδράσεις των αλκοολών τόσο σε ευκαρυωτικούς όσο και σε προκαρυωτικούς μικροοργανισμούς διέπονται από τις ίδιες γενικές αρχές και οφείλονται κυρίως στις φυσικοχημικές ιδιότητες των αλκοολών (Ingram et al. 1984). Πιο συγκεκριμένα, έχειδειχθεί ότι οι περισσότερες των βιολογικών επιπτώσεων των αλκοολών στα κύτταρα συνδέονται άμεσα με την υδροφοβικότητα των ουσιών αυτών. Επίσης, βασικό ρόλο παίζουν και οι χημικές ιδιότητες της εκάστοτε αλκοόλης, δηλαδή ο αριθμός των ατόμων άνθρακα και η πολικότητά της. Μερικά από τα σημαντικότερα σημεία παρεμπόδισής των αλκοολών και συγκεκριμένα της αιθανόλης στα κύτταρα είναι οι κυτταρικές μεμβράνες, τα συστήματα μεταφορών και η λιπιδική σύσταση των μεμβρανών, τα οποία αναλύονται λεπτομερώς παρακάτω, καθώς και η διαμόρφωση των ενζύμων και των μακρομορίων, η τιμή του ενδοκυτταρικού pH και άλλα.

### **3.1 Ανάπτυξη και Μορφολογία Κυττάρων**

Μία από τις σημαντικότερες επιδράσεις της βιοαιθανόλης στους μικροοργανισμούς είναι η παρεμπόδιση της κυτταρικής τους ανάπτυξης. Έχει αποδειχθεί ότι σχετικά μικρές συγκεντρώσεις της εμποδίζουν την κυτταρική διαίρεση, μειώνουν τον κυτταρικό όγκο καθώς και το ρυθμό ανάπτυξης. Αντίθετα, σε μεγάλες συγκεντρώσεις η αιθανόλη είναι υπεύθυνη για την αύξηση των κυτταρικών θανάτων και τη μείωση του πληθυσμού των κυττάρων (Birch and Walker 2000). Ερευνητές επίσης διαπίστωσαν βλάβη του μιτοχονδριακού DNA των ζυμών και των μυκήτων (Augustin et al. 1965, Nagodawithana et al. 1976, Leao et al. 1982, Ingram et al. 1984).

Επιπλέον, έχει δειχτεί ότι αυξημένες συγκεντρώσεις αιθανόλης εμποδίζουν το σχηματισμό των ινών μυκηλίων (Turian et al 1972) στο μικροοργανισμό *N.crassa*.

Η αιθανόλη επιδρά ακόμα στη μορφολογία του κενοτόπιου, ενός σημαντικού κυτταρικού οργάνου, και το μεταβάλλει από ένα κυστίδιο με καθαρά διαχωρισμένες δομές σε ένα μεγάλο και ενιαίο οργανίδιο, εμποδίζοντας έτσι τις φυσιολογικές λειτουργίες του (Meaden et al.1999).

Μεταξύ των ευκαρυωτικών μικροοργανισμών, ο ζυμομύκητας *S.cerevisiae* φαίνεται ότι παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στην αιθανόλη, και μπορεί να αναπτύσσεται ακόμα και σε συγκεντρώσεις αιθανόλης 70 – 110 g/L. Όμως, η διαπίστωση ότι όλα τα στελέχη της ζύμης δεν είναι το ίδιο ανθεκτικά μεταξύ τους, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η ανθεκτικότητα καθορίζεται εν μέρει από το γονιδίωμα του κάθε στελέχους (Gray 1941). Μερικά από τα πιο ανθεκτικά στελέχη του *S.cerevisiae* μελετήθηκαν και απομονώθηκαν (Williamson et al. 1980) και αποδείχτηκε ότι παρουσιάζουν ιδιαίτερες άμυνες στις αφυδρογονάσεις των αλκοολών, αποτρέποντας έτσι την αναγωγή της αλλυλικής αλκοόλης στην τοξική ουσία ακεταλδεΐδη. Ερευνητές (Wikie , Maroudas 1969) απέδωσαν την ελάττωση της κυτταρικής αναπνοής και της κυτταρικής ανάπτυξης που παρατήρησαν στη ζύμη *S.cerevisiae* παρουσία αιθανόλης, εν μέρει σε αύξηση μικρών μεταλλάξεων και εν μέρει σε άμεση παρεμπόδιση της αναπνοής λόγω της αύξησης της διαπερατότητας των μιτοχονδρίων.

Τέλος, έχει αποδειχθεί ότι 201 (Alexandre et al. 2001) και 274 (Chandler et al. 2004) γονίδια αντίστοιχα είχαν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης κατά τη διάρκεια της έκθεσης τους σε αιθανόλη. Αυτά τα γονίδια αποδείχθηκε ότι σχετίζονταν με τη σύνθεση πρωτεϊνών, το σχηματισμό και τις λειτουργίες του RNA, το μεταβολισμό των αμινοξέων και των νουκλεοτιδίων.

### **3.2 Συστήματα μεταφοράς**

Μία ακόμα σημαντική επίδραση των αλκοολών είναι η παρεμπόδιση των συστημάτων μεταφοράς των ευκαρυωτικών μικροοργανισμών. Τα τελευταία και η σύνδεσή τους με την πρόσληψη γλυκόζης και αμινοξέων μελετήθηκαν εκτενώς και αποδείχτηκε ότι οι συγκεντρώσεις αιθανόλης οι οποίες παρεμπόδιζαν την ανάπτυξη



και τη παραγωγή βιομάζας, μειώναν επίσης την πρόσληψη γλυκόζης κατά 45% καθώς και αμινοξέων κατά 75-95% (Lester 1965). Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι οι αλκοόλες παρεμποδίζουν την πρόσληψη αδενίνης και ασπαρτικού οξέος στη ζύμη *S.cerevisiae* (Yamashiro 1971).

Μεταγενέστερες μελέτες με θέμα τη μεταφορά της γλυκόζης παρουσία αιθανόλης και άλλων αλκοολών έδειξαν ότι ο ρυθμός πρόσληψης του υποστρώματος ( $V_{max}$ ) μειωνόταν με αύξηση της συγκέντρωσης της περιεχόμενης αλκοόλης. Επιπλέον, αποδείχτηκε ότι υπάρχει σχέση μεταξύ της παρεμπόδισης που παρουσιάζεται και της υδροφοβικότητάς της αλκοόλης καθώς και του μεγέθους του μορίου της (Leao and Uden 1982). Το συμπέρασμα που προέκυψε είναι ότι η αιθανόλη και άλλες αλκοόλες παρεμποδίζουν την πρόσληψη γλυκόζης μεταβάλλοντας το λιπιδικό περιβάλλον της πλασματικής μεμβράνης. Το μέγεθος της παρεμπόδισης εξαρτάται από την υδροφοβικότητα αλλά και τον όγκο του εκάστοτε μορίου. Σε ίδια αποτελέσματα κατέληξαν κι άλλοι ερευνητές που μελέτησαν την πρόσληψη διαφορετικής πηγής άνθρακα, της μαλτόζης (Loueiro-Dias και Peinado, 1982).

### **3.3 Διαπερατότητα και δομή μεμβράνης**

Μια πληθώρα φυσικών μεθόδων έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη των επιδράσεων της αιθανόλης και άλλων αλκοολών στη δομή των κυτταρικών μεμβρανών. Όλες οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί καταλήγουν στο ίδιο συμπέρασμα, δηλαδή στο ότι προσθήκη παραπλήσιων συγκεντρώσεων αλκοολών του μεγέθους  $C_{1-9}$  αυξάνει την ελευθερία κινήσεων διαμέσου της μεμβράνης, δηλαδή τη διαπερατότητα της και επίσης αυξάνει την αταξία στη δομή της (Mishra and Prasad 1989). Αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο πολλοί ερευνητές έχουν διατυπώσει την άποψη ότι η μεμβράνη αποτελεί το σημαντικότερο τομέα επίδρασης των αλκοολών στα κύτταρα.

Έχει αποδειχθεί ότι προσθήκη αιθανόλης και άλλων αλκοολών αυξάνουν τη διαπερατότητα της μεμβράνης σε ιόντα και μικρού μεγέθους μεταβολίτες, όπως αμινοξέα και άλλες ουσίες. Πιο συγκεκριμένα, συγκεντρώσεις αιθανόλης που εμπόδιζαν την κυτταρική ανάπτυξη του μικροοργανισμού *S.cerevisiae*, αποδείχτηκε ότι προκαλούσαν εκροή ενζύμων, όπως πρωτεασών ενώ άλλες μελέτες έδειξαν ότι

παρουσία αιθανόλης παρατηρείται έντονη εκροή μικρού μεγέθους ιόντων, όπως το κάλιο αλλά και πρωτονίων. Έχειδειχτεί επίσης ότι όσο αυξάνεται η υδροφοβικότητα καθώς και το μέγεθος της ανθρακικής αλυσίδας της αλκοόλης, τόσο αυξάνονται και οι αρνητικές επιδράσεις της (Thomas et al. 1992).

Η καταστροφή της δομής της μεμβράνης στις ζύμες και τους μύκητες που οδηγεί στην αύξηση της διαπερατότητας της έχει σημαντικές συνέπειες για τα κύτταρα. Σύμφωνα με έρευνες (Eddy, 1982) συνδέεται με την πρόσληψη θρεπτικών συστατικών και συνεπώς επηρεάζει αρνητικά την ανάπτυξη του κύτταρου.

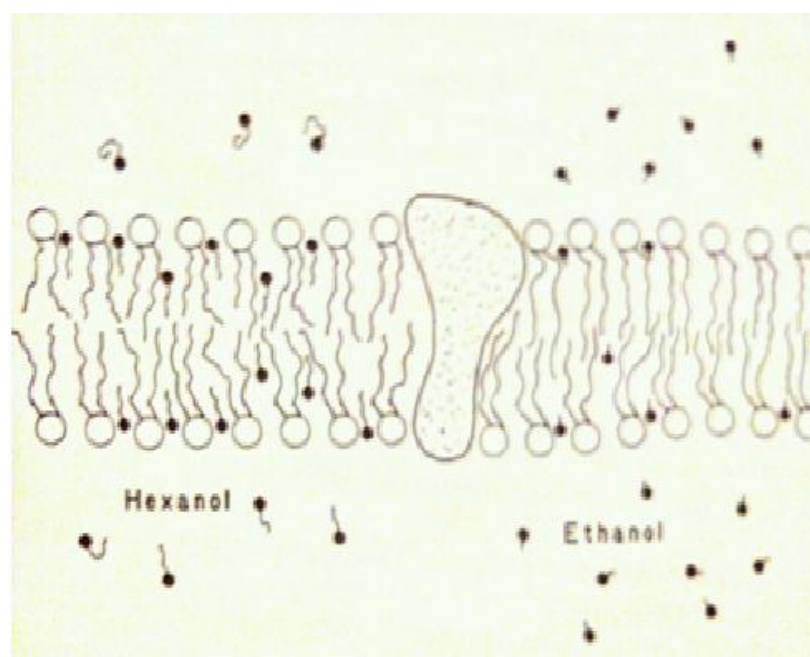
Παρότι και οι μεγαλύτερες αλλά και οι μικρότερου μεγέθους αλκοόλες, επιδρούν στην κυτταρική μεμβράνη αυξάνοντας τη διαπερατότητα της, φαίνεται ότι επιδρούν με διαφορετικό τρόπο στα βιολογικά συστήματα. Οι αλκοόλες αποτελούνται από δυο κύριες λειτουργικές ομάδες, από μια υδροξυλομάδα και από μια υδρογονανθρακική αλυσίδα. Οι επιδράσεις των μικρότερων σε μέγεθος αλκοολών, όπως η αιθανόλη, συνδέεται με την πολική ομάδα. Στις μεγαλύτερες αλκοόλες, όπως η εξανόλη, η υδροφοβική φύση της υδρογονανθρακικής αλυσίδας κυριαρχεί στις επιδράσεις της.

Η προσθήκη μικρών αλκοολών, όπως η αιθανόλη έχει ποικίλες βιοφυσικές συνέπειες στα κύτταρα. Πιο συγκεκριμένα, προσθήκη αιθανόλης προκαλεί αύξηση του pH (Jukes and Schmidt, 1934) που οφείλεται στην αντικατάσταση του νερού από έναν απρωτικό διαλύτη. Επίσης, προκαλεί μείωση της ισχύος των υδρόφοβων δεσμών (Yaacobi and Ben-Naim, 1974) αλλά αύξηση της ισχύος των δεσμών Coulomb (Franks and Ives, 1966). Επιπλέον, μια ποσότητα της αιθανόλης συνδέεται στη μεμβράνη προκαλώντας άμεσες διαταραχές στη δομή της.

Οι υδροφοβικοί δεσμοί είναι σπουδαίας σημασίας για τη δομή της κυτταρικής μεμβράνης και την οργάνωση των συστατικών της. Προσθήκη αλκοολών αναμένεται να προκαλέσει σημαντικές μεταβολές σε αυτή την πολύπλοκη οργάνωση. Το υδρόφοβο εσωτερικό της μεμβράνης λειτουργεί ως το πρώτο επίπεδο διαπερατότητας του κύτταρου και αποτρέπει την ελεύθερη ανταλλαγή πολικών μορίων. Η σύνδεση του μορίου της αιθανόλης σε αυτό το υδρόφοβο εσωτερικό προκαλεί μια αύξηση της πολικότητας της περιοχής, με αποτέλεσμα να αποδυναμωθεί. Μία ακόμα επίδραση της αιθανόλης, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω είναι η αύξηση της ισχύος των δεσμών coulomb που έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του μεγέθους του ιονισμού με παράλληλη αύξηση της απόθησης μεταξύ των πολικών ομάδων. Αυτό καταλήγει σε

αύξηση της επιφάνειας που καταλαμβάνει κάθε φωσφολιπίδιο με συνεπαγόμενη μείωση της συνοχής της μεμβράνης και αύξηση της διαπερατότητας της.

Οι επιδράσεις μεγαλύτερων σε μέγεθος αλκοολών, όπως η εξανόλη, οφείλονται στην υδρογονανθρακική αλυσίδα τους. Η εξανόλη συγκεκριμένα, συμμετέχει ενεργά στη μεμβράνη και προκαλεί αξιοσημείωτες αυξήσεις στην ελευθερία των κινήσεων της, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 5 (Jan and Wu 1977). Παρότι η επίδραση της στην πολικότητα του υδρόφοβου εσωτερικού είναι πολύ μικρότερη από αυτήν της αιθανόλης, προκαλεί και αυτή αύξηση της διαπερατότητας της μεμβράνης και έντονες απώλειες ενδοκυτταρικών μορίων.



**Εικόνα 5.** Συμμετοχή αιθανόλης και εξανόλης στην πλασματική μεμβράνη

### 3.4 Λιπιδική σύσταση

Η σύσταση των λιπιδίων στα κύτταρα είναι πρωταρχικής σημασίας για την ανθεκτικότητα τους ως προς την αιθανόλη και άλλες αλκοόλες. Εφόσον, η ζύμη *S.cerevisiae* παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ανθεκτικότητα, είναι αναμενόμενο να παρουσιάζει και ιδιαίτερη λιπιδική σύσταση. Πράγματι, ο μικροοργανισμός αυτός δεν είναι σε θέση να συνθέσει πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, και συνεπώς περιέχει μόνο μονοακόρεστους ή κορεσμένους εστέρες λιπαρών οξέων στα φωσφολιπίδια του. Όμως, περιέχει και μεγάλες ποσότητες από μεμβρανικές στερόλες. Η ιδιαιτερότητα

αυτού του μικροοργανισμού έγκειται στο γεγονός ότι συνθέτει εργοστερόλη και όχι χοληστερόλη και στο ότι τα φωσφολιπίδια του περιέχουν πολύ μεγάλες ποσότητες (70-80%) ακόρεστων εστέρων λιπαρών οξέων. Το υψηλό αυτό περιεχόμενο ακόρεστων λιπαρών οξέων στη μεμβράνη των ζυμών καθώς και το περιεχόμενο τους σε εργοστερόλη συνδέεται άμεσα με την ανθεκτικότητα τους στην αιθανόλη.

Ανεξάρτητες μελέτες που έχουν διεξαχθεί (Yamashiro et al 1967, Beaven et al 1982, Ingram, 1976) οδήγησαν όλες σε παρόμοια συμπεράσματα όσον αφορά στο λιπιδικό περιεχόμενο διαφόρων μικροοργανισμών, όπως ο *S.cerevisiae*, η *N.crassa*, ο *T.pyriiformis* και ο *E.coli*. Αποδείχτηκε λοιπόν ότι οι παραπάνω μικροοργανισμοί αφού εκτεθούν σε αιθανόλη, μεταβάλλουν τη σύσταση των λιπαρών οξέων της μεμβράνης τους κατά το στάδιο της ανάπτυξης. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε αύξηση στο περιεχόμενο των μονοακόρεστων λιπαρών οξέων (κυρίως στο ολεϊκό οξύ C<sub>18:1</sub>), συνοδευόμενη από μια μείωση στα κορεσμένα οξέα. Από τα παραπάνω εξάγεται το συμπέρασμα ότι οι μικροοργανισμοί απαντούν στην παρουσία της αιθανόλης, μεταβάλλοντας τη λιπιδική τους σύσταση.

### **3.5 Μηχανισμοί παρεμπόδισης της ζύμωσης παρουσία αιθανόλης.**

Στα παραπάνω κεφάλαια εξετάστηκαν λεπτομερώς οι επιπτώσεις που έχει η προσθήκη εξωκυτταρικής αιθανόλης σε καλλιέργειες μικροοργανισμών κατά το στάδιο της ανάπτυξης. Παρόλα αυτά, περισσότερο ενδιαφέρον τόσο από επιστημονικής όσο και από οικονομικής πλευράς παρουσιάζει η ανθεκτικότητα των ζυμών και των μυκήτων στην αιθανόλη κατά τη διεργασία παραγωγής αιθανόλης. Παραδόξως, φαίνεται ότι η ενδοκυτταρική ή παραγόμενη αιθανόλη έχει διαφορετικές επιπτώσεις στα κύτταρα και την μεμβράνη τους από την εξωκυτταρική ή προστιθέμενη. Πολλοί ερευνητές έχουν δείξει ότι υψηλές συγκεντρώσεις παραγόμενης αιθανόλης είναι υπεύθυνες για τον πρόωρο τερματισμό της διαδικασίας της ζύμωσης (Beaven et al. 1982, Nagodawithana and Steinkraus 1976, Navarro and Durand 1978). Η συσσώρευση παραγόμενης αιθανόλης, που αποτελεί και το τελικό προϊόν της γλυκόλυσης, συνδέεται άμεσα με μείωση στο ρυθμό της ζύμωσης (Brown 1905, Richards 1928, Rahn 1929).

Παρόλο που η αιθανόλη αποτελεί το τελικό προϊόν του γλυκολυτικού μονοπατιού Embden-Meyerhof, έρευνα στο μικροοργανισμό *S.cerevisiae* κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η δράση της αιθανόλης στο να παρεμποδίζει τη ζύμωση από τα κύτταρα, συνδέεται με τις φυσικοχημικές της ιδιότητες ως συστατικό του μέσου καλλιέργειας και όχι με το ότι αποτελεί μεταβολίτη της ζύμης (Troyer 1955). Δύο από τις ιδιότητες των αλκοολών που μελετήθηκαν τα αμέσως επόμενα χρόνια ήταν το μέγεθος τους (αριθμός ατόμων άνθρακα) καθώς και η πολικότητά τους (αριθμός των υδροξυλομάδων). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η συγκέντρωση της αλκοόλης (μεγέθους μεταξύ C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>) η οποία απαιτείται για τη μείωση της παραγωγής αιθανόλης στο μισό είναι αντιστρόφως ανάλογη του μεγέθους της ουσίας (Gray and Sova, 1956). Επιπλέον, μελετήθηκε η σημασία της θέσης και του αριθμού των υδροξυλομάδων των αλκοολών στην ανθεκτικότητα των κυττάρων. Ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι αλκοόλες με παραπάνω από μία υδροξυλομάδα δρουν ως πλασμολυτικοί παράγοντες, ενώ αντίθετα οι αλκοόλες με μια υδροξυλομάδα δρουν ως αναισθητικά καθώς επίσης και ότι η συγκέντρωση μιας αλκοόλης που απαιτείται για ίδιου μεγέθους παρεμπόδιση της διαδικασίας της ζύμωσης του *S.cerevisiae* συνδέεται άμεσα με την υδροφοβικότητα της (Gray and Sova 1956, Katz and Diamond 1974). Συνεπώς, συμπεραίνεται ότι, όπως και στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών, έτσι και στη ζύμωση, η κυτταρική μεμβράνη που είναι η πιο υδροφοβική περιοχή του κυττάρου αποτελεί τον κύριο στόχο της αιθανόλης και άλλων αλκοολών.

Δευτερεύων αλλά εξίσου σημαντικό στόχο της δράσης της αιθανόλης αποτελούν τα γλυκολυτικά ένζυμα. Η πεποίθηση αυτή οφείλεται σε δυο βασικούς λόγους. Αφενός, τα ένζυμα που μετέχουν στο γλυκολυτικό μονοπάτι έχουν υδρόφοβες περιοχές, οπότε η δράση τους αναμένεται να επηρεαστεί παρουσία αιθανόλης και αφετέρου, εφόσον η αιθανόλη αποτελεί τελικό προϊόν του Embden-Meyerhof μονοπατιού, είναι λογικό να παρεμποδίζει ένα ή περισσότερα ένζυμα αυτού του μονοπατιού.

Πολλές *in vitro* μελέτες πραγματοποιήθηκαν για να εξεταστεί ποια ένζυμα παρεμποδίζονται από την αιθανόλη (Augustin et al 1965, Llorente and Sols 1969, Nagodawithana et al 1977, Navarro 1980, Millar et al 1982). Το συμπέρασμα που προέκυψε ήταν ότι το ένζυμο εξοκινάση, το οποίο δρα στην αρχή του γλυκολυτικού μονοπατιού, παρεμποδιζόταν ιδιαίτερα ακόμα και από μικρές συγκεντρώσεις αιθανόλης. Δεν είναι όμως το μόνο ένζυμο που αποδείχθηκε ότι επηρεάζεται από την

αιθανόλη. Μια πιθανή αιτία της παρεμπόδισης είναι η μείωση της ενεργότητας του νερού, που με τη σειρά του έχει ως συνέπεια την αφυδάτωση πρωτεϊνών και σημαντικών γλυκολυτικών ενζύμων (Hallsworth et al.1998). Συνεπώς, η αιθανόλη προκαλεί παρεμπόδιση σε αρκετά γλυκολυτικά ένζυμα, μειώνοντας έτσι το μεταβολισμό του κυττάρου και τελικά το ρυθμό της ζύμωσης (Milar et al 1982).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Ουσίες που αυξάνουν την ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών παρουσία αιθανόλης

Οι ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί, όπως είναι οι ζύμες και οι μύκητες, λόγω των αντίξοων συνθηκών που αντιμετωπίζουν κατά τη διάρκεια του κύκλου αναπαραγωγής και ανάπτυξής τους, έχουν αναπτύξει ποικίλους μηχανισμούς για να καταπολεμήσουν τις επιβλαβείς συνέπειες της αιθανόλης στα κύτταρά τους και συνεπώς να αυξήσουν την ανθεκτικότητά τους σε αυτήν. Οι ποικίλοι αυτοί μηχανισμοί συνοψίζονται στον Πίνακα 2. Παρόλο που λίγα γνωρίζουμε σχετικά με τον πολύπλοκο μηχανισμό αντίδρασης στην αιθανόλη, διάφοροι τέτοιοι μηχανισμοί έχουν προταθεί μέχρι στιγμής από ερευνητές. Ενδεικτικά παραδείγματα αποτελούν: οι αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση και στη μεμβρανική δομή καθώς και η αύξηση των συνοδευτικών πρωτεϊνών που βοηθά στη σταθεροποίηση άλλων, αφυδατωμένων πρωτεϊνών. Παρακάτω θα γίνει μια σύντομη επισκόπηση στις πρόσφατες εξελίξεις όσον αφορά στην κατανόηση της ανθεκτικότητας σε αιθανόλη αλλά και στους μηχανισμούς αντίδρασης των ζυμών και των μυκήτων σε αυτήν.

**Πίνακας 2:** Παράγοντες που συνδέονται με αυξημένη ανθεκτικότητα στην αιθανόλη ζυμών και μυκήτων.

Παράγοντες που συνδέονται με αυξημένη ανθεκτικότητα των κυττάρων στην αιθανόλη	Πηγές αναφοράς
Ακόρεστα λιπαρά οξέα (UFAs)	You et al(2003), Xiao et al.(2008), Ingram et al.(1990), Weber et al.(1996)
Εργοστερόλη	Inoue et al(2000), Swang et al.(1998)
Αμινοξέα	Hu et al.(2005), Takagi et al.(2005)
Ινοσιτόλη και H <sup>+</sup> -ATPάση	Cartwright et al.(1987), Furukawa et al. (2004), Fernandes et al. (2003)
Τρεχαλόζη	Gomes et al. (2002),Ogawa et al.(2000), Lucero et al. (1997), Bary et al.(1995)
Πρωτεΐνες θερμικού σοκ	Wu et al. (1995), Hahn et al.(2004), Takemori et al. (2006), Liu et al. (2008)
Βελτιστοποίηση της σύστασης των θρεπτικών συστατικών	Bai et al. (2008), Xue et al. (2008), Hu et al. (2003)

Όπως έχει αναφερθεί σε προηγούμενο κεφάλαιο, μία από τις δράσεις της αιθανόλης είναι η αύξηση της ρευστότητας και της διαπερατότητας της πλασματικής μεμβράνης καθώς και η καταστροφή των φυσιολογικών δομών της τελευταίας. Σε απάντηση, τα

κύτταρα των ζυμών μεταβάλλουν τη σύνθεση της μεμβράνης για να ανταγωνιστούν τη διαπερατότητά της και να συμβάλλουν στη σταθεροποίησή της. Πιο συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι τα επίπεδα των ακόρεστων λιπαρών οξέων UFAs (You et al. 2003) καθώς και της εργοστερόλης (Daum et al. 1998, Swan and Watson 1998) αυξάνονται σε απάντηση της υψηλής συγκέντρωσης της βιοαιθανόλης. Επιπλέον, η προσθήκη συγκεκριμένων αμινοξέων (Hu et al. 2005, Takagi et al. 2005) αλλά και ινοσιτόλης (Kelley et al. 1988) έχει δειχθεί ότι μπορούν να βελτιώσουν την αντοχή των μικροοργανισμών στην αιθανόλη, πιθανότατα μέσω μηχανισμού σταθεροποίησης της μεμβράνης. Ένας ακόμα παράγοντας που φαίνεται να συνδέεται με την ανθεκτικότητα στην αιθανόλη είναι η έκφραση ουσιών όπως η τρεχαλόζη και οι «πρωτεΐνες θερμικού σοκ» HSPs (Swan and Watson 1998, Vianna et al. 2008).

Η κατανόηση των μηχανισμών της ανθεκτικότητας στην αιθανόλη είναι πρωταρχικής σημασίας τόσο σε επιστημονικό όσο και σε οικονομικό επίπεδο αφού ένα από τα επιθυμητά χαρακτηριστικά που πρέπει να έχει ένας αιθανολοπαραγωγός μικροοργανισμός είναι η υψηλή ανθεκτικότητα στην αιθανόλη. Συνεπώς, η επεξήγηση και πληρέστερη κατανόηση των μηχανισμών που ευθύνονται για την αντοχή στην αιθανόλη, μπορεί να συμβάλλει στην παραγωγή μεγαλύτερων συγκεντρώσεων βιοαιθανόλης. Τέτοιοι μηχανισμοί είναι : οι ουσίες που συμβάλλουν στη σταθεροποίηση της κυτταρικής μεμβράνης, οι ουσίες που συμβάλλουν στη σταθεροποίηση ή επιδιόρθωση των αφυδατωμένων (από την αιθανόλη) πρωτεϊνών και η βελτιστοποίηση της σύστασης των θρεπτικών συστατικών, οι οποίοι αναλύονται λεπτομερώς παρακάτω.

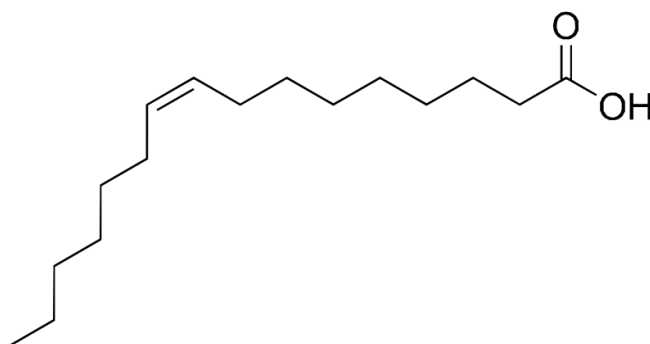
#### **4.1 Ουσίες που συμβάλλουν στη σταθεροποίηση της κυτταρικής μεμβράνης.**

Έχουν αναπτυχθεί εκτενώς σε προηγούμενο κεφάλαιο οι επιβλαβείς συνέπειες της αιθανόλης στην κυτταρική μεμβράνη. Παρακάτω αναλύονται οι μηχανισμοί αντιμετώπισης των κυττάρων και πιο συγκεκριμένα η επίδραση στην ανθεκτικότητα των κυττάρων από τα ακόρεστα λιπαρά οξέα, την εργοστερόλη, τα αμινοξέα, την ινοσιτόλη και την ενεργότητα του ενζύμου  $H^+$ -ATPάση.

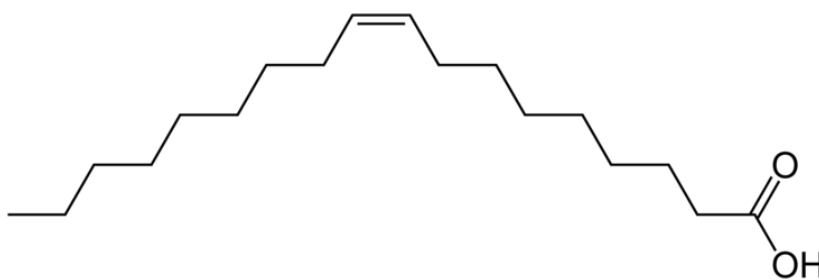


#### 4.1.1 Ακόρεστα λιπαρά οξέα

Η παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων αιθανόλης προκαλεί μεταβολές στη σύσταση των ακόρεστων λιπαρών οξέων της πλασματικής μεμβράνης. Αρκετοί συγγραφείς έχουν προτείνει ότι η ικανότητα των κυττάρων να αυξάνουν τη συγκέντρωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων του κυττάρου αποτελεί τον κυρίαρχο μηχανισμό που χρησιμοποιούν οι ζύμες για να αυξήσουν την βιωσιμότητα τους παρουσία αιθανόλης. Η σύνθεση των UFAs στη ζύμη *S.cerevisiae* αποτελείται κυρίως από τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, το παλμιτελαϊκό οξύ (C<sub>16:1</sub>) και το ολεϊκό οξύ(C<sub>18:1</sub>).



**Εικόνα 6.** Παμπελαϊκό οξύ



**Εικόνα 7.** Ολεϊκό οξύ

Ο ζυμομύκητας συνθέτει και τα δύο UFAs με μια διαδικασία η οποία καταλύεται από ένα ένζυμο της κυτταρικής μεμβράνης που κωδικοποιείται από το γονίδιο OLE1 (Stukey et al. 1989,1990). Σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε στελέχη του μικροοργανισμού *S.cerevisiae* παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων αιθανόλης στο μέσο καλλιέργειας, παρατηρήθηκε αύξηση του ποσοστού των μονοακόρεστων

λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων, όπως το ολεϊκό οξύ, αλλά και μείωση των κορεσμένων λιπαρών οξέων, όπως το παλμιτικό οξύ (C16:0) (Thomas and Rose 1979, Beaven et al. 1982, Ghareib et al. 1988). Επιπλέον, η αύξηση του ποσοστού του ολεϊκού οξέος παρουσία αιθανόλης συνοδεύεται από μείωση στο ποσοστό του παλμιτελαϊκού οξέος (Sajbidor and Greco 1992), που συνεπάγεται ότι η παρουσία αιθανόλης προκαλεί αύξηση του μακρύτερου ακόρεστου λιπαρού οξέος. Ερευνητές (Chi and Arneborg 1999), παρατήρησαν ότι τα στελέχη της ζύμης τα οποία ήταν περισσότερο ανθεκτικά στην αιθανόλη, περιείχαν μεγαλύτερες ποσότητες μονοακόρεστων λιπαρών οξέων από τα υπόλοιπα, και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα λιπαρά οξέα με μεγάλη αλυσίδα παίζουν καθοριστικό ρόλο στην ανθεκτικότητα των κυττάρων στην αιθανόλη.

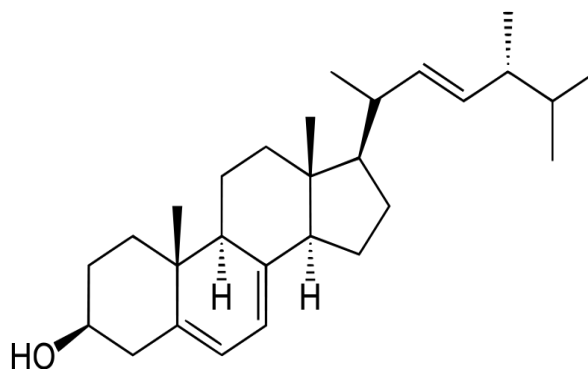
Ο μηχανισμός, όμως, της προστατευτικής τους λειτουργίας αποδεικνύεται ιδιαίτερα πολύπλοκος μιας και τα UFAs φαίνεται ότι αυξάνουν τη ρευστότητα της μεμβράνης, κάτι που αντιβαίνει στη θεωρία ότι στην ανθεκτικότητα στην αιθανόλης βοηθούν ουσίες που συμβάλλουν στη σταθεροποίηση της. Γι αυτό το λόγο, η αύξηση των ποσοτήτων των UFAs ως παράγοντας αντίδρασης των κυττάρων, έχει προταθεί ότι συνδέεται με τις στερεό - χημικές επιδράσεις της αιθανόλης στις κεφαλές των φωσφολιπιδίων της μεμβράνης (Weber and de Bont 1996). Τέλος, έρευνες στο μικροοργανισμό *K.Lactis* έδειξαν ότι σημαντικό ρόλο στην ανθεκτικότητα αυτού του μικροοργανισμού στην αιθανόλη παίζει ο βαθμός ακορεστότητας (unsaturation index, UI), ο οποίος προκύπτει μετά από ανάλυση της σύστασης των λιπαρών οξέων. Το UI είναι ένα μέγεθος του μέσου όρου των διπλών δεσμών ανά λιπαρό οξύ και αποτελεί ένδειξη της ρευστότητας της μεμβράνης. Μετά από μελέτη διαπιστώθηκε ότι το UI μειώνεται με αυξανόμενη συγκέντρωση αιθανόλης.

Το συμπέρασμα ότι οι ζύμες μπορούν να αντιδράσουν στην παρουσία αιθανόλης με το να μεταβάλλουν τη σύσταση των λιπιδίων της μεμβράνης τους έχει στηριχθεί και από άλλες ανεξάρτητες έρευνες (Chatterjee et al., Alexandre et al. 1994, Xiao et al. 2008) με τις οποίες ισχυροποιήθηκε η πεποίθηση ότι το αυξημένο περιεχόμενο μικροοργανισμών σε UFAs συνδέεται θετικά με την ανθεκτικότητά τους σε αιθανόλη. Αυτό θα μπορούσε να λειτουργήσει και ως κριτήριο στο μέλλον για την επιλογή μικροοργανισμών ιδιαίτερα αποδοτικών στην παραγωγή βιοαιθανόλης.

#### 4.1.2 Εργοστερόλη

Η εργοστερόλη αποτελεί τη σημαντικότερη στερόλη στη δομή της μεμβράνης των μυκήτων και επιτελεί λειτουργίες παρόμοιες με αυτές της χοληστερόλης στα κύτταρα ανώτερων οργανισμών. Συμβάλλει σε πολλές φυσιολογικές λειτουργίες, μεταξύ των οποίων η διαπερατότητα των μεμβρανών και η ορθή λειτουργία των ενζύμων της μεμβράνης. Οι στερόλες αποτελούν μια διαφορετική τάξη των λιπαρών συστατικών της πλασματικής μεμβράνης των ζυμών. Η σύνδεση μεταξύ της στερολικής σύνθεσης της μεμβράνης και της ανθεκτικότητας των κυττάρων σε αιθανόλη έχει μελετηθεί εκτενώς (Thomas et al. 1978, Walker-Caprioglio et al. 1990, Castillo Agudo 1992). Έρευνες έχουν δείξει ότι η εργοστερόλη συμβάλλει στη διατήρηση της συνοχής της μεμβράνης (Hossack and Rose, 1976) μειώνοντας τη διαπερατότητά της όταν τα κύτταρα εκτίθενται σε αιθανόλη (Zinser et al. 1991, Alexandre et al. 1994)). Αναλυτικότερα, η εργοστερόλη είναι αναγκαία για τη φυσιολογική δομή και λειτουργία των κυτταρικών μεμβρανών αφού ρυθμίζει τις ισορροπίες μεταξύ των συστατικών της μεμβράνης όπως είναι τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες (Bagnat et al.2000, Shobayashi et al.2005).

Τα παραπάνω συμπεράσματα επιβεβαιώνονται και από άλλες έρευνες (Larue et al. 1980, Lees et al. 1980, Bottema et al.1985 και πιο πρόσφατα των Inoue et al. 2000), σύμφωνα με τις οποίες στελέχη του *S.cerevisiae* με μικρότερο περιεχόμενο σε εργοστερόλη στην κυτταρική τους μεμβράνη, είχαν μειωμένη βιωσιμότητα, χαμηλούς ρυθμούς ανάπτυξης και δεν μπορούσαν να ζυμώσουν σάκχαρα παρουσία αιθανόλης. Σε αντίθεση, ζύμες οι οποίες είχαν υψηλότατο περιεχόμενο σε εργοστερόλη στη μεμβράνη τους, φαίνεται να είναι και οι πιο ανθεκτικές στην αιθανόλη (Castillo Agudo 1992, Alexandre et al. 1994).



Εικόνα 8. Εργοστερόλη

### 4.1.3 Αμινοξέα

Η σπουδαιότητα της βιοσύνθεσης και μεταφοράς των αμινοξέων για τη βελτίωση της ανθεκτικότητας των κυττάρων στην αιθανόλη έχει μελετηθεί εκτενώς (Hirasawa et al. 2007, Pham and Wright 2008). Σύμφωνα με πρόσφατες έρευνες (Hu et al. 2005), αν μια καλλιέργεια κυττάρων ζύμης που αναπτύσσεται παρουσία συγκέντρωσης αιθανόλης ικανής να προκαλέσει θανάτωση, περιέχει και τρία αμινοξέα: την ισολευκίνη, τη μεθειονίνη και τη φαινυλαλανίνη, τότε το 57% των κυττάρων θα παρέμεναν ζωντανά. Εν συνεχεία, ακολούθησε ανάλυση της σύστασης των αμινοξέων στις μεμβρανικές πρωτεΐνες αλλά και μέτρηση της διαπερατότητας της μεμβράνης, οι οποίες οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η ιδιαίτερα αυξημένη ανθεκτικότητα αυτών των κυττάρων συνδεόταν με την προσθήκη των παραπάνω αμινοξέων στη μεμβράνη, γεγονός που με τη σειρά του οδηγούσε στην καλύτερη συνοχή της τελευταίας ώστε να γίνεται αμελητέα η αύξηση της διαπερατότητάς της, παρουσία αιθανόλης.

Επιπλέον, τα γονίδια για τη βιοσύνθεση ενός ακόμα αμινοξέος, της τρυπτοφάνης, αποδείχτηκε ότι συνδέονται με την ανθεκτικότητα στην αιθανόλη (Hirasawa et al. 2007). Πιο συγκεκριμένα, η υπερέκφραση του γονιδίου της σύνθεσης της τρυπτοφάνης TRP1-5 και της περιμιάσης της τρυπτοφάνης TAT2, καθώς και η προσθήκη τρυπτοφάνης στο μέσο καλλιέργειας, είχαν σαν αποτέλεσμα τη βελτίωση της ανθεκτικότητας της ζύμης *S.cerevisiae* στην αιθανόλη (Yoshikawa et al. 2009). Τέλος, ένα ακόμα αμινοξύ που φαίνεται να επιδρά θετικά στη βελτίωση της ανθεκτικότητας των κυττάρων είναι η L-προλίνη (Takagi et al. 2005). Παρά το γεγονός ότι απαιτείται εκτενέστερη μελέτη για τη διασαφήνιση του μηχανισμού δράσης της τελευταίας, αξίζει να σημειωθεί ότι η δράση της φαίνεται να οφείλεται στη σταθεροποίηση των πρωτεϊνών και των φωσφολιπιδίων της μεμβράνης σε καταστάσεις χαμηλής ενεργότητας του νερού (όπως παρουσία αιθανόλης).

Τα αμινοξέα θεωρούνται θρεπτικά συστατικά. Οι παραπάνω μελέτες ανέδειξαν και το σημαντικό ρόλο που αυτά έχουν στην ανθεκτικότητα των ζυμών στην αιθανόλη. Λόγω όμως του μεγάλου κόστους που έχει η προσθήκη αμινοξέων στο μέσο καλλιέργειας, ο έλεγχος της μεταφοράς τους αποτελεί ορθότερη επιλογή για τη βελτίωση της ανθεκτικότητας των κυττάρων στην αιθανόλη (Chen and Fink 2006).

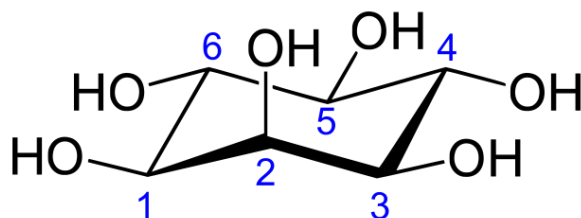
#### 4.1.4 Ινοσιτόλη και ενεργότητα του ενζύμου $H^+$ -ΑΤΡάση

Έρευνες που πραγματοποιήθηκαν στο ζυμομύκητα *S.cerevisiae* για τη μελέτη της επίδρασης του κυτταρικού περιεχομένου σε ινοσιτόλη κατά την ανάπτυξη και ζύμωση, έδειξαν ότι τα κύτταρα που περιείχαν μικρότερο ποσοστό σε αυτή την ουσία (limited cells ή L-cells, 10mM εξωκυτταρικά , 1,6mg/g ενδοκυτταρικά) είχαν κατά πολύ μεγαλύτερο ρυθμό θανάτου παρουσία αιθανόλης από αυτά με ικανοποιητικό ποσοστό ινοσιτόλης (H-cells, 90 εξωκυτταρικά, 4,6mg/g ενδοκυτταρικά ). Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά μεταξύ των κυττάρων στο ρυθμό ζύμωσης και παραγωγής αιθανόλης (Furukawa et al. 2004). Το συμπέρασμα που προκύπτει από τα παραπάνω αποτελέσματα είναι ότι το κυτταρικό περιεχόμενο αυτής της ουσίας συνδέεται άμεσα με τη βιωσιμότητα των κυττάρων και την ανθεκτικότητα τους σε αιθανόλη, ενώ τα ένζυμα της γλυκόλυσης είναι το ίδιο αφυδατωμένα ή παρεμποδισμένα ανεξαρτήτως του περιεχομένου του κυττάρου σε ινοσιτόλη ( Furukawa et al. 2004).

Η αύξηση της κυτταρικής ανάπτυξης στα H-cells οφείλεται σε πολλούς παράγοντες. Καταρχάς, σύμφωνα με έρευνες (Cartwright et al. 1987) κύτταρα τα οποία περιέχουν λιγότερη ινοσιτόλη, έχουν αυξημένη διαπερατότητα στη μεμβράνη τους παρουσία αιθανόλης, με αποτέλεσμα να παρατηρείται διαρροή πολύτιμων ενδοκυτταρικών συστατικών όπως νουκλεοτίδια, ιόντα φωσφόρου, καλίου και άλλα με μεγαλύτερη ταχύτητα απ' ό τι στα κύτταρα που περιέχουν ικανοποιητική ποσότητα ινοσιτόλης. Επιπλέον, μετρήσεις έδειξαν ότι έχουν και χαμηλότερο ενδοκυτταρικό pH λόγω της μειωμένης εκροής πρωτονίων  $H^+$  που οφείλεται στη μειωμένη ενεργότητα του ενζύμου  $H^+$ -ΑΤΡάση. Πιο συγκεκριμένα η ενεργότητα της  $H^+$ -ΑΤΡάσης της πλασματικής μεμβράνης βρέθηκε ότι είναι η μισή στα L-cells(Furukawa et al. 2004) με αποτέλεσμα τη μείωση της βιωσιμότητας αυτών των κυττάρων. Όπως έχει αναφερθεί και σε προηγούμενο κεφάλαιο, η αιθανόλη διαταράσσει τη φυσιολογική δομή της υδροφοβικής περιοχής της κυτταρικής μεμβράνης, επηρεάζοντας έτσι τη διαπερατότητα της και οδηγώντας σε αύξηση της παθητικής εισροής των πρωτονίων στο κύτταρο με αποτέλεσμα αυξημένη ενδοκυτταρική οξύτητα(Cartwright et al. 1987, Rosa and Sa-Correia 1996). Η μεταφορά των ενδοκυτταρικών πρωτονίων στα κενοτόπια από το ένζυμο  $H^+$  V-ΑΤΡάση είναι σημαντική για τους ζυμομύκητες στο να διατηρούν την τιμή του ενδοκυτταρικού pH σταθερή και να επιβιώνουν παρουσία αιθανόλης. Το ένζυμο αυτό βοηθάει στη μεταφορά των πρωτονίων διαμέσου του

κενοτοπιώδους υμένα μέσω υδρόλυσης του ATP (Forgac 1998, Inoue et al. 2005). Αποδείχθηκε, όμως, ότι η αυξημένη ποσότητα ινοσιτόλης ενός κυττάρου βοηθάει στην αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου  $H^+$ -ΑΤΡάση, που συνεπάγεται την αύξηση εκροής πρωτονίων εκτός του κυττάρου και τελικά την αύξηση της ανθεκτικότητας του παρουσία αιθανόλης (Cartwright et al. 1987, Cartwright et al. 1987). Η μεταφορά των πρωτονίων θεωρείται ως αντίδραση των ζυμών στην παρουσία αιθανόλης.

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η  $H^+$ -ΑΤΡάση της μεμβράνης φαίνεται να είναι κυρίαρχης σημασίας για τη συμπεριφορά της ζύμης *S.cerevisiae* παρουσία και απουσία αιθανόλης. Ο μηχανισμός, όμως, που το περιεχόμενο ενός κυττάρου ζύμης σε ινοσιτόλη επηρεάζει την ενεργότητα της  $H^+$ -ΑΤΡάσης, διασαφηνίστηκε μόλις τα τελευταία χρόνια. Αρχικά, βρέθηκε ότι τα L- και τα H-κύτταρα δεν παρουσιάζουν καμία διαφορά στο επίπεδο έκφρασης του ενζύμου, το οποίο κωδικοποιείται από τα γονίδια PMA1 και PMA2. Συνεπώς, προέκυψε το συμπέρασμα ότι η επίδραση της ινοσιτόλης στο ένζυμο καθορίζεται από κάποιο φαινόμενο που έπεται της έκφρασής του. Πιο συγκεκριμένα, αποδείχτηκε ότι η ενεργότητα του ενζύμου επηρεάζεται από το λιπιδικό του περιβάλλον. Έρευνες έδειξαν ότι η μείωση της ενεργότητας της  $H^+$ -ΑΤΡάσης στα L-κύτταρα παρουσία αιθανόλης είναι αποτέλεσμα της μείωσης των επιπέδων των γλυκεροφωσfolιπιδίων που περιέχουν ινοσιτόλη, σημαντικότερο των οποίων είναι το PI (Furukawa et al. 2004). Τα παραπάνω συμπεράσματα επιβεβαιώθηκαν και από μεταγενέστερη έρευνα που έδειξε ότι κύτταρα με υψηλή περιεκτικότητα σε PI ήταν περισσότερο ανθεκτικά από άλλα που είχαν μικρότερη ποσότητα του λιπιδίου (Patton et al. 1992).



Εικόνα 9. Ινοσιτόλη

Συνεπώς, το περιεχόμενο ενός κυττάρου σε ινοσιτόλη αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα ανθεκτικότητας παρουσία αιθανόλης, αφού έχειδειχθεί ότι αυξάνει τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Συνοπτικά, η δράση της οφείλεται στην αύξηση της ενεργότητας της  $H^+$ -ΑΤΡάσης, ώστε να διατηρείται η διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης σε φυσιολογικά επίπεδα και η ομοιόσταση των ιόντων στο κυτόπλασμα.

#### **4.2 Ουσίες που συμβάλλουν στη σταθεροποίηση ή επιδιόρθωση των αφυδατωμένων από την αιθανόλη πρωτεϊνών.**

Σε προηγούμενο κεφάλαιο έχει αναπτυχθεί ότι εκτός από την επίδραση που έχει η αιθανόλη στη σταθερότητα και δομή της κυτταρικής μεμβράνης, βλάπτει επίσης και τις «λειτουργικές» πρωτεΐνες της μεμβράνης (Samuel et al. 2000, Takagi et al. 2005). Συνεπώς, παράγοντες οι οποίοι έχουν την ικανότητα να σταθεροποιούν και να επαναδιατάσσουν τις αφυδατωμένες πρωτεΐνες, συμβάλλουν στην αύξηση της αντοχής στην αιθανόλη. Τέτοιες ουσίες είναι οι «πρωτεΐνες θερμικού σοκ» και η τρεχαλόζη, οι οποίες αναπτύσσονται παρακάτω.

##### **4.2.1 Τρεχαλόζη**

Η τρεχαλόζη αποτελεί έναν από τους αποθεματικούς υδρογονάνθρακες στα κύτταρα των ζυμομυκήτων και συγκεκριμένα στον *S.cerevisiae* μπορεί να φτάσει έως και το 25% της ξηρής μάζας του κυττάρου, ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες (Hohmann 2002). Εκτός όμως από τις ζύμες, βρίσκεται και σε άλλους μύκητες, βακτήρια, σε αρκετά φυτά και ασπόνδυλα, στα οποία παρουσιάζει ιδιαίτερη αύξηση υπό αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες (Gaff 1971, Chen et al. 2002, Zentella et al. 1999). Η ουσία αυτή είναι ένας μη αναγωγικός δισακχαρίτης της γλυκόζης και στις ζύμες συνθέτεται από δύο κυρίως ένζυμα: την 6-φωσφορική συνθάση της τρεχαλόζης (TPS1) και την 6-φωσφορική-φωσφατάση της τρεχαλόζης (TPS2) (Bell et al. 1992). Η τρεχαλόζη υδρολύεται σε δύο μόρια γλυκόζης από την τρεχαλάση. Οι ζύμες έχουν δύο είδη τρεχαλάσης: την ουδέτερη (NTH1) και την όξινη (ATH1). Η πρώτη είναι ένα κυτοσολικό ένζυμο που κωδικοποιείται από το NTH1 γονίδιο, η έκφραση του οποίου εξαρτάται από τις συνθήκες του περιβάλλοντος (Thevelein 1984).

Το περιεχόμενο ενός κυττάρου σε τρεχαλόζη κυμαίνεται, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, από 1 έως 25% του ξηρού βάρους του κυττάρου, ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες, και εδώ και δυο δεκαετίες αρκετές έρευνες έχουν συνδέσει το ενδοκυτταρικό περιεχόμενο της τρεχαλόζης με την ικανότητα των ζυμών να επιβιώνουν σε μια πληθώρα αντίξοων συνθηκών, όπως εξάντληση θρεπτικών συστατικών, οξύτητα, αφυδάτωση, οσμωτική πίεση, θερμικό σοκ και άλλα (Thevelein et al. 1995, Elbein et al. 2003, Herdeiro et al. 2006). Ο ρόλος της τρεχαλόζης όμως στην ανθεκτικότητα των ζυμών, και συγκεκριμένα του *S.cerevisiae*, στην αιθανόλη παραμένει αμφιλεγόμενος με άλλες έρευνες να δείχνουν θετική επίδραση στην ανάπτυξη των κυττάρων (Soto et al 1999, Mansure et al. 1997, Jung et al. 2005), και άλλες ότι το περιεχόμενο σε τρεχαλόζη δεν έχει καμία επίδραση (Lewis et al. 1997, Gomes et al. 2002). Έχει δειχθεί ότι η σύνθεση της τρεχαλόζης αυξάνεται παρουσία αιθανόλης (Mansure et al. 1997) και ότι τα γονίδια τα οποία συνδέονται με αυτό (TPS1, TPS2, TSL1) εκφράζονται έντονα στη ζύμη *S.cerevisiae* όταν αυτή εκτίθεται σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης (Alexandre et al. 2001). Επιπλέον, σύμφωνα με έρευνες, κύτταρα του *S.cerevisiae* που αποδείχθηκε ότι ήταν περισσότερο ανθεκτικά από άλλα παρουσία αιθανόλης, περιείχαν ικανοποιητική ποσότητα τρεχαλόζης κατά την περίοδο της ανάπτυξης τους ενώ αντίθετα, αυτά που δεν περιείχαν αρκετή ποσότητα αυτής της ουσίας, είχαν χαμηλούς ρυθμούς ανάπτυξης στην έκθεση σε αιθανόλη (Okawa et al. 2000). Αυτά τα αποτελέσματα προτείνουν ότι η τρεχαλόζη ή το μονοπάτι βιοσύνθεσής της παίζει σημαντικό ρόλο στην ανθεκτικότητα στην αιθανόλη του *S. cerevisiae*.

Αντιφατικά αποτελέσματα ως προς την επίδραση της τρεχαλόζης προκύπτουν από μελέτες (Alexandre et al. 1998 και Gomes et al. 2002) στο μικροοργανισμό *Schizosaccharomyces pombe* παρουσία αιθανόλης. Πιο συγκεκριμένα, στελέχη με υψηλές ποσότητες τρεχαλόζης παρουσίασαν μικρότερη ανθεκτικότητα και μικρότερους ρυθμούς ανάπτυξης. Η αντιπαράθεση που επικρατεί ακόμα και σήμερα για την επίδραση της τρεχαλόζης στην ανθεκτικότητα των κυττάρων σε αιθανόλη αποδίδεται στο γονιδίωμα του κάθε στελέχους το οποίο καθορίζει σε σημαντικό βαθμό τη συμπεριφορά του.

Παρόλα αυτά, κάποιες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί σε παρόμοια στελέχη της ζύμης *S.cerevisiae* και έχουν δείξει σύνδεση του περιεχομένου της τρεχαλόζης με την επιβίωση και ανάπτυξη παρουσία αιθανόλης σε συγκεντρώσεις 18%, 15% και 10%



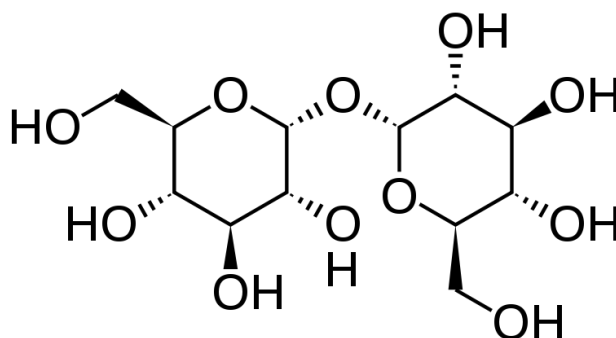
w/v (Liu et al. 2010). Οι δύο κυρίαρχοι ρόλοι που έχουν αποδοθεί στην προστατευτική ικανότητα της τρεχαλόζης είναι αφενός η μείωση της διαπερατότητας της πλασματικής μεμβράνης, η οποία συμβάλλει στη σταθεροποίηση της τελευταίας, αφετέρου η σωστή αναδίπλωση των κυτοπλασματικών πρωτεϊνών και η αποτροπή της συσσωμάτωσής τους (Mansure et al. 1994, Simola et al. 2000). Με αυτό τον τρόπο η τρεχαλόζη προστατεύει τις πρωτεΐνες του κυττάρου από την επίδραση της αιθανόλης, βελτιώνοντας την ανθεκτικότητα του μικροοργανισμού και βοηθώντας στην επιβίωση του.

Κατά τη διάρκεια καλλιέργειας κυττάρων παρουσία αιθανόλης, η τρεχαλόζη λειτουργεί ως ένας χημικός συνοδός με διττό ρόλο: να σταθεροποιεί τις πρωτεΐνες στην αρχική φυσική τους κατάσταση και να αποτρέπει την συσσωμάτωση των αποδιατεταγμένων πρωτεϊνών της μεμβράνης. Σε σύγκριση με άλλα σάκχαρα, η τρεχαλόζη αποδεικνύεται ιδιαίτερα αποτελεσματική στην προστασία των πρωτεϊνών ενάντια στην αφυδάτωση και τη συσσωμάτωση λόγω της ασυνήθιστης ικανότητας της να μεταβάλλει το υδάτινο περιβάλλον των πρωτεϊνών.

Η δεύτερη λειτουργία που της έχει αποδοθεί είναι η διατήρηση της σταθερότητας της πλασματικής μεμβράνης, με το να υποκαθιστά το νερό και να δημιουργεί δεσμούς με τις πολικές ομάδες των φωσφολιπιδίων (Sebollela et al. 2004). Το νερό παίζει κυρίαρχο ρόλο στη δομή των βιολογικών μεμβρανών επειδή μπορεί να διαπεράσει τη διπλοστοιβάδα των λιπιδίων και να σχηματίσει δεσμούς υδρογόνου με τις πολικές ομάδες των φωσφολιπιδίων. Η αιθανόλη μπορεί να υποκαταστήσει αυτό το ρόλο του νερού, και συνεπώς να μεταβάλλει τη χωροθέτηση των μορίων στις μεμβράνες, να επηρεάσει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των λιπιδίων και των πρωτεϊνών και τελικά να βλάψει τη δομή και τις λειτουργίες της μεμβράνης (Bary and Gawrisch 1995, Lucero et al. 1997). Υψηλές συγκεντρώσεις τρεχαλόζης, επαναφέρουν το νερό στη μεμβράνη, στη θέση που είχε καταλάβει η αιθανόλη, με αποτέλεσμα το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου μεταξύ των υδροξυλομάδων της τρεχαλόζης και των πολικών ομάδων των λιπιδίων, σταθεροποιώντας έτσι τη μεμβράνη (Leao and Van Uden 1984).

Τέλος, παρόλο που όλες σχεδόν οι έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί στο ζυμομύκητα *S.cerevisiae* έχουν δείξει ότι το ενδοκυτταρικό περιεχόμενο σε τρεχαλόζη αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα για μεγαλύτερη βιωσιμότητα παρουσία αιθανόλης και αυξημένο ρυθμό κυτταρικής ανάπτυξης, δεν έχει

παρατηρηθεί κάποια βελτίωση στη ζύμωση και στην παραγωγή αιθανόλης (Gomes et al. 2002).



**Εικόνα 10.** Τρεχαλόζη

#### 4.2.2 Πρωτεΐνες θερμικού σοκ (HSPs)

Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ (HSPs) είναι οι πιο κοινές προστατευτικές πρωτεΐνες και έχουν παρόμοια λειτουργία με αυτή της τρεχαλόζης. Δρουν ως συνοδοί μορίων για την προστασία των κυττάρων από τις επιδράσεις της αιθανόλης. Παρουσία αιθανόλης, λοιπόν, οι HSPs συμβάλλουν στη φυσιολογική αναδίπλωση άλλων πρωτεϊνών για να αποτρέψουν περαιτέρω καταστροφή και να επιδιορθώσουν ενδοκυτταρικές ζημιές (Craig et al. 1993).

Οι αρχικές μελέτες για τη σχέση των παραπάνω πρωτεϊνών με την ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών στην αιθανόλη πραγματοποιήθηκαν από τους Watson and Cavicchioli (1983) και έδειξαν ότι οι συνθήκες που προκαλούσαν αύξηση της σύνθεσης των HSPs, συνδέονταν με αύξηση της ανθεκτικότητας σε αιθανόλη. Μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι η ίδια η αιθανόλη σε συγκεντρώσεις 4-10% αυξάνει το ρυθμό της σύνθεσης των HSPs (Piper et al. 1994, Kubota et al. 2004). Πιο συγκεκριμένα, μελέτες στη ζύμη *Sc* παρουσία αιθανόλης αποκάλυψαν ότι η γονιδιακή έκφραση 14 HSPs αυξήθηκε από 3 έως 22 φορές (Alexandre et al 2001).

#### 4.3 Βελτιστοποίηση της σύστασης των θρεπτικών συστατικών

Η επίδραση που έχει η σύσταση του μέσου καλλιέργειας και των θρεπτικών συστατικών τόσο στην ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών στην αιθανόλη, όσο και στην παραγωγή της μέσω της ζύμωσης γλυκόζης, είναι πρωταρχικής σημασίας και

αποτελεί θέμα μελέτης από τους ερευνητές εδώ και τρεις δεκαετίες. Εκτός από την προσθήκη βιταμινών στο μέσο, που έχει αποδειχθεί ότι συμβάλλει στην ανθεκτικότητα των κυττάρων (Wang et al.1997), τα μεταλλικά ιόντα έχουν επίσης μελετηθεί εκτενώς. Έχει αποδειχθεί ότι τα ιόντα του καλίου, του μαγνησίου, του ασβεστίου και του ψευδαργύρου έχουν θετική επίδραση στο ρυθμό της παραγωγής αιθανόλης στη ζύμη *S.cerevisiae* (Chandrasena and Walker 1997), ενώ τα ιόντα του μαγνησίου και του ασβεστίου συμβάλλουν στην ανθεκτικότητα του μικροοργανισμού στην αιθανόλη και αυξάνουν το ρυθμό ανάπτυξής τους (Birch and Walker 2000, Nabais et al. 1988, Walker 1998). Συγκεκριμένα, το ιόν του μαγνησίου  $Mg^{2+}$  φαίνεται ότι συμβάλλει στη μείωση της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης παρουσία αιθανόλης, με αποτέλεσμα να αυξάνει την ανθεκτικότητα του μικροοργανισμού σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αιθανόλης ( Hu et al. 2003).

Κάποια μεταλλικά ιόντα, συμπεριλαμβανομένων των: μαγνήσιο, ασβέστιο, ψευδάργυρος, μαγγάνιο, σίδηρος και κοβάλτιο τα οποία λειτουργούν ως συμπαραγοντες των γλυκολυτικών ενζύμων έχουν επίσης μελετηθεί. Βρέθηκε ότι το μαγνήσιο και το ασβέστιο συμβάλλουν θετικά στην κυτταρική βιωσιμότητα και ότι το μαγνήσιο βοηθάει και στην κυτταρική ανάπτυξη, ενώ το ασβέστιο όχι (Bai et al. 2008). Το μαγγάνιο βελτιώνει σε μικρό ποσοστό τη βιωσιμότητα των κυττάρων αλλά και την παραγωγή αιθανόλης, ενώ το κοβάλτιο αύξανε το ρυθμό της ζύμωσης αλλά δεν βελτιώνει την ανθεκτικότητα σε αιθανόλη (Xue et al. 2008). Τέλος, όσον αφορά στον ψευδάργυρο ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ), βρέθηκε ότι βελτιώνει τη βιωσιμότητα των κυττάρων και την παραγωγή αιθανόλης. Από μετρήσεις παρατηρήθηκε ότι η αύξηση της συγκέντρωσης του προστιθέμενου ψευδάργυρου συνοδευόταν από αύξηση των ποσοστών της εργοστερόλης και της τρεχαλόζης του κυττάρου, με αποτέλεσμα να αυξάνεται και η ανθεκτικότητα του μικροοργανισμού παρουσία αιθανόλης (Zhao et al. 2008).

## **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## Υλικά και μέθοδοι

- Χημικά και διαλύματα

Όλα τα χημικά προϊόντα τα προμηθευτήκαμε από την εταιρία Sigma-Aldrich (USA).

- Μικροοργανισμοί

Ο μύκητας που χρησιμοποιήθηκε είναι ο *F. oxysporum* F3 που απομονώθηκε από κύμνο (Christakopoulos et al., 1989). Ο μύκητας αναπτύχθηκε σε potato-dextrose-agar PDA σε θερμοκρασία 30 °C για 5 ημέρες. Μετέπειτα διατηρήθηκε στους 4 °C.

- Προκαλλιέργεια

Για την προκαλλιέργεια του μύκητα χρησιμοποιήθηκαν κωνικές φιάλες των 250 ml οι οποίες είχαν αποστειρωθεί στους 110 °C για 40 λεπτά. Οι φιάλες περιείχαν 100mL απιονισμένου νερού με τα παρακάτω μεταλλικά άλατα: 1.00 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.30 g/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.30 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 10.0 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 6.94 g/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  και 9.52 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  καθώς επίσης και 20 g/L γλυκόζης. Το διάλυμα ρυθμίστηκε σε pH 6.0.

Ένα διάλυμα 15 mL απιονισμένου νερού προστέθηκε στο σωλήνα με τον αποθηκευμένο μικροοργανισμό και όγκος 5 mL από αυτό μεταφέρθηκε σε κάθε κωνική φιάλη. Τέλος, ο επωασμός της προκαλλιέργειας έγινε σε θερμοκρασία 30 °C για 2 ημέρες σε 200 rpm σε αναδευόμενο θάλαμο επώασης (ZHWHY-211C, ZHICHENG®).

- Αερόβια ανάπτυξη

Για την αερόβια ανάπτυξη του μύκητα χρησιμοποιήθηκαν κωνικές φιάλες των 250 ml οι οποίες είχαν αποστειρωθεί στους 110 °C για 40 λεπτά. Οι φιάλες περιείχαν 100mL απιονισμένου νερού με τα παρακάτω μεταλλικά άλατα: 1.00 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.30 g/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.30 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 10.0 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 6.94 g/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  και 9.52 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  καθώς επίσης και 20 g/L γλυκόζης. Το διάλυμα ρυθμίστηκε σε pH 6.0.

Σε κάθε μία κωνική φιάλη μεταφέρθηκε το 10% του όγκου της προκαλλιέργειας. Ανά δύο κωνικές φιάλες αντιστοιχούσε μία διαφορετική συνθήκη ανάπτυξης, δηλαδή

προστέθηκε διαφορετική συγκέντρωση αιθανόλης ή διαφορετική προστατευτική ουσία. Τέλος, ο επωασμός της καλλιέργειας έγινε σε θερμοκρασία 30 °C για 4 ημέρες σε 200 rpm σε αναδευόμενο θάλαμο επώασης (ZHWHY-211C, ZHICHENG®).

- Αναερόβια ανάπτυξη

Σε κωνικές φιάλες των 250 ml οι οποίες είχαν αποστειρωθεί στους 110 °C για 40 λεπτά και περιείχαν 20 ή 40 g/L γλυκόζης, μεταφέρθηκαν 100 mL της αερόβιας καλλιέργειας. Στις φυάλες προστέθηκε και η αντίστοιχη αρχική συγκέντρωση αιθανόλης ή προστατευτικής ουσίας. Τέλος, ο επωασμός της καλλιέργειας έγινε σε θερμοκρασία 30 °C για 4 ημέρες σε 80 rpm σε αναδευόμενο θάλαμο επώασης (ZHWHY-211C, ZHICHENG®).

- Βελτίωση ανθεκτικότητας

Για τη μελέτη της βελτίωσης της ανθεκτικότητας του μύκητα παρουσία αιθανόλης, οι διάφορες προστατευτικές ουσίες προστέθηκαν στην καλλιέργεια κατά τη φάση της αερόβιας ανάπτυξης προκειμένου να εισέλθουν στο μεταβολισμό του *F.oxysporum* όταν αυτός αναπτύσσεται.

Στη μελέτη της βελτίωσης της αναερόβιας, οι ουσίες είχαν ήδη προστεθεί από την αερόβια ανάπτυξη για τον ίδιο λόγο.

- Δειγματοληψία

Τα δείγματα λαμβάνονταν ανά εικοσιτετράωρο σε πλαστικά vials υπό στείρες συνθήκες σε θάλαμο νηματικής ροής. Αντιστοιχούσε ένα ζεύγος δειγμάτων ανά συνθήκη και τα αποτελέσματα των μετρήσεων αποτελούν το μέσο όρο των δύο δειγμάτων.

Στα δείγματα που χρησιμοποιούνταν για μέτρηση σακχάρων ή αιθανόλης, προηγούταν φυγοκέντρηση για 10 min σε ταχύτητα 5000rpm στη φυγόκεντρο TJ-6 CENTRIFUGE της εταιρίας BEKMAN®.

- Μετρήσεις βιομάζας

Ο υπολογισμός της βιομάζας του μύκητα έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο OD (optical density), όπου δείγματα μετά από κατάλληλες αραιώσεις και υπό συνεχή ανάδευση φωτομετρούνταν στα 600nm (S-22 UV/Vis Spectrophotometer, BOECO, Germany).

- Μετρήσεις αιθανόλης

Ο υπολογισμός της παραγόμενης αιθανόλης κατά την αναερόβια ανάπτυξη έγινε με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης HPLC. Πριν τις αναλύσεις τα δείγματα φιλτράρονταν (0,20 mm, Macherey-Nagel) για απομάκρυνση παρεμποδιζουσών ουσιών. Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν διάλυμα θειικού οξέος (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)5mM και η απαέρωση του γινόταν με ήλιο. Η ροή του διαλύτη ήταν 0,6ml/min, η ποσότητα της κάθε δειγματοληψίας ήταν 50μl και η κάθε ανάλυση διαρκούσε 30 min. Το σύστημα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Shimadzu UFLC με αυτόματο δειγματολήπτη και ανιχνευτή RID-10A Shimadzu. Η στήλη διαχωρισμού βρισκόταν σε 40°C και ήταν η HPLC Organic Acid Analysis Column, Animex<sup>®</sup> HPX-87H Ion Exclusion Column, 300mm\*7,8mm της εταιρίας BIORAD.

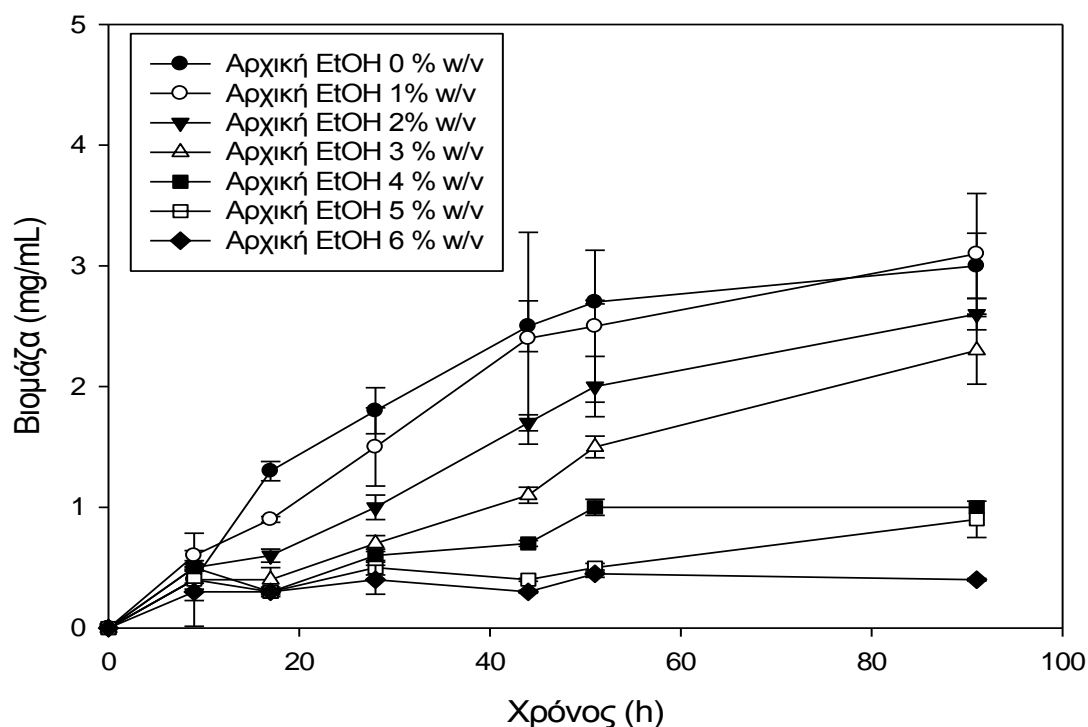
- Μετρήσεις σακχάρων

Ο υπολογισμός της εναπομείνουσας γλυκόζης στην καλλιέργεια κατά την αερόβια και αναερόβια ανάπτυξη του μύκητα έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS). Σύμφωνα με τη μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος, σε 250 μl δείγματος προστίθενται 250 μl διαλύματος DNS. Πραγματοποιείται βρασμός για 5min. Ακολουθεί προσθήκη 2 ml απιονισμένου νερού και φωτομέτρηση στα 540nm [Miller 1959]. (S-22 UV/Vis Spectrophotometer,BOECO, Germany).

## Αποτελέσματα – Συζήτηση

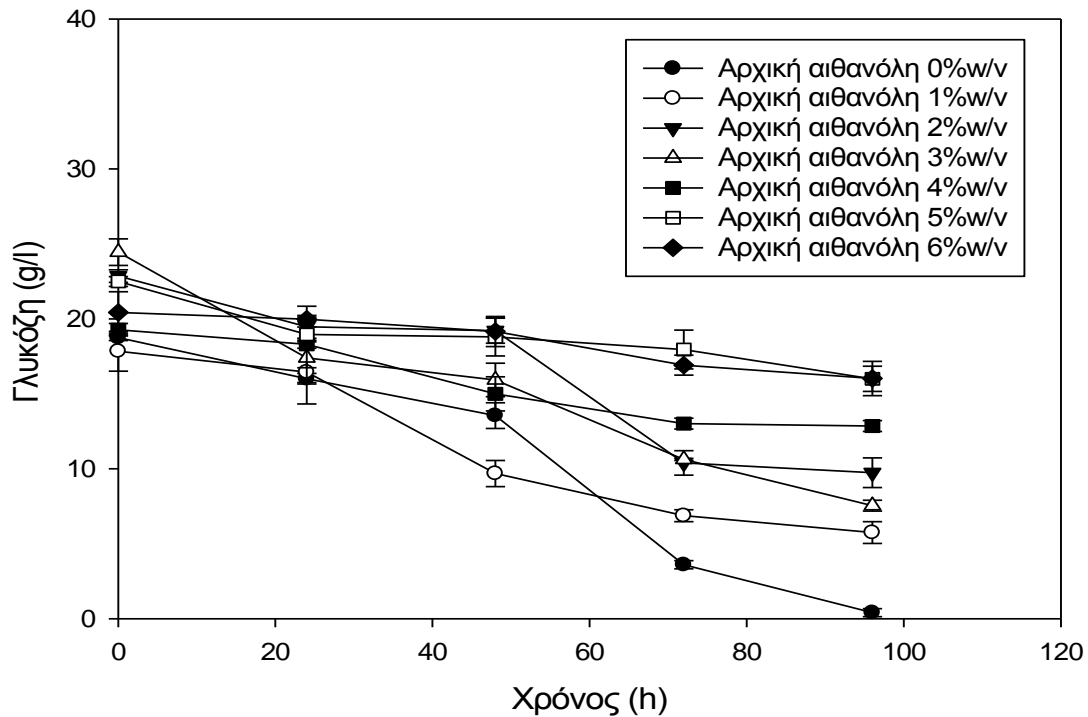
### Μελέτη ανάπτυξης του μύκητα *Fusarium oxysporum* σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις αιθανόλης.

Για να μελετηθεί η επίδραση της αιθανόλης στην ανάπτυξη του μύκητα *F.oxysporum*, ο μύκητας καλλιεργήθηκε αερόβια σε γλυκόζη συγκέντρωσης 2% w/v. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν. Σε κάθε ζεύγος κωνικών φιαλών αντιστοιχούσε και διαφορετική συνθήκη, δηλαδή στο διάλυμα είχε προστεθεί διαφορετική αρχική συγκέντρωση αιθανόλης και το αποτέλεσμα των μετρήσεων προέκυψε ως ο μέσος όρος των δύο. Οι περιεκτικότητες αιθανόλης που περιέχονταν ήταν αυξανόμενες από 0% w/v έως 6% w/v.



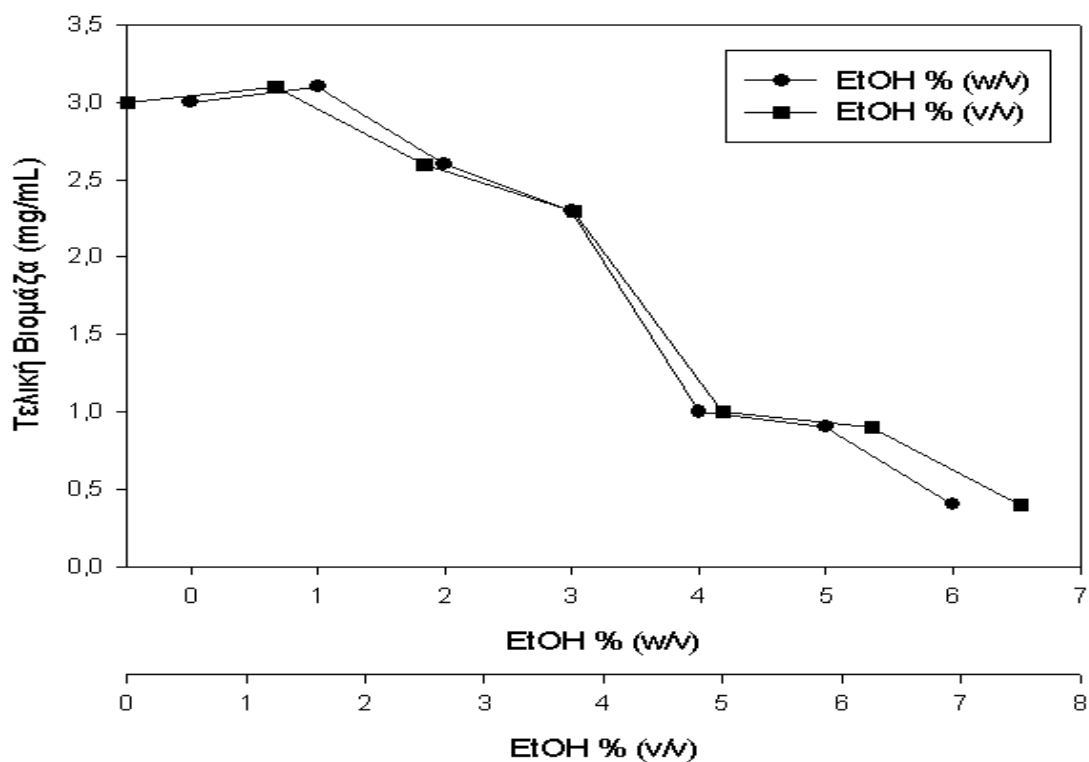
Διάγραμμα 1: Παραγωγή βιομάζας κατά την αερόβια ανάπτυξη του μύκητα σε σχέση με το χρόνο ανάλογα με την συγκέντρωση αιθανόλης που περιεχόταν στην καλλιέργεια.





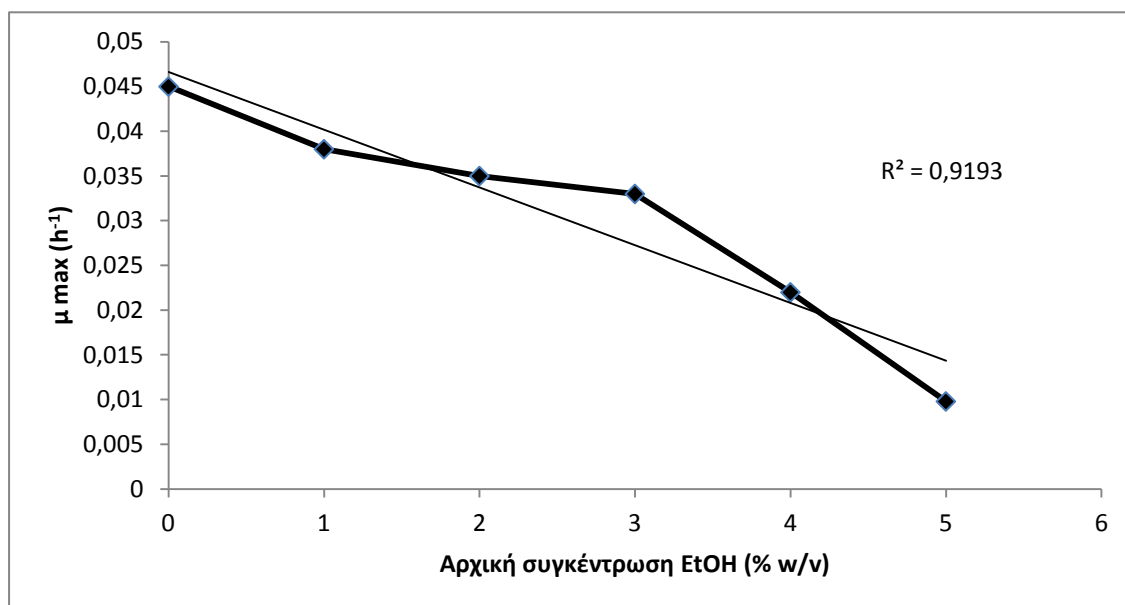
**Διάγραμμα 2: Κατανάλωση γλυκόζης κατά την αερόβια ανάπτυξη του μύκητα σε σχέση με το χρόνο ανάλογα με τη συγκέντρωση αιθανόλης που περιεχόταν στην καλλιέργεια.**

Από τα διαγράμματα 1 και 2 καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η παρουσία αιθανόλης επηρεάζει έντονα την ανθεκτικότητα του μικροοργανισμού. Η αύξηση της συγκέντρωσης της ουσίας στο μέσο καλλιέργειας του *F.oxysporum* μειώνει σημαντικά την ανάπτυξη του και την παραγωγή βιομάζας. Αυτό επιβεβαιώνεται και από τις μετρήσεις της γλυκόζης που φαίνονται και παραπάνω. Η καλλιέργεια που αναπτυσσόταν απουσία αιθανόλης κατανάλωσε σχεδόν όλη την παρεχόμενη γλυκόζη προς παραγωγή βιομάζας (3 mg/ml). Αντίθετα, στα δείγματα στα οποία είχε προστεθεί 5 ή 6% w/v αιθανόλη, το μεγαλύτερο ποσοστό γλυκόζης βρισκόταν στο διάλυμα την τελική ημέρα δειγματοληψίας, δηλαδή δεν είχε καταναλωθεί από τον μύκητα, αφού ο ίδιος δεν είχε αναπτυχθεί. Η μέγιστη παραγωγή βιομάζας που μετρήθηκε για συγκέντρωση αιθανόλης 6% ήταν μόλις 0,4 mg/ml οπότε και εξάγεται το πρωταρχικό συμπέρασμα της ισχυρής παρεμπόδισης της αερόβιας ανάπτυξης.



**Διάγραμμα 3:** Μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας του μύκητα *F.oxysporum* κατά την ανάπτυξη του σε διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις αιθανόλης.

Στο παραπάνω διάγραμμα παρουσιάζεται η τελική συγκέντρωση βιομάζας που παράχθηκε από το μικροοργανισμό ανάλογα με τη συνθήκη στην οποία αναπτυσσόταν. Βρέθηκε ότι η μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας μειώνεται με την αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης της αιθανόλης. Συγκέντρωση αιθανόλης της τάξης του 6% w/v προκαλεί μείωση στην παραγωγή βιομάζας κατά 90%.



**Διάγραμμα 4:** Μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων του *F. oxysporum* συναρτήσει της αρχικής συγκέντρωσης αιθανόλης. Η σχέση που προκύπτει είναι η  $\mu_{\max} = (-0,0065 * C_{\text{EtOH}}) + 0,0466$ .

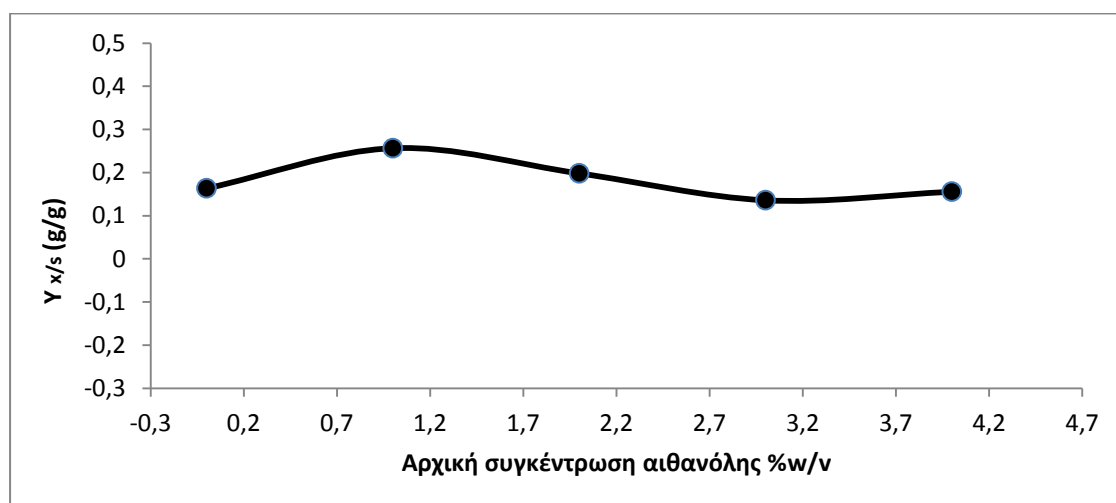
Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα, η μείωση του μέγιστου ρυθμού ανάπτυξης που παρατηρείται στα κύτταρα του μύκητα και η αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης της αιθανόλης συνδέονται με γραμμική σχέση. Αυτή είναι η  $\mu_{\max} = (-0,0065 * C_{\text{EtOH}}) + 0,0466$  απ' την οποία προκύπτει ότι για αρχική αιθανόλη 7,17% w/v ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης μηδενίζεται, οπότε σταματά και κάθε μεταβολική δραστηριότητα του μικροοργανισμού. Επίσης ο μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης απουσία αιθανόλης που βρέθηκε ότι είναι  $0,043 \text{ h}^{-1}$  συμφωνεί με παλαιότερες μελέτες (Panagiotou et al. 2004).

Η παρουσία αιθανόλης επηρεάζει και τη διάρκεια της λανθάνουσας φάσης, για την οποία παρατηρείται αύξηση με αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης της αιθανόλης, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα. Συμπεραίνεται, λοιπόν, ότι τα κύτταρα χρειάζονται περισσότερο χρόνο για να εγκλιματιστούν σε μεγάλες περιεκτικότητες αιθανόλης, ενώ για άνω του 5% w/v δεν παρατηρείται λανθάνουσα φάση γιατί τα κύτταρα έχουν σχεδόν μηδενικούς ρυθμούς ανάπτυξης, οπότε και δεν διαχωρίζονται φάσεις.

**Πίνακας 1:** Διάρκεια λανθάνουσας φάσης κατά την ανάπτυξη των κυττάρων σε διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις αιθανόλης.

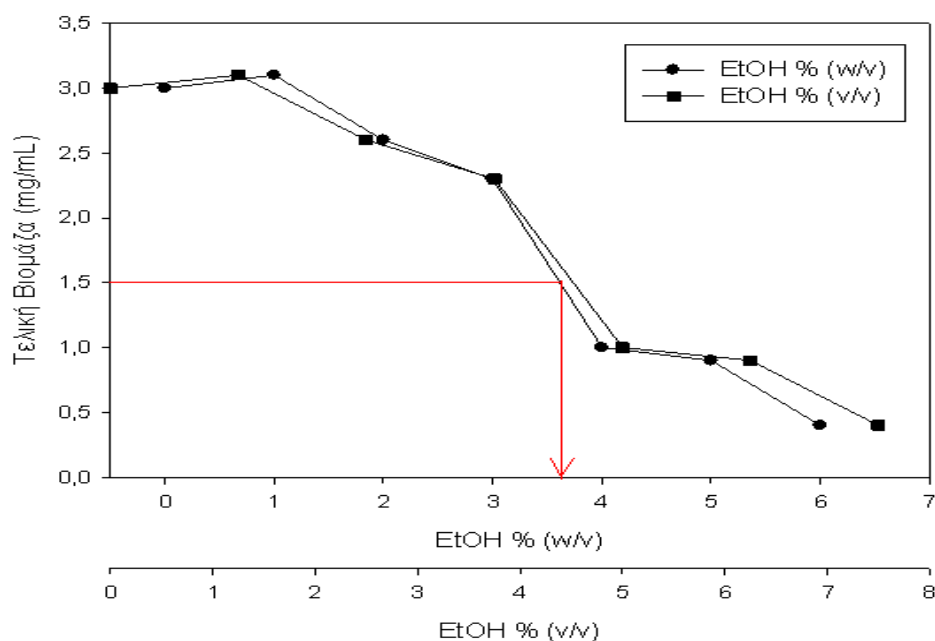
EtOH %	Λανθάνουσα φάση (h)
0	9
1	9
2	17
3	28
4	44
5	0
6	0

Από τα αποτελέσματα των μετρήσεων διαπιστώθηκε επίσης ότι ο συντελεστής μετατροπής των θρεπτικών συστατικών σε κύτταρα  $Y_{x/s}$  δεν παρουσιάζει ιδιαίτερες αποκλίσεις συναρτήσει της συγκέντρωσης της αιθανόλης που περιέχεται στο διάλυμα, όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 5. Τα κύτταρα, δηλαδή, χρησιμοποιούν όση γλυκόζη μεταβολίζουν, για την παραγωγή βιομάζας -ανεξάρτητα της συγκέντρωσης της αιθανόλης- χωρίς να οδηγούν το μεταβολισμό τους σε διαφορετικά μεταβολικά μονοπάτια. Σε κανένα πείραμα δεν παρατηρείται κάποια δυσανάλογη κατανάλωση υποστρώματος και παραγωγή κυττάρων ώστε να δικαιολογείται μόλυνση. Τα αποτελέσματα μας για την τιμή του συντελεστή μετατροπής συμφωνούν με παλαιότερες μελέτες (Panagiotou et al. 2004).



**Διάγραμμα 5:** Συντελεστής μετατροπής θρεπτικών σε βιομάζα συναρτήσει της αρχικής συγκέντρωσης αιθανόλης.

Η ποσότητα αιθανόλης που έχει προστεθεί στο μέσο καλλιέργειας πριν την αερόβια ανάπτυξη και προκαλεί παρεμπόδιση στην κυτταρική ανάπτυξη κατά 50% είναι 3,7 % w/v.



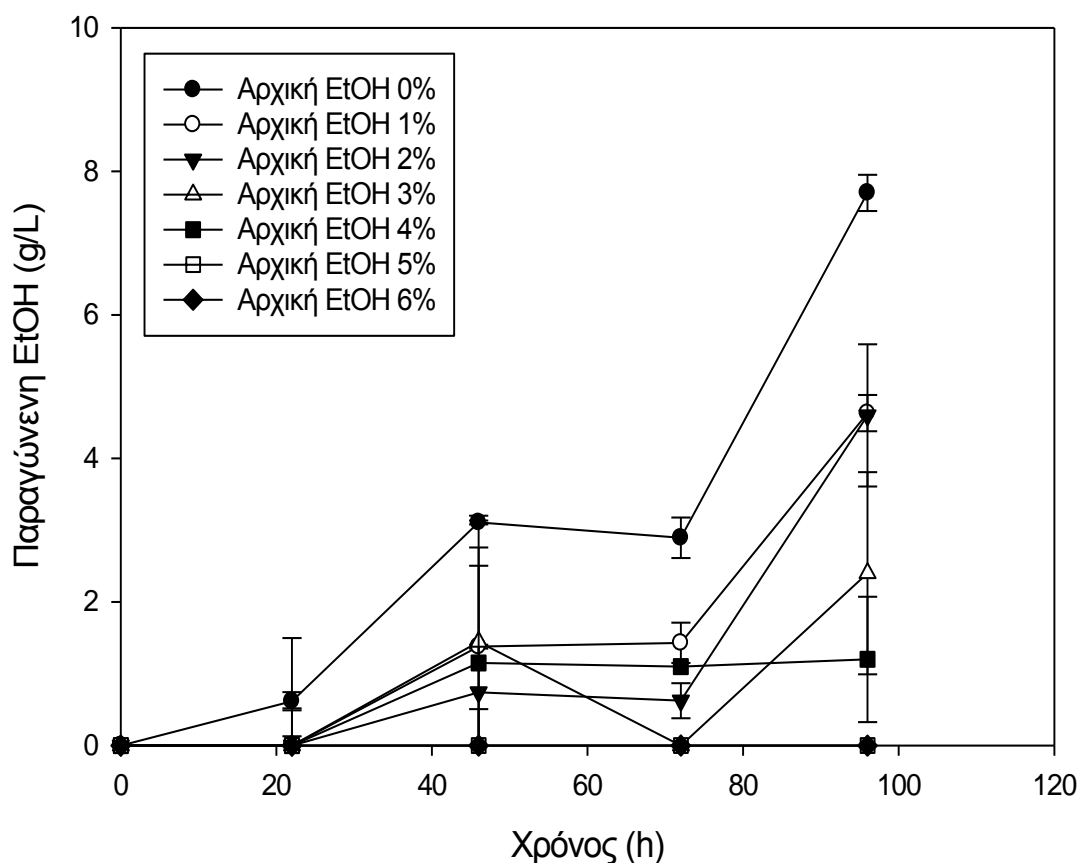
**Διάγραμμα 6:** Συγκέντρωση αιθανόλης που απαιτείται για τη μείωση της ανάπτυξης κατά 50%.

Συνολικά, από τη μελέτη των διαγραμμάτων και πινάκων επίδρασης της αιθανόλης στην αερόβια ανάπτυξη του μικροοργανισμού, μπορούμε να εξαγάγουμε το συμπέρασμα ότι η αιθανόλη παρεμποδίζει έντονα το μύκητα *F.oxysporum* κατά τη διάρκεια της αερόβιας ανάπτυξης του. Η παρεμπόδιση αυξάνεται γραμμικά με την αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης της αιθανόλης στο μέσο καλλιέργειας.

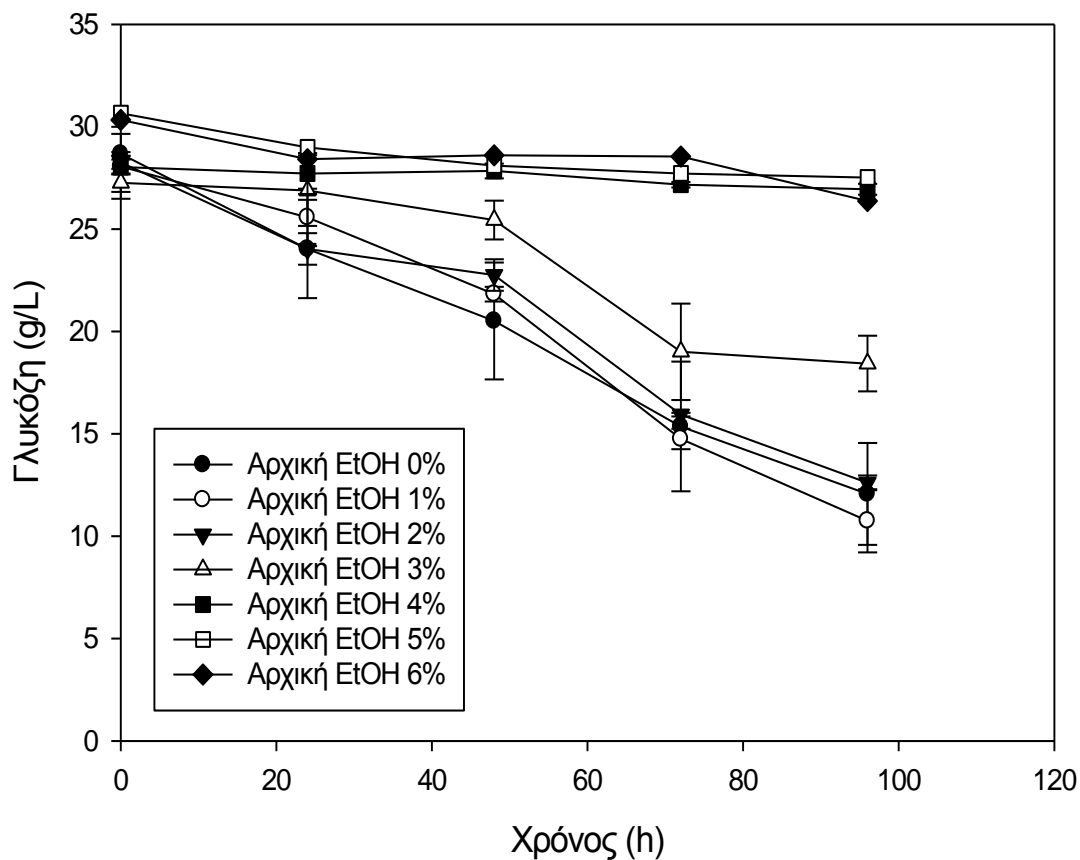
## Μελέτη ζύμωσης του μύκητα *Fusarium oxysporum* σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις αιθανόλης.

Για να μελετηθεί η επίδραση της αιθανόλης στη ζύμωση της γλυκόζης από τον *F.oxysporum*, πραγματοποιήθηκαν δύο σειρές πειραμάτων, μία με συγκέντρωση γλυκόζης 2% w/v και μία με συγκέντρωση 4% w/v. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε δυάδες. Σε κάθε ζεύγος κωνικών φιαλών αντιστοιχούσε και διαφορετική συνθήκη, δηλαδή στο διάλυμα είχε προστεθεί διαφορετική αρχική συγκέντρωση αιθανόλης και το αποτέλεσμα των μετρήσεων προέκυψε ως ο μέσος όρος των δύο. Οι περιεκτικότητες αιθανόλης που περιέχονταν ήταν αυξανόμενες από 0% w/v έως 6% w/v.

### Μελέτη ζύμωσης σε υπόστρωμα συγκέντρωσης 2% w/v.

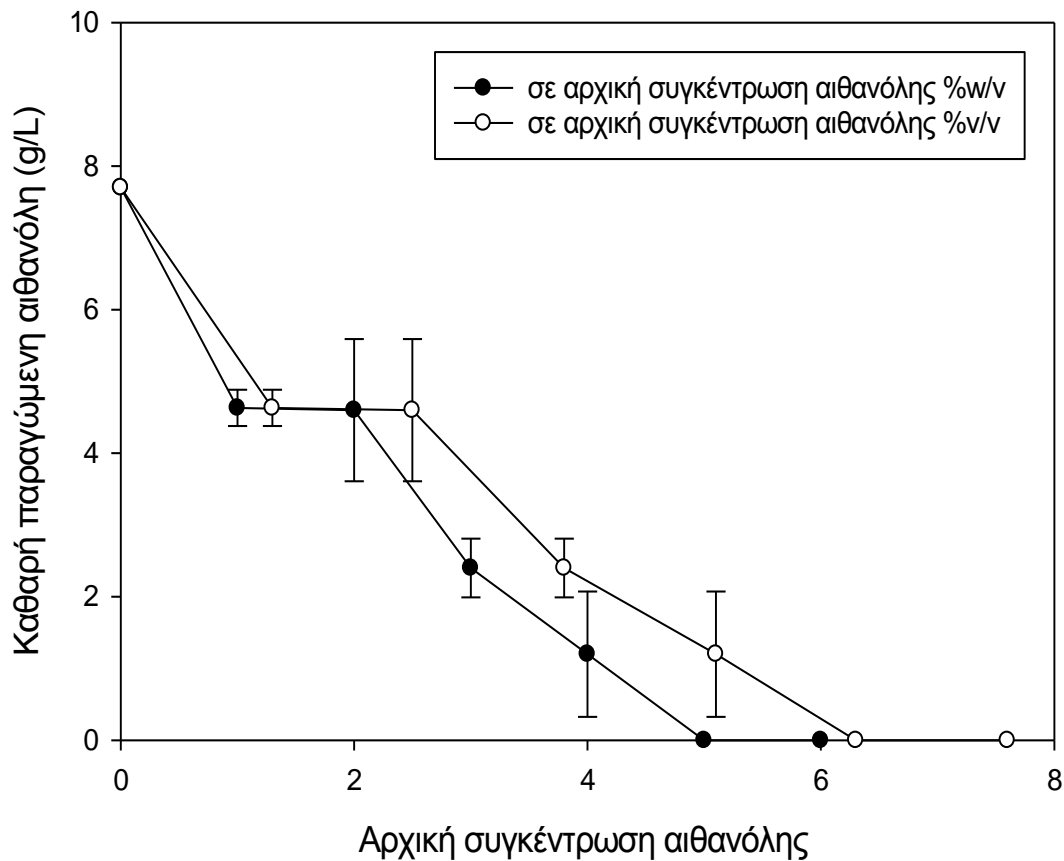


Διάγραμμα 7: Καθαρή παραγωγή αιθανόλης κατά τη ζύμωση του μύκητα σε σχέση με το χρόνο ανάλογα με την συγκέντρωση αιθανόλης που περιεχόταν στην καλλιέργεια.



**Διάγραμμα 8: Κατανάλωση γλυκόζης κατά τη ζύμωση του μύκητα σε σχέση με το χρόνο ανάλογα με τη συγκέντρωση αιθανόλης που περιεχόταν στην καλλιέργεια.**

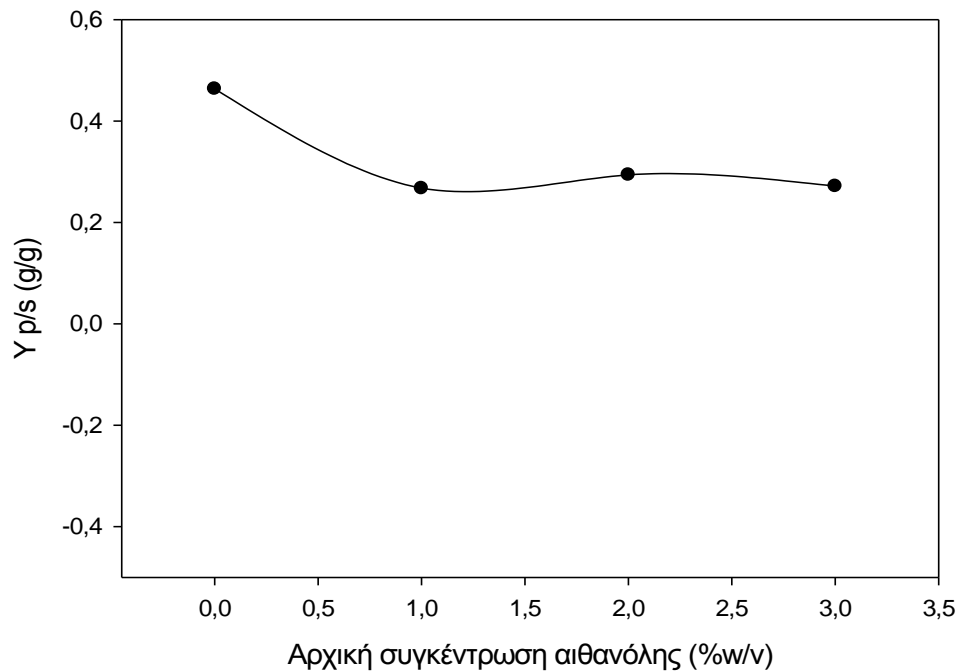
Από τα διαγράμματα 7 και 8 καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η παρουσία αιθανόλης στο μέσο καλλιέργειας του *F.oxysporum* επηρεάζει έντονα την ανθεκτικότητα του μικροοργανισμού. Η αύξηση της συγκέντρωσης της ουσίας συνοδεύεται από σημαντική μείωση στην καθαρή παραγωγή αιθανόλης. Αυτό επιβεβαιώνεται και από τις μετρήσεις του υποστρώματος που φαίνονται και παραπάνω. Η καλλιέργεια που αναπτυσσόταν απουσία αιθανόλης κατανάλωσε μεγάλη ποσότητα γλυκόζης (16,6 g/L) προς παραγωγή αιθανόλης (7,7 mg/ml). Αντίθετα, στα δείγματα στα οποία είχε προστεθεί 5 ή 6% w/v αιθανόλη, το μεγαλύτερο ποσοστό γλυκόζης βρισκόταν στο διάλυμα την τελική ημέρα δειγματοληψίας, δηλαδή δεν είχε καταναλωθεί από τον μύκητα, αφού η παρουσία της διέκοψε την μεταβολική λειτουργία του *F. oxysporum*. Συγκεκριμένα, τα δείγματα στα οποία είχε προστεθεί 5 και 6% w/v αιθανόλη, παρουσίασαν μηδενική παραγωγή αιθανόλης. Από τα παραπάνω εξάγεται το συμπέρασμα της ισχυρής παρεμπόδισης της ζύμωσης από την αιθανόλη.



**Διάγραμμα 9: Μέγιστη καθαρή παραγόμενη αιθανόλη κατά τη ζύμωση του μύκητα σε σχέση με τη συγκέντρωση αιθανόλης που περιεχόταν αρχικά στην καλλιέργεια.**

Στο παραπάνω διάγραμμα παρουσιάζεται η τελική συγκέντρωση αιθανόλης που παράχθηκε από το μικροοργανισμό ανάλογα με τη συνθήκη στην οποία αναπτυσσόταν. Βρέθηκε ότι η μέγιστη συγκέντρωση παραγόμενης αιθανόλης μειώνεται με την αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης της αιθανόλης. Συγκέντρωση αιθανόλης της τάξης του 4% w/v προκαλεί μείωση στην παραγωγή αιθανόλης κατά 84%. Όσο αυξάνεται κι άλλο η αρχική συγκέντρωση αιθανόλης, η παραγωγή αιθανόλης μηδενίζεται.

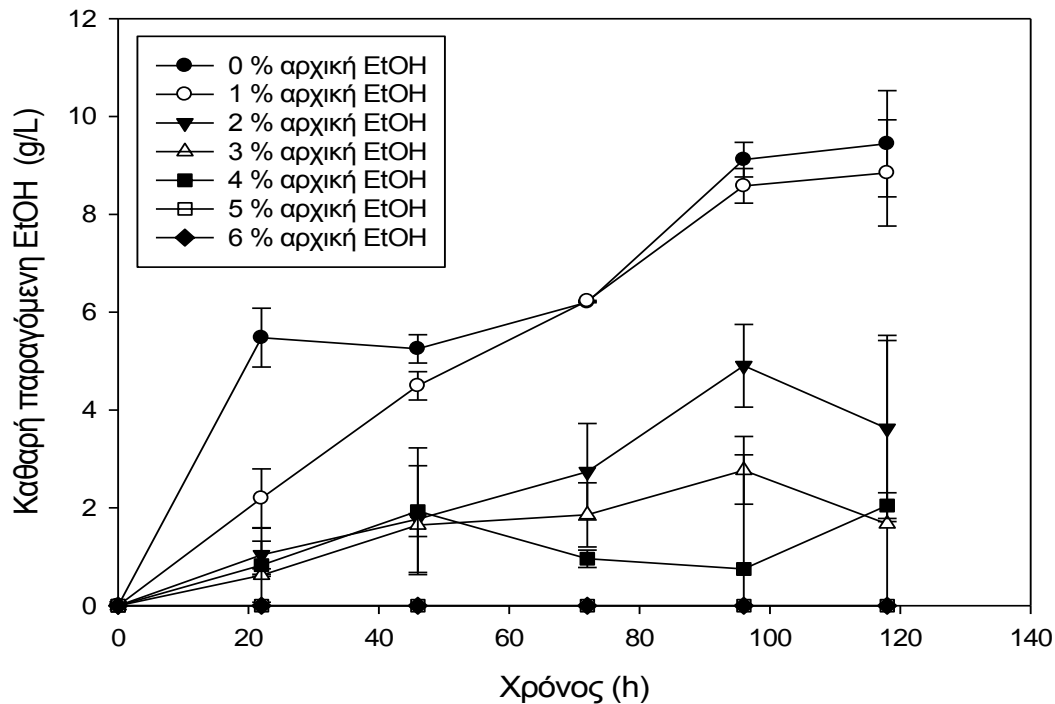




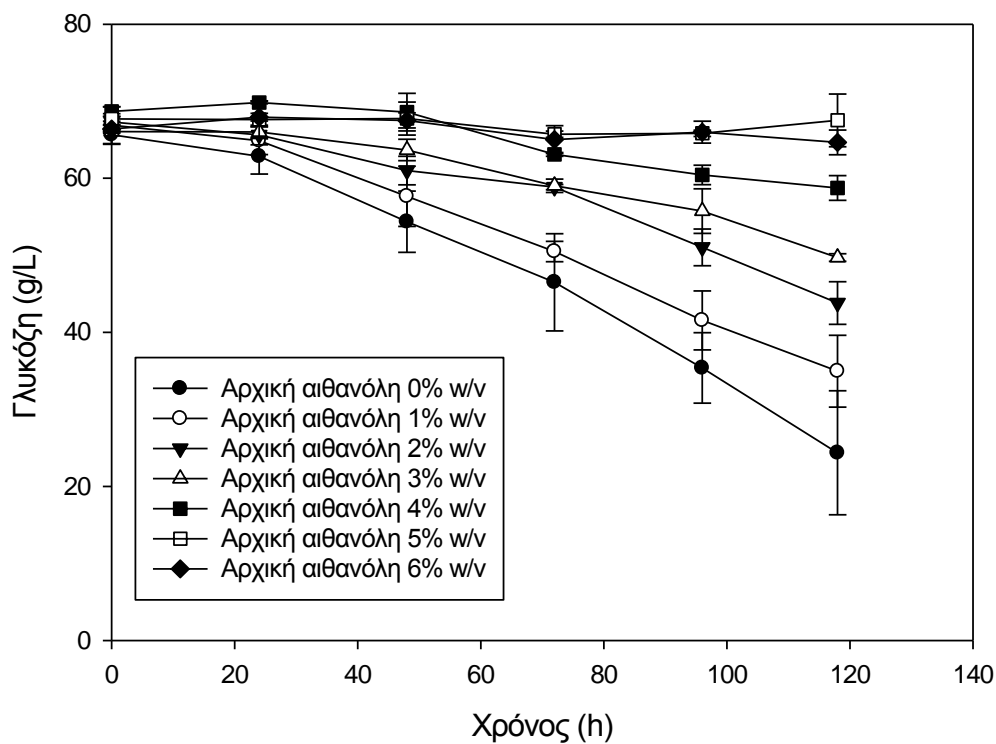
**Διάγραμμα 10:** Συντελεστής μετατροπής θρεπτικών σε προϊόν συναρτήσει της αρχικής συγκέντρωσης αιθανόλης.

Από τα αποτελέσματα των μετρήσεων διαπιστώθηκε επίσης ότι ο συντελεστής μετατροπής των θρεπτικών συστατικών σε αιθανόλη  $Y_{p/s}$  δεν παρουσιάζει ιδιαίτερες αποκλίσεις συναρτήσει της συγκέντρωσης της αιθανόλης που περιέχεται στο διάλυμα, όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 10. Τα κύτταρα, δηλαδή, χρησιμοποιούν την γλυκόζη που μεταβολίζουν για την παραγωγή αιθανόλης, χωρίς η αρχική συγκέντρωση της αιθανόλης να ενεργοποιεί διαφορετικά μονοπάτια. Σε κανένα πείραμα δεν παρατηρείται κάποια δυσανάλογη κατανάλωση υποστρώματος και παραγωγή αιθανόλης.

**Μελέτη ζύμωσης σε υπόστρωμα συγκέντρωσης 4% w/v.**

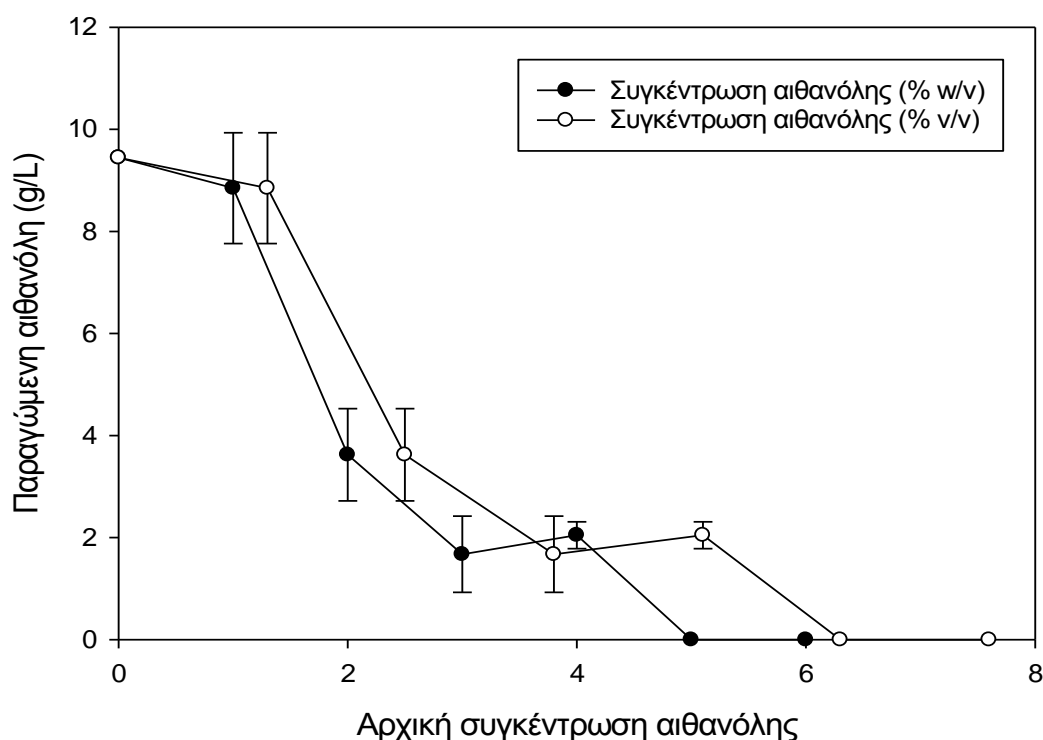


**Διάγραμμα 11:** Καθαρή παραγωγή αιθανόλης κατά τη ζύμωση του μύκητα σε σχέση με το χρόνο ανάλογα με την συγκέντρωση αιθανόλης που περιεχόταν στην καλλιέργεια.



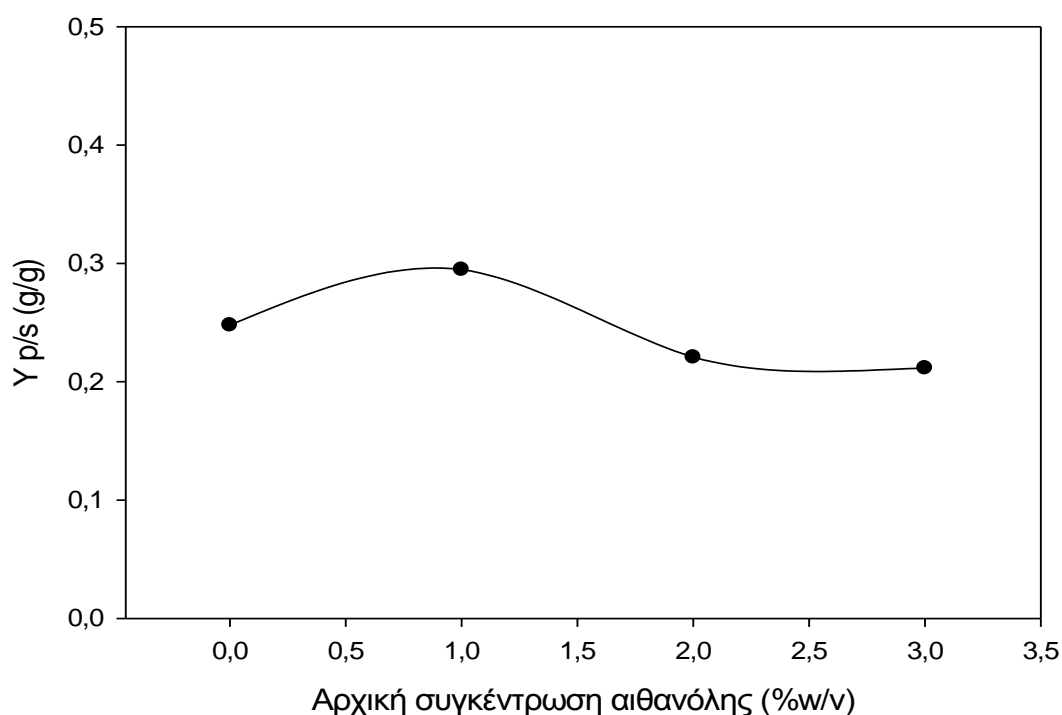
**Διάγραμμα 12:** Κατανάλωση γλυκόζης κατά τη ζύμωση του μύκητα σε σχέση με το χρόνο ανάλογα με τη συγκέντρωση αιθανόλης που περιεχόταν στην καλλιέργεια.

Από τα διαγράμματα 11 και 12 καταλήγουμε σε παρόμοια συμπεράσματα με αυτά για τη μελέτη της ζύμωσης σε 2% υπόστρωμα. Η παρουσία της αιθανόλης στο μέσο καλλιέργειας του *F.oxysporum* επηρεάζει έντονα την ανθεκτικότητα του μικροοργανισμού και με υπόστρωμα 4% w/v. Η αύξηση της συγκέντρωσης της ουσίας συνοδεύεται από σημαντική μείωση στην καθαρή παραγωγή αιθανόλης. Αυτό επιβεβαιώνεται και από τις μετρήσεις του υποστρώματος που φαίνονται και παραπάνω. Η καλλιέργεια που αναπτυσσόταν απουσία αιθανόλης κατανάλωσε μεγάλη ποσότητα γλυκόζης (37,9 g/L) προς παραγωγή αιθανόλης (9,5 mg/ml). Αντίθετα, στα δείγματα στα οποία είχε προστεθεί 5 ή 6% w/v αιθανόλη, το μεγαλύτερο ποσοστό γλυκόζης βρισκόταν στο διάλυμα την τελική ημέρα δειγματοληψίας, δηλαδή δεν είχε καταναλωθεί από τον μύκητα.. Συγκεκριμένα, τα δείγματα στα οποία είχε προστεθεί 5 και 6% w/v αιθανόλη, παρουσίασαν μηδενική παραγωγή αιθανόλης και πολύ μικρή κατανάλωση υποστρώματος. Από τα παραπάνω εξάγεται το συμπέρασμα της ισχυρής παρεμπόδισης της ζύμωσης από την αιθανόλη ακόμα και σε μεγαλύτερη συγκέντρωση υποστρώματος σε σύγκριση με τη πρώτη σειρά πειραμάτων.



**Διάγραμμα 13:** Μέγιστη καθαρή παραγόμενη αιθανόλη κατά τη ζύμωση του μύκητα σε σχέση με τη συγκέντρωση αιθανόλης που περιεχόταν αρχικά στην καλλιέργεια.

Στο παραπάνω διάγραμμα παρουσιάζεται η τελική συγκέντρωση αιθανόλης που παράχθηκε από το μικροοργανισμό ανάλογα με τη συνθήκη στην οποία αναπτυσσόταν. Βρέθηκε ότι η μέγιστη συγκέντρωση παραγόμενης αιθανόλης μειώνεται με την αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης της αιθανόλης. Συγκέντρωση αιθανόλης της τάξης του 4% w/v προκαλεί μείωση στην παραγωγή αιθανόλης κατά 38%. Όσο αυξάνεται κι άλλο η αρχική συγκέντρωση αιθανόλης, η παραγωγή αιθανόλης μηδενίζεται.



**Διάγραμμα 14:** Συντελεστής μετατροπής θρεπτικών σε προϊόν συναρτήσει της αρχικής συγκέντρωσης αιθανόλης.

Από τα αποτελέσματα των μετρήσεων διαπιστώθηκε επίσης ότι ο συντελεστής μετατροπής των θρεπτικών συστατικών σε αιθανόλη  $Y_{p/s}$  δεν παρουσιάζει ιδιαίτερες αποκλίσεις συναρτήσει της συγκέντρωσης της αιθανόλης που περιέχεται στο διάλυμα, όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 14. Σε κανένα πείραμα δεν παρατηρείται κάποια δυσανάλογη κατανάλωση υποστρώματος και παραγωγή κυττάρων.

Πίνακας 2: Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων για τη ζύμωση παρουσία αιθανόλης σε υπόστρωμα 4% w/v.

Αρχική συγκέντρωση αιθανόλης (%w/v)	Ποσότητα γλυκόζης που καταναλώθηκε (g/L)	Καθαρή ποσότητα παραγόμενης αιθανόλης (g/L)	%
0	33,7	9,4	32,1
1	29,5	8,8	35,0
2	21,0	4,9	29,5
3	15,3	2,7	24,7
4	7,7	2	26,1
5	4,4	0	0
6	4,5	0	0

Στον πίνακα 2 συνοψίζονται οι μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή του πειράματος. Επιπλέον, εξάγεται η επί τοις εκατό απόδοση σε αιθανόλη. Προκύπτει ότι η απόδοση δεν παρουσιάζει σημαντικές μεταβολές με την αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης της αιθανόλης. Από αυτό συμπεραίνουμε ότι όση γλυκόζη καταναλώνεται από τα κύτταρα χρησιμοποιείται για την παραγωγή αιθανόλης και ότι η αύξηση της συγκέντρωσης της αιθανόλης προκαλεί μείωση στην κατανάλωση της γλυκόζης από το μύκητα.

## **Μελέτη βελτίωσης της ανθεκτικότητας του μύκητα *Fusarium oxysporum* στην αιθανόλη κατά την ανάπτυξη και τη ζύμωση.**

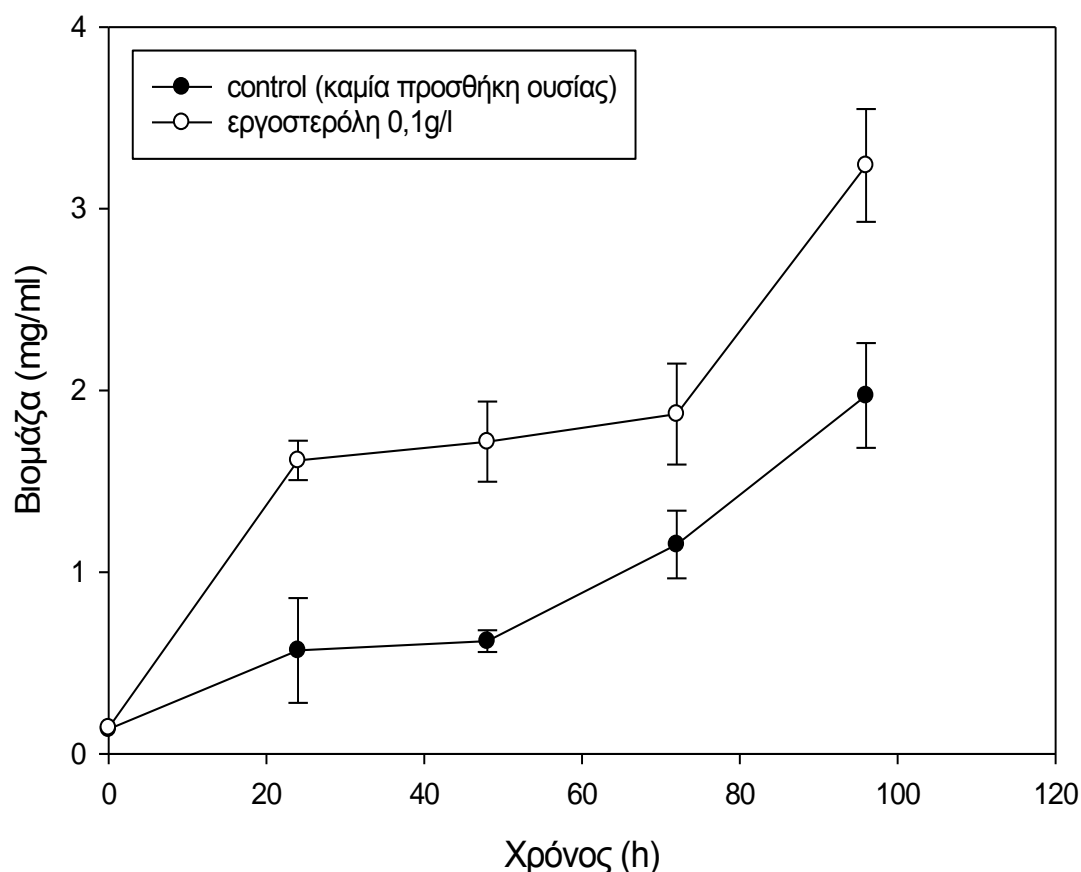
Για να μελετηθεί η επίδραση κάποιων ουσιών στην ανθεκτικότητα του μικροοργανισμού παρουσία αιθανόλης στην ανάπτυξη του σε αερόβιες συνθήκες καθώς και στη ζύμωση της γλυκόζης προς αιθανόλη, πραγματοποιήθηκαν δύο σειρές πειραμάτων. Αρχικά, ο μύκητας καλλιεργήθηκε αερόβια σε γλυκόζη συγκέντρωσης 2% w/v αφού είχαν προστεθεί στο διάλυμα διαφορετικές συγκεντρώσεις των ουσιών ινοσιτόλη, εργοστερόλη, τρεχαλόζη καθώς και συνδυασμός αυτών. Σε όλα τα δείγματα είχε προστεθεί αρχική συγκέντρωση αιθανόλης. Η συγκέντρωση που επελέγη (3,7% w/v) είναι η συγκέντρωση της αιθανόλης που προκαλεί μείωση της ανάπτυξης των κυττάρων κατά 50% όπως υπολογίστηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο. Σε αυτή τη συνθήκη παρατηρείται σημαντική παρεμπόδιση στις μεταβολικές λειτουργίες του μύκητα, αλλά ωστόσο το ποσό της αρχικής αιθανόλης επιτρέπει να παρατηρηθεί τυχόν βελτίωση στην ανάπτυξη. Ακολούθησε η καλλιέργεια σε αναερόβιες συνθήκες, στην οποία οι προστατευτικές ουσίες είχαν προστεθεί ήδη από την αερόβια ανάπτυξη των κυττάρων ώστε να εισέλθουν στο μεταβολισμό τους όταν αυτά αναπτύσσονται. Η αρχική συγκέντρωση αιθανόλης που προστέθηκε στα δείγματα πριν τη ζύμωση ήταν 3% w/v, συγκέντρωση που προκαλεί μείωση της παραγόμενης αιθανόλης στο μισό. Οι λόγοι επιλογής αυτής της συνθήκης είναι παρόμοιοι με αυτούς της αερόβιας ανάπτυξης.

## **Μελέτη βελτίωσης της ανάπτυξης του μύκητα.**

Οι ουσίες ινοσιτόλη, εργοστερόλη και τρεχαλόζη που επιλέχθηκαν έχουν διαπιστωθεί από προηγούμενες μελέτες, που αναπτύχθηκαν στο Θεωρητικό μέρος, ότι βελτιώνουν σημαντικά το ρυθμό ανάπτυξης διαφόρων μικροοργανισμών, όπως η ζύμη *S.cerevisiae*. Στα επόμενα πειράματα θα μελετηθεί η ικανότητα των ουσιών αυτών να αυξήσουν την ανάπτυξη του μύκητα *F.oxysporum*.

## A) Εργοστερόλη

Η ουσία εργοστερόλη προστέθηκε στο μέσο καλλιέργειας των κυττάρων σε συγκέντρωση 0,1 g/L. Η συγκέντρωση αυτή επιλέχθηκε με βάση έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί σε ζυμομύκητες (Inpoue et al. 2000) και έχουν δείξει αύξηση στο ρυθμό ανάπτυξης τους.



Διάγραμμα 15: Παραγωγή βιομάζας κατά την αερόβια ανάπτυξη του μύκητα παρουσία εργοστερόλης και χωρίς καμία προστατευτική ουσία στο μέσο καλλιέργειας σε σχέση με το χρόνο.

Από το παραπάνω διάγραμμα προκύπτει ότι η ουσία εργοστερόλη σε συγκέντρωση 0,1 g/l βελτιώνει την ανάπτυξη του μύκητα παρουσία αιθανόλης. Η αύξηση στην τελική παραγόμενη βιομάζα είναι της τάξης του 60%. Αυτά τα συμπεράσματα επιβεβαιώνονται και από την κατανάλωση γλυκόζης του μικροοργανισμού προς παραγωγή κυττάρων, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν πως ο *F. oxysporum* μπορεί να εισάγει στο μεταβολισμό του την

εργοστερόλη και να την χρησιμοποιήσει για την προστασία του από τις επιπτώσεις της εξωκυτταρικής παρουσίας της αιθανόλης.

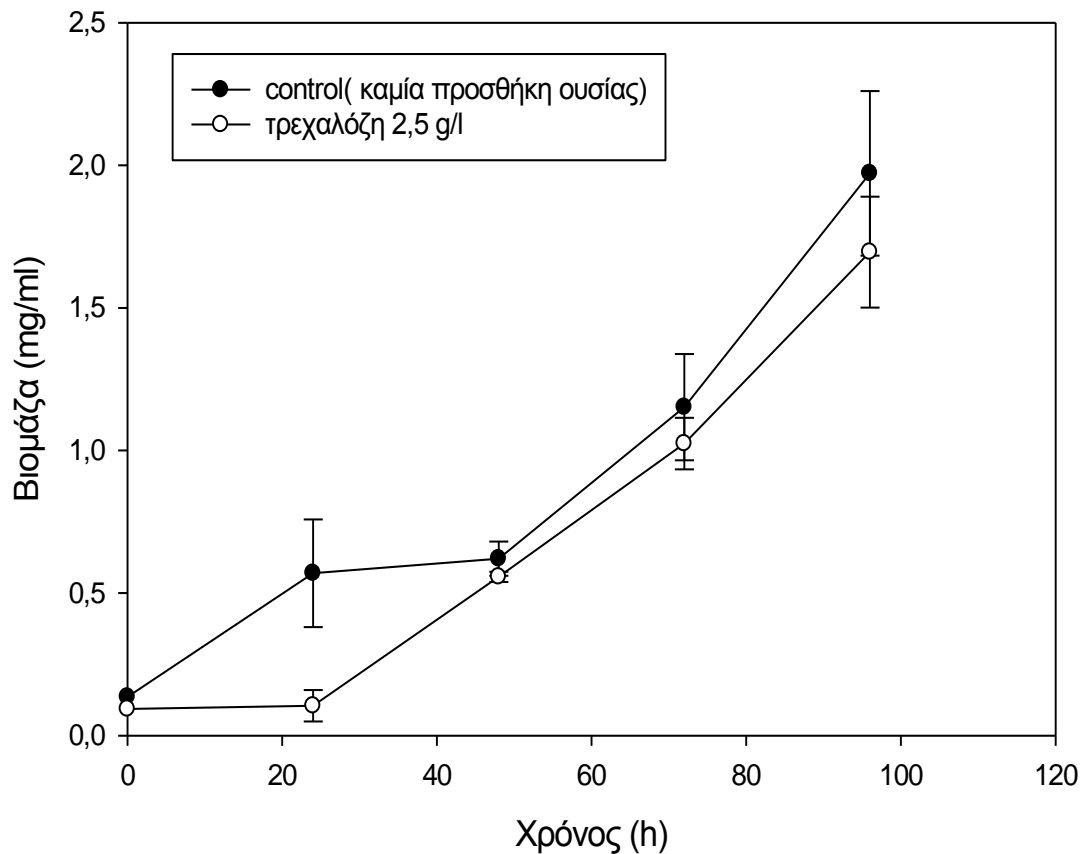
**Πίνακας 3: Ποσότητα υποστρώματος που καταναλώθηκε προς παραγωγή κυττάρων.**

<b>Ουσία που προστέθηκε παρουσία αιθανόλης 3,7% w/v</b>	<b>Καταναλωθέν υπόστρωμα (g/l)</b>
Εργοστερόλη 0,1 g/l	10,6

### **B) Τρεχαλόζη**

Η ουσία τρεχαλόζη προστέθηκε στο μέσο καλλιέργειας των κυττάρων σε συγκέντρωση 2,5 g/L. Η συγκέντρωση αυτή επιλέχθηκε με βάση έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί σε ζυμομύκητες (Ogawa et al. 2000) και έχουν δείξει αύξηση στο ρυθμό ανάπτυξης τους.





**Διάγραμμα 16:** Παραγωγή βιομάζας κατά την αερόβια ανάπτυξη του μύκητα παρουσία τρεχαλόζης και χωρίς καμία προστατευτική ουσία στο μέσο καλλιέργειας σε σχέση με το χρόνο.

Σύμφωνα με το διάγραμμα 16 η τρεχαλόζη σε συγκέντρωση 2,5 g/L δεν παρουσιάζει καμία βελτίωση της ανθεκτικότητας του μικροοργανισμού απέναντι στη δράση της αιθανόλης. Όπως φαίνεται και από τον επόμενο πίνακα, ο μικροοργανισμός κατανάλωσε πολύ μικρή ποσότητα του υποστρώματος.

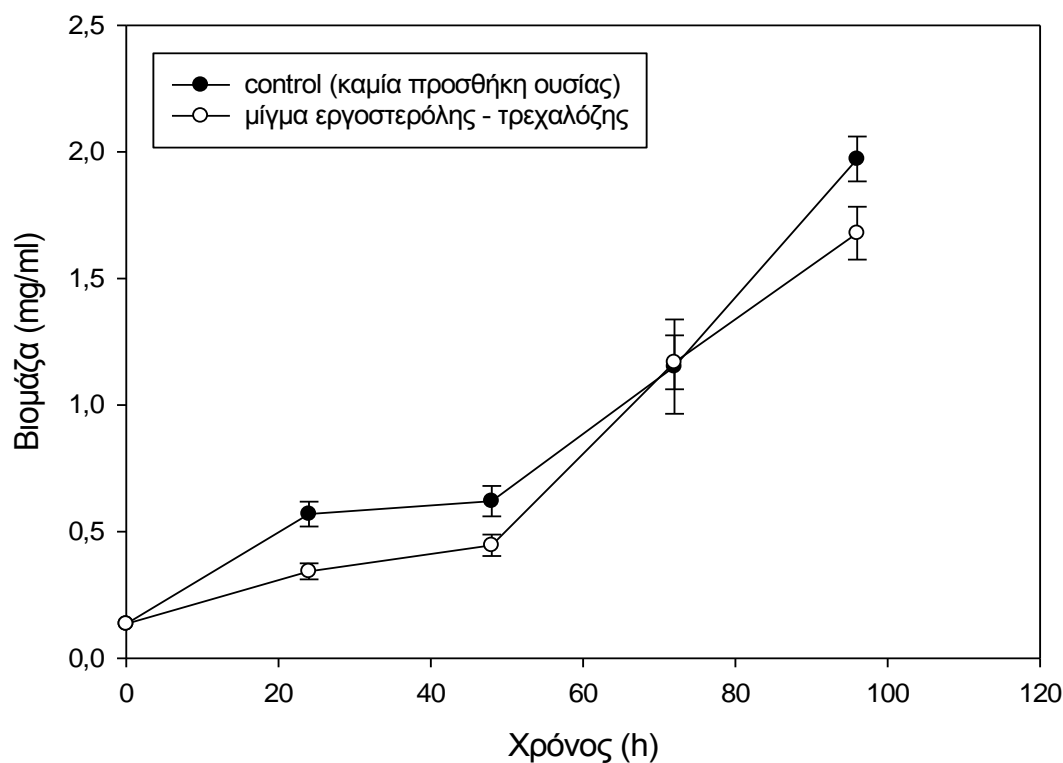
Φαίνεται από τα παραπάνω πως η παρουσία τρεχαλόζης δεν συμβάλει στην «προστασία» του μικροοργανισμού από την αρνητική δράση της αιθανόλης.

**Πίνακας 4:** Ποσότητα υποστρώματος που καταναλώθηκε προς παραγωγή κυττάρων.

Ουσία που προστέθηκε παρουσία αιθανόλης 3,7% w/v	Καταναλωθέν υπόστρωμα (g/l)
Τρεχαλόζη 2,5 g/l	8,4

### Γ) Συνδυασμός εργοστερόλης – τρεχαλόζης

Στο μέσο καλλιέργειας προστέθηκε επίσης ο συνδυασμός των ουσιών εργοστερόλη και τρεχαλόζη στις συγκεντρώσεις που είχαν προστεθεί και παραπάνω, δηλαδή 0,1 και 2,5 g/L αντίστοιχα.



**Διάγραμμα 17:** Παραγωγή βιομάζας κατά την αερόβια ανάπτυξη του μύκητα παρουσία συνδυασμού εργοστερόλης - τρεχαλόζης και χωρίς καμία προστατευτική ουσία στο μέσο καλλιέργειας σε σχέση με το χρόνο.

Συμπεραίνεται ότι ο συνδυασμός τρεχαλόζης – εργοστερόλης δεν παρουσιάζει καμία βελτίωση στην ανάπτυξη του μύκητα παρουσία αιθανόλης. Πράγματι, ο μικροοργανισμός δεν κατανάλωσε μεγάλη ποσότητα υποστρώματος που δικαιολογείται από την περιορισμένη παραγωγή βιομάζας.

Αν και η παρουσία εργοστερόλης συμβάλει στον περιορισμό της δράσης της αιθανόλης, στο παραπάνω πείραμα παρατηρείται πως ο συνδυασμός των δύο ουσιών δεν έχει την αναμενόμενη βελτίωση. Είναι πιθανό η παρουσία διαφορετικών «βελτιωτικών» ουσιών να μην έχει συνδυαστική αλλά ανταγωνιστική δράση.

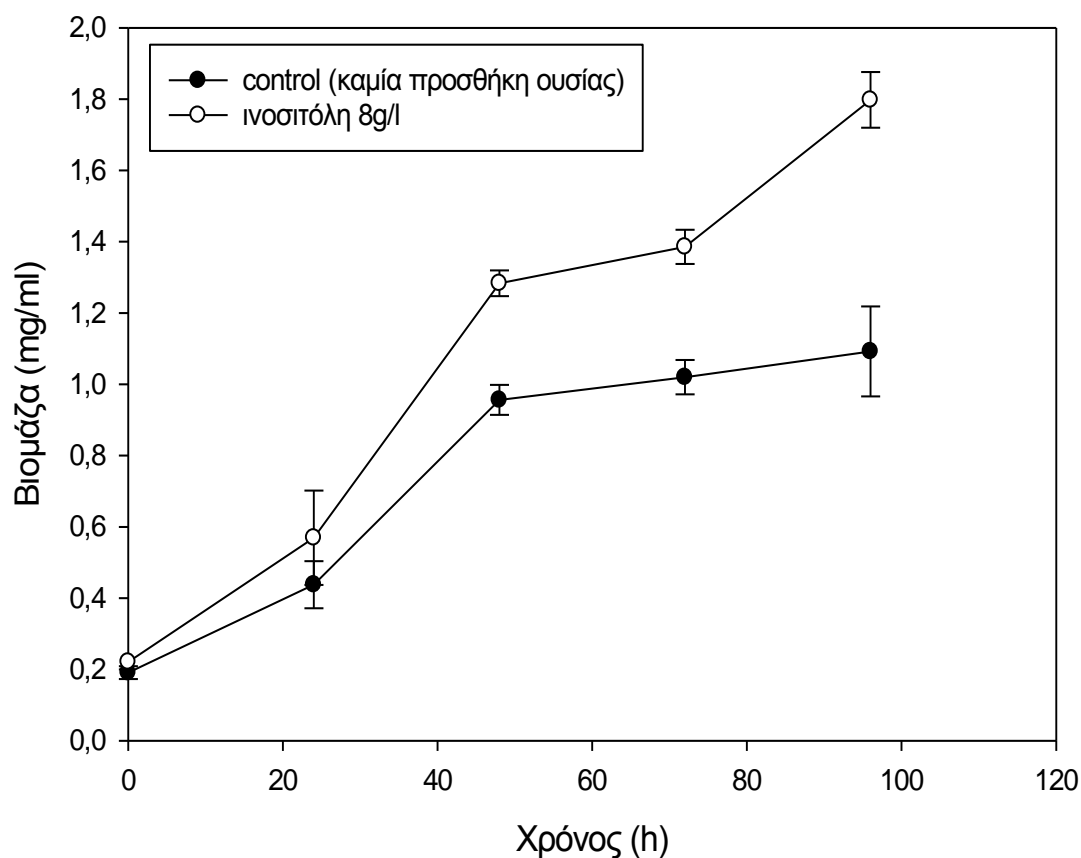
Πίνακας 5: Ποσότητα υποστρώματος που καταναλώθηκε προς παραγωγή κυττάρων.

Ουσία που προστέθηκε παρουσία αιθανόλης 3,7% w/v	Καταναλωθέν υπόστρωμα (g/l)
Συνδυασμός εργοστερόλης 0,1 g/l – τρεχαλόζης 2,5 g/l	4,7

## Δ) Ινοσιτόλη

### ι) Ινοσιτόλη 8 g/L

Η ουσία ινοσιτόλη προστέθηκε στο μέσο καλλιέργειας των κυττάρων σε συγκέντρωση 8 g/L. Η συγκέντρωση αυτή επιλέχθηκε με βάση έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί σε ζυμομύκητες (Furukawa et al. 2004) και έχουν δείξει αύξηση στο ρυθμό ανάπτυξης τους.



Διάγραμμα 18: Παραγωγή βιομάζας κατά την αερόβια ανάπτυξη του μύκητα παρουσία ινοσιτόλης 8g/L και χωρίς καμία προστατευτική ουσία στο μέσο καλλιέργειας σε σχέση με το χρόνο.

Από το διάγραμμα 18 εξάγεται το συμπέρασμα ότι η ουσία ινοσιτόλη σε συγκέντρωση 8 g/L έχει την ικανότητα να βελτιώνει την ανάπτυξη του μύκητα και την παραγωγή κυττάρων παρουσία αιθανόλης. Από τις μετρήσεις προκύπτει αύξηση στην παραγωγή κυττάρων κατά 64%. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν πως ο μύκητας *F. oxysporum* μπορεί να εισάγει στο μεταβολισμό του την ινοσιτόλη και να την χρησιμοποιήσει για την προστασία του από τις επιπτώσεις της εξωκυτταρικής παρουσίας της αιθανόλης.

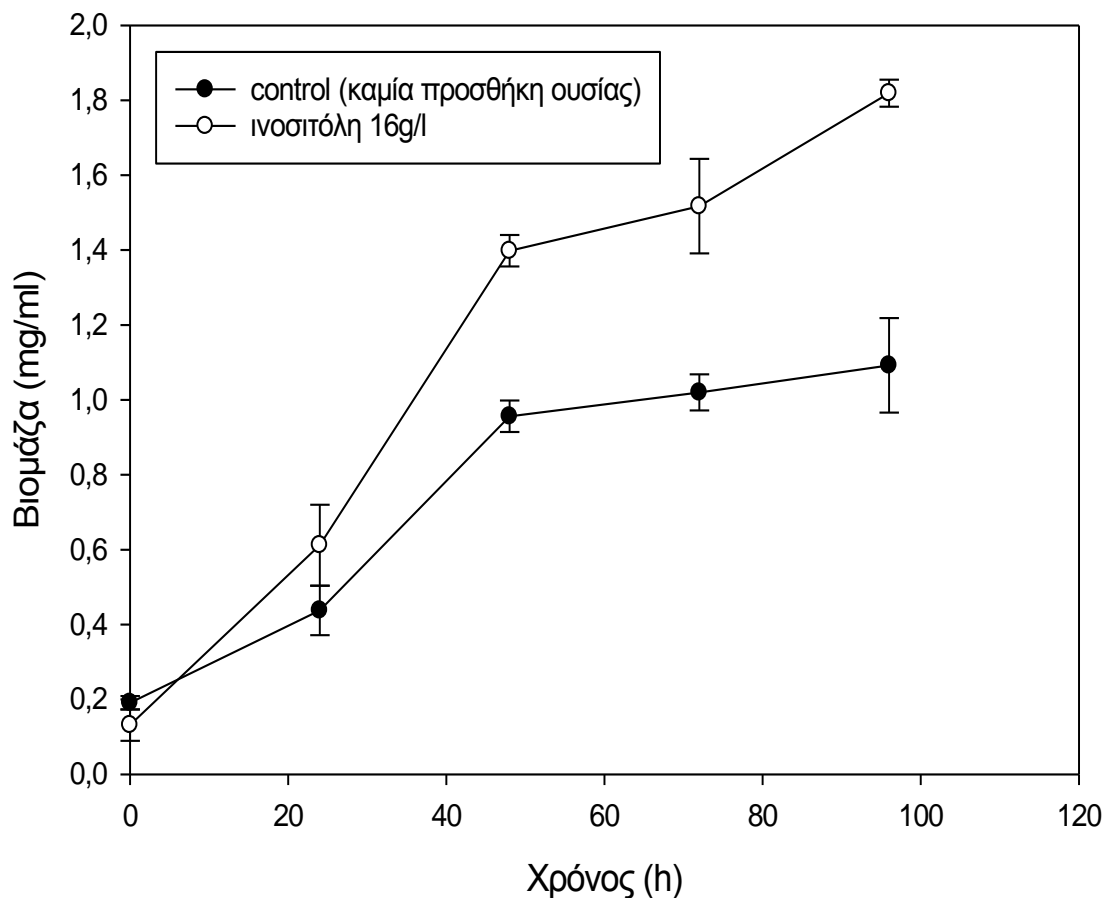
**Πίνακας 6: Ποσότητα υποστρώματος που καταναλώθηκε προς παραγωγή κυττάρων.**

<b>Ουσία που προστέθηκε παρουσία αιθανόλης 3,7% w/v</b>	<b>Καταναλωθέν υπόστρωμα (g/l)</b>
Ινοσιτόλη 8 g/l	5,1

Τα αποτελέσματα παραγωγής βιομάζας συμφωνούν με την καταναλωθείσα ποσότητα γλυκόζης από το μύκητα, όπως φαίνεται από τον πίνακα 6.

### **ii) Ινοσιτόλη 16 g/l**

Η ουσία ινοσιτόλη προστέθηκε στο μέσο καλλιέργειας των κυττάρων σε ακόμα μία συγκέντρωση, μεγαλύτερη της προηγούμενης, 16 g/L. Η συγκέντρωση αυτή επιλέχθηκε με βάση έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί σε ζυμομύκητες (Furukawa et al. 2004) και έχουν δείξει αύξηση στο ρυθμό ανάπτυξης τους.



**Διάγραμμα 19:** Παραγωγή βιομάζας κατά την αερόβια ανάπτυξη του μύκητα παρουσία ινοσιτόλης 16g/L και χωρίς καμία προστατευτική ουσία στο μέσο καλλιέργειας σε σχέση με το χρόνο.

Σύμφωνα με το διάγραμμα 19 η προσθήκη στο μέσο καλλιέργειας ινοσιτόλης συγκέντρωσης 16 g/l παρουσιάζει βελτίωση στην ανθεκτικότητα του μύκητα κατά 65% σε σχέση με δείγμα που δεν περιέχει καμία προστατευτική ουσία σε συγκέντρωση αιθανόλης 3,7% w/v. Η κατανάλωση του υποστρώματος φαίνεται στον πίνακα 7.

Το συμπέρασμα που προκύπτει από τα δύο πειράματα ανάπτυξης του μύκητα παρουσία αιθανόλης, μετά από προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων ινοσιτόλης, είναι ότι παρόλο που στο δεύτερο πείραμα η συγκέντρωση της ινοσιτόλης είναι διπλάσια από αυτήν του πρώτου, οι δύο καλλιέργειες είχαν ίδια βελτίωση στην ανάπτυξή τους. Εφόσον λοιπόν με προσθήκη ινοσιτόλης 0,8 g/l επιτυγχάνεται αύξηση παραγωγής βιομάζας κατά 64%, περαιτέρω προσθήκη ινοσιτόλης είναι ανώφελη,

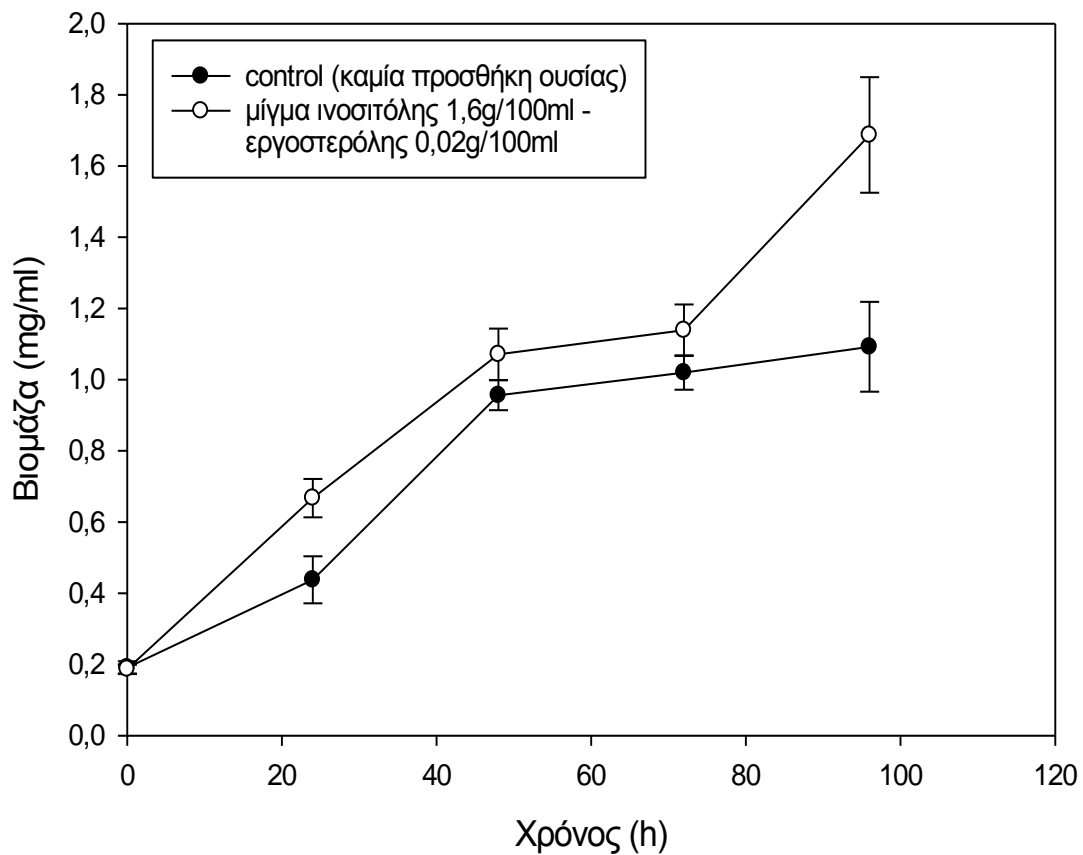
αφού η αύξηση στην ανάπτυξη είναι μηδαμινή μπροστά στο κόστος προσθήκης μεγαλύτερης ποσότητας ινοσιτόλης.

**Πίνακας 7: Ποσότητα υποστρώματος που καταναλώθηκε προς παραγωγή κυττάρων.**

<b>Ουσία που προστέθηκε παρουσία αιθανόλης 3,7% w/v</b>	<b>Καταναλωθέν υπόστρωμα (g/l)</b>
Ινοσιτόλη 16 g/l	5,3

### **Ε) Συνδυασμός ινοσιτόλης – εργοστερόλης**

Στο μέσο καλλιέργειας προστέθηκε επίσης συνδυασμός ινοσιτόλης 16 g/l και εργοστερόλης 0,2 g/l. Τα αποτελέσματα, όπως φαίνονται στο διάγραμμα 20, δείχνουν ότι ο συνδυασμός των δύο ουσιών παρουσία αιθανόλης 3,7 w/v βελτιώνουν την παραγωγή βιομάζας του μύκητα. Η αύξηση που παρατηρείται είναι κατά 55%.



**Διάγραμμα 20:** Παραγωγή βιομάζας κατά την αερόβια ανάπτυξη του μύκητα παρουσία συνδυασμού ινοσιτόλης 16g/L – εργοστερόλης 0,2g/L και χωρίς καμία προστατευτική ουσία στο μέσο καλλιέργειας σε σχέση με το χρόνο.

Τα παραπάνω αποτελέσματα συμφωνούν με τις μετρήσεις κατανάλωσης υποστρώματος τα οποία παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 8:** Ποσότητα υποστρώματος που καταναλώθηκε προς παραγωγή κυττάρων.

<b>Ουσία που προστέθηκε παρουσία αιθανόλης 3,7% w/v</b>	<b>Καταναλωθέν υπόστρωμα (g/l)</b>
Συνδυασμός ινοσιτόλης 16 g/l και εργοστερόλης 0,2 g/l	4,8

Στον πίνακα 9 παρουσιάζονται οι μέγιστοι ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης ανάλογα με την ουσία που είχε προστεθεί στο μέσο καλλιέργειας. Παρατηρείται ότι η προσθήκη εργοστερόλης και ινοσιτόλης, οι οποίες παρουσιάζουν όπως αναφέρθηκε και παραπάνω αύξηση της παραγωγής της βιομάζας, δεν βελτιώνουν ιδιαίτερα το ρυθμό παραγωγής της ανάπτυξης.

**Πίνακας 9: Μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων του μύκητα *F. oxysporum* που επετεύχθη παρουσία διαφορετικών ουσιών.**

Ουσία που προστέθηκε παρουσία αιθανόλης 4.7%v/v ή 3.7%w/v	$\mu$ ( $h^{-1}$ )
Control (καμία)	0,033
Εργοστερόλη 0,1 g/l	0,031
Τρεχαλόζη 2.5 g/l	0,023
Μίγμα εργοστερόλης - τρεχαλόζης	0,028
Ινοσιτόλη 8 g/l	0,034
Ινοσιτόλη 16 g/l	0,034
Μίγμα εργοστερόλης – ινοσιτόλης	0,020



### **Μελέτη βελτίωσης της ζύμωσης του μύκητα.**

Οι ουσίες ινοσιτόλη, εργοστερόλη και τρεχαλόζη καθώς και συνδυασμοί αυτών μελετήθηκαν για την επίδραση τους στην αερόβια ανάπτυξη του μύκητα *F.oxysporum* παρουσία αιθανόλης και αποδείχτηκε ότι η ινοσιτόλη και η εργοστερόλη αυξάνουν την παραγωγή βιόμαζας πάνω από το μισό. Στη συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση τους στην ζύμωση του μύκητα για την παραγωγή αιθανόλης. Οι ουσίες δεν προστέθηκαν στην αρχή της αναερόβιας καλλιέργειας, αλλά είχαν ήδη προστεθεί από την αερόβια για να εισέλθουν στο μεταβολισμό των κυττάρων.

**Πίνακας 10: Ποσότητα παραγόμενης αιθανόλης κατά τη ζύμωση του μύκητα *F.oxysporum* σε σχέση με την προστιθέμενη ουσία στο μέσο καλλιέργειας.**

<b>Ουσία που προστέθηκε παρουσία αιθανόλης</b>	<b>Παραγόμενη αιθανόλη (g/L)</b>
Control (καμία προσθήκη ουσίας)	2,7
Ινοσιτόλη (16 g/L)	0
Εργοστερόλη (0,2 g/L)	2,4
Εργοστερόλη (0,1 g/L)	1,8
Τρεχαλόζη (2,5 g/L)	0
Μίγμα εργοστερόλης 0,02% – ινοσιτόλης 1,6%	2,1

Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα καμία ουσία δεν παρουσιάζει βελτίωση κατά τη ζύμωση. Το ίδιο συμπέρασμα προκύπτει και από τον επόμενο πίνακα, καθώς φαίνεται ότι τα κύτταρα δεν κατανάλωσαν μεγάλη ποσότητα υποστρώματος.

**Πίνακας 11: Ποσότητα υποστρώματος που καταναλώθηκε κατά τη ζύμωση του μύκητα *F.oxysporum* σε σχέση με την προστιθέμενη ουσία στο μέσο καλλιέργειας.**

<b>Ουσία που προστέθηκε παρουσία αιθανόλης</b>	<b>Καταναλωθέν υπόστρωμα (g/l)</b>
Control (καμία προσθήκη ουσίας)	6,4
Ινοσιτόλη (16 g/L)	2,1
Εργοστερόλη (0,2 g/L)	5,7
Εργοστερόλη (0,1 g/L)	5,1
Τρεχαλόζη (2,5 g/L)	1,8
Μίγμα εργοστερόλης 0,02% – ινοσιτόλης 1,6%	5,8

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν παραπάνω συμφωνούν με έρευνες που έχουν διεξαχθεί και δείχνουν ότι οι ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν δεν παρουσιάζουν κάποια βελτίωση στην παραγωγή αιθανόλης κατά την αναερόβια ανάπτυξη( Gomes et al. 2002).

Συνολικά, από τη μελέτη των διαγραμμάτων και πινάκων της επίδρασης των ουσιών εργοστερόλη, ινοσιτόλη και τρεχαλόζη, καθώς και συνδυασμός αυτών στην αερόβια αλλά και αναερόβια ανάπτυξη του μύκητα, μπορούμε να εξάγουμε το συμπέρασμα ότι οι ουσίες ινοσιτόλη και εργοστερόλη βελτιώνουν σημαντικά την κυτταρική ανάπτυξη σε αερόβιες συνθήκες και την παράγωγή βιομάζας κατά 60% περίπου. Οι παραπάνω ουσίες, όμως, δεν παρουσιάζουν καμία βελτίωση στην παραγωγή αιθανόλης.

Επιπλέον, η ουσία τρεχαλόζη δεν παρουσιάζει καμία βελτίωση ούτε στην αερόβια ούτε στην αναερόβια ανάπτυξη του μικροοργανισμού.

## Συμπεράσματα – Προτάσεις

Συνοψίζοντας, στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η επίδραση της αιθανόλης στην ανάπτυξη και στην παραγωγή αιθανόλης του μύκητα *Fusarium oxysporum* σε υγρές καλλιέργειες. Καθώς επίσης και η ικανότητα κάποιων ουσιών να βελτιώσουν την ανθεκτικότητα του.

Από τη μελέτη της επίδρασης της αιθανόλης στην αερόβια ανάπτυξη του μικροοργανισμού προκύπτουν τα παρακάτω συμπεράσματα:

- ❖ Η αιθανόλη επηρεάζει έντονα την ανάπτυξη και βιωσιμότητα του μύκητα.
- ❖ Η κυτταρική ανάπτυξη του μικροοργανισμού και η τελική του βιομάζα μειώνονται με αύξηση της συγκέντρωσης της αιθανόλης. Συγκεκριμένα, σε συγκέντρωση αιθανόλης 3,7% w/v η ανάπτυξη είναι ακριβώς η μισή ενώ ο ρυθμός πρακτικά μηδενίζεται, οπότε και σταματάει κάθε μεταβολική δραστηριότητα σε συγκέντρωση αιθανόλης 7,1% w/v.

Από τη μελέτη της επίδρασης της αιθανόλης στην αναερόβια ανάπτυξη του μικροοργανισμού εξάγονται τα εξής συμπεράσματα:

- ❖ Η ζύμωση παρουσία αιθανόλης επηρεάζεται ακόμα περισσότερο από την αερόβια.
- ❖ Η παραγωγή αιθανόλης με υπόστρωμα 2% γλυκόζη μειώθηκε στο μισό όταν η καλλιέργεια αναπτυσσόταν παρουσία 3% w/v ενώ άνω του 4% w/v η παραγωγή αιθανόλης μηδενίζεται.

Από τη μελέτη της βελτίωσης της ανθεκτικότητας του μύκητα εξάγονται τα εξής συμπεράσματα:

- ❖ Η ουσία εργοστερόλη βελτιώνει το ρυθμό ανάπτυξης του μικροοργανισμού.
- ❖ Η ουσία ινοσιτόλη επίσης βελτιώνει την ανάπτυξη του.
- ❖ Η ουσία τρεχαλόζη δεν παρουσιάζει καμία βελτίωση.
- ❖ Μίγμα ινοσιτόλης-εργοστερόλης βελτιώνει την ανθεκτικότητα του μύκητα *F.oxysporum*.
- ❖ Μίγμα τρεχαλόζης-εργοστερόλης δεν βελτιώνει τη βιωσιμότητα του μύκητα παρουσία αιθανόλης.

Η επίδραση της αιθανόλης στη μεταβολική δραστηριότητα του μύκητα *Fusarium oxysporum* είναι πολύ έντονη, με αποτέλεσμα η διεργασία παραγωγής αιθανόλης να παρουσιάζει σημαντικά μειονεκτήματα.

Επιπλέον, λαμβάνοντας υπ' όψιν τα παραπάνω συμπεράσματα, θα μπορούσαμε να προτείνουμε την παρουσία «προστατευτικών» ουσιών στην ανάπτυξη των κυττάρων. Ακόμα, θα μπορούσαμε να προτείνουμε μία διεργασία στην οποία η εισαγωγή του μύκητα στο σύστημα θα προηγείται της προσθήκης των ζυμών, όταν δεν θα υπάρχει σε αυτό αιθανόλη. Έτσι, θα μπορεί ο μικροοργανισμός να μεταβολίσει το υπόστρωμα, χωρίς να παρεμποδίζεται από την παρουσία αιθανόλης που θα είχε παραχθεί από τις ζύμες. Μία ιδανική λύση θα ήταν η χρησιμοποίηση ενός συστήματος με άμεση απομάκρυνση της αιθανόλης κατά τη διάρκεια παραγωγής της από το μικροοργανισμό, ώστε να μην παρατηρείται παρεμπόδιση.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adams A., Gottschling D., Kaiser C., Stearns T. (1997). *Methods in yeast genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- Aguilera F., Peinado R., Millán C., Ortega J., Mauricio J. (2006). Relationship between ethanol tolerance, H<sup>+</sup>-ATPase activity and the lipid composition of the plasma membrane in different wine yeast strains. *Int J Food Microbiol* 110:34–42
- Alexandre H., Rousseaux I., Charpentier C. (1994). Relationship between ethanol tolerance, lipid composition and plasma membrane fluidity in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. *FEMS Microbiol Lett* 124:17–22
- Alexandre H., Ansanay-Galeote, V., Dequin, S., Blondin, B., 2001. Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*498, 98–103.
- Alexandre H, Plourde L, Charpentier C, Francois J (1998) Lack of correlation between trehalose accumulation, cell viability, and intracellular acidification as induced by various stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 144(Pt 4):1103–1111
- Alfani F., Gallifuoco A., Saporoci A., Spera A., Cantarella M. (2000). Comparison of SHF and SSF processes for the bioconversion of steam-exploded wheat straw. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 25:184-192
- Alfenore, S., Molina-Jouve, C., Guillouet, S.E., Uribelarrea, J.L., Goma, G., Benbadis, L., 2002. Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*60, 67–72.
- Alper H, Moxley J, Nevoigt E, Fink GR, Stephanopoulos G (2006) Engineering yeast transcription machinery for improved ethanol tolerance and production. *Science* 314:1565–1568
- Araque E., Parra C., Rodríguez M., Freer J., Baeza J. (2008). Selection of thermotolerant yeast strains *Saccharomyces cerevisiae* for bioethanol production. *Enzyme Microb Technol* 43:120–123
- Aristidou A., Penttilä M. (2000). Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. *Current Opinion in Biotechnology* 11:187-198

- Attfield, P.V., 1997. Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker's yeast. *Nat. Biotechnol.* 15, 1351–1357.
- Bai, F.W., Chen, L.J., Zhang, Z., Anderson, W.A., Moo-Young, M., 2004. Continuous ethanol production and evaluation of yeast cell lysis and viability loss under very high gravity medium conditions. *J. Biotechnol.* 110, 287–293.
- Bai, F.W., Anderson, W.A., Moo-Young, M., 2008. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnol. Adv.* 26, 89–105.
- Balat M. Current alternative engine fuels. *Energy Sources* 27, pp. 569–77, 2005.
- Balat M. Global bio-fuel processing and production trends. *Energy Explor Exploit* 25, pp. 195–218, 2007.
- Barry JA, Gawrisch K (1995) Effects of ethanol on lipid bilayers containing cholesterol, gangliosides, and sphingomyelin. *Biochemistry* 34:8852–8860
- Baerends RJS, Qiu JL, Rasmussen S, Nielsen HB, Brandt A (2009) Impaired uptake and/or utilization of leucine by *Saccharomyces cerevisiae* is suppressed by the SPT15-300 allele of the TATA-binding protein gene. *Appl Environ Microbiol* 75:6055–6061
- Bandara A., Fraser S., Chambers P.J., Stanley G.A. (2009) Trehalose promotes the survival of *Saccharomyces cerevisiae* during lethal ethanol stress, but does not influence growth under sublethal ethanol stress. *FEMS Yeast Res.* 9:1208-1216
- Bell W, Klaassen P, Ohnacker M, Boller T, Herweijer M et al (1992) Characterization of the 56-kDa subunit of yeast trehalose-6-phosphate synthase and cloning of its gene reveal its identity with the product of CIF1, a regulator of carbon catabolite inactivation. *Eur J Biochem* 209:951–959
- Berry, D.B., Gasch, A.P., 2008. Stress-activated genomic expression changes serve a preparative role for impending stress in yeast. *Mol. Biol. Cell* 19, 4580–4587.
- Birch, R.M., Walker, G.M., 2000. Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb. Technol.* 26, 678–687
- Blazquez MA, Lagunas R, Gancedo C, Gancedo JM (1993) Trehalose-6-phosphate, a new regulator of yeast glycolysis that inhibits hexokinase. *FEBS Lett* 329:51–54

- Boukis I., Vassilakos N., Kontopoulos G., Karellas S. Policy plan for the use of biomass and biofuels in Greece Part II: Logistics and economic investigation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2008.
- Cadenas A., Cabezudo S. Biofuels as sustainable technologies: perspectives for less developed countries. *Technol Forecast Social Change* 58, pp. 83–103, 1998.
- Caputo A.C., Palumbo M., Pelagagge P.M., Scacchia F. Economics of biomass energy utilization in combustion and gasification plants: effects of logistic variables. *Biomass and Bioenergy* 28, pp. 35-51, 2005.
- Cardona F, Carrasco P, Pérez-Ortín JE, del Olmo M, Aranda A (2007) A novel approach for the improvement of stress resistance in wine yeasts. *Int J Food Microbiol* 114:83–9
- Cartwright CP, Veazey FJ, Rose AH (1987) Effect of ethanol on activity of the plasma-membrane ATPase in, and accumulation of glycine by, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol* 133:857– 865
- Casey GP, Ingledew WE (1986) Ethanol tolerance in yeast. *Crit Rev Microbiol* 13:219–280
- Causton HC, Ren B, Koh SS, Harbison CT, Kanin E, Jennings EG, Lee TI, True HL, Lander ES, Young RA (2001) Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol Biol Cell* 12:323–337
- Chandel A.K., Es C., Rudravaram R., Narasu M.L., Rao L.V., Ravindra P. Economics and environmental impact of bioethanol production technologies: an appraisal. *Biotechnol Molec Biol Rev* 2, pp. 14–32, 2007.
- Chatterjee, M.T., Khalawan, S.A., Curran, B.P.G., 2000. Cellular lipid composition influences stress activation of the yeast general stress response element (STRE). *Microbiology* 146, 844–877.
- Chen, H., Fink, G.R., 2006. Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *Genes Dev.* 20, 1150–1161.
- Chen H., Jin S. Effect of ethanol and yeast on cellulase activity and hydrolysis of crystalline cellulose. *Enzyme Microb Technol* 39, pp. 1430–2, 2006.
- Chi, Z., Kohlwein, S.D., Paltauf, F., 1999. Role of phosphatidylinositol (PI) in ethanol production and ethanol tolerance by a high ethanol producing yeast. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 22, 58–63.

- Chi Z, Arneborg N (1999) Relationship between lipid composition, frequency of ethanol-induced respiratory deficient mutants, and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Appl Microbiol* 86:1047–1052
- Christakopoulos P., Kekos D., Macris B.J., Claeysens M., Bhat M.K. (1996). Purification and characterisation of a major xylanase with cellulose and transferase activities from *Fusarium oxysporum*. *Carbohydrate Research* 289:91-104
- Christakopoulos P., Kekos D., Macris B.J., Claeysens M., Bhat M.K. (1995). Purification and mode of action of a low molecular mass endo-1,4- $\beta$ -D-glucanase from *Fusarium oxysporum*. *Journal of Biotechnology* 39:85-93
- Christakopoulos P., Mamma D., Kekos D., Makris B.J. (1999). Enhanced acetyl esterase production by *Fusarium oxysporum*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 15:443-446
- Christakopoulos P., Macris B.J., Kekos D. Direct fermentation of cellulose to ethanol by *Fusarium oxysporum*. *Enzyme and Microbial Technology* 11, pp. 236-239, 1989.
- Christakopoulos P., Macris B.J., Kekos D. On the mechanism of direct conversion of cellulose to ethanol by *Fusarium oxysporum*: effect of cellulase and  $\beta$ -glucosidase. *Applied Microbiology Biotechnology* 33, pp.18-20, 1990.
- Christakopoulos P, Mamma D, Nerinckx W, Kekos D, Macris B, Claeysens M: Production and partial characterization of xylanase from *Fusarium oxysporum*. *Bioresour Technol* 1996, 58:115-119.
- Coote PJ, Jones MV, Seymour IJ, Rowe DL, Ferdinando DP, McArthur AJ, Cole MB (1994) Activity of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase is a key physiological determinant of thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 140:1881–1890
- Costa, V., Reis, E., Quintanilha, A., Moradas-Ferreira, P., 1993. Acquisition of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the key role of the mitochondrial superoxide dismutase. *Arch. Biochem. Biophys.* 300, 608–614.
- D'Amore T, Stewart GG (1987) Ethanol tolerance of yeast. *Enzyme Microb Technol* 9:322–330
- D'Amore T, Panchal CJ, Stewart GG (1990) A study of ethanol tolerance in yeast. *Crit Rev Biotechnol* 9:287–304



- del Castillo AL (1992) Lipid content of *Saccharomyces cerevisiae* strains with different degrees of ethanol tolerance. *Appl Microbiol Biotechnol* 37:647–651
- Demirbas A. Ethanol from cellulosic biomass resources. *Int J Green Ener* 1, pp. 79–87, 2004.
- Demirbas A. Bioethanol from Cellulosic Materials: A Renewable Motor Fuel from Biomass. *Energy Sources* 27, pp. 327–337, 2005.
- Demirbas A. Hazardous emissions, global climate change and environmental precautions. *Energy Sources B* 1, pp. 75–84, 2006.
- Demirbas A. Progress and recent trends in biofuels. *Prog Energy Combust Sci* 33, pp. 1–18, 2007.
- Demirbas A. Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. *Energy Conversion and Management*, pp. 1-11, 2008.
- Ding J, Huang X, Zhang L, Zhao N, Yang D, Zhang K (2009) Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 85:253–263
- Dinh TN, Nagahisa K, Hirasawa T, Furusawa C, Shimizu H (2008) Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* cells to high ethanol concentration and changes in fatty acid composition of membrane and cell size. *PLoS ONE* 3:e2623
- Dinh TN, Nagahisa K, Yoshikawa K, Hirasawa T, Furusawa C, Shimizu H (2009) Analysis of adaptation to high ethanol concentration in *Saccharomyces cerevisiae* using DNA microarray. *Bioprocess Biosyst Eng* 32:681–688
- Dombek, K.M., Ingram, L.O., 1986. Magnesium limitation and its role in apparent toxicity of ethanol during yeast fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 52, 975–981
- Faaij A.P.C. Bio-energy in Europe: changing technology choices. *Energy Policy* 34, pp. 322-342, 2006.
- Farrell AE, Plevin RJ, Turner BT, Jones AD, O'Hare M, Kammen DM (2006) Ethanol can contribute to energy and environmental goals. *Science* 311:506–508
- Fernandes AR, Sa-Correia I (2003) Transcription patterns of PMA1 and PMA2 genes and activity of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in *Saccharomyces cerevisiae* during diauxic growth and stationary phase. *Yeast* 20:207–219
- Forgac M (1998) Structure, function and regulation of the vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPases. *FEBS Lett* 440:258–263

- Francois J, Parrou JL (2001) Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* 25:125–145
- Fujita K, Matsuyama A, Kobayashi Y, Iwahashi H (2006) The genome-wide screening of yeast deletion mutants to identify the genes required for tolerance to ethanol and other alcohols. *FEMS Yeast Res* 6:744–750
- Furukawa K, Kitano H, Mizoguchi H, Hara S (2004) Effect of cellular inositol content on ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* in sake brewing. *J Biosci Bioeng* 98:107–113
- Gibson BR, Lawrence SJ, Leclaire JP, Powell CD, Smart KA (2007) Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. *FEMS Microbiol Rev* 31:535–569
- Gomes FC, Pataro C, Guerra JB, Neves MJ, Correa SR et al (2002) Physiological diversity and trehalose accumulation in *Schizosaccharomyces pombe* strains isolated from spontaneous fermentations during the production of the artisanal Brazilian cachaca. *Can J Microbiol* 48:399–406
- Gong Y, Kakihara Y, Krogan N, Greenblatt J, Emili A, Zhang Z, Houry WA (2009) An atlas of chaperone-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*: implications to protein folding pathways in the cell. *Mol Syst Biol* 5:275
- Hou L (2010) Improved production of ethanol by novel genome shuffling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Biochem Biotechnol* 160:1084–1093
- Hahn JS, Hu Z, Thiele DJ, Iyer VR (2004) Genome-wide analysis of the biology of stress responses through heat shock transcription factor. *Mol Cell Biol* 24:5249–5256
- Hahn S (2004) Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Nat Struct Mol Biol* 11:394–403
- Hara S, Sasaki M, Obata T, Noshiro K (1976a) Isolation of ethanol tolerant mutants from sake yeast Kyotai no. 7. *J Brew Soc Jpn* 71:301–304
- Harbison CT, Gordon DB, Lee TI, Rinaldi NJ, Macisaac KD, Danford TW, Hannett NM, Tagne JB, Reynolds DB, Yoo J, Jennings EG, Zeitlinger J, Pokholok DK, Kellis M, Rolfe PA, Takusagawa KT, Lander ES, Gifford DK, Fraenkel E, Young RA (2004) Transcriptional regulatory code of a eukaryotic genome. *Nature* 431:99–104
- Hu, C.K., Bai, F.W., An, L.J., 2005a. Protein amino acid composition of plasma membranes affects membrane fluidity and thereby ethanol tolerance in a

self-flocculating fusant of *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae*. Chin. J. Biotechnol. 21, 809–813.

- Hu, C.K., Bai, F.W., An, L.J., 2005b. Effect of flocculence of a self-flocculating yeast on its tolerance to ethanol and the mechanism. Chin. J. Biotechnol. 21, 123–128.
- Hu, C.K., Bai, F.W., An, L.J., 2003a. Enhancing ethanol tolerance of a self-flocculating fusant of *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae* by Mg<sup>2+</sup> via reduction in plasma membrane permeability. Biotechnol. Lett. 25, 1191–1194.
- Hu, C.K., Bai, F.W., An, L.J., 2003b. Enhancements in ethanol tolerance of a self-flocculating yeast by calcium ion through decrease in plasmalemma permeability. Chin. J. Biotechnol. 19, 715–719.
- Hu, X.H., Wang, M.H., Tan, T., Li, J.R., Yang, H., Leach, L., Zhang, R.M., Luo, Z.W., 2007. Genetic dissection of ethanol tolerance in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics 175, 1479–1487.
- Ingram, L.O., Buttke, T.M., 1984. Effects of alcohols on microorganisms. Adv. Microb. Physiol. 25, 253–300.
- Inoue T, Wang Y, Jefferies K, Qi J, Hinton A, Forgac M (2005) Structure and regulation of the V-ATPases. J Bioenerg Biomembr 37:393–398
- Jones RP (1989) Biological principles for the effects of ethanol. Enzyme Microb Technol 11:130–153
- Jules, M., Beltran, G., François, J., and Parrou, J. L.: New insights into trehalose metabolism by *Saccharomyces cerevisiae*: NTH2 encodes a functional cytosolic trehalase, and deletion of TPS1 reveals Ath1p-dependent trehalose mobilization, Appl. Environ. Microbiol., 74, 605–614 (2008).
- Kaino T, Takagi H (2008) Gene expression profiles and intracellular contents of stress protectants in *Saccharomyces cerevisiae* under ethanol and sorbitol stresses. Appl Microbiol Biotechnol 79:273–283
- Kopp, M., Müller, H., and Holzer, H.: Molecular analysis of the neutral trehalase gene from *Saccharomyces cerevisiae*, J. Biol. Chem., 268, 4766–4774 (1993).
- Kubota S, Takeo I, Kume K, Kanai M, Shitamukai A, Mizunuma M, Miyakawa T, Shimoi H, Lefuji H, Hirata D (2004) Effect of ethanol on cell growth of budding yeast: genes that are important for cell growth in the presence of ethanol. Biosci Biotechnol Biochem 68:968–972

- Krishna S.H., Reddy T.J., Chowdary G.V. (2001). Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast. *Bioresource Technology* 77:193-196
- Lei, J.J., Zhao, X.Q., Ge, X.M., Bai, F.W., 2007. Ethanol tolerance and the variation of plasma membrane composition of yeast floc populations with different size distribution. *J. Biotechnol.* 131, 270–275.
- Lillie, S. H. and Pringle, J. R.: Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation, *J. Bacteriol.*, 143, 1384–1394 (1980)
- Lin Y, Tanaka S (2006) Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* 69:627– 642
- Liu, Z.L., 2006. Genomic adaptation of ethanologenic yeast to biomass conversion inhibitors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73, 27–36.
- Ma M, Liu ZL (2010) Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 87:829– 845
- Maddox, I.S., Hough, J.S., 1970. Effect of zinc and cobalt on yeast growth and fermentation. *J. Inst. Brew.* 76, 262–264.
- Mahmud S.A., Takashi H., Shimidzu H. (2010) Differential importance of trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* in response to various environmental stresses. *J. Bioscience and Bioengineering* 109/3:262-266
- Mansure JJC, Panek AD, Crowe LM, Crowe JH (1994) Trehalose inhibits ethanol effects on intact yeast cells and liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1191:309–316
- Martin CE, Oh CS, Jiang Y (2007) Regulation of long chain unsaturated fatty acid synthesis in yeast. *Biochim Biophys Acta* 1771:271–285
- Millar DG, Griffiths-Smith K, Algar E, Scopes RK (1982) Activity and stability of glycolytic enzymes in the presence of ethanol. *Biotechnol Lett* 9:601–606
- Morita, Y., Nakamori, S., Takagi, H., 2003. L-proline accumulation and freeze tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* are caused by a mutation in the PRO1 gene encoding gamma-glutamyl kinase. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 212–219.
- Nabais, R.C., Sa-Correia, I., Viegas, C.A., Novais, J.M., 1988. Influence of calcium ion on ethanol tolerance of *Saccharomyces bayanus* and alcoholic fermentation by yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2439–2446.
- Nevoigt, E., 2008. Progress in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72, 379–412. Sajbidor J, Ciesarova Z,

- Smogrovicova D (1995) Influence of ethanol on the lipid content and fatty acid composition of *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Microbiol* 40:508–510
- Novotny C., Karst F., (1994) Sterol dependent growth and ethanol tolerance of a sterol auxotrophic *erg-9* mutant. *Biotechn. Lett.* 16, 539-542
  - Ogawa Y, Nitta A, Uchiyama H, Imamura T, Shiomi H, Ito K (2000) Tolerance mechanism of the ethanol-tolerant mutant of sake yeast. *J Biosci Bioeng* 90:313–320
  - Oliveria M.E.D., Vaughan B.E., Rykiel E.J. Ethanol as fuel: energy, carbon dioxide balances, and ecological footprint. *BioScience* 55, pp. 593–602, 2005.
  - Panagiotou G., Christakopoulos P. (2004). NADPH-Dependent D-Aldose Reductases and xylose fermentation in *Fusarium oxysporum*. *J Bioscience and Bioengineering* 97:299-304
  - Panagiotou G., Christakopoulos P., Olsson L (2005 $\alpha$ ). The influence of different cultivation conditions on the metabolome of *Fusarium oxysporum*. *Journal of Biotechnology* 118:304-315
  - Panagiotou G., Christakopoulos P., Olsson L. (2005 $\beta$ ). Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose by *Fusarium oxysporum* F3-growth characteristics and metabolite profiling. *Enzyme and Microbial Technology* 36:693-699
  - Panagiotou G., Christakopoulos P., Villas-Boas S.G., Olsson L. (2005 $\gamma$ ). Fermentation performance and intracellular metabolite profiling of *Fusarium oxysporum* cultivated on a glucose-xylose mixture. *Enzyme and Microbial Technology* 36:100-106
  - Panagiotou G., Kekos D., Macris B.J., Christakopoulos P. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation. *Industrial Crops and Products* 18, pp. 37-45, 2003.
  - Panagiotou G., Villas-Boas S.G., Christakopoulos P., Nielsen J., Olsson L. (2005 $\delta$ ). Intracellular metabolite profiling of *Fusarium oxysporum* converting glucose to ethanol. *Journal of Biotechnology* 115:425-434
  - Pascual C, Alonso A, García I, Romay C (1988) Effect of ethanol on glucose transport, key glycolytic enzymes and proton extrusion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng* 32:374–378

- Picard D (2002) Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. *Cell Mol Life Sci* 59:1640–1648
- Piper PW (1995) The heat shock and ethanol stress responses of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap. *FEMS Microbiol Lett* 134:121–127
- Piper PW, Talreja K, Panaretou B, Moradas-Ferreira P, Byrne K, Praekelt UM, Meacock P, Récnacq M, Boucherie H (1994) Induction of major heat-shock proteins of *Saccharomyces cerevisiae*, including plasma membrane Hsp30, by ethanol levels above a critical threshold. *Microbiology* 140:3031–3038
- Rodrusamee N., Lertwattanasakul N., Hirata K., Limtong S., Kosaka T., (2011) Growth and ethanol fermentation ability on hexose and pentose sugars and glucose effect under various conditions in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Appl Microbiol Microbiol* 90:1573-1586
- Rosa MF, Sá-Correia I (1994) Limitations to the use of extracellular acidification for the assessment of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity and ethanol tolerance in yeasts. *Enzyme Microbiol Technol.* 16:808-812
- Rosa MF, Sá-Correia I (1996) Intracellular acidification does not account for inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth in the presence of ethanol. *FEMS Microbiol Lett* 135:271–274
- Salgueiro SP, Sá-Correia I, Novais JM (1988) Ethanol induced leakage in *Saccharomyces cerevisiae*: kinetics and relationship to yeast ethanol tolerance and alcohol fermentation productivity. *Appl Environ Microbiol* 54:903–909
- Samuel D, Kumar TKS, Ganesh G, Jayaraman G, Yang PW, Chang MM, Trivedi VD, Wang SL, Hwang KC, Chang DK, Yu C (2000) Proline inhibits aggregation during protein refolding. *Protein Sci* 9:344–352
- Sanchez OJ, Cardona CA (2008) Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresour Technol* 99:5270–5295
- Sebollela A, Louzada PR, Sola-Penna M, Sarrone-Williams V, Coelho-Sampaio T, Ferreira ST (2004) Inhibition of yeast glutathione reductase by trehalose: possible implications in yeast survival and recovery from stress. *Int J Biochem Cell Biol* 36:900–908
- Singer MA, Lindquist S (1998) Multiple effects of trehalose on protein folding in vitro and in vivo. *Mol Cell* 1:639–648
- Shuler M.L., Kargi F. (2005). Μηχανική Βιοδιεργασιών (Βασικές έννοιες). ΑΘΗΝΑ, ΕΜΠ: 365-366, 695-700

- Stanley D., Bandara A., Fraser S., Chambers P.J., Stanley G.A. (2010) The ethanol stress response and ethano tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Appl Microbiol.* 109:13-24
- Stukey JE, McDonough VM, Martin CE (1989) Isolation and characterization of OLE1, a gene affecting fatty acid desaturation from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 264:16537–16544
- Stryer L (1994) Βιοχημεία. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης. Τόμος 1. Ηράκλειο
- Sun Y., Cheng J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology* 83:1-11
- Takagi H (2008) Proline as a stress protectant in yeast: physiological functions, metabolic regulations and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 81:211–223
- Takagi H, Takaoka M, Kawaguchi A, Kubo Y (2005) Effect of Lproline on sake brewing and ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* 71:8656–8662
- Takagi, H., Matsui, F., Kawaguchi, A., Wu, H., Shimoi, H., Kubo, Y., 2007. Construction and analysis of self-cloning sake yeasts that accumulate proline. *J. Biosci. Bioeng.* 103, 377–380.
- Takahashi, T., Shimoi, H., Ito, K., 2001. Identification of genes required for growth under ethanol stress using transposon mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Genet. Genomics* 265, 1112–1119.
- Thevelein JM (1991) Fermentable sugars and intracellular acidification as specific activators of the RAS-adenylate cyclase signaling pathway in yeast: the relationship to nutrient-induced cell cycle control. *Mol Microbiol* 5:1301–1307
- Thevelein JM, de Winde JH (1999) Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 33:904–918
- Thomas, K.C., Ingledew, W.M., 1990. Fuel ethanol production: effects of free amino nitrogen on fermentation of very-high-gravity wheat mashes. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2046–2050.
- Thomas, K.C., Ingledew, W.M., 1992. Production of 21% (v/v) ethanol by fermentation of very high gravity (VHG) wheat mashes. *J. Ind. Microbiol.* 10, 61–68.

- Tosun, A., Ergun, M., 2007. Use of experimental design method to investigate metal ion effects in yeast fermentations. *J. Chem. Biotechnol.* 82, 11–15.
- Trabalzini, L., Paffetti, A., Scalon, A., Talamo, F., Ferro, E., Coratza, G., Bovalini, L., Lusini, P., Martelli, P., Santucci, A., 2003. Proteomic response to physiological fermentation stresses in a wild-type wine strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* 370, 35–46.
- Van Laere, A., 1989. Trehalose, reserve and/or stressmetabolite. *FEMS Microbiol. Rev.* 63, 201–210.
- Van Uden, N., 1985. Ethanol toxicity and ethanol tolerance in yeasts. *Annual Reports on Fermentation Processes* 8, 11–58.
- Villalba, J.M., Palmgren, M.G., Berberían, G.E., Ferguson, C., 1992. Functional expression of plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in yeast endoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry* 267, 12341–12349.
- Wach, A., Ahlers, J., Graber, P., 1990. The H<sup>+</sup>-ATPase of the plasma membrane from yeast. Kinetics of ATP hydrolysis in native membranes, isolated and reconstituted enzymes. *European Journal of Biochemistry* 189, 675–682.
- Walker-Caprioglio, H.M., Casey, W.M., Parks, L.W., 1990. *Saccharomyces cerevisiae* membrane sterol modifications in response to growth in the presence of ethanol. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 2853–2857.
- Watanabe D, Wu H, Noguchi C, Zhou Y, Akao T, Shimoi H (2011) Enhancement of the initial rate of ethanol fermentation due to dysfunction of yeast stress response components Msn2p and/or Msn4p. *Appl Environ Microbiol* 77:934–941
- Wu, H., Zheng, X., Araki, Y., Sahara, H., Takagi, H., Shimoi, H., 2006. Global gene expression analysis of yeast cells during sake brewing. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7353–7358.
- Xiros C, Christakopoulos P: Enhanced ethanol production from brewer's spent grain by a *Fusarium oxysporum* consolidated system. *Biotechnology for biofuels* 2009, 2:4.
- Xiros C, Topakas E, Katapodis P, Christakopoulos P: Hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain by *Neurospora crassa*. *Bioresour Technol* 2008, 99:5427-5435.
- Xiros C, Topakas E, Katapodis P, Christakopoulos P: Evaluation of *Fusarium oxysporum* as an enzyme factory for the hydrolysis of brewer's spent grain with



improved biodegradability for ethanol production. *Ind Crops Prod* 2008, 28:213-224.

- Xu, T.J., Zhao, X.Q., Bai, F.W., 2005. Continuous ethanol production using self flocculating yeast in a cascade of fermentors. *Enzyme Microb. Technol.* 37, 634–640.
- Xue, C., Zhao, X.Q., Yuan, W.J., Bai, F.W., 2008. Improving ethanol tolerance of a selfflocculating yeast by optimization of medium composition. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 2257–2261.
- Yamamoto A, Mizukami Y, Sakurai H (2005) Identification of a novel class of target genes and a novel type of binding sequence of heat shock transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 280:11911–11919
- You, K.M., Rosenfield, C.L., Knipple, D.C., 2003. Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1499–1503.
- Yoshikawa K, Tanaka T, Furusawa C, Nagahisa K, Hirasawa T, Shimizu H (2009) Comprehensive phenotypic analysis for identification of genes affecting growth under ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 9:32–44
- Young JC, Agashe VR, Siegers K, Hartl FU (2004) Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:781–791
- Zhang, Y.X., Perry, K., Vinci, V.A., Powell, K., Stemmer, W.P., del Cardayri, S.B., 2002. Genome shuffling leads to rapid phenotypic improvement in bacteria. *Nature* 415, 644–646.
- Zhao, X.Q., Bai, F.W., 2009. Mechanisms of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production. *J. Biotechnol.* 144, 23-30.
- Zhao, X.Q., Xue, C., Ge, X.M., Wang, J.Y., Yuan, W.J., Bai, F.W., 2009. Impact of zinc supplementation on the improvement of ethanol tolerance of self-flocculating yeast in continuous ethanol fermentation. *J. Biotechnol.* 139, 55–60.
- Κέκος Δ., Παπαγιαννάκος Ν. (1999). Σημειώσεις Βιοχημικής Μηχανικής. ΑΘΗΝΑ, ΕΜΠ: 70-71, 100-113
- Κολίσης Φ.Ν., Κέκος Δ., Μακρής Β.Ι. (2002). Εφαρμοσμένη Βιοτεχνολογία (Σημειώσεις). ΑΘΗΝΑ, ΕΜΠ: 32-38
- Ρήγας Φ. (2003). Επιστήμη και τεχνολογία περιβάλλοντος. ΑΘΗΝΑ, ΕΜΠ: 45-46

