



Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Agricultural University of Athens

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΤΜΗΜΑ
ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ
ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΡΟΦΙΜΩΝ

***ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΗΣ 2,3-
ΒΟΥΤΑΝΟΔΙΟΛΗΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΥΞΗΣΗ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ
ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΣΕ ΑΝΑΝΕΩΣΙΜΕΣ ΠΗΓΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ***

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ:
ΚΛΕΟΠΑΤΡΑ Ν. ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΪΔΗ

Επιβλέπων: ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ ΣΕΡΑΦΕΙΜ, Επίκουρος Καθηγητής

ΑΘΗΝΑ
ΙΟΥΝΙΟΣ 2013

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΤΜΗΜΑ
ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ
ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΡΟΦΙΜΩΝ

***ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΗΣ 2,3-
ΒΟΥΤΑΝΟΔΙΟΛΗΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΥΞΗΣΗ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ
ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΣΕ ΑΝΑΝΕΩΣΙΜΕΣ ΠΗΓΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ***

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ:
ΚΛΕΟΠΑΤΡΑ Ν. ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΪΔΗ

Επιβλέπων: ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ ΣΕΡΑΦΕΙΜ, Επίκουρος Καθηγητής

ΑΘΗΝΑ
ΙΟΥΝΙΟΣ 2013

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**«ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΗΣ 2,3-
ΒΟΥΤΑΝΟΔΙΟΛΗΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΥΞΗΣΗ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ
ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΣΕ ΑΝΑΝΕΩΣΙΜΕΣ ΠΗΓΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ»**

ΚΛΕΟΠΑΤΡΑ Ν. ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΪΔΗ

Επιβλέπων: ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ ΣΕΡΑΦΕΙΜ (Επίκουρος Καθηγητής)

Επιτροπή:

ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ ΣΕΡΑΦΕΙΜ (Επίκουρος Καθηγητής)

ΚΟΥΤΙΝΑΣ ΑΠΟΣΤΟΛΗΣ (Λέκτορας)

ΔΡΟΣΙΝΟΣ ΕΛΕΥΘΕΡΙΟΣ (Αναπληρωτής Καθηγητής)

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Μετά το τέλος της παρούσας πτυχιακής μελέτης, που εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους μαζί και καθένα ξεχωριστά όσους βοήθησαν να γίνει άλλος ένας στόχος μου πραγματικότητα.

Θα ήθελα να εκφράσω τις βαθύτερες ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα της πτυχιακής μελέτης κ. Παπανικολάου Σεραφείμ, Επίκουρο καθηγητή του Γ.Π.Α, για την καθοδήγησή του στη σύλληψη και υλοποίηση του θέματος, καθώς και για τις πολύτιμες επισημάνσεις του.

Ιδιαίτερα θερμά θα ήθελα να ευχαριστήσω την Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια του εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων κα Χατζηφράγκου Αφροδίτη για τις εύστοχες συμβουλές της και για την συνεργασία της κατά την διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας και τη συγγραφή της πτυχιακής μελέτης.

Θα ήθελα επίσης, να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής κ. Κουτίνα Αποστόλη, Λέκτορα του ΓΠΑ και τον κ. Δροσινό Ελευθέριο, Αναπληρωτή Καθηγητή του ΓΠΑ για την ουσιαστική βοήθεια τους στη διάρκεια του μεταπτυχιακού μου.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στις συμφοιτήτριες και στους συμφοιτητές μου για το δημιουργικό και ευχάριστο κλίμα που επικράτησε στο χώρο του εργαστηρίου καθώς και σε όλα τα παιδιά του μεταπτυχιακού για τις όμορφες στιγμές που περάσαμε μαζί εντός και εκτός του πανεπιστημίου.

Κρατάω πάντα για το τέλος τους δικούς μου ανθρώπους τους γονείς μου, Καίτη και Νίκο, τον αδελφό μου Αναστάση και τον αγαπημένου μου Φάνη για την υπομονή και την κατανόηση όλο αυτό το διάστημα.

Κλεοπάτρα Παρασκευαΐδη
Αθήνα, 2013

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
Abstract	9
I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	11
I.1 Τα σάκχαρα ως ανανεώσιμες πηγές άνθρακα	11
I.1.1 Τα γεωργο-βιομηχανικά παραπροϊόντα και απόβλητα	11
I.1.2 Ανανεώσιμοι υδατάνθρακες ως πηγή άνθρακα	13
I.2 Μελάσα	17
I.2.1 Εισαγωγή	17
I.2.2 Σύσταση της μελάσας και τα χαρακτηριστικά της	17
I.2.3 Μελανοΐδινες	19
I.2.4 Επεξεργασία μελάσας και αποικοδόμηση μελανοΐδινών	20
I.2.5 Βιο-αποικοδόμηση μελανοΐδινών	21
I.2.6 Παραγωγή βιοτεχνολογικών προϊόντων	22
I.3. Η ένωση “2,3-βουτανοδιόλη”	25
I.3.1. Χαρακτηριστικά και βιομηχανικές εφαρμογές 2,3-βουτανοδιόλης	25
I.3.2. Παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης	27
I.3.3. Υποστρώματα για την βιοτεχνολογική παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης	29
I.3.4. Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης	30
I.4. Οικογένεια Enterobacteriaceae	35
I.4.1 Γενικά χαρακτηριστικά της οικογένειας Enterobacteriaceae	35
Σκοπός μεταπτυχιακής μελέτης	37
II. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	38
II.1 Βιολογικό υλικό	38
II.2 Υποστρώματα	38
II.3 Συνθήκες καλλιέργειας	39
II.4 Αναλύσεις	41
II.4.1. Προσδιορισμός pH	41
II.4.2. Προσδιορισμός βιομάζας	41
II.4.3. Προσδιορισμός αναγωγικών σακχάρων	42
II.4.4 Προσδιορισμός των ολικών σακχάρων	44
II.4.5. Προσδιορισμός 2,3-βουτανοδιόλης, αιθανόλης και οργανικών οξέων	45

Π.4.6 Προσδιορισμός αποχρωματισμού μελάσας	46
III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	47
III.1 Μελέτη επιλογής βακτηρίων της οικογένειας Enterobacteriaceae σε υπόστρωμα εμπορικής γλυκόζης για την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης	47
III.2 Αύξηση του στελέχους <i>Enterobacter</i> sp. FMCC-208 σε διάφορα σακχαρούχα υποστρώματα σε υγρές καλλιέργειες σε φιάλες Duran για την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης	48
III.2.1 Καλλιέργεια του <i>Enterobacter</i> sp. FMCC-208 στην εμπορική γλυκόζη για την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης	49
III.2.2 Καλλιέργεια του <i>Enterobacter</i> sp. FMCC-208 στην εμπορική σακχαρόζη για την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης	55
III.3 Αύξηση του στελέχους <i>Enterobacter</i> sp. FMCC-208 στην απόβλητη μελάσα σε υγρές καλλιέργειες σε φιάλες Duran για την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης	56
III.4 Αύξηση του στελέχους <i>Enterobacter</i> sp. FMCC-208 σε βιοαντιδραστήρα με μοναδική πηγή άνθρακα τη μελάσα	61
III.4.1 Αύξηση του στελέχους <i>Enterobacter</i> sp. FMCC-208 σε κλειστή καλλιέργεια (batch culture) στη μελάσα	61
III.4.2 Αύξηση του στελέχους <i>Enterobacter</i> sp. FMCC-208 σε ημισυνεχής τροφοδοτούμενη καλλιέργεια (fed-batch culture) στη μελάσα	62
IV. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ	65
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	74

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η ικανότητα 6 βακτηριακών στελεχών της οικογένειας Enterobacteriaceae να μεταβολίζουν χαμηλού κόστους σακχαρούχα υποστρώματα (εμπορική γλυκόζη, εμπορική σακχαρόζη και μελάσα) προς παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης. Τα εξεταζόμενα στελέχη ανήκουν στη συλλογή του εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων και απομονώθηκαν από το φλοιό και τη σάρκα των σταφυλιών που είχαν προσβληθεί από το μύκητα *Botrytis* sp.. Το στέλεχος που επιλέχτηκε για τη συνέχεια της πειραματικής διαδικασίας ήταν το *Enterobacter* sp. FMCC-208, το οποίο αφομοίωσε πλήρως τα 20 g/L εμπορικής γλυκόζης και παρήγαγε τη μεγαλύτερη ποσότητα της 2,3-βουτανοδιόλης συγκριτικά με τα υπόλοιπα στελέχη.

Το επόμενο στάδιο της παρούσας εργασίας αποτέλεσε η διερεύνηση του ρυθμού ανάδευσης στην παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης και η επίδραση της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιούνταν σε φιάλες Duran υπό αναερόβιες συνθήκες. Οι ρυθμοί ανάδευσης που επιλέχτηκαν ήταν των 80±5 rpm και των 180±5 rpm και οι καλλιέργειες του στελέχους *Enterobacter* sp. πραγματοποιηθήκαν σε πηγή άνθρακα την εμπορική γλυκόζη σε αρχική συγκέντρωση 40, 60 και 90 g/L. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν πως στον μεγαλύτερο ρυθμό ανάδευσης είχαμε υψηλότερη συγκέντρωση 2,3-βουτανοδιόλης συγκρίνοντας την εκάστοτε αρχική συγκέντρωση και για το λόγο αυτό τα επόμενα πειράματα πραγματοποιηθήκαν υπό αυτές τις συνθήκες ανάδευσης. Όσον αφορά την επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης, παρατηρήσαμε πως αύξηση της συγκέντρωσης έως και τα 60 g/L γλυκόζης έχει θετική επίδραση στην παράγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης με τον συντελεστή απόδοσης να λαμβάνει τιμή 0.37 g/g ενώ στην καλλιέργεια με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 90 g/L, ο συντελεστής απόδοσης μειώθηκε κατά 0.05 g/g.

Κατόπιν, ακολούθησε καλλιέργεια του στελέχους σε εμπορική σακχαρόζη. Η αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης του υποστρώματος (από 20 έως 80 g/L) έδρασε θετικά στην παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης και η μέγιστη συγκέντρωση της παρατηρήθηκε στην καλλιέργεια των 80 g/L, όπου ήταν 29.6 g/L με συντελεστή απόδοσης 0.40 g/g με μέγιστο θεωρητικό τα 0.50 g/g. Δεδομένου των θετικών αποτελεσμάτων που είχαμε στα σακχαρούχα υποστρώματα, ακολούθησε καλλιέργεια σε πηγή άνθρακα τη μελάσα, όπου η παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης αυξανόταν με την αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης (20, 35 και 65 g/L). Η μέγιστη παραγωγή της σημειώθηκε στην καλλιέργεια των 65 g/L με τιμή 25 g/L και ο συντελεστής απόδοσης των καλλιεργειών κυμάνθηκε από 0.42-0.49 g/g με μέγιστο θεωρητικό τα 0.50 g/g.

Στο τελευταίο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας, μελετήθηκε η αύξηση του μικροοργανισμού σε βιοαντιδραστήρα. Η πηγή άνθρακα που χρησιμοποιήθηκε ήταν η μελάσα και μελετήθηκε η επίδραση του μη-ελεγχόμενου pH σε ασυνεχείς καλλιέργειες με αρχική συγκέντρωση 20 g/L. Το ιδανικό pH για την καλλιέργεια του εν λόγω στελέχους είναι στο εύρος 6.0-6.3, σε ελαφρώς όξινες συνθήκες. Τέλος πραγματοποιήθηκε ημι-συνεχής καλλιέργεια όπου το pH ελεγχόταν στην τιμή 6.0-6.3 και η παραγόμενη 2,3-βουτανοδιόλη έλαβε τιμή 73.2 g/L με συντελεστή απόδοσης 0.44 g/g ενώ καταναλώθηκαν περίπου 180 g/L μελάσας. Πραγματοποιήθηκε και αποχρωματισμός της μελάσας σε ποσοστό 27%, όπου το αποτέλεσμα κρίνεται ικανοποιητικό αφού οι πειραματικές συνθήκες ευνοούσαν το σχηματισμό της 2,3-βουτανοδιόλης.

Λέξεις-κλειδιά: Γεωργο-βιομηχανικά παραπροϊόντα και απόβλητα, μελάσα, 2,3-βουτανοδιόλη

ABSTRACT

At the present study, 6 different bacterial strains that belong to the Enterobacteriaceae family were examined for their ability to convert low-cost sugar-containing substrates (commercial glucose, commercial sucrose and molasses) to 2,3-butanediol. The strains that are investigated are included in the assortment of the Laboratory of Microbiology and Biotechnology of Foods of the Department of Food Science & Technology and they were extracted from the peel and flesh of grapes infested from the fungus *Botrytis* sp.. A specific strain was selected to continue for further examination, the *Enterobacter* sp. FMCC-208 which consumed the 20g/L of commercial glucose completely and produced the larger amount of 2,3-butanediol, when compared with the other strains.

In addition, the rate of stirring and the concentration of the substrate were checked for their effect on the production of 2,3-butanediol. All the cultivations were taking place in Duran bottles under anaerobic conditions. The different stirring rates were at 80 ± 5 rpm and 180 ± 5 rpm, while the cultivations were applied at commercial glucose in concentrations of 40, 60 and 90 g/L. According to the results, the highest quantity of 2,3-butanediol was produced when stirring with the highest rate for each different concentration and due to this fact, the next experimental procedures were done at this stirring conditions. As far as the initial concentration is concerned, the 40 and 60 g/L of glucose affected positively the production of 2,3-butanediol ($Y_{BD/Glu} = 0.37$ g/g), while for the 90 g/L the yield of 2,3-butanediol was reduced for 0.05 g/g.

The next step was to cultivate the strain at the substrate containing commercial sucrose. The production of 2,3-butanediol was increased in proportion to the substrate's initial concentration (from 20 to 80 g/L) and the maximum quantity (29.6 g/L) was observed at the culture with 80 g/L ($Y_{BD/Glu} = 0.40$ g/g). These results led to culture containing molasses, where the production of 2,3-butanediol was increased accordingly to the initial concentration (20, 35 και 65 g/L). The maximum concentration of 2,3-BD was observed at the culture of 65 g/L and reached 25 g/L. The 2,3-BD yields of all cultures was about 0.42-0.49 g/g while the maximum theoretical is 0.50 g/g.

Last but not least, the growth of the microorganism in bioreactor was investigated. The molasses was used as carbon resource with the initial concentration of 20 g/L in batch cultures and examined the effect of uncontrolled pH. The ideal pH for the culture of *Enterobacter* sp. FMCC-208 is at 6.0-6.3. Lastly, it was conducted a fed-batch culture where the pH was

controlled at pH=6.0-6.3 and the produced 2,3-butanediol reached the level of 73.2 g/L with $Y_{BD/Glu} = 0.44$ g/g, while 180 g/L of molasses were consumed. Also the decolourisation of molasses was about 27% and this result is satisfying since the experimental conditions were in favour of the production of 2,3-butanediol.

Keywords: agricultural by-products and waste, molasses, 2,3-butanediol

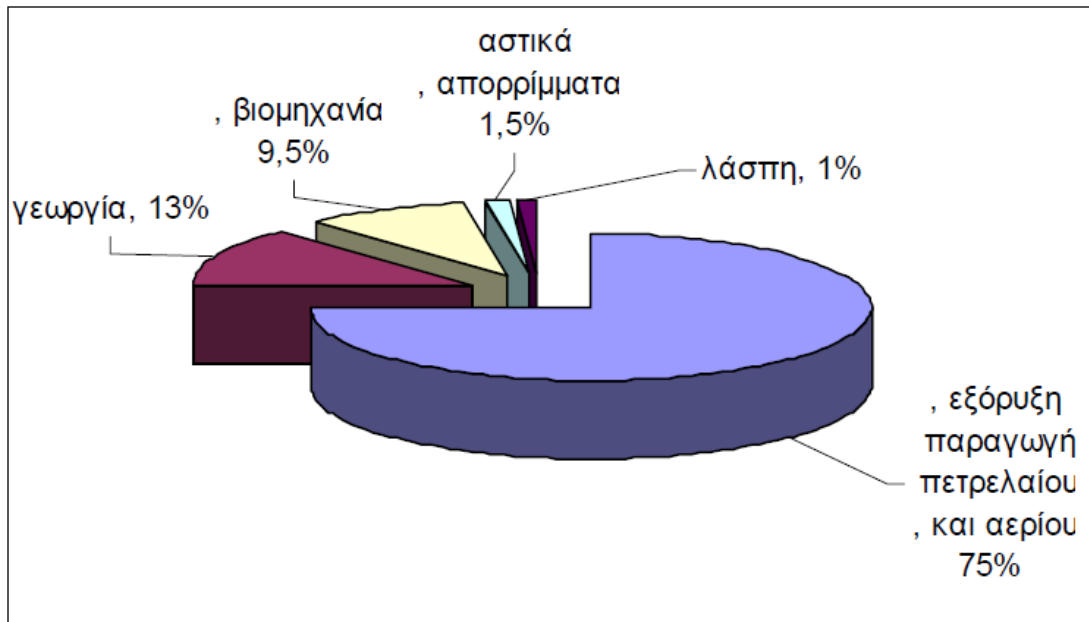
I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

I.1 Τα σάκχαρα ως ανανεώσιμες πηγές άνθρακα

I.1.1 Τα γεωργο-βιομηχανικά παραπροϊόντα και απόβλητα

Τα γεωργο-βιομηχανικά παραπροϊόντα και απόβλητα προέρχονται από τη δραστηριότητα των διαφόρων Γεωργικών Εκμεταλλεύσεων καθώς και των Γεωργικών Βιομηχανιών και Επιχειρήσεων Μεταποίησης και Επεξεργασίας Τροφίμων και Γεωργικών Προϊόντων. Πρόκειται για παραπροϊόντα και απόβλητα, των οποίων ο όγκος αυξάνει με ταχύτατους ρυθμούς λόγω της εντατικοποίησης της γεωργικής πρακτικής. Στις ανεπτυγμένες χώρες, τα δύο τρίτα των οργανικών αυτών αποβλήτων και παραπροϊόντων παράγονται από τις γεωργικές και βιομηχανικές εκμεταλλεύσεις. Τα βιομηχανικά απόβλητα είναι συνήθως παραπροϊόντα της παραγωγικής διαδικασίας, ακαθαρσίες της πρώτης ύλης και λάσπες που παράγονται σε κάποιο σημείο της διεργασίας, όπως η λάσπη που σχηματίζεται κατά την πρωτοβάθμια καθίζηση ή την κροκίδωση λυμάτων.

Στις ΗΠΑ παράγονται ετησίως 10 δις τόνοι στερεών αποβλήτων. Παράγονται εξάλλου περίπου 700 κιλά αστικών απορριμμάτων ετησίως ανά κάτοικο, δυο με τρεις φορές περισσότερα από όσα στις υπόλοιπες ανεπτυγμένες χώρες. Στην Εικόνα I.1.1-1 παρουσιάζεται η κατανομή των στερεών αποβλήτων στις ΗΠΑ ανά τομέα παραγωγής. Ετησίως συσσωρεύονται 800.000.000 τόνοι στερεών παραπροϊόντων, τα οποία παράγονται κατά την επεξεργασία του φυτικού υλικού, που πραγματοποιείται με την αποφλοιώση, αποχύμωση, εκχύλιση, διήθηση καθώς και με την πλύση, κατεργασία σε υψηλή θερμοκρασία και παστερίωση (Weiland, 1999). Τα στερεά απόβλητα μπορεί να είναι απόβλητα τύπου «ημι-κυτταρίνης» που προέρχονται από το φυτικό υλικό και στερεά απόβλητα τύπου «ευαφομοίωτων» σακχάρων όπως τα προερχόμενα από ληγμένα προϊόντα (παιδικές τροφές, αστοχίες κατά την παραγωγή, απόβλητη ζάχαρη, ψωμιά και άλλα). Για τα «ευαφομοίωτου» τύπου απόβλητα, η βιομηχανία πληρώνει από 0,1-0,5 ευρώ ανά κιλό αποβλήτου για να απαχθούν αυτά τα απόβλητα, τα οποία συνήθως σε επόμενο στάδιο υφίστανται διεργασία κομποστοποίησης.



Εικόνα I.1.1-1: Κατανομή των στερεών αποβλήτων στις ΗΠΑ ανά τομέα παραγωγής (Environmental Science (Chapter 11). G. Tyler Miller, 1997)

Τεράστιες είναι και οι ποσότητες των υγρών ή ημιστερεών αποβλήτων τα οποία παράγονται κατά την γεωργική πρακτική. Αυτά μπορεί να είναι:

- πλούσια σε υδατάνθρακες (σάκχαρα απλά ή σύνθετα),
- πλούσια σε λίπος (βιομηχανικά λίπη και έλαια), όπου προέρχονται από σφαγεία, εστιατόρια, fast-foods ή βιομηχανίες παρασκευής έτοιμων εδεσμάτων και άλλα, τηγανισμένα / ψημένα / θερμικώς επεξεργασμένα λίπη
- υγρά απόβλητα ελαιουργείων, τα οποία είναι πλούσια σε σάκχαρα, οργανικά οξέα, φαινολικά συστατικά και άλατα.

Ο σύγχρονος βιομηχανικός τρόπος ζωής έχει οδηγήσει στην αύξηση των παραγόμενων λυμάτων και αποβλήτων, ιδιαίτερα αυτών που δεν έχουν υποστεί επεξεργασία, με σοβαρές επιπτώσεις στο οικοσύστημα. Η ανεξέλεγκτη διάθεση των αποβλήτων είναι μόνιμη απειλή για το περιβάλλον, τους υδατικούς πόρους, το έδαφος και τη δημόσια υγεία. Κατά την παραμονή τους, τα απόβλητα και τα παραπροϊόντα αποσυντίθενται αρκετά γρήγορα, παράγοντας οργανικά οξέα και δύσοσμα συστατικά, κάνοντας δύσκολη την αποθήκευση και τα χρήση τους. Τα λύματα είναι πλούσια σε οργανικά θρεπτικά συστατικά και όταν αποβάλλονται στους υδάτινους αποδέκτες (θάλασσα, λίμνες, ποτάμια), δημιουργούν μεγάλες απαιτήσεις σε οξυγόνο, προκειμένου να διασπαστούν αερόβια από βακτήρια και μύκητες. Οι υδάτινοι αποδέκτες των υγρών αποβλήτων μπορεί να είναι επιφανειακοί (θάλασσα, έλη, λίμνες, ποταμοχείμαρροι) ή υπόγειοι. Η διαρροή των στοιχείων αυτών προκαλεί το φαινόμενο του ευτροφισμού με

αποτέλεσμα να διαταράσσεται η ισορροπία του οικοσυστήματος. Επίσης η διαρροή αζώτου προς τα υπόγεια ύδατα, τα καθιστά ακατάλληλα για πόση. Άλλο ένα πρόβλημα που δημιουργείται είναι η έκλυση αερίων όπως η αμμωνία και το μεθάνιο, τα οποία ρυπαίνουν την ατμόσφαιρα.

Λύση πρέπει να βρεθεί στη μόλυνση που προκαλείται από τις βιομηχανίες τροφίμων και τα απόβλητα τους (Food Waste Treatment Methodologies, 2008). Τα τελευταία χρόνια, έχοντας υπόψη την ρύπανση του περιβάλλοντος, καθώς και τα διάφορα οικονομικά κίνητρα και την ανάγκη για τη διατήρηση της ενέργειας και των νέων υλικών, καινούριες μέθοδοι και πολιτικές έχουν προταθεί για την ανάκτηση, τη βιομετατροπή και τη χρησιμοποίηση των θρεπτικών συστατικών των αποβλήτων της επεξεργασίας τροφίμων. Η επεξεργασία των αποβλήτων και των παραπροϊόντων αποβλέπει στην ανακύκλωση τους, στην χρησιμοποίησή τους σε βιομηχανίες, τη μετατροπή τους σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας ή και τη χρήση ως ζωοτροφές μετά από βιολογική επεξεργασία. Ειδικότερα, η βιομετατροπή των αποβλήτων τράβηξε την προσοχή γιατί αντιπροσωπεύουν ένα δυνατό και αξιοποιήσιμο πόρο για τη μετατροπή σε χρήσιμα προϊόντα (Martin, 1998).

Η χρήση των ανανεώσιμων γεωργικών και αγρο-βιομηχανικών απόβλητων ως πρώτες ύλες για την παραγωγή ζυμώσιμων σακχάρων βοηθούν στη μείωση του κόστους παραγωγής και την εξάρτηση από τις καλλιέργειες τροφίμων (Zahari et al., 2012). Πολλές βιοτεχνολογικές διεργασίες έχουν αναπτυχθεί, με σπουδαιότερες τις μικροβιακές ζυμώσεις, για την αξιοποίησή των παραπροϊόντων. Τα παραπροϊόντα μπορούν να αντικαταστήσουν τα καθαρά σάκχαρα ως πρώτη ύλη στις μικροβιακές ζυμώσεις, συμβάλλοντας στη μείωση του κόστους των βιοδιεργασιών (Peters, 2006). Αυτό οφείλεται στα υψηλής αξίας συστατικά τους όπως τα σάκχαρα, οι πρωτεΐνες, τα λίπη κλπ που μπορούν να βιομετατραπούν σε πρωτεΐνη, βιοαέριο, λίπασμα, οργανικά οξέα, λιπίδια, οργανικά οξέα, βιοπλαστικά, βιοιθανόλη, 1,3-προπανοδιόλη και πληθώρα άλλων προϊόντων (Peters, 2006).

I.1.2 Ανανεώσιμοι υδατάνθρακες ως πηγή άνθρακα

Οι βιομηχανικές ζυμώσεις έχουν ένα μεγάλο εύρος εφαρμογών στη διαχείριση των αποβλήτων και παραπροϊόντων. Τα οργανικά απόβλητα μπορούν να ζυμωθούν με ταυτόχρονη παραγωγή μεθανίου, υδρογόνου και χαμηλομοριακούς μεταβολίτες, όπως τα οργανικά οξέα (Karadag et al., 2010). Η βιοτεχνολογική αξιοποίηση ανανεώσιμων σακχαρούχων πρώτων υλών σχετίζεται με ζύμωση φυτικής ύλης που περιέχει σάκχαρα ή μπορεί να μετατραπεί σε σάκχαρα, καθώς και με τη ζύμωση βιομηχανικών και αστικών απόβλητων, γεγονός το οποίο δίνει λύση

στο πρόβλημα της απομάκρυνσης αυτών από το περιβάλλον, όπως αναφέραμε και στην προηγούμενη ενότητα.

Η φυτική βιομάζα, όπως τα διάφορα λιγνοκυτταρινικά ή αμυλούχα υλικά, θεωρείται η καταλληλότερη επιλογή πρώτης ύλης για τις διάφορες ζυμωτικές διεργασίες, δεδομένου ότι είναι μια φυσική, ανανεώσιμη οργανική ύλη, η οποία απαντάται σε αφθονία στη φύση. Οι υδατάνθρακες είναι συστατικά των τροφίμων καθώς αποτελούν πηγή ενέργειας αλλά και στοιχεία δομής (άμυλο, γλυκογόνο, κυτταρίνη). Τα κύρια συστατικά της φυτικής βιομάζας είναι η γλυκόζη και η ξυλόζη. Το μίγμα αυτών των σακχάρων δεν απαντάται πάντα αυτούσιο μέσα στην οργανική ύλη. Στις περισσότερες περιπτώσεις, απαιτείται μία προεργασία ανάκτησης των σακχάρων η οποία επιτυγχάνεται μέσω ενζυματικής υδρόλυσης ή υδρόλυσης με οξέα. Γενικά, οι πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται σαν πηγή σακχαρούχων υλικών τα οποία δύνανται να αξιοποιηθούν μέσω της βιοτεχνολογικής οδού ταξινομούνται στις εξής, τέσσερις κατηγορίες:

- Άμεσα ζυμώσιμες πρώτες ύλες: Τα απλά σάκχαρα ή ολιγοσακχαρίδια (πχ γλυκόζη, φρουκτόζη, σακχαρόζη, λακτόζη, τρεχαλόζη κλπ) ζυμώνονται απευθείας ή διασπώνται πριν από τη ζύμωση με επενέργεια απλών υδρολυτικών διεργασιών. Στην κατηγορία των άμεσα ζυμώσιμων πρώτων υλών κατατάσσονται κάποια φρούτα πλούσια σε φρουκτόζη και σακχαρόζη, το σακχαροκάλαμο, τα σακχαρότευτλα καθώς και τα προϊόντα επεξεργασίας αυτών, όπως είναι ο χυμός του σακχαροκάλαμου και η μελάσα.

Η γλυκόζη αποτελεί δομικό συστατικό διαφόρων ολιγοσακχαριτών, όπως της σακχαρόζης, της λακτόζης και της μαλτόζης, καθώς επίσης και πολυσακχαριτών όπως του αμύλου, του γλυκογόνου και της κυτταρίνης και τέλος και συστατικό γλυκοζιτών. Μπορεί να παρασκευαστεί βιομηχανικά με όξινη ή ενζυμική υδρόλυση του αμύλου και με όξινη υδρόλυση της κυτταρίνης. Είναι ζυμώσιμο σάκχαρο τόσο με αερόβιους μικροοργανισμούς όσο και με αναερόβιους (παραγωγή αιθανόλης).

Η σακχαρόζη (ή απλά ζάχαρη) είναι ευρύτατα διαδεδομένη στη φύση, ιδιαίτερα στο σακχαροκάλαμο και τα σακχαρότευτλα (περιέχουν 16-20% σακχαρόζη) και αποτελούν τις δύο κυριότερες πηγές από τις οποίες παραλαμβάνεται βιομηχανικά η σακχαρόζη με την εμπορική ονομασία ζάχαρη. Αποτελείται από μόρια γλυκόζης και φρουκτόζης ενωμένα μεταξύ τους με α-D-γλυκοζιτικό δεσμό και δεν είναι ζυμώσιμη απ' ευθείας, αλλά μετά από υδρόλυση αυτής. Η υδρόλυση της σακχαρόζης γίνεται με οξέα και με ένζυμα. Η ενζυμική υδρόλυση γίνεται με το ένζυμο ιμπερτάση (β -D-fructofuranoside fructohydrolase, EC 3.2.1.26) και η αντίδραση αυτή καλείται ιμπερτοποίηση. Η σακχαρόζη δεν είναι ζυμώσιμο σάκχαρο παρά μόνο μετά από ιμπερτοποίηση. Με την υδρόλυση αποφεύγεται η παραγωγή χρωματισμένων ενώσεων

οξειδωσης που αποτελούν τα υποπροϊόντα της όξινης υδρόλυσης και απαιτούν επεξεργασία αποχρωματισμού (Combes D. and Monsan P., 1982).

Η μελάσα αποτελεί ένα παραπροϊόν της σακχαροβιομηχανίας, το οποίο περιέχει 45-50% ζυμώσιμα σάκχαρα (σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη) και 50-55% οργανικά και ανόργανα συστατικά. Θα αναλυθεί περαιτέρω σε επόμενο κεφάλαιο.

Αμυλούχες πρώτες ύλες: Τα περισσότερα αμυλούχα προϊόντα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν υπόστρωμα για τις διάφορες ζυμωτικές διεργασίες. Η ζύμωση του αμύλου είναι μια διαδικασία περίπλοκη εν συγκρίσει με τη ζύμωση των σακχάρων. Το άμυλο είναι πολυμερές της γλυκόζης και αποτελείται από δύο τύπους μορίων, την αμυλόζη και την αμυλοπηκτίνη. Η βιομετατροπή του αμύλου σε προϊόντα υψηλής αξίας (π χ κιτρικό οξύ, αιθανόλη κλπ) είναι μια διαδικασία που ολοκληρώνεται σε δύο στάδια. Κατά το πρώτο στάδιο γίνεται η υδρόλυση του αμύλου όπου τούτο μετατρέπεται σε σάκχαρα είτε με τη χρήση ενός αμυλολυτικού μικροοργανισμού, είτε με την προσθήκη ενζύμων. Κατά την ενζυμική υδρόλυση του αμύλου (α-αμυλάση, β-αμυλάση, γλυκοαμυλάση) σχηματίζονται ανάλογα με την περίπτωση, μαλτόζη, γλυκόζη και οριοδεξτρίνες. Κατά την υδρόλυση του αμύλου με οξέα λαμβάνεται ως τελικό προϊόν σχεδόν ποσοτικά η γλυκόζη, που αποτελεί το απλούστερο δομικό τμήμα του μορίου του αμύλου. Κατά την όξινη υδρόλυση του αμύλου σχηματίζονται μερικά ενδιάμεσα προϊόντα με κομμώδη σύσταση και χωρίς καθορισμένη σύνθεση, που ονομάζονται δεξτρίνες. Με πλήρη υδρόλυση, οι δεξτρίνες μετατρέπονται σε γλυκόζη. Στο δεύτερο στάδιο γίνεται η ζύμωση όπου τα σάκχαρα μετατρέπονται στα τελικά προϊόντα.

Κυτταρινούχα υλικά: Τα λιγνοκυτταρινικά υλικά (ξύλο, καλάμια, άχυρα) αποτελούν την πιο άφθονη ανανεώσιμη πηγή ενέργειας σε βιομηχανικό επίπεδο. Παρόλο που η παγκόσμια παραγωγή φυτικής βιομάζας είναι ιδιαίτερα υψηλή, η χρήση των κυτταρινούχων υλικών δεν είναι πάντοτε πρακτική λόγω της εποχιακής διαθεσιμότητάς τους, του υψηλού κόστους μεταφοράς και αποθήκευσης των μεγάλων ποσοτήτων οργανικών υλικών αλλά και λόγω των δυσκολιών που προκύπτουν κατά την κατεργασία της λιγνοκυτταρίνης. Προσφάτως, η ενζυματική υδρόλυση της κυτταρίνης θεωρήθηκε μία πολλά υποσχόμενη τεχνολογία στον τομέα της παραγωγής αιθανόλης από κυτταρινούχα υλικά. Ωστόσο, η διαδικασία αυτή σε βιομηχανική κλίμακα κωλύεται από τεχνολογικά θέματα που προκύπτουν καθώς και από την έλλειψη βιοδιύλησητριών. Η λιγνοκυτταρίνη είναι ένα αρκετά πολύπλοκο υπόστρωμα που αποτελείται από μίγμα υδατανθράκων (κυτταρίνη και ημικυτταρίνη) και λιγνίνης. Διάφορες προεργασίες (μηχανικές, χημικές, προ-επεξεργασία με ατμό) απαιτούνται για την αποσύνθεση της. Για την αξιοποίηση του συγκεκριμένου υποστρώματος είναι απαραίτητη η υδρόλυσή του, η οποία

γίνεται κυρίως με ένζυμα. Σύμφωνα με τον Peters (2007), η τεχνολογία της υδρόλυσης μπορεί να περιλαμβάνει φυσικές διεργασίες (explosion-καύση με ατμό, καύση με αμμωνία, ζεστό νερό, θερμοϋδρόλυση υπό πίεση), χημικές μεθόδους, όπως υδρόλυση με συμπυκνωμένο και αραιωμένο οξύ και ακόμα ενζυμικές μεθόδους οι οποίες συχνά συνδυάζονται με τη χημική υδρόλυση. Τα υγρά υδρολύματα που παραλαμβάνονται από κάθε στάδιο και περιέχουν τα σάκχαρα, καθαρίζονται για να αξιοποιηθούν στη συνέχεια ως πηγή άνθρακα στις διάφορες ζυμώσεις. Το προϊόν που προκύπτει από την υδρόλυση είναι ένα μίγμα σακχάρων που αποτελείται από γλυκόζη και ξυλόζη. Η όλη διαδικασία απαιτεί υψηλό κόστος σακχάρων, σωστή μεταχείριση των λυμάτων και μακροπρόθεσμα την υποστήριξη των βιοτεχνολογικών βιομηχανιών (Zahari et al., 2012).

Βιομηχανικά απόβλητα (απόνερα) πλούσια σε υδατάνθρακες: Στην κατηγορία αυτή υπάγονται τα υγρά που αποβάλλονται κατά το πλύσιμο, καθάρισμα, επεξεργασία και κονσερβοποίηση φρούτων και λαχανικών. Η συγκέντρωση των υδατανθράκων ποικίλει ανάλογα την προέλευση και μπορεί να φτάσει έως και σε αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις της τάξης του 10-15% (w/v). Σημειώνεται ότι στην Ελλάδα δραστηριοποιούνται πολλές τέτοιου είδους βιομηχανίες, και η αξιοποίηση των αποβλήτων αυτού του τύπου μέσω της βιοτεχνολογικής οδού είναι αμελητέα (Αγγελής, 2007). Οι υδατάνθρακες που περιέχουν μπορεί να είναι είτε απλοί όπως μελάσες, σιρόπια γλυκόζης, απόβλητα βιομηχανιών παρασκευής παγωτών και γλυκών, βιομηχανιών φρούτων και τυροκομείων, είτε σύνθετοι όπως άμυλο και πηκτινικές ύλες. Τα απόβλητα αυτά ενίοτε αντιμετωπίζονται κατά τρόπο ορθολογικό από τους ενυπάρχοντες Σταθμούς Βιολογικού Καθαρισμού ή στους κατά τόπους σηπτικούς βόθρους. Για την απορρύπανση των αποβλήτων αυτών πραγματοποιείται Προηγμένου Τύπου Επεξεργασία, που συγχρόνως οδηγεί στην παραγωγή:

1. Μονοκυτταρικής πρωτεΐνης (single-cell protein),
2. Ενδιάμεσων οργανικών οξέων του κύκλου του Krebs, με κυριότερο το κιτρικό,
3. Βιοιθανόλης,
4. Γαλακτικού οξέος,
5. Μικροβιακής προέλευσης διαλυτών,
6. Αμινοξέων με κυριότερο το γλουταμινικό,
7. Μονοκυτταρικού λίπους,
8. Ενζύμων

I.2 Μελάσα

I.2.1 Εισαγωγή

Η μελάσα αποτελεί το κύριο παραπροϊόν κατά την παραγωγή της ζάχαρης και περιέχει μεγάλη ποσότητα σακχάρων (50% σάκχαρα επί ξηρού, κυρίως σακχαρόζη και σημαντικές ποσότητες γλυκόζης και φρουκτόζης) με αποτέλεσμα να αποτελεί ιδανικό υπόστρωμα στις ζυμωτικές διεργασίες για την παραγωγή αιθανόλης, ζύμης αρτοποιίας, κιτρικού οξέος, γλουταμινικού οξέος και άλλων καθώς και στις ζωοτροφές με χαμηλό σχετικά κόστος.

Η μελάσα είναι ένα παχύρευστο σιρόπι, παραπροϊόν από την επεξεργασία του ζαχαροκάλαμου ή του ζαχαρότευτλου στην παραγωγή ζάχαρης. Η λέξη μελάσα προέρχεται από την πορτογαλική λέξη *melaço*, η οποία προέρχεται από το *mel mellis*, τη λατινική λέξη για το "μέλι". Η ποιότητα της μελάσας εξαρτάται από την ωριμότητα της ζάχαρης από το ζαχαροκάλαμο ή τα ζαχαρότευτλα, το ποσό της ζάχαρης που εξάγεται, καθώς και από τη μέθοδο της εξόρυξης. Υπάρχουν τρία είδη μελάσας: α) η ήπια ή πρώτη μελάσα, β) το «σκοτάδι» ή δεύτερη μελάσα και γ) η blackstrap μελάσα.

Για την παραλαβή της κρυσταλλικής ζάχαρης, τα φυτά ζαχαροκάλαμο ή ζαχαρότευτλο που χρησιμοποιούνται ως πρώτη ύλη, συγκομίζονται και αφαιρούνται τα φύλλα τους. Στη συνέχεια γίνεται θραύση ή πολτοποίησή τους ώστε να εξαχθεί ο χυμός τους που είναι πλούσιος σε σάκχαρα. Ο χυμός αυτός βράζεται για να συγκεντρώσει τα συστατικά που θα οδηγήσουν στην κρυστάλλωση της ζάχαρης. Το αποτέλεσμα του πρώτου βρασμού και της απομάκρυνσης των κρυστάλλων ζάχαρης είναι η πρώτη μελάσα, η οποία έχει και την υψηλότερη περιεκτικότητα σε σάκχαρα σε σχέση με τα υπόλοιπα είδη μελάσας, διότι έχει αφαιρεθεί μικρότερη ποσότητα σακχάρων από το χυμό σε σχέση με τη συνέχεια της διεργασίας. Η δεύτερη μελάσα δημιουργείται μετά από δεύτερο βράσιμο και μια δεύτερη εξαγωγή ζάχαρης και έχει μια ελαφρώς πικρή γεύση. Το τρίτο βράσιμο της ζάχαρης δίνει τη blackstrap μελάσα. Το μεγαλύτερο ποσοστό της σακχαρόζης από τον αρχικό χυμό έχει αφαιρεθεί και κρυσταλλοποιηθεί αλλά η μαύρη λωρίδα μελάσας εξακολουθεί να περιέχει μια ποσότητα σακχαρόζης.

I.2.2 Σύσταση της μελάσας και τα χαρακτηριστικά της

Η σύσταση της μελάσας ποικίλλει ανάλογα με την ποικιλία των ζαχαροκάλαμων, τις αγρο-κλιματολογικές συνθήκες της περιοχής, τη διαδικασία παρασκευής ζάχαρης και τη διακίνηση και αποθήκευσης της (Godbole, 2002). Στον Πίνακα I.2.2-1 παρουσιάζεται η χημική σύσταση της μελάσας από ζαχαροκάλαμο και από ζαχαρότευτλο.

Πίνακας 1.2.2-1: Σύσταση μελάσας από ζαχαροκάλαμο και ζαχαρότευτλο (Curtin, 1983; Chen and Chou, 1993; Godbole, 2002)

Χαρακτηριστικό	Ζαχαροκάλαμο	Ζαχαρότευτλο
Brix (%)	79.5 85-92 ^b	79.5
Ειδικό βάρος	1.41 1.38-1.52 ^a	1.41
Συνολικά Στερεά (%)	75.0 75-88 ^a	77.0
Συνολικά Σάκχαρα (%)	46.0 44-46 ^a 50-90 ^b	48.0
Πρωτεΐνες (%)	3.0 2.5-4.5 ^b	6.0
Συνολικά λιπαρά (%)	0.0	0.0
Συνολικές ίνες (%)	0.0	0.0
Τέφρα (%)	8.1 7-15 ^b	8.7
Ασβέστιο (%)	0.8	0.2
Φώσφορος (%)	0.08	0.03
Κάλιο (%)	2.4	4.7
Νάτριο (%)	0.2	1.0
Χλώριο (%)	1.4	0.9
Θείο (%)	0.5	0.5

^a Godbole(2002)

^b Chen and Chou(1993)

Ωστόσο, κατά την επεξεργασία της μελάσας παράγονται μεγάλοι όγκοι αποβλήτων (Dahiya et al.,2001). Τα απόβλητα αυτά χαρακτηρίζονται από υψηλές τιμές COD (80000-10000 mg/L) και BOD (40000-50000 mg/L) καθώς και από χαμηλό pH (4-5), άσχημη οσμή και σκούρο χρώμα (Central Pollution Control Board 1994, 2003). Η απευθείας διάθεση των αποβλήτων αυτών μπορεί να προκαλέσει σοβαρά προβλήματα σε ένα οικοσύστημα. Εκτός των άλλων, η

μελάσα περιέχει θρεπτικά στοιχεία, όπως άζωτο (1600-4200 mg/L), φώσφορο (225-3.038 mg/L) και κάλιο (9600-17475 mg/L) που μπορεί να οδηγήσουν σε προβλήματα ευτροφισμού. Επιπλέον, το σκούρο χρώμα μειώνει την ικανότητα των οργανισμών για φωτοσύνθεση, εμποδίζοντας τη διέλευση του ηλιακού φωτός, με αποτέλεσμα να προκαλεί σοβαρές βλάβες στην υδρόβια ζωή (FitzGibbon et al., 1998). Το σκούρο καφέ χρώμα είναι το αποτέλεσμα της μη ενζυματικής αντίδρασης αμαύρωσης, γνωστής και ως αντίδραση Maillard, που λαμβάνει χώρα λόγω της δράσης των αμινοξέων επί των αναγόντων σακχάρων. Τελικό προϊόν της αντίδρασης είναι οι μελανοϊδίνες, που θεωρούνται περιβαλλοντικοί ρύποι (Reynolds, 1968; Wedzicha & Kaputo, 1992; Patil et al., 2001; Kumar & Chandra, 2006; Thakkar et al., 2006) και θα μελετηθούν στη συνέχεια. Η διάθεση της στο έδαφος είναι εξίσου επικίνδυνη εξαιτίας της μείωσης της εδαφικής αλκαλικότητας και της διάθεσης του μαγγανίου που παρεμποδίζουν τη βλάστηση των σπόρων (Kannabiran and Pragasam, 1993; Agarwal and Pandey, 1994; Dahiya et al., 2001; Kumar & Chandra, 2006; Thakkar et al., 2006). Μελέτες που έχουν γίνει στην ποιότητα του νερού, έχουν δείξει ότι οι ποταμοί που έχουν μολυνθεί από μελάσα παρουσιάζουν υψηλές τιμές BOD, της τάξης των 1600-21000 mg/L σε απόσταση 8km από το σημείο απόρριψης (Baruah et al., 1993).

I.2.3 Μελανοϊδίνες

Οι μελανοϊδίνες είναι χρωστικές ουσίες, χρώματος σκούρο καφέ προς μαύρο και αποτελούν προϊόντα συμπύκνωσης των σακχάρων και των αμινοξέων που παράγονται από τη μη-ενζυματική αντίδραση αμαύρωσης, γνωστή και ως αντίδραση Maillard (Plavsic et al., 2006). Η αντίδραση Maillard είναι μια χημική αντίδραση που λαμβάνει χώρα μεταξύ των καρβονυλομάδων των αναγωγικών σακχάρων και των αμινομάδων των αμινοξέων, των πεπτιδίων, ή των πρωτεϊνών (Wang et al., 2011). Οι φυσικές μελανοϊδίνες βρίσκονται στα τρόφιμα (Painter et al., 1998), στα ποτά και σε μεγάλο βαθμό σε διάφορα αγρο-βιομηχανικά προϊόντα όπως η μελάσα (Gagosian and Lee, 1981; Kumar and Chandra, 2006). Η δομή των μελανοϊδινών δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητή αλλά θεωρείται πως δεν έχει μια καθορισμένη δομή, καθώς η στοιχειακή της δομή και η χημική της σύσταση (Ikan et al., 1990) εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τη φύση και τη μοριακή συγκέντρωση των αντιδρώντων. Επιπλέον, εξαρτάται και από τις συνθήκες της αντίδρασης όπως το pH, τη θερμοκρασία, το χρόνο θέρμανσης και το σύστημα διαλυτών που χρησιμοποιείται (Yaylayan and Kaminsky, 1998).

Οι μελανοϊδίνες που βρίσκονται στα τρόφιμα, όπως σε προϊόντα αρτοποιίας, στον καφέ και στην μύρα που έχουν καφέ χρώμα, προσδίδουν αντιοξειδωτικές, αντιαλλεργικές,

αντιμικροβιακές και κυτταροτοξικές ιδιότητες που βοηθούν στην υγεία του ανθρώπου καθώς δρουν ως αναγωγικοί παράγοντες και ως χηλικές ενώσεις. Παρόλα αυτά, οι μελανοϊδίνες μπορεί να είναι μεταλλαξιόνες, καρκινογόνες και κυτταροτοξικές, κάτι που είναι επιβλαβές για την ανθρώπινη υγεία (Silvan et al., 2006; Borrelli et al., 2003).

Τα απόβλητα με υψηλό ποσοστό μελανοϊδινών που προέρχονται από τις διάφορες βιομηχανίες, αποτελούν τη κύρια πηγή ρύπανσης του εδάφους και των υδάτινων πόρων (Evershed et al., 1997), καθώς είναι ιδιαίτερα ανθεκτικά στη μικροβιακή προσβολή και στις συμβατικές βιολογικές διεργασίες. Ως εκ τούτου, τα λύματα αυτά απαιτούν μια προεπεξεργασία, πριν απορριφθούν στο περιβάλλον (Mohana et al., 2007; Kumar and Chandra, 2006).

I.2.4 Επεξεργασία μελάσας και αποικοδόμηση μελανοϊδινών

Η επεξεργασία της μελάσας γίνεται κυρίως για δύο λόγους: αρχικά για τον αποχρωματισμό του αποβλήτου και δεύτερον χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα για την παραγωγή βιοτεχνολογικών προϊόντων με ταυτόχρονη επίτευξη αποχρωματισμού του.

Η επεξεργασία του αποβλήτου με φυσικές ή χημικές μεθόδους (κροκίδωση, οζονόλυση, απορρόφηση σε ενεργό άνθρακα) κρίνεται ακατάλληλη λόγω του υψηλού κόστους εφαρμογής σε μεγάλη κλίμακα, ενώ ιδιαίτερα δύσκολη θεωρείται και η μεταχείριση με τις συνήθεις βιολογικές διεργασίες όπως η ενεργοποιημένη ιλύς (Singh & Nigam, 1995). Οι βιολογικές επεξεργασίες κατά τις οποίες χρησιμοποιούνται μύκητες του γένους *Coriolus* (Aoshima et al., 1985; Ohmomo et al., 1985b), *Aspergillus* (Ohmomo et al., 1987, 1988a), *Phanerochaete* (Fahy et al., 1997) και βακτήρια του γένους *Bacillus* (Murata et al., 1992) και *Lactobacillus* (Ohmomo et al., 1988b) έχουν επιτευχθεί επιτυχώς και μπορούν έτσι να εφαρμοστούν ως τεχνική βιοτροποποίησης (bioremediation technique) (Kumar and Chandra, 2006). Η βιολογική αποικοδόμηση των μελανοϊδινών εξαρτάται από το pH, τη θερμοκρασία, τη συγκέντρωση των θρεπτικών συστατικών, τη συγκέντρωση του οξυγόνου και το μέγεθος του εμβολίου, ενώ το ενζυμικό σύστημα που είναι υπεύθυνο για την αποικοδόμηση των μελανοϊδινών περιλαμβάνει κυρίως οξειδάσεις και περοξειδάσεις, όπως η οξειδάση της γλυκόζης, οι εξαρτώμενες και μη μαγγανικές περοξειδάσεις (MnP και MIP αντίστοιχα) (Watanabe et al., 1982; Ohmomo et al., 1985; Aoshima et al., 1985). Μελέτες έδειξαν πως η MnP και η MIP έχουν την ικανότητα παρουσία H_2O_2 να αποχρωματίζουν τις μελανοϊδίνες και να είναι μέγιστη σε συγκεκριμένη τιμή pH, θερμοκρασία και εξαρτάται από την εξειδίκευση του υποστρώματος (Boer et al., 2006).

I.2.5 Βιο-αποικοδόμηση μελανοϊδινών

Οι μικροοργανισμοί (βακτήρια / μύκητες / ζύμες) λόγω της έμφυτης ικανότητας τους να μεταβολίζουν ποικίλες ενώσεις, έχουν χρησιμοποιηθεί για τη βιο-αποικοδόμηση πολύπλοκων, τοξικών και ανθεκτικών ενώσεων, που βρίσκονται σε βιομηχανικά απόβλητα για την περιβαλλοντική ασφάλεια. Η μικροβιακή αποικοδόμηση και ο αποχρωματισμός των βιομηχανικών αποβλήτων είναι μια φιλική προς το περιβάλλον και οικονομικά ανταγωνιστική εναλλακτική λύση στη χημική διαδικασία της αποσύνθεσης των αποβλήτων (Mohana et al, 2007;. Pant and Adholeya, 2007). Η αποικοδόμηση των αποβλήτων αυτών μετριέται με τη μείωση της απορρόφησης σε συγκεκριμένο μήκος κύματος που εξαρτάται από τις ενώσεις, τη βακτηριακή ανάπτυξη, την αύξηση της βιομάζας, και τη μείωση της έντασης χρώματος. Ο αποχρωματισμός και η βιο-αποικοδόμηση των υγρών αποβλήτων μελετήθηκε στα 475nm (Chandra et al., in press).

Οι Kumar και Viswanathan (1991) απομόνωσαν κάποια βακτηριακά στελέχη από τα λύματα και τα εμβολίασαν σε απόβλητα κατατακτηρίων. Παρατήρησαν πως το COD μειώθηκε κατά 80% μέσα σε 4-5 μέρες χωρίς αερισμό και τα κύρια προϊόντα ήταν η βιομάζα, το διοξείδιο του άνθρακα και τα πτητικά οξέα. Το βακτήριο *Pseudomonas fluorescense* αποχρωμάτισε υγρά απόβλητα μελανοϊδινών (MWW) έως 76% υπό μη άσηπτες συνθήκες και έως 90% σε άσηπτικές συνθήκες (Dahiya et al., 2001a). Η διαφορά αυτή στον αποχρωματισμό οφείλεται στο γεγονός ότι οι μελανοϊδίνες σταθεροποιούνται ανάλογα με το pH και τη θερμοκρασία και στις υψηλότερες θερμοκρασίες κατά την αποστείρωση, οι μελανοϊδίνες διασπώνται σε χαμηλού μοριακού βάρους ενώσεις (Ohmomo et al., 1987). Κυανοβακτήρια όπως το *Oscillatoria boryna* έχουν επίσης αναφερθεί να αποικοδομούν τις μελανοϊδίνες λόγω της παραγωγή H_2O_2 , και υδροξειδίου (Kalavathi et al., 2001). Τα τελευταία χρόνια, αρκετοί Βασιδιομύκητες και Ασκομύκητες έχουν χρησιμοποιηθεί για τον αποχρωματισμό τόσο των φυσικών όσο και των συνθετικών μελανοϊδινών (Thakkar et al., 2006; Raghukumar et al, 2004;. Raghukumar and Rivonkar, 2001; Miranda et al., 1996).

Πολλοί ερευνητές έχουν μελετήσει τη χημική και μικροβιακή αποικοδόμηση και τον αποχρωματισμό των φυσικών και συνθετικών μελανοϊδινών στις μελάσες από ζαχαροκάλαμο, όμως δεν υπάρχει μια σαφής ερμηνεία σχετικά με το μηχανισμό αποικοδόμησης τους (Metsoviti et al., 2011). Αυτό οφείλεται κυρίως στην πολυπλοκότητα των αντιδράσεων Maillard και στη μη καθορισμένη δομή των μελανοϊδινών (Ikan et al., 1990, 1992) .

1.2.6 Παραγωγή βιοτεχνολογικών προϊόντων

Όπως έχουμε προαναφέρει, ένα από τα χαμηλού κόστους υποστρώματα που προέρχονται από τα γεωργικά υπολείμματα, αποτελεί η μελάσα ζαχαροκάλαμου. Θεωρείται κατάλληλη για μικροβιακές ζυμώσεις αφού αποτελεί πηγή άνθρακα και είναι πλούσια σε σάκχαρα (Akaraonye et al., 2012).

Ένα από τα σημαντικότερα προϊόντα είναι η αιθανόλη. Από την δεκαετία του '80 έχουν γίνει διάφορες μελέτες για την παραγωγή αιθανόλης με πηγή άνθρακα τη μελάσα τόσο από τα ζαχαρότευτλα όσο και από το ζαχαροκάλαμο. Κατά κύριο λόγο χρησιμοποιήθηκαν ελεύθερα ή ακινητοποιημένα κύτταρα της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae* και του βακτηρίου *Zymomonas mobilis*. Επίσης, έχει μελετηθεί και η παραγωγή αιθανόλης από μη-αποστειρωμένη μελάσα σε συστήματα συνεχούς και ημι-συνεχούς καλλιέργειας με την χρήση της ζύμης *S. cerevisiae* από αρκετούς ερευνητές. Η ημι-συνεχής καλλιέργεια αποδείχθηκε ότι είναι το καλύτερο σύστημα ζύμωσης για την παραγωγή αιθανόλης.

Το κιτρικό οξύ είναι ένα άλλο βιοτεχνολογικό προϊόν και παράγεται κατά κύριο λόγο από το μύκητα *Aspergillus niger*, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα τη μελάσα. Το κιτρικό οξύ αποτελεί έναν ενδιάμεσο μεταβολίτη του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων και χρησιμοποιείται στη βιομηχανία τροφίμων, στη φαρμακευτική και σε άλλες βιομηχανίες (Wang and Liu, 1996). Το κιτρικό οξύ παράγεται είτε με βυθισμένη ζύμωση (submerged fermentation-SmF) είτε με υγρή ζύμωση επιφάνειας (liquid surface fermentation-LSF) με χρήση της μελάσας ως υπόστρωμα (Milson and Meers, 1985). Η παραγωγή κιτρικού οξέος από το μύκητα *Aspergillus niger* είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στην ύπαρξη μετάλλων στην μελάσα, όπως σίδηρος, ψευδάργυρος, χαλκός, μαγγάνιο κτλ, ειδικότερα κατά την διάρκεια της βυθισμένης ζύμωσης. Η συγκέντρωση αυτών των βαρέων μετάλλων πρέπει να μειωθεί αρκετά κάτω από το απαραίτητο για τη βέλτιστη μυκηλιακή αύξηση (Majolli and Aguirre, 1999). Οι Pera & Callieri (1997) αναφέρουν ότι η παραγωγή κιτρικού οξέος με την χρήση μελάσας ως υπόστρωμα, επηρεάζεται σοβαρά από την παρουσία ιόντων σιδήρου σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 0,2ppm.

Ένα ακόμη βιοτεχνολογικό προϊόν είναι το γλυκονικό οξύ. Το γλυκονικό οξύ είναι προϊόν οξειδώσεως της γλυκόζης και βρίσκει εφαρμογή στην φαρμακευτική, στην βιομηχανία απορρυπαντικών, στην βιομηχανία τροφίμων, στην βιομηχανία δερμάτων και σε άλλες βιομηχανίες. Η παραγωγή του σε υπόστρωμα μελάσας, πραγματοποιείται με ζύμωση με την χρήση γενετικά τροποποιημένων στελεχών του μύκητα *Aspergillus niger*. Η ζύμωση στερεού υποστρώματος (Solid-state fermentation-SSF), η οποία ήταν πολύ πιο αποδοτική σε σχέση με τη

βυθισμένη ζύμωση. Η ζύμωση στερεού υποστρώματος επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, οι πιο σημαντικοί είναι η χρήση κατάλληλου στελέχους, κατάλληλου υποστρώματος καθώς και οι άλλοι παράμετροι της διεργασίας (Pandey et al., 2001). Θα πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη σημασία στα υλικά που θα χρησιμοποιηθούν για την στερεοποίηση του υποστρώματος γιατί αυτά παρέχουν στους μικροοργανισμούς τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά ενώ μπορεί να περιέχουν και συστατικά που αναστέλλουν την μικροβιακή ανάπτυξη.

Αξίζει να αναφέρουμε και την παραγωγή φρουκτο-ολιγοσακχαριτών από τη μελάσα. Οι φρουκτο-ολισακχαρίτες καθώς και οι ισομαλτο-ολισακχαρίτες είναι πρεβιοτικές ουσίες, δηλαδή ουσίες που επηρεάζουν την ανάπτυξη και δραστηριότητα συγκεκριμένων μικροοργανισμών και κυρίως των ενδογενών bifidobacteria. Οι φρουκτο-ολισακχαρίτες παράγονται βιομηχανικά από καθαρή σακχαρόζη, χρησιμοποιώντας ενδοκυτταρικά ένζυμα από το μύκητα *Aspergillus* (Hidaka et al., 1988; Hirayama et al., 1989) ή το ζυμοειδές *Aureobasidium* (Yun et al, 1990).

Καλλιέργεια του ζυμοειδούς *Aureobasidium pullulans* έδωσε την πουλλουλάνη, έναν μικροβιακό, υδατοδιαλυτό πολυσακχαρίτη. Η πουλλουλάνη αποτελείται από μονάδες μαλτοτριόζης, ενωμένες μεταξύ τους με α,1-6 γλυκοζιτικούς δεσμούς. Έχει προταθεί μια ευρεία χρήση εφαρμογών αυτού του πολυσακχαρίτη εξαιτίας των ιδιοτήτων του να σχηματίζει φιλμς, τα οποία είναι ανθεκτικά στα έλαια και μη διαπερατά στο οξυγόνο. Επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν υλικό συσκευασίας και σαν υποκατάστατο αμύλου σε τροφές χαμηλών λιπαρών, σε γαλακτώματα περιποίησης προσώπου, καθώς και σε άλλες βιομηχανικές και φαρμακευτικές εφαρμογές. Η συγκέντρωση του πολυσακχαρίτη αυξάνεται καθώς αυξάνεται και η παροχή αέρα. Η παροχή αέρα έχει ως αποτέλεσμα την καλύτερη ανάδευση στο βιοαντιδραστήρα, βοηθώντας έτσι την καλύτερη διαβάθμιση στη συγκέντρωση μέσα και έξω από το κύτταρο. Η παροχή μέσω της διάχυσης, βοηθάει την καλύτερη διαθεσιμότητα των σακχάρων, ενώ διευκολύνει την καλύτερη διακίνηση των αερίων και άλλων παραπροϊόντων του καταβολισμού από το μικροπεριβάλλον των κυττάρων. Η παροχή αέρα βοηθάει την παροχή μέσα στο κύτταρο και έτσι στην αύξηση της συγκέντρωσης της βιομάζας, η οποία έχει ως συνέπεια την καλύτερη παραγωγή προϊόντος. Η υψηλότερη συγκέντρωση του πολυσακχαρίτη (23 g/L) επιτεύχθηκε στην καλλιέργεια με παροχή αέρα 1 vvm, ενώ στις καλλιέργειες χωρίς καθόλου παροχή ή παροχή 0.5 vvm, η μέγιστη συγκέντρωση του πολυσακχαρίτη ήταν 12 και 14 g/L αντίστοιχα.

Ένα επιπλέον βιοτεχνολογικό προϊόν είναι το ηλεκτρικό οξύ. Το ηλεκτρικό οξύ παράγεται από διάφορα μεταβολικά μονοπάτια τόσο αερόβιων όσο και δυνητικά αερόβιων οργανισμών και αποτελεί πρόδρομο ουσία για πληθώρα προϊόντων, που περιλαμβάνουν

εμπορικά, χημικά, φαρμακευτικά, πρόσθετα τροφών, διαλύτες και βιοαποικοδομίστμα πλαστικά (Willke and Vorlop, 2004). Η ζύμωση που πραγματοποιήθηκε από το βακτήριο *Actinobacillus succinogenes*, έδωσε μετά από 60 ώρες 44.2 ± 1.0 g/L ηλεκτρικού οξέος. Σημαντικά παραπροϊόντα της όλης διαδικασίας ήταν το οξικό οξύ ($6,2 \pm 0,3$ g/L) και το μυρμηκικό οξύ (1.7 ± 0.1 g/L). Η ζύμωση του βακτηρίου *Actinobacillus succinogenes* σε μελάσα (η οποία είχε προηγουμένως επεξεργαστεί για απομάκρυνση βαρέων μετάλλων) οδήγησε σε τελική συγκέντρωση ηλεκτρικού οξέος 50.6 g/L με ταυτόχρονη κατανάλωση του 95% των αρχικών σακχάρων.

Ένα επιπλέον μεταβολικό προϊόν είναι το ενδοκυτταρικό λίπος, που παράγεται κατά την καλλιέργεια της ζύμης *Trichosporon fermentans* έχοντας ως περιοριστικό παράγοντα το άζωτο. Με υπόστρωμα τη μελάσα προκύπτουν λίπη, των οποίων τα λιπαρά οξέα έχουν παρόμοια σύσταση με τα φυτικά λιπαρά οξέα και ο συντελεστής απόδοσης σε μεθυλεστέρες αυτών των λιπαρών είναι 92%. Την έβδομη μέρα της ζύμωσης παρατηρήθηκε η υψηλότερη περιεκτικότητα σε λίπος (57%) καθώς επίσης και ο μεγαλύτερος συντελεστής αποδόσεως (12.3 g/L). Οι παράγοντες που επηρεάζουν την αποδοτικότητα της ζυμώσεως είναι ποικίλοι. Οι πιο σημαντικοί έχουν να κάνουν με την σύνθεση του υποστρώματος, για παράδειγμα τη πηγή αζώτου και το λόγο C/N, ενώ σημαντική επίδραση ασκούν και οι συνθήκες καλλιέργειας, όπως η θερμοκρασία και το pH (Chatzifragkou et al., 2010; Fakas et al., 2007; Koike et al., 2001; Suutari et al., 1993; Papanikolaou et al., 2007). Τα αποτελέσματα αναλύσεων έδειξαν τα λιπαρά οξέα που παράγονται από την ζύμη *T. fermentans* περιλάμβαναν κυρίως το παλμιτικό οξύ, το στεαρικό οξύ, το ελαϊκό οξύ και το λινολενικό οξύ και το ποσοστό των ακόρεστων λιπαρών οξέων ήταν περίπου 64%.

Τέλος, οι El-Enshay et al. (2008) χρησιμοποίησαν τον ακτινομύκητα *Saccharopolyspora erythraea* και πραγματοποιώντας βυθισμένη ζύμωση, κατάφεραν να παράγουν από τη μελάσα το αντιβιοτικό ερυθρομυκίνη. Η ερυθρομυκίνη είναι ένας δευτερογενής μεταβολίτης και η παραγωγή του αποτελεί μια πολύπλοκη διαδικασία, η οποία εξαρτάται τόσο από την σύνθεση του υποστρώματος όσο και από τις συνθήκες καλλιέργειας. Όσον αφορά το υπόστρωμα, προσοχή πρέπει να δοθεί στη συγκέντρωση των υδατανθράκων, στην πηγή αζώτου, στην πηγή φωσφόρου και στα ιχνοστοιχεία (Singh et al., 1981). Γενικά, η πηγή άνθρακα πρέπει να χρησιμοποιείται σε υψηλές συγκεντρώσεις, και για αυτόν τον λόγο η χρήση μελάσας θεωρείται καλή πηγή άνθρακα. Η παραγωγή της έχει μελετηθεί και τους Metsoviti et al., 2011 σε μελέτη βακτηριοσινών. Χρησιμοποιείται στην φαρμακευτική για την καταπολέμηση των Gram- και των Gram+ βακτηρίων, όπως για παράδειγμα τα βακτήρια *Staphylococci* spp. και *Neisseria* spp.

(Lesmana et al., 2001) ενώ μπορεί να συνδυαστεί με άλλα φάρμακα για την καταπολέμηση της ελονοσίας.

I.3. Η ένωση “2,3-βουτανοδιόλη”

Καθώς τα αποθέματα του αργού πετρελαίου γίνονται όλο και πιο σπάνια, τα βιο-δωλιστηρία που ασχολούνται με τις διαδικασίες μετατροπής της βιομάζας και την παραγωγή καυσίμων, ενέργειας και χημικών ουσιών από ανανεώσιμες πηγές, βρίσκονται στο στάδιο της ανάπτυξης σε παγκόσμιο επίπεδο (Kamm and Kamm, 2004; Ragauskas et al., 2006). Έτσι, πολλές χημικές ουσίες που στο παρελθόν μπορούσαν να παραχθούν μόνο από χημικές διεργασίες, στη σημερινή εποχή μπορούν να παραχθούν βιολογικά με τη χρήση ανανεώσιμων πηγών (Danner and Braun, 1999; Hatti-Kaul et al., 2007). Η μικροβιακή παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης (2,3-BD) είναι ένα τέτοιο παράδειγμα και το ενδιαφέρον για την παραγωγή της έχει αυξηθεί εντυπωσιακά λόγω του μεγάλου αριθμού βιομηχανικών εφαρμογών τις οποίες αυτό το υλικό έχει (Celińska and Grajek, 2009; Wu et al., 2008). Η 2,3-βουτανοδιόλη είναι ένα προϊόν υψηλής προστιθέμενης αξίας, το οποίο παράγεται από τη βιομετατροπή (κατά κύριο λόγο) από την εμπορική γλυκόζη και από άλλα σακχαρούχα υλικά εκκίνησης (πχ αγκινάρα της Ιερουσαλήμ). Η κύρια χρήση της είναι στα βιοκαύσιμα και στα γεωργο-βιομηχανικά προϊόντα, τα οποία θα αναλυθούν στην συνέχεια.

I.3.1. Χαρακτηριστικά και βιομηχανικές εφαρμογές 2,3-βουτανοδιόλης

Η 2,3-βουτανοδιόλη είναι γνωστή και ως διμέθυλο γλυκόλη και έχει τον χημικό τύπο $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ με μοριακή μάζα 90,121 g/mol. Έχει σημείο βρασμού τους 180-184 °C και σημείο τήξης τους -60 °C. Μπορεί να εμφανιστεί σαν άχρωμο και άοσμο υγρό ή και σε κρυσταλλική μορφή. Η 2,3-βουτανοδιόλη απαντάται σε 3 ισομερή: D(-)-, L(+)- και μέσο-μορφή. Στον Πίνακα I.3.1-1 παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά της 2,3-βουτανοδιόλης.

Πίνακας I.3.1-1: Χαρακτηριστικά της 2,3-βουτανοδιόλης

Γενικά Χαρακτηριστικά	
Όνομασία (κατά IUPAC);	2,3-βουτανοδιόλη
Μοριακός τύπος:	$\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2$
Μοριακή μάζα:	90.121 g/mol
Χημικά Χαρακτηριστικά	
Πυκνότητα:	0.987 g/mL

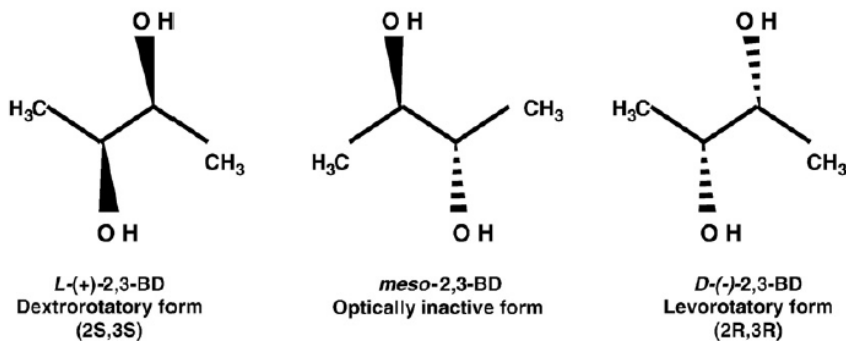
Σημείο βρασμού:

180-184 °C

Σημείο τήξης:

-60 °C

Στερεοϊσομερή

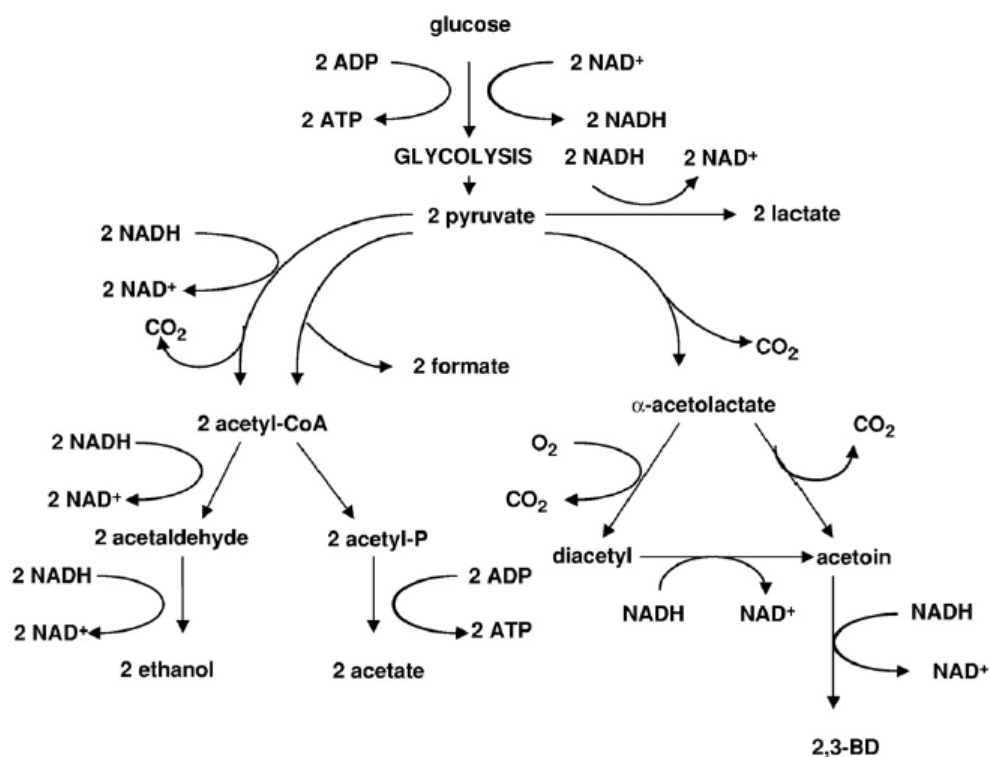


(Celińska & Grajek, 2009)

Η 2,3-βουτανοδιόλη είναι ένα από τα σημαντικότερα προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας με πληθώρα εφαρμογών και χρήσεων. Μια από τις σημαντικότερες εφαρμογές της 2,3-BD είναι η μετατροπή της σε 1,3-βουταδιένη, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην παραγωγή συνθετικού καουτσούκ. Η σύνθεση αυτή ήταν ιδιαίτερα σημαντική στον 2^ο Παγκόσμιο Πόλεμο, που οι ανάγκες για παραγωγή καουτσούκ ήταν υψηλές (Celińska & Grajek, 2009). Η 2,3-βουτανοδιόλη μπορεί να προστεθεί και σαν αρωματικό πρόσθετο στην βιομηχανία των τροφίμων, δίνοντας μια βουτυρώδη γεύση όταν μετατραπεί σε διακετύλιο με αφυδρογόνωση (Bartowsky and Henschke, 2004). Επιπλέον, λόγω της βακτηριοστατικής δράσης χρησιμοποιείται και ως συντηρητικό. Μία άλλη χρήση της είναι η μετατροπή της με αφυδάτωση σε μεθυλ-αιθυλ-κετόνη (MEK), η οποία χρησιμοποιείται ως υγρό πρόσθετο στα καύσιμα, αλλά και ως διαλύτης στην σύνθεση ρητίνων (Celińska & Grajek, 2009). Η εστεροποίηση της 2,3-βουτανοδιόλης έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή προϊόντων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη βιομηχανία φαρμάκων και καλλυντικών (Garg and Jain, 1995). Πολύ σημαντική είναι η θερμαντική αξία της 2,3-βουτανοδιόλης (27198 J/g) σε σύγκριση με άλλα υγρά καύσιμα όπως η μεθανόλη (22081 J/g) και η αιθανόλη (29055 J/g) (Flickinger, 1980). Λόγω του υψηλού αριθμού οκτανίων εφαρμόζεται ως ενισχυτής οκτανίου στην βενζίνη ενώ χάρη του χαμηλού σημείου τήξης στους -60°C, η 2,3-βουτανοδιόλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αντιψυκτικό (Soltys et al., 2001). Η 2,3-βουτανοδιόλη καθώς και τα παράγωγά του βρίσκουν εφαρμογές στα πολυμερή και στα πλαστικά. Άλλες εφαρμογές είναι η παραγωγή εκτυπωτικών μελανιών, αρωμάτων, καπνογόνων και πλαστικών (Garg and Jain, 1995).

1.3.2. Παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης

Η μικροβιακή παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης έχει μια ιστορία παραπάνω των 100 χρόνων. Η σύνθεση της 2,3-βουτανοδιόλης μελετήθηκε για πρώτη φορά το 1906 από τους Harden και Walpole σε καλλιέργεια του μικροοργανισμού *Aerobacter aerogenes* (*Klebsiella pneumoniae*) και ακολούθησε ο Donker (1926) μελετώντας τη σύνθεση της με το μικροοργανισμό *Bacillus polymyxa*. Βιομηχανικής κλίμακας παραγωγή αυτής της ένωσης πιστεύεται ότι προτάθηκε για πρώτη φορά το 1993 από τους Fulmer και τους συνεργάτες του. Στη δεκαετία του '70, η παραγωγή της γινόταν με χημικές μεθόδους. Όμως το υψηλό κόστος περιόρισε την παραγωγή της με αποτέλεσμα να στραφεί το ενδιαφέρον προς τη μικροβιακή παραγωγή (Li et al., 2011). Ο κυριότερος τρόπος παραγωγής της 2,3-βουτανοδιόλης μέσω της βιοτεχνολογικής οδού είναι μέσω διαφόρων μικροβιακών ζυμώσεων. Ανάλογα με το είδος του μικροοργανισμού οι ζυμώσεις πραγματοποιούνται είτε υπό αναερόβιες, είτε υπό μικρο-αερόφιλες είτε υπό αερόβιες συνθήκες. Το κύριο υπόστρωμα που χρησιμοποιείται για την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης είναι η γλυκόζη και το μεταβολικό μονοπάτι της παρουσιάζεται στο Σχήμα 1.3.2-1:

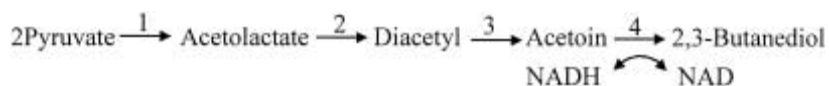


Σχήμα 1.3.2-1: Μεταβολισμός πυροσταφυλικού οξέος από τον μικροοργανισμό *Lactococcus lactis* προς παραγωγή αιθανόλης, 2,3-βουτανοδιόλης, οξικού, γαλακτικού και μυρμηκικού οξέος (Celińska & Grajek, 2009)

Πολλοί μονοσακχαρίτες (εξόζες ή πεντόζες) είναι ικανοί να ζυμωθούν προς παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης (Syn, 2001). Στο βακτηριακό μεταβολισμό, οι μονοσακχαρίτες πρέπει αρχικά να μετατραπούν σε πυροσταφυλικό, το οποίο σχηματίζεται μέσω της οδού Embden-Meyerhof-Parnas (γλυκόλυση) ώστε στη συνέχεια να παραχθεί η 2,3-BD αλλά και άλλα μεταβολικά προϊόντα όπως το οξικό, γαλακτικό, μυρμηκικό και ηλεκτρικό οξύ καθώς και ακετοΐνη και αιθανόλη (Maddox, 1996; Magee and Kosaric, 1987) τα οποία εξαρτώνται από τον εκάστοτε μικροοργανισμό και τις συνθήκες καλλιέργειας (Celińska & Grajek, 2009).

Για τη βιοσύνθεση της 2,3-BD από το πυροσταφυλικό οξύ εμπλέκονται τρία βασικά ένζυμα, η συνθετάση του α-ακετογαλακτικού (α -ALS, EC 4.1.3.18), η αποκαρβοξυλάση του α-ακετογαλακτικού (α -ALD, EC 4.1.1.5) και η αφυδρογονάση της 2,3-BD (BDH, EC 1.1.1.76). Το ένζυμο α -ALS δρα καλύτερα σε ελαφρώς όξινες συνθήκες (αναφέρεται και ως pH 6 ένζυμο) και έτσι διαφέρει από το αναβολικό α -ALS, ή «pH 8 ένζυμο» (Gottshalk, 1986). Το pH 6 ένζυμο διεξάγει μια αντίδραση δύο σταδίων: στο πρώτο στάδιο, το πυροσταφυλικό συμπλέκεται με τη πυροφωσφορική θειαμίνη (TPP) για το σχηματισμό του ακετύλο-TPP, το οποίο σε δεύτερο στάδιο συμπυκνώνεται με νβ, ξνη ένα δεύτερο μόριο του πυροσταφυλικού για το σχηματισμό του α-ακετογαλακτικού (Magee and Kosaric, 1987).

Αρχικά, το πυροσταφυλικό από τη γλυκόλυση μπορεί να μετατραπεί είτε σε γαλακτικό οξύ, που απαιτεί NADH ή σε α-ακετογαλακτικό (α -acetolactate) από την α -ALS, η οποία παράγεται κάτω από χαμηλή διαθεσιμότητα NADH. Στη συνέχεια, το α-ακετογαλακτικό κάτω από αναερόβιες συνθήκες μπορεί να μετατραπεί σε ακετοΐνη ενώ υπό την παρουσία οξυγόνου, υφίσταται αποκαρβοξυλίωση και παράγεται διακετυλίο. Στη συνέχεια με την αφυδρογονάση της ακετοΐνης, το διακετυλίο μετατρέπεται σε ακετοΐνη. Τέλος, η αφυδρογονάση της 2,3-βουτανοδιόλης μετατρέπει την ακετοΐνη σε 2,3-βουτανοδιόλη (Celińska & Grajek, 2009). Πιο κατανοητά, η βιοσύνθεση της 2,3-βουτανοδιόλης έχει ως εξής:



Ο μέγιστος θεωρητικός συντελεστής $Y_{BD/Glu}$ παραχθείσας 2,3-βουτανοδιόλης ανά καταναλωθείσα γλυκόζη είναι 0.5 g/g (Nilegaonkar et al., 1992).

Οι μικροοργανισμοί που μπορούν να ζυμώσουν το πυροσταφυλικό οξύ σε 2,3-βουτανοδιόλη είναι: *Aeromonas hydrophila*, *B. subtilis*, *Brevibacillus brevis* SI, *Corynebacterium glutamicum*, *E. aerogenes*, *K. pneumoniae*, *K.oxytoca*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis subsp. Leuconostoc lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* (Caspi, 2008), *B.*

polymyxa (Hespell, 1996; Mallonee and Speckman, 1988; Nakashimada et al., 2000), *Klebsiella terrigena* (Blomqvist et al., 1993; Mayer et al., 1995), *Streptococcus faecalis* (Speckman and Collins, 1982), *Enterobacter cloacae* (Saha and Bothast, 1999), *Bacillus licheniformis* (Perego et al., 2000), *Bacillus amyloliquefaciens* (Alam et al., 1990), *Aerobacter indologenes* (Mickelson and Werkman, 1938), rhizobacterium *Pseudomonas chlororaphis* O6 (Cho et al., 2008) και *Chlamydomonas perigranulata* (Hon-Nami, 2006). Αξίζει να σημειωθεί ότι κάποια στελέχη δεν ακολουθούν επακριβώς το μεταβολικό μονοπάτι που αναλύθηκε πιο πάνω. Αρκετές ζύμες έχουν την ικανότητα να συνθέσουν 2,3-BD, αν και η παραγωγικότητα της είναι εξαιρετικά μικρή, και ως εκ τούτου τα βακτήρια είναι επί του παρόντος οι μόνοι μικροοργανισμοί βιομηχανικής σημασίας για τη σύνθεση της 2,3-βουτανοδιόλης (Garg and Jain, 1995). Οι μικροοργανισμοί που είναι πιο αποδοτικοί στην παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης είναι οι *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* και *B. polymyxa*. Το στέλεχος *Enterobacter aerogenes* είναι ένας πολλά υποσχόμενος μικροοργανισμός, που υπό αυστηρά αναερόβιες συνθήκες παράγει κατά προτίμηση υδρογόνο, ενώ σε μικροαερόφιλες συνθήκες παράγει 2,3-βουτανοδιόλη, όπως και το στέλεχος *Klebsiella oxytoca* (Perego et al., 2000). Το στέλεχος *Bacillus polymyxa* υπό αναερόβιες συνθήκες δύναται να παράξει 2,3-βουτανοδιόλη (Hespell, 1996).

I.3.3. Υποστρώματα για την βιοτεχνολογική παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης

Σημαντικό ρόλο στην παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης όπως και άλλων προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας έχει το κόστος του υποστρώματος (Voloach et al., 1985) καθώς η τιμή του τελικού προϊόντος επηρεάζεται περισσότερο από τις πρώτες ύλες (Willke and Vorlop, 2007). Έτσι, η διαθεσιμότητα φτηνών πρώτων υλών υδατανθράκων είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη μιας οικονομικής διεργασίας σχετικά με την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης. Ιδανική λύση είναι η βιομετατροπή των αποβλήτων (όπως η γλυκερόλη, ο ορός γάλακτος ή γεωργικά υπολείμματα) και της περίσσειας βιομάζας (όπως το υδρολυμένο ξύλο).

Πολλές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στις ζυμώσεις που χρησιμοποιούν ως υπόστρωμα σάκχαρα από προϊόντα υδρόλυσης ξύλου, ειδικά εκείνα που προέρχονται από το κλάσμα της ημι-κυτταρίνης. Αυτά τα υποστρώματα έχουν μελετηθεί από τους μικροοργανισμούς *B. polymyxa* και *K. oxytoca*. Ωστόσο λόγω της έλλειψης των κυτταρινών και των ημι-κυτταρινών, το στέλεχος *K. oxytoca* απαιτεί μια προεπεξεργασία του υποστρώματος, έχοντας σαν μειονέκτημα την απελευθέρωση τοξικών παραγώγων στο μέσο καλλιέργειας (Frazer and McCaskey, 1991).

Υποστρώματα που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι διάφορα σάκχαρα όπως η γλυκόζη (το κυριότερο) αλλά και η φρουκτόζη, η ριβόζη, η μαννόζη, η αραβινόζη, η λακτόζη και η ξυλόζη.

Γενικά τα υποστρώματα μπορούν να ταξινομηθούν σε 2 κατηγορίες: στα μη-κυτταρινούχα και στα λιγνοκυτταρινούχα.

1. Τα μη-κυτταρινούχα υποστρώματα:

α) Υγρά απόβλητα βιομηχανιών τροφίμων. Είναι πλούσια σε σάκχαρα, όπως το υδρολυμένο άμυλο από την επεξεργασία του καλαμποκιού (το οποίο παρουσιάζει υψηλή απόδοση κατά τη ζύμωση του), η μελάσα από το ζαχαροκάλαμο και ο ορός γάλακτος από τα τυριά.

β) Εξόζες από το φυτό αγκινάρα της Ιερουσαλήμ (*Helianthus tuberosus*). Περιέχει υψηλά ποσά υδατανθράκων (ινουλίνη και σουκρόζη), καθιστώντας το εξαιρετική πηγή ζυμώσιμων σακχάρων.

γ) Γλυκερόλη, παραπροϊόν του βιοντήζελ. Λαμβάνεται κατά τη μετεστεροποίηση των φυτικών ελαίων και των ζωικών λιπών και είναι άφθονη στην φύση. Λόγω της αφθονίας της, πολλοί μικροοργανισμοί μπορούν να την χρησιμοποιήσουν ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας. Χρησιμοποιείται σαν πηγή άνθρακα για την παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης, 2,3-βουτανοδιόλης και αιθανόλης.

2. Λιγνοκυτταρινούχα υποστρώματα. Η λιγνοκυτταρίνη είναι η πιο άφθονη βιομάζα στη γη και έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον ως εναλλακτική πρώτη ύλη για βιολογικές διεργασίες λόγω της μεγάλης διαθεσιμότητάς της στη φύση. Η μεγαλύτερη εφαρμογή των λιγνοκυτταρινούχων υποστρωμάτων είναι στη χημική παραγωγή με βιοτεχνολογικά μέσα (Ragauskas et al., 2006). Τα κύρια συστατικά της λιγνοκυτταρίνης είναι η λιγνίνη, η κυτταρίνη και η ημι-κυτταρίνη. Η κυτταρίνη είναι ένα πολυμερές της γλυκόζης ενώ η ημι-κυτταρίνη είναι ένα πολυμερές που περιέχει ως επί το πλείστον πεντόζες συμπεριλαμβανομένων της ξυλόζης, της αραβινόζης και της ριβόζης (Saha, 2003; Yan et al., 2009a).

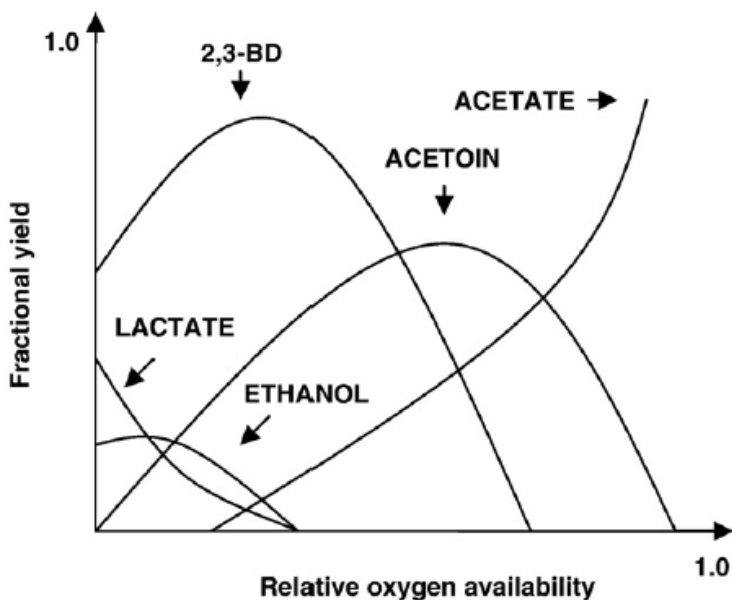
1.3.4. Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης

Οι κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης είναι η διαθεσιμότητα του οξυγόνου, το pH, η θερμοκρασία και η συγκέντρωση του υποστρώματος.

1. Οξυγόνο

Το οξυγόνο είναι απαραίτητο για την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης και ειδικότερα παράγεται κάτω από χαμηλή διαθεσιμότητα οξυγόνου και γι' αυτό άλλωστε αποτελεί παράδειγμα αναερόβιας ή μικροαερόφιλης ζύμωσης (Converti et al., 2003). Οι περισσότερες μελέτες έγιναν στους μικροοργανισμούς *Klebsiella* sp. και *B. polymyxa* όπου βρέθηκε ότι η απόδοση της παραγωγής της 2,3-βουτανοδιόλης μπορεί να μεγιστοποιηθεί με την ελαχιστοποίηση του εφοδιασμού της ζύμωσης με οξυγόνο, γιατί έτσι περιορίζεται η διαδικασία της αναπνοής. Επίσης

με τη μείωση της διαθεσιμότητας του οξυγόνου, μειώνεται και η βιομάζα με αποτέλεσμα να μειώνεται και ο συντελεστής απόδοσης της 2,3-βουτανοδιόλης. Έτσι, η αύξηση της συγκέντρωσης του O_2 οδηγεί σε υψηλότερη πυκνότητα κυττάρων και (κατά κάποιο τρόπο) σε υψηλότερες αποδόσεις. Συμπερασματικά, μειώνοντας το επίπεδο προσφοράς σε O_2 , θα έχουμε αύξηση της απόδοσης σε 2,3-βουτανοδιόλη, αν και μειώνεται η συνολική μετατροπή εξαιτίας της χαμηλότερης πυκνότητας των κυττάρων (Celińska and Grajek, 2009). Ο λόγος της ζήτησης και της προσφοράς οξυγόνου μπορεί να ελέγξει τις αναλογίες των μεταβολικών προϊόντων και φαίνεται στο Σχήμα I.3.4-1:



Σχήμα I.3.4-1: Η επιρροή της διαθεσιμότητας του οξυγόνου στην παραγωγή των μεταβολικών προϊόντων (Celińska & Grajek, 2009).

Σε γενικές γραμμές, η υψηλή συγκέντρωση O_2 ευνοεί την κυτταρική ανάπτυξη, δηλαδή την αύξηση της βιομάζας και των εκπομπών CO_2 , σε βάρος της παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης. Απουσία οξυγόνου, παράγεται συνήθως αιθανόλη σε ισομοριακές ποσότητες με την 2,3-βουτανοδιόλη αλλά παράγονται επίσης και μυρμηκικό οξύ, ακετοΐνη, γαλακτικό οξύ και ακετόνη. Η διαθεσιμότητα σε οξυγόνο είναι άμεσα συνδεδεμένη με τη ταχύτητα ανάδευσης (agitation speed). Η ανάδευση είναι ιδιαίτερα σημαντική σε διεργασίες ζύμωσης, δεδομένου ότι αυξάνει την απόδοση της ζύμωσης με τη συνεχή έκθεση νέου υποστρώματος στην καλλιέργεια και τη διάδοση των μεταβολικών προϊόντων σε όλο τον όγκο του μέσου (Long and Patrick, 1963; Garg and Jain, 1995). Η ανάδευση γενικά αυξάνει σημαντικά την απόδοση σε 2,3-βουτανοδιόλη. Σε καλλιέργειες με τα στελέχη *E. aerogenes* και *K. pneumoniae* σε γλυκόζη ή λακτόζη ως υπόστρωμα υπό ανάδευση 220 rpm, η παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλη αυξήθηκε έως

και 5 φορές στη ζύμωση γλυκόζης και μέχρι 15 φορές στη ζύμωση λακτόζης (Barret et al., 1983) σε σύγκριση με καλλιέργειες με μηδενική ανάδευση.

2. pH

Ο δεύτερος παράγοντας που επηρεάζει την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης είναι το pH. Γενικά θα μπορούσαμε να ισχυριστούμε ότι οι αλκαλικές συνθήκες ευνοούν το σχηματισμό οργανικών οξέων με ταυτόχρονη μείωση της απόδοσης σε 2,3-βουτανοδιόλη (Garg and Jain, 1995). Αντιθέτως, σε όξινες συνθήκες, η σύνθεση οργανικών οξέων είναι μειωμένη (πάνω από 10 φορές) και η σύνθεση διόλης είναι αυξημένη (3 με 7 φορές). Ωστόσο, το βέλτιστο pH για παραγωγή διόλης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το μικροοργανισμό και το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται.

Στις περισσότερες αναερόβιες ζυμώσεις, η ανάπτυξη του μικροοργανισμού γίνεται σε συνδυασμό με το σχηματισμό οργανικών οξέων. Έτσι, κατά τη διάρκεια της ζύμωσης το υπόστρωμα σταδιακά καταναλώνεται και η τάση που τελικά διαμορφώνεται είναι η αδρανοποίηση του μικροοργανισμού από τα δικά του τοξικά προϊόντα (Biebl et al., 1998). Ορισμένοι μικροοργανισμοί έχουν εξελίξει αμυντικές στρατηγικές, όπως η αλλαγή του μεταβολισμού τους ώστε να παράγουν λιγότερο τοξικές ενώσεις, όπως αλκοόλες ή γλυκόλες (Van Houdt et al., 2007). Σε μια μελέτη (Maddox, 1996) για την εξήγηση του παραπάνω φαινομένου, θεωρήθηκε ότι η πιο πιθανή αιτία επαγωγής της 2,3-βουτανοδιόλης είναι η συσσώρευση των όξινων προϊόντων στο μέσο και όχι η τροποποίηση του pH. Κατά τη διάρκεια της εκθετικής ανάπτυξης του στελέχους *C. acetobutylicum* παράγεται οξικό και βουτυρικό οξύ. Κατά τη διάρκεια της στάσιμης φάσης ανάπτυξης (μετά από την ισχυρή αύξηση της οξύτητας), παράγονται προϊόντα όπως η ακετόνη, η βουτανόλη και η αιθανόλη (Lopez-Contreras et al., 2000). Ένα παρόμοιο φαινόμενο παρατηρήθηκε σε ζύμωση με είδη του γένους *Klebsiella*, όπου σε ουδέτερο pH παρατηρήθηκε σύνθεση οξικού οξέως και αιθανόλης και σε pH μικρότερο του 6 σύνθεση 2,3-βουτανοδιόλης και αιθανόλης (Biebl et al., 1998). Σε ζύμωση γλυκερόλης με το στέλεχος *K. pneumoniae* σε χαμηλό pH (περίπου 5,5), σχεδόν το 10% του υποστρώματος κατευθύνθηκε προς τη σύνθεση της 2,3-βουτανοδιόλης και το 44% για τη σύνθεση της 1,3-προπανοδιόλης. Αυτό είναι κατανοητό, καθώς η 1,3-προπανοδιόλη είναι το χαρακτηριστικό προϊόν της ζύμωσης της γλυκερόλης (Menzel et al., 1997; Biebl et al., 1998). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μελέτης των Biebl και των συνεργατών του (1998), εάν το pH του μέσου είναι σταθερό (συγκεκριμένα στην τιμή 5.0 ή 7.0) τότε στο χαμηλότερο pH, η τελική συγκέντρωση της 2,3-βουτανοδιόλης είναι υψηλότερη. Ωστόσο, η μέγιστη συγκέντρωση της 2,3-βουτανοδιόλης επιτεύχθηκε όταν το pH δεν ελέγχονταν καθόλου (μειωνόταν συνεχώς με την

αρχική τιμή του pH στο 7.0 και με την τελική τιμή του pH στο 5.5). Αυτό που είναι εξαιρετικά σημαντικό είναι ότι η σύνθεση της 2,3-βουτανοδιόλης δεν οφείλεται τόσο στην τιμή του pH, όσο στη παρουσία του οξικού οξέος. Ωστόσο, οι ερευνητές υποστηρίζουν πως η συσσώρευση οξέος δεν είναι ο μοναδικός παράγοντας που καθορίζει το σχηματισμό 2,3-βουτανοδιόλης, καθώς η βουτανοδιόλη παράγεται, επίσης σε ουδέτερο pH με τη γλυκερόλη ως πηγή άνθρακα (Biebl et al., 1998). Σύμφωνα με άλλη μελέτη (Voloach et al., 1985) η βέλτιστη τιμή του pH για παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης από το μικροοργανισμό *K. oxytoca* κυμαίνεται από 5.0 έως 6.0. Για τον μικροοργανισμό *E. aerogenes* θεωρήθηκε ως βέλτιστη τιμή pH για την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης το pH 6.0 (Converti et al., 2003) καθώς σε pH άνω του 6 διαπιστώθηκε ότι προκαλείται έντονη μείωση της δραστηριότητας των βασικών ενζύμων που συμμετέχουν στην παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης (Stormer, 1968). Η απόδοση σε 2,3-βουτανοδιόλη δύναται να θεωρηθεί σχεδόν σταθερή μέσα σε ένα στενό εύρος pH (από 5.0 έως 6.5), ενώ σε χαμηλότερες ή υψηλότερες τιμές pH μειώνεται απότομα.

3. Θερμοκρασία

Η αποτελεσματικότητα των βιοδιεργασιών είναι αυστηρά εξαρτημένη και από τη θερμοκρασία, καθώς η τελευταία επηρεάζει την ενζυματική δραστηριότητα και γενικότερα το μεταβολισμό των μικροοργανισμών (Garg and Jain, 1995). Ένα εύρος θερμοκρασιών από 30 έως 35°C θεωρείται το βέλτιστο για βακτηριακή ζύμωση, δεδομένου ότι οι τιμές αυτές ευνοούν την μέγιστη παραγωγή βιομάζας. Εκατέρωθεν των τιμών αυτών η κυτταρική ανάπτυξη μειώνεται αισθητά.

Η τιμή της βέλτιστης θερμοκρασίας για την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης εξαρτάται άμεσα από το στέλεχος. Σύμφωνα με μελέτη (Biebl et al., 1998) σε καλλιέργειες με το είδος *K. pneumoniae*, η μείωση της θερμοκρασίας από 35°C στους 30°C είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της σύνθεσης αιθανόλης και την αύξηση της σύνθεσης της 2,3-βουτανοδιόλης. Ως εκ τούτου, οι καλύτερες συνθήκες για τη μέγιστη παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης από καλλιέργειες με το είδος *K. pneumoniae* θεωρούνται: α) μη ελεγχόμενη αύξηση της οξύτητας με αρχικό pH όχι μικρότερο της τιμής 7,0 και β) σε θερμοκρασία που δεν υπερβαίνει τους 30°C.

4. Υπόστρωμα

Η παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης εξαρτάται από την καθαρότητα του υποστρώματος. Έτσι όταν το μέσο της καλλιέργειας είναι απόβλητα γεωργο-βιομηχανιών, τότε η αρχική

συγκέντρωση της πηγής άνθρακα είναι της τάξεως του 5-10% (Garg and Jain, 1995). Οι συγκεντρώσεις αυτές είναι σχετικά χαμηλές κυρίως λόγω των τοξικών ουσιών που υπάρχουν στα ακατέργαστα προς ζύμωση υλικά. Η συγκέντρωση, μάλιστα, των τοξικών ουσιών αυξάνει παράλληλα με την αύξηση της συγκέντρωσης της πηγής άνθρακα. Αντιθέτως στα συνθετικά μέσα που αποτελούνται από καθαρά σάκχαρα όπως η γλυκόζη, η αυξημένη αρχική συγκέντρωση δε θεωρείται παρεμποδιστική της ζύμωσης. Έτσι ακόμα και σε αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 200 g/L, είναι εφικτή η παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης, ωστόσο έχει παρατηρηθεί ότι η αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης των σακχάρων άνω των 20 g/L, έχει ως αποτέλεσμα την μείωση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης, εξαιτίας της μειωμένης ενεργότητας νερού (a_w). Πρέπει, βέβαια, να σημειωθεί ότι η μείωση της ενεργότητας του νερού είναι συνάρτηση της μοριακότητας του υποστρώματος. Επομένως, στη λακτόζη (δισακχαρίτης) η μείωση είναι μικρότερη από ότι στη γλυκόζη (μονοσακχαρίτης). Η παραγωγικότητα της 2,3-βουτανοδιόλης, όμως, ελάχιστα επηρεάζεται από την αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης του άνθρακα και μέγιστες τιμές παραγωγικότητας εμφανίζονται σε αρχική συγκέντρωση περίπου 100 g/L (Celińska and Grajek, 2009). Σε καλλιέργειες με το είδος *E. aerogenes*, η αρχική συγκέντρωση γλυκόζης από 9 έως 72 g/L αποδείχτηκε ότι δεν επηρέαζε την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης (Converti and Perego, 2002), ενώ σε καλλιέργειες με το είδος *B. polymyxa* παρατηρήθηκε αναστολή της αύξησης σε συγκεντρώσεις πηγής άνθρακα άνω των 150 g/L (De mas et al., 1988). Επίσης, σε συνεχείς καλλιέργειες το στέλεχος *K. pneumoniae* DSM 2026 με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 60 g/L ήταν σε θέση να καταναλώσει 9.2 g/L γλυκερόλη σε χρονικό διάστημα 12 ωρών. Μετά την πάροδο των 12 ωρών η ανάπτυξη του μικροοργανισμού σταματούσε (Biebl et al., 1998).

Σε γενικές γραμμές, λοιπόν, διαπιστώνεται ότι το είδος και η συγκέντρωση του υποστρώματος επηρεάζουν την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης, ανάλογα με το είδος του μικροοργανισμού. Τέλος, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η προσθήκη οξικού οξέος σε συγκεντρώσεις έως 200 mM στο θρεπτικό μέσο βελτιώνουν την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης (Nakashimada et al., 2000).

I.4. Οικογένεια Enterobacteriaceae

I.4.1 Γενικά χαρακτηριστικά της οικογένειας Enterobacteriaceae

Τα βακτήρια της οικογένειας Enterobacteriaceae είναι η μεγαλύτερη από τις τρεις οικογένειες της ομάδας των προαιρετικά αναερόβιων και αρνητικών κατά Gram ραβδίων. Είναι ευρύτατα διαδεδομένα στη φύση και βρίσκονται στο έδαφος, στο νερό, στα λαχανικά και στον εντερικό σωλήνα των ζώων ή ως παράσιτα στα ζώα. Μερικά είναι παθογόνα των θηλαστικών και των ζώων. Το βακτήριο *Enterobacter* spp. κατά κανόνα δεν είναι παθογόνο, όμως όπως και τα περισσότερα εντροροβακτήρια μπορούν να προκαλέσουν λοιμώξεις, ιδιαίτερα σε εξασθενημένους ανθρώπους (M. A. Gaston, 1987). Η μικροβιολογική εξέταση των τροφίμων, των συστατικών και των πρώτων υλών επιτυγχάνεται με ειδικά τεστ για την παρουσία των ομάδων-δεικτών όπως τα κολοβακτηρίδια ή την ολική μεσόφιλη χλωρίδα (Blood, Curtis, 1995). Η οικογένεια περιλαμβάνει 30 γένη που διαφοροποιούνται με βάση τα βιοχημικά χαρακτηριστικά (Αγγελής, 2007). Στον Πίνακα I.4.1-1 παρουσιάζεται η ταξινόμηση της οικογένειας Enterobacteriaceae.

Πίνακα I.4.1-1: Ταξινόμηση της οικογένειας Enterobacteriaceae

Βασίλειο:	Bacteria
Φύλο:	Protobacteria
Κλάση:	Gammaprotobacteria
Τάξη:	Enterobacteriales
Οικογένεια:	Enterobacteriaceae
Γένη:	<i>Arsenophonus, Bubvicia, Buttiarella, Cedecea, Citrobacter, Dickeya, Edwardsiella, Enterobacter, Erwinia, Escherichia, Ewingella, Hafnia, Klebsiella, Kluyvera, Leclercia, Leminorella, Moellerella, Morganella, Obesumbacterium, Pantoea, Pragia, Proteus, Providencia, Rahnella, Salmonella, Serratia, Shigella, Tatumella, Xenorhabdus, Yersinia</i>

Πηγή: www.wikipedia.gr

Τα στελέχη της οικογένειας είναι Gram αρνητικά, προαιρετικά αναερόβια και μη σποριογόνα βακτήρια, σχήματος ράβδου και μεγέθους 1-5 μm και αναπτύσσονται αρκετά καλά σε πεπτόνη, εκχύλισμα κρέατος και σε MacConkey άγαρ (Brenner, 1984). Τα περισσότερα

στελέχη ζυμώνουν τη γλυκόζη ενώ υπάρχουν και στελέχη που ζυμώνουν και τη λακτόζη όπως τα γένη *Klebsiella*, *Escherichia*, *Erwinia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* και άλλα. Η ζύμωση των σακχάρων μέσω του μεταβολικού μονοπατιού Embden-Meyerhof-Parnas έχει ως επακόλουθο την παραγωγή γαλακτικού οξέος, ηλεκτρικού και μυρμηκικού και άλλων μεταβολικών προϊόντων. Τα περισσότερα ανάγουν τα νιτρικά προς νιτρώδη, είναι αρνητικά στη δοκιμή οξειδάσης και θετικά στη δοκιμή καταλάσης. Σε αντίθεση με τα περισσότερα παρόμοια εντεροβακτηρίδια στερούνται της οξειδάσης του κυτοχρώματος C, αν και υπάρχουν εξαιρέσεις. Τα περισσότερα έχουν μαστίγια που χρησιμοποιούνται για την μετακίνηση, αλλά μερικά γένη είναι μη κινητά (non-motile). Τα περισσότερα στελέχη της οικογένειας Enterobacteriaceae έχουν περιτρίχια για την προσκόλληση των βακτηριακών κυττάρων στους ξενιστές. Μερικά εντεροβακτήρια παράγουν ενδοτοξίνες, οι οποίες εμφανίζονται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων και απελευθερώνονται μετά τη λύση του κυττάρου και όταν το κυτταρικό τοίχωμα αποσυντίθεται.

Το γένος *Enterobacter* ενδιαφέρει την Τεχνολογία Τροφίμων γιατί αλλοιώνει διάφορα τρόφιμα ζωικής προέλευσης, όπως γάλα, γιαούρτι και τυριά καθώς επίσης και φυτικά προϊόντα γαλακτικής ζύμωσης (τουρσιά, ελιές). Παράγει δύσοσμα προϊόντα μεταβολισμού και αέρια (CO₂ και H₂) τα οποία εγκλωβίζονται στους φυτικούς ιστούς και δημιουργούν φλύκταινες (Αγγελής, 2007).

Σκοπός της μεταπτυχιακής μελέτης

Η ανάγκη για παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας, οι ταχείες πρόοδοι στη βιοτεχνολογία και τη μικροβιακή γενετική καθώς και η «μετατόπιση» χημικών επιχειρήσεων στον τομέα των βιολογικών επιστημών λόγω του υψηλού κόστους είναι μερικές από τις κινητήριες δυνάμεις για το ανανεωμένο ενδιαφέρον για την παραγωγή των μαζικών χημικών ουσιών από τους ανανεώσιμους πόρους με τις βιολογικές διαδικασίες. Ιδιαίτερη πρόκληση για την επιστήμη αποτελεί η αξιοποίηση και επεξεργασία των γεωργο-βιομηχανικών αποβλήτων και παραπροϊόντων, ο όγκος των οποίων συνεχώς αυξάνει και θεωρείται σοβαρός κίνδυνος για την ρύπανση του περιβάλλοντος.

Η παρούσα μελέτη διερευνά τις φυσιολογικές και βιοχημικές δυνατότητες επιλεγμένων βακτηριακών στελεχών (των γενών *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*) σε σχέση με τη δυνατότητα παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης κατά την αύξηση τους σε σακχαρούχα ανανεώσιμα υποστρώματα (γλυκόζη, σακχαρόζη, μελάσα). Το επιλεγμένο στέλεχος καλλιεργείται αρχικά σε αναδευόμενες φιάλες Duran υπό αναερόβιες συνθήκες σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και υποστρώματα και στη συνέχεια σε βιοαντιδραστήρα, χρησιμοποιώντας τη μελάσα ως πιο ενδιαφέρουσα πηγή άνθρακα, για τη μελέτη ανάπτυξης του και την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων και ιδιαιτέρως για την 2,3-βουτανοδιόλη.

II. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

II.1 Βιολογικό υλικό

Στην παρούσα πτυχιακή μελέτη μελετήθηκαν 6 βακτήρια της οικογένειας Enterobacteriaceae για την παραγωγή της 2,3-βουτανодиόλης, το στέλεχος *Citrobacter farmeri* FMCC-7, το στέλεχος *farmeri* FMCC-5, το στέλεχος *freudii* FMCC-8, το στέλεχος *Enterobacter aerogenes* FMCC-9, το στέλεχος *Enterobacter* sp. FMCC-208 και τέλος το στέλεχος *Klebsiella oxytoca* FMCC-197. Τα παραπάνω στελέχη ανήκουν στη συλλογή του εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και απομονώθηκαν από το φλοιό και τη σάρκα ώριμων καρπών σταφυλής προσβεβλημένων από τον μύκητα *Botrytis* sp.

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ανανεώνονταν τακτικά και επωάζονταν σε θερμοστατούμενο επωαστικό κλίβανο στους 30 ± 1 °C για 24 ± 1 h σε βιδωτούς δοκιμαστικούς σωλήνες πεπληρωμένους με θρεπτικό μέσο MRS Broth και διατηρούνταν σε θερμοκρασία 4 ± 1 °C.

Πριν από κάθε εμβολιασμό τα στελέχη ανανεώνονται έτσι ώστε το προκύπτον εναιώρημα κυττάρων που αποτελούσε το εμβόλιο της κύριας καλλιέργειας να είναι ηλικίας 20 h.

II.2 Υποστρώματα

Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε τόσο για την διατήρηση των μικροοργανισμών, όσο και για την δημιουργία των εναιωρημάτων κυττάρων (εμβόλιο) ήταν το MRS Broth, το οποίο είχε την ακόλουθη σύσταση (σε g/L):

Πίνακας II.2-1: Σύσταση MRS Broth.

Θρεπτικό υλικό	Συγκέντρωση (g/L)
Πεπτόνη	5.00
Εκχύλισμα κρέατος	5.00
Εκχύλισμα ζύμης	2.50
K ₂ HPO ₄	2.00
CH ₃ COONa	5.00
MgSO ₄	0.41

Επιπλέον, η σύσταση του θρεπτικού μέσου που χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα αύξησης της κύριας καλλιέργειας παρατίθεται στον ακόλουθο Πίνακα Π.2-2.

Πίνακας Π.2-2: Σύσταση θρεπτικού υποστρώματος κύριας καλλιέργειας.

Θρεπτικό υλικό	Συγκέντρωση (g/L)
Πεπτόνη	5.00
Εκχύλισμα κρέατος	5.00
Εκχύλισμα ζύμης	2.50
K_2HPO_4	2.00
CH_3COONa	5.00
$MgSO_4$	0.41
Πηγή άνθρακα	20 - 90

Ως πηγές άνθρακα χρησιμοποιήθηκαν η εμπορική γλυκόζη, η εμπορική σακχαρόζη και η μελάσα σε συγκεντρώσεις εξαρτώμενες από την εκάστοτε ακολουθούμενη πειραματική διαδικασία. Η απόβλητη μελάσα που χρησιμοποιήθηκε προήλθε από την Ελληνική Βιομηχανία Ζάχαρης και περιείχε 60% σάκχαρα, κυρίως σακχαρόζη, αλλά και σημαντικό ποσοστό ελεύθερης γλυκόζης περίπου 50%.

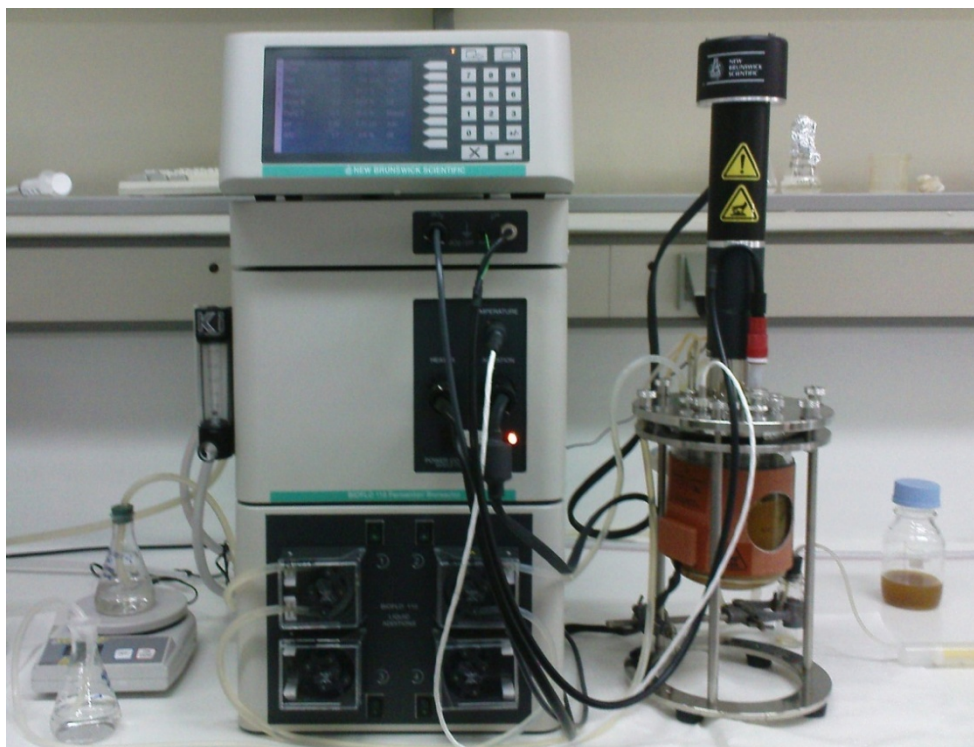
Π.3 Συνθήκες καλλιέργειας

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε μια διαδικασία επιλογής διαφόρων βακτηριών προκειμένου να αξιολογηθεί η ικανότητα τους να αναπτυχθούν σε σακχαρούχες ανανεώσιμες πηγές άνθρακα και να παράγουν 2,3-βουτανодиόλη. Η εν λόγω πειραματική διαδικασία έλαβε χώρα σε φιάλες τύπου Duran 1-L, πληρωμένες κατά τα 4/5 τους (0.8 L) ώστε να μελετηθεί η ανάπτυξη των μικροοργανισμών και η παραγωγή των μεταβολικών προϊόντων. Από την εν λόγω διαδικασία επιλέχθηκαν για περαιτέρω μελέτη οι μικροοργανισμοί που αφομοίωσαν πλήρως την διαθέσιμη πηγή άνθρακα και παρήγαγαν 2,3-βουτανодиόλη, ως κύριο μεταβολικό προϊόν. Εν συνεχεία, η παραγωγή της 2,3-βουτανодиόλης από επιλεγμένα στελέχη βακτηρίων έλαβε χώρα α) σε ασυνεχείς καλλιέργειες βυθού σε φιάλες Duran των 1000 mL, πεπληρωμένες κατά τα 4/5 τους, 0.8 L (Εικόνα Π.3-1), από το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας, β) σε ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα 1-L με ενεργό όγκο 0.8 L (Εικόνα Π.3-2) και γ) σε ημι-συνεχείς καλλιέργειες

σε βιοαντιδραστήρα των 3-L με ενεργό όγκο 1.5 L. Συγκεκριμένα, στις ασυνεχείς καλλιέργειες βυθού σε φιάλες Duran οι φιάλες υφίσταντο σπαργή με καθαρό άζωτο για 30 min ώστε να απομακρυνθεί το οξυγόνο από το μέσο καλλιέργειας και να επιτευχθούν αναερόβιες συνθήκες. Στην συνέχεια, οι φιάλες Duran τοποθετούνταν σε αυτόκλειστο όπου και αποστειρώνονταν (121 °C/ 20 min). Το pH του θρεπτικού μέσου μετά την αποστείρωση είχε τιμή 7.0 ± 0.1 . Οι φιάλες εμβολιάζονταν υπό ασηπτικές συνθήκες με 10% (κ.ο.) εναιωρήματος κυττάρων και τοποθετούνταν για επώαση σε ανακινούμενο επωαστικό κλίβανο τύπου Labline. Η θερμοκρασία επώασης ήταν για όλα τα στελέχη 30 °C, ενώ διερευνήθηκε η επίδραση δυο διαφορετικών ρυθμών ανάδευσης στην απόδοση των μικροοργανισμών, 80 ± 5 rpm και σε 180 ± 5 rpm αντιστοίχως. Επιπλέον, καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου συνολικού όγκου 1-L (New Brunswick Scientific, USA), με ενεργό όγκο 0.8 L. Τέλος, καλλιέργειες έλαβαν χώρα σε βιοαντιδραστήρα ημι-διαλείποντος έργου (New Brunswick Scientific, USA), συνολικού όγκου 3-L, με ενεργό όγκο 1.5 L. Στις εν λόγω καλλιέργειες πραγματοποιήθηκε προσθήκη πυκνού διαλύματος μελάσας (50% κ.ο.) εμπλουτισμένο με εκχύλισμα ζύμης. Σε κάθε περίπτωση, μετά την αποστείρωση και πριν τον εμβολιασμό, το θρεπτικό μέσο όντος του βιοαντιδραστήρα υφίστατο σπαργή με αέριο άζωτο για 30 min για την απομάκρυνση του οξυγόνου.



Εικόνα Π.3-1: Φιαλές Duran 1-L, πληρωμένες κατά τα 4/5 τους.



Εικόνα Π.3-2: Βιοαντιδραστήρας συνολικού όγκου 1-L (New Brunswick Scientific, USA) κατά τη διάρκεια ασυνεχούς καλλιέργειας.

Π.4 Αναλύσεις

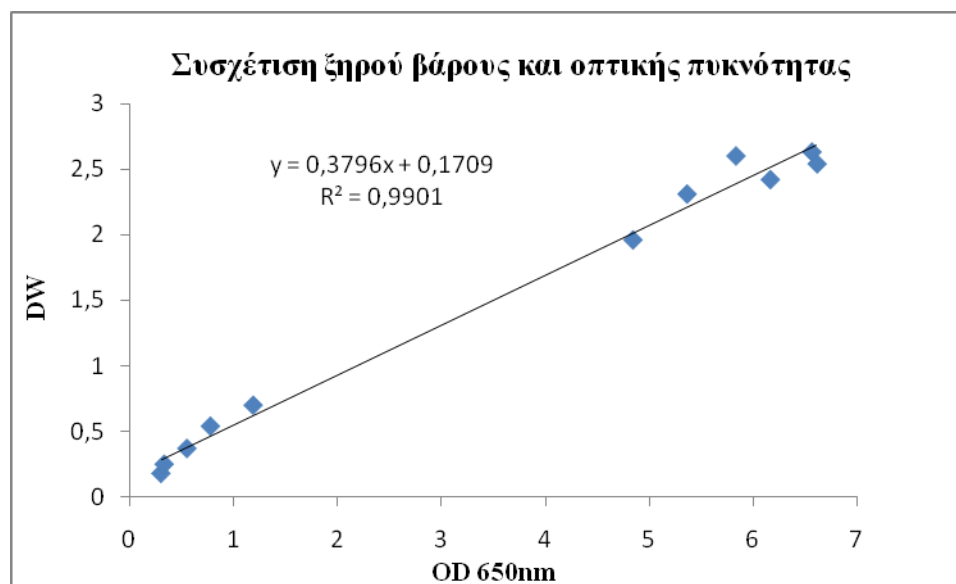
Οι αναλύσεις της παρούσας πτυχιακής αφορούσαν τον προσδιορισμό της τιμής του pH της καλλιέργειας, τον προσδιορισμό της βιομάζας, τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της πηγής άνθρακα (της γλυκόζης, σακχαρόζης ή της μελάσας), της 2,3-βουτανοδιόλης, της αιθανόλης και των οργανικών οξέων και τέλος τον αποχρωματισμό της μελάσας.

Π.4.1. Προσδιορισμός pH

Το pH της καλλιέργειας μετρήθηκε με pH-μέτρο τύπου Jenway 3020 pHmeter. Μετά την μέτρηση του εκάστοτε σημείου της κινητικής, πραγματοποιήθηκε διόρθωση του pH στο θρεπτικό μέσο, όπου ήταν αναγκαίο, ώστε η τιμή του να κυμαίνεται μεταξύ 6.0-7.0. Η διόρθωση του pH έγινε με προσθήκη καυστικού καλίου KOH 5M υπό ασηπτικές συνθήκες, ενώ στην περίπτωση του βιοαντιδραστήρα, η προσθήκη του αλκαλικού διαλύματος γίνονταν αυτόματα με περισταλτική αντλία.

II.4.2. Προσδιορισμός βιομάζας

Ο προσδιορισμός της βιομάζας έγινε έμμεσα με την μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (Optical Density, OD) και άμεσα με την μέτρηση του ξηρού βάρους. Συγκεκριμένα, λαμβάνεται δείγμα 1 mL σε διάφορα χρονικά σημεία και τοποθετείται σε κυψελίδα του 1.5 mL. Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας έγινε στο μήκος κύματος των 650 nm σε φασματοφωτόμετρο διπλής θέσεως τύπου Hitachi U-2000 (Hitachi, Tokyo, Japan). Παράλληλα, λαμβάνεται και άλλο δείγμα, το οποίο φυγοκεντρείται σε φυγόκεντρο τύπου Universal 320R (Hettich Zentrifugen, Germany) (9000 rpm, 15min, 5 °C). Το υπερκείμενο απορριπτεται και ακολουθεί έκπλυση με απιονισμένο νερό και στη συνέχεια τα κύτταρα φυγοκεντρούνται για δεύτερη φορά. Μετά τη στράγγιση, η βιομάζα μεταφέρεται σε προζυγισμένα φιαλίδια και στη συνέχεια σε φούρνο προς ξήρανση (85 °C) για 24 ώρες μέχρι σταθεροποίησης του βάρους. Το ξηρό υπόλειμμα ζυγίζεται σε ζυγό ακριβείας τύπου Sartorius basic (4 δεκαδικών ψηφίων) και εκφράζεται σε g/L. Με τον τρόπο αυτό, υπάρχει συσχέτιση του ξηρού βάρους και της οπτικής πυκνότητας για τον προσδιορισμό της βιομάζας, η οποία φαίνεται στο Γράφημα II.4.2-1.



Γράφημα II.4.2-1: Συσχέτιση ξηρού βάρους και οπτικής πυκνότητας για τον προσδιορισμό της βιομάζας

II.4.3. Προσδιορισμός αναγωγικών σακχάρων

Ο προσδιορισμός των αναγωγικών σακχάρων πραγματοποιήθηκε με τη φωτομετρική μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS) (Miller, 1959). Η μέθοδος στηρίζεται στην αναγωγή του 3,5 δινιτροσαλικυλικού οξέος προς 3-αμινο-5-νιτροσαλικυλικό οξύ παρουσία NaOH και την ταυτόχρονη οξείδωση της γλυκόζης προς γλυκονικό οξύ (Miller, 1959).

- **Αντιδραστήρια**

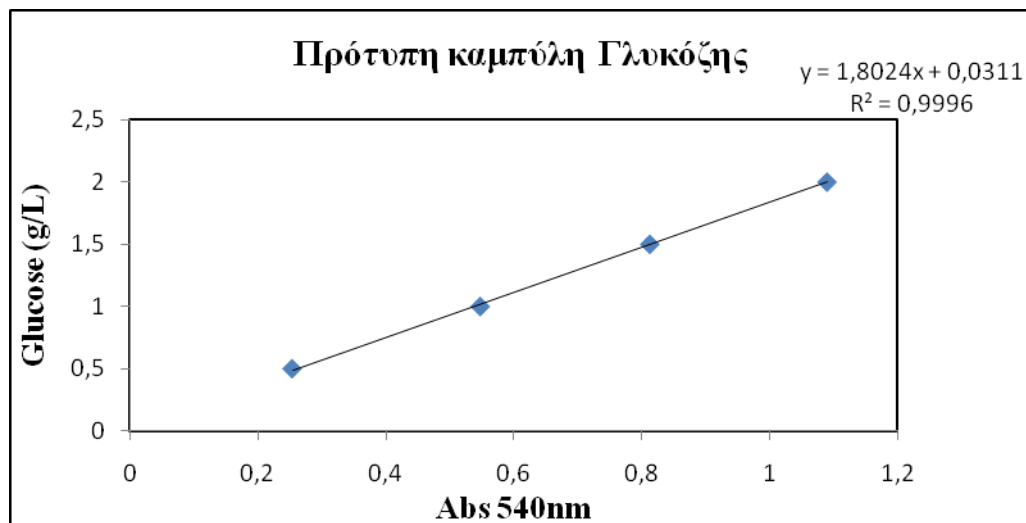
- 3.5- δινιτροσαλικυλικό οξύ (DNS) (10g)
- τρυγικό καλιονάτριο (300 g)
- διάλυμα NaOH (2N)

- **Παρασκευή αντιδραστηρίου DNS**

Σε 700 mL διαλύματος NaOH 0,5N, με ήπια θέρμανση, διαλύουμε αργά 10 g 3.5-δινιτροσαλικυλικού οξέος. Ακολουθεί κατόπιν αργή προσθήκη του τρυγικού καλιονατρίου και τέλος συμπληρώνουμε με H₂O μέχρι τα 1000 mL (τελικός όγκος αντιδραστηρίου). Το αντιδραστήριο έχει χρώμα σκούρο πορτοκαλί και είναι σταθερό για αρκετές ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου.

- **Εφαρμογή της μεθόδου**

Σε 0,5 mL αραιωμένου δείγματος προστίθενται 0.5 mL αντιδραστηρίου DNS και ακολουθεί ανάδευση. Ακολουθώντας μεταφέρουμε σε υδατόλουτρο (100°C) για 5 λεπτά ακριβώς και ψύχουμε σε H₂O (25°C). Στη συνέχεια προσθέτουμε 5 mL απιονισμένο H₂O και μετράμε την απορρόφηση στα 540 nm. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του δείγματος σε ανάγοντα σάκχαρα έγινε με τη χρήση των ακόλουθων καμπύλων αναφοράς και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε ισοδύναμα γλυκόζης (g/L) (Γράφημα Π.4.3-1). Όλες οι απορροφήσεις μετρήθηκαν με τη χρήση φασματοφωτομέτρου τύπου Hitachi U-2000 spectrophotometer.



Γράφημα Π.4.3-1: Καμπύλη αναφοράς γλυκόζης με τη μέθοδο DNS

Π.4.4 Προσδιορισμός των ολικών σακχάρων

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της σακχαρόζης και της μελάσας γίνεται χημική υδρόλυση ώστε να υδρολυθεί η σακχαρόζη σε γλυκόζη και φρουκτόζη. Έτσι, λαμβάνεται 1 mL δείγματος και τοποθετείται σε δοκιμαστικό σωλήνα. Στη συνέχεια προστίθενται 4.5 mL HCl 1 M, ακολουθεί ανάδευση και τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους 100 °C για 30 λεπτά. Τέλος, γίνεται προσθήκη 4.5 mL KOH 1M και το δείγμα αναδεύεται και πάλι. Για τον προσδιορισμό των αναγόντων σακχάρων εφαρμόζεται η μέθοδος DNS όπως περιγράφεται στην παράγραφο Π.4.3.

Επίσης, ο προσδιορισμός των ολικών σακχάρων γίνεται με τη μέθοδο Dubois, μία χρωμομετρική μέθοδος προσδιορισμού των σακχάρων και των παραγώγων τους (Dubois et al., 1956). Η μέθοδος βασίζεται στην ιδιότητα των απλών σακχάρων, ολιγοσακχαριτών, πολυσακχαριτών και των παραγώγων τους να αποκτούν ένα κίτρινο-πορτοκαλί χρώμα όταν αντιδρούν με φαινόλη και πυκνόθειϊκό οξύ.

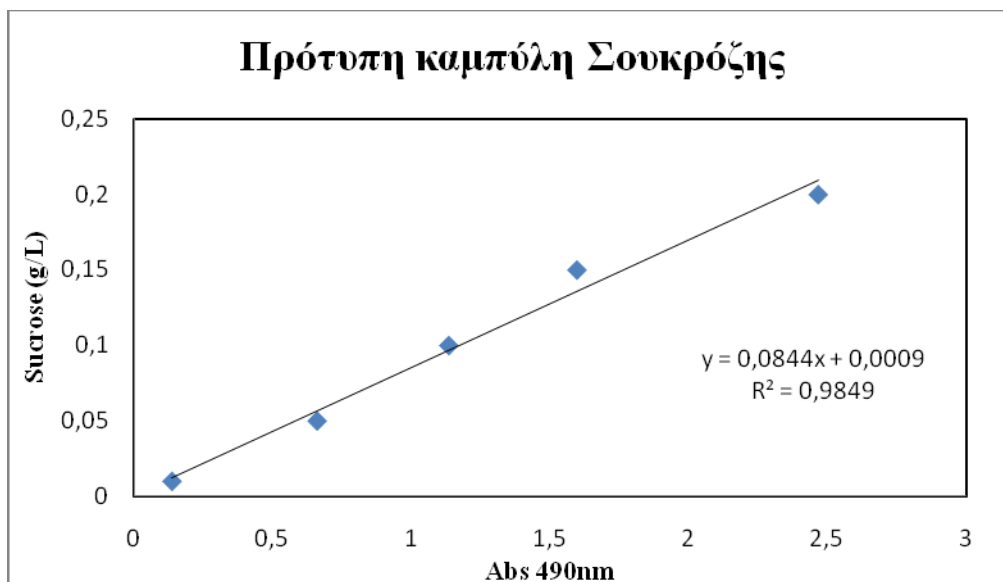
- **Αντιδραστήρια**

Θειϊκό οξύ 95.5% w/v

Φαινόλη 80 % w/w

- **Εφαρμογή της μεθόδου**

Σε 2 mL κατάλληλα αραιωμένου δείγματος προστίθενται 50 μL φαινόλης και 5 mL πυκνού θειϊκού οξέος. Το διάλυμα αναδεύεται και μετά αφήνεται σε ηρεμία για 10 λεπτά αφού έχει τοποθετηθεί σε υδατόλουτρο με πάγο. Στη συνέχεια ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης στα 490 nm. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του δείγματος σε ολικά σάκχαρα ανάλογα με την πηγή άνθρακα έγινε με τη χρήση της ακόλουθης καμπύλης αναφοράς (Γράφημα Π.4.4-1). Όλες οι απορροφήσεις μετρήθηκαν με τη χρήση φασματοφωτομέτρου τύπου Hitachi U-2000 spectrophotometer.



Γράφημα Π.4.4-1: Καμπύλη αναφοράς σουκρόζης με τη μέθοδο Dubois

Π.4.5. Προσδιορισμός 2,3-βουτανοδιόλης, αιθανόλης και οργανικών οξέων

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της 2,3-βουτανοδιόλης, της αιθανόλης και των οργανικών οξέων έγινε με την χρήση της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Αποδόσεως (HPLC) σε σύστημα Waters 600E. Η ανίχνευση της 2,3-βουτανοδιόλης και της αιθανόλης έγινε σε ανιχνευτή RI (RI Waters 410), ενώ των οργανικών οξέων σε ανιχνευτή UV (Waters 486).

Η ταυτοποίηση των μεταβολικών προϊόντων βασίστηκε στον χρόνο κατακράτησης, ο οποίος συγκρίθηκε με πρότυπα δείγματα των αντίστοιχων ουσιών. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε αραιό διάλυμα H_2SO_4 (0,005 M) και η ροή της ρυθμίστηκε στα 0.6 mL/min. Η στήλη με την οποία έγινε ο διαχωρισμός του δείγματος ήταν τύπου Aminex HPX-87H (BIO-Rad) και θερμοκρασίας 60 °C. Από τη στήλη περνούσαν 20 μ L δείγματος και η διάρκεια της ανάλυσης ήταν 20 λεπτά.

Με τη χρήση προτύπων διαλυμάτων προέκυψαν οι ακόλουθες εξισώσεις (Πίνακας Π.4.5-1) με την βοήθεια των οποίων υπολογίστηκε η συγκέντρωση των οργανικών οξέων και της αιθανόλης. Στις εξισώσεις με C συμβολίζεται η συγκέντρωση σε g/L και με E συμβολίζεται το εμβαδό (area) σε αυθαίρετες μονάδες (A.U).

Πίνακας Π.4.5-1: Εξισώσεις HPLC

Συστατικό	Εξίσωση
2,3-βουτανودیολη (2,3-BD)	$C = 4 \cdot 10^{-6} E + 0,068$
Αιθανόλη (Eth)	$C = 9 \cdot 10^{-6} E - 0,4682$
Γαλακτικό (Lac)	$C = 7 \cdot 10^{-7} E + 0,0774$

Π.4.6 Προσδιορισμός αποχρωματισμού μελάσας

Για τον προσδιορισμό του ποσοστού αποχρωματισμού της μελάσας ορίστηκε ως σημείο αναφοράς η απορρόφηση του δείγματος μελάσας πριν τον εμβολιασμό στα 475 nm, με αραιώση 1/10 (Dahiya et al., 2001; Thakkar et al., 2006). Στην συνέχεια λαμβάνονταν μέτρηση της απορρόφησης του υπερκείμενου της καλλιέργειας από κάθε σημείο της κινητικής στο ίδιο μήκος κύματος και στην ίδια αραιώση. Η διαφορά απορρόφησης μεταξύ του αρχικού σημείου και του εκάστοτε σημείου κινητικής εκφράστηκε σε ποσοστό επί τοις %, δηλαδή:

$$A = (A_0 - A_i) / A_0 \cdot 100,$$

όπου A_0 η απορρόφηση στις 0 ώρες και A_i η απορρόφηση στο κάθε σημείο της κινητικής.

III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

III.1 Μελέτη επιλογής βακτηρίων της οικογένειας Enterobacteriaceae σε υπόστρωμα εμπορικής γλυκόζης για την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης

Το πρώτο στάδιο της παρούσας μελέτης είχε ως στόχο τη διερεύνηση των βιοχημικών δυνατοτήτων 6 βακτηριακών στελεχών της οικογένειας Enterobacteriaceae, (το στέλεχος *Citrobacter farmeri* FMCC-7, *farmeri* FMCC-5, *freudii* FMCC-8, *Enterobacter aerogenes* FMCC-9, το στέλεχος *Enterobacter* sp. FMCC-208 και το στέλεχος *Klebsiella oxytoca* FMCC-197) προς την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκαν αναερόβιες καλλιέργειες σε φιάλες Duran, υπό ανάδευση 180±5 rpm. Η πηγή άνθρακα που χρησιμοποιήθηκε ήταν η εμπορική γλυκόζη σε αρχική συγκέντρωση 20 g/L και η θερμοκρασία επώασης ήταν 30 °C. Το pH διορθωνόταν καθ'όλη τη διάρκεια της ζύμωσης. Στον Πίνακα III.1-1 παρουσιάζεται η κατανάλωση της γλυκόζης και η παραγωγή των μεταβολικών προϊόντων μετά το πέρας της ζύμωσης.

Πίνακας III.1-1: Κατανάλωση γλυκόζης (Glu, g/L) και παραγωγή μεταβολικών προϊόντων κατά τη διεργασία ζυμώσεων στελεχών εντεροβακτηρίων σε αναερόβιες αναδευόμενες φιάλες.

Στέλεχος	Time (h)	pH _{in}	pH _f	Glu _{in} (g/L)	Glu _f (g/L)	2,3-BD (g/L)	Eth (g/L)	Lac (g/L)	Ace (g/L)	Form (g/L)
<i>Citrobacter farmeri</i> FMCC-7	56	6.72	5.47	20	2.9	0.0	0.0	14.8	0.0	0.2
<i>Citrobacter farmeri</i> FMCC-5	56	6.68	6.65	20	3.2	0.0	0.0	7.1	0.0	0.8
<i>Citrobacter freudii</i> FMCC-8	50	6.91	5.65	20	8.7	0.0	0.9	10.0	6.9	1.0
<i>Enterobacter aerogenes</i> FMCC-9	24	6.75	6.50	20	1.2	8.9	1.4	0.0	0.0	0.0
<i>Enterobacter</i> sp. FMCC-208	24	6.55	6.12	20	0.9	13.1	2.5	1.5	0.0	0.0
<i>Klebsiella oxytoca</i> FMCC-197	24	6.75	6.11	20	1.0	9.5	1.2	0.3	1.5	0.2

Time: η διάρκεια ζύμωσης (h), **pH_{in}:** η αρχική τιμή pH, **pH_f:** η τελική τιμή pH, **Glu_{in}:** η αρχική συγκέντρωση γλυκόζης (g/L), **Glu_f:** η τελική συγκέντρωση γλυκόζης (g/L), **2,3-BD:** η συγκέντρωση της 2,3-βουτανοδιόλης (g/L),

Eth: η συγκέντρωση της αιθανόλης (g/L), **Lac:** η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος (g/L), **Ace:** η συγκέντρωση του οξικού οξέος (g/L), **Form:** η συγκέντρωση του φορμικού οξέος (g/L)

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχείς καλλιέργειες σε φιάλες Duran 1-L, πληρωμένες κατά τα 4/5, υπό αναερόβιες συνθήκες, αρχική τιμή pH=7.0±0.3 και θερμοκρασία 30 °C.

Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν και οι παρουσιαζόμενες τιμές είναι ο μέσος όρος 2 επαναλήψεων

Όπως φαίνεται από τον Πίνακα III.1-1, από τα 6 βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν, το στέλεχος *Enterobacter* sp. FMCC-208 κατανάλωσε τη γλυκόζη σε χρονικό διάστημα 24h και παράγαγε τη μεγαλύτερη συγκέντρωση 2,3-βουτανοδιόλης (13.1 g/L), καθώς και ικανοποιητική ποσότητα αιθανόλης (2.5 g/L) και γαλακτικού οξέος (1.5 g/L). Τα στελέχη *Citrobacter farmeri* FMCC-7, *Citrobacter farmeri* FMCC-5 και *Citrobacter freudii* FMCC-8 δεν παράγαγαν καθόλου 2,3-βουτανοδιόλη αλλά (κατά κύριο λόγο) γαλακτικό οξύ, ενώ η συγκέντρωση της 2,3-βουτανοδιόλης που παράχθηκε από τα στελέχη *Enterobacter aerogenes* FMCC-9 και *Klebsiella oxytoca* FMCC-197 ήταν κατά 3-4 g/L μικρότερη σε σχέση με το στέλεχος *Enterobacter* sp. FMCC-208. Αφού συνεκτιμήθηκε τόσο η κατανάλωση της γλυκόζης όσο και η παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης, επιλέχθηκε για τη συνέχεια της πειραματικής διαδικασίας το στέλεχος *Enterobacter* sp. FMCC-208.

III.2 Αύξηση του στελέχους *Enterobacter* sp. FMCC-208 σε διάφορα σακχαρούχα υποστρώματα σε υγρές καλλιέργειες σε φιάλες Duran για την παραγωγή 2,3- βουτανοδιόλης

Σε δεύτερη προσέγγιση, το στέλεχος *Enterobacter* sp. FMCC-208 καλλιεργήθηκε σε υγρό συνθετικό θρεπτικό μέσο με πηγή άνθρακα την εμπορική γλυκόζη και την εμπορική σακχαρόζη στους 30 °C για την μελέτη της αύξησης του μικροοργανισμού και την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης. Παράλληλα, εξετάστηκε η επίδραση του ρυθμού ανάδευσης στην αύξηση του εν λόγω στελέχους και η επίδραση της συγκέντρωσης του υποστρώματος στην παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης. Οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε φιάλες Duran 1-L (Batch-Duran Cultures) με ενεργό όγκο 0.8 L σε θερμοκρασία T=30 °C και το pH διορθωνόταν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης για να διατηρείται σε τιμή 6-7. Πραγματοποιήθηκαν κινητικές στις οποίες μετρήθηκαν οι εξής παράμετροι της μικροβιακής αύξησης:

- ✓ Το pH της καλλιέργειας

- ✓ Η παραγωγή βιομάζας, **X** (g/L)
- ✓ Η κατανάλωση της γλυκόζης, **Glu** (g/L), της σακχαρόζης, **Suc** (g/L), και των συνολικών σακχάρων **TS** (g/L) για την περίπτωση της μελάσας
- ✓ Η παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης, **2,3-BD** (g/L), αιθανόλης, **Eth** (g/L) και του γαλακτικού οξέος, **Lac** (g/L)

Κατά τη βιοδιεργασία υπολογίστηκαν οι εξής παράμετροι της μικροβιακής αύξησης:

- ❖ Ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης, **Y_{2,3-BD}** (g παραχθείσας 2,3-βουτανοδιόλης ανά g καταναλωθέντος υποστρώματος), ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής αιθανόλης, **Y_{Eth}** (g παραχθείσας αιθανόλης ανά g καταναλωθέντος υποστρώματος) και ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής γαλακτικού οξέος, **Y_{Lac}** (g παραχθείσας γαλακτικού οξέος ανά g καταναλωθέντος υποστρώματος)
- ❖ Η παραγωγικότητα της 2,3-βουτανοδιόλης, **P_{2,3-BD}** (g/L παραχθείσας 2,3-βουτανοδιόλης ανά ώρα)

III.2.1 Καλλιέργεια του *Enterobacter* sp. FMCC-208 στην εμπορική γλυκόζη για την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία (Morin et al., 1993), η αύξηση του ρυθμού ανάδευσης κατά την ζύμωση έχει θετική επίδραση και μπορεί να αυξήσει την παραγωγικότητα των προϊόντων. Στην παρούσα μελέτη επιλέχτηκαν δύο ρυθμοί ανάδευσης, ο πρώτος ήταν αυτός των 80±5 rpm και ο δεύτερος των 180±5 rpm. Η διερεύνηση αυτή έχει σαν στόχο την επιλογή του καταλληλότερου ρυθμού ανάδευσης που θα αυξήσει την απόδοση της 2,3-βουτανοδιόλης αλλά και που θα ολοκληρώσει τη ζύμωσης στο μικρότερο χρονικό διάστημα. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε αύξηση του στελέχους *Enterobacter* sp. σε υγρή καλλιέργεια σε φιάλη Duran 1-L με μοναδική πηγή άνθρακα την εμπορική γλυκόζη σε αρχική συγκέντρωση 40 g/L, 60 g/L και σε 90 g/L. Στον Πίνακα III.2.1-1 δίνεται η επίδραση του ρυθμού ανάδευσης στην κατανάλωση της γλυκόζης και στην παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης και των άλλων παραπροϊόντων της βιοδιεργασίας.

Πίνακας III.2.1-1: Επίδραση του ρυθμού ανάδευσης στην κατανάλωση της εμπορικής γλυκόζης και στην παραγωγή προϊόντων κατά την αύξηση του στελέχους *Enterobacter* sp. FMCC-208. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν και οι παρουσιαζόμενες τιμές είναι ο μέσος όρος 2 επαναλήψεων.

rpm	Time (h)	Glu _{in} (g/L)	Glu _f (g/L)	X _{max} (g/L)	2,3-BD _{max} (g/L)	Y _{2,3-BD} (g/g)	P _{2,3-BD} (g/L/h)	Eth (g/L)	Y _{Eth} (g/g)	Lac (g/L)	Y _{Lac} (g/g)
80	48	40	1.5	2.1	13.4	0.34	0.27	3.5	0.09	1.5	0.03
	48	60	3.0	2.2	19.5	0.35	0.40	8.6	0.15	2.7	0.04
	78	90	14.9	2.2	21.9	0.29	0.28	8.1	0.11	3.1	0.04
180	48	40	1.0	2.1	13.7	0.35	0.28	3.6	0.09	1.5	0.03
	48	60	2.0	2.7	21.6	0.37	0.45	8.0	0.13	5.1	0.08
	48	90	4.5	2.2	26.5	0.33	0.55	10.3	0.12	9.0	0.11

Time: η διάρκεια ζύμωσης (h), **Glu_{in}:** η αρχική συγκέντρωση γλυκόζης (g/L), **Glu_f:** η τελική συγκέντρωση γλυκόζης (g/L), **X_{max}:** η μέγιστη βιομάζα (g/L), **2,3-BD:** η συγκέντρωση της 2,3-βουτανοδιόλης (g/L), **Y_{2,3-BD}:** ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης προς καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g), **P_{2,3-BD}:** η παραγωγικότητα της 2,3-βουτανοδιόλης ανά ώρα (g/L/h), **Eth:** η συγκέντρωση της αιθανόλης (g/L), **Y_{Eth}:** ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής αιθανόλης προς καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g), **Lac:** η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος (g/L), **Y_{Lac}:** ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής γαλακτικού οξέος προς καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g).

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχείς καλλιέργειες σε φιάλες Duran 1-L, πληρωμένες κατά τα 4/5, υπό αναερόβιες συνθήκες, αρχική τιμή pH=6.5±0.2 και θερμοκρασία 30 °C.

Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν και οι παρουσιαζόμενες τιμές είναι ο μέσος όρος 2 επαναλήψεων

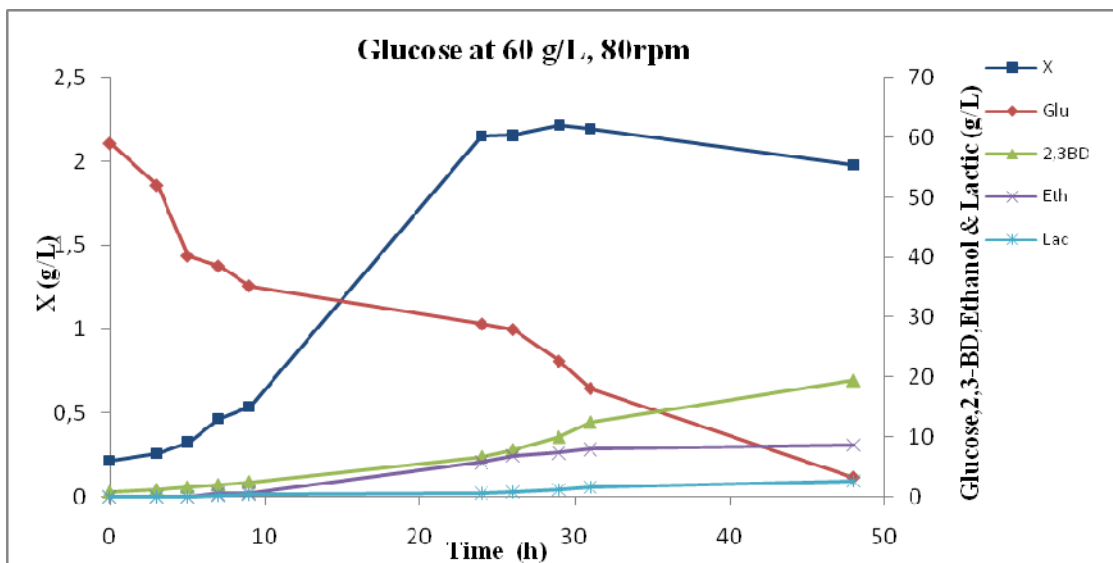
Από τα δεδομένα του πίνακα III.2.1-1 φαίνεται πως ο ρυθμός ανάδευσης στις καλλιέργειες με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 40 και 60 g/L δεν είχε ιδιαίτερη επίδραση στην συγκέντρωση της 2,3-βουτανοδιόλης και των άλλων προϊόντων. Πιο συγκεκριμένα, στις καλλιέργειες με αρχική συγκέντρωση 40 g/L, οι ζυμώσεις ολοκληρώθηκαν μέσα σε 48 ώρες με την γλυκόζη να καταναλώνεται σχεδόν όλη (έμεινε περίπου 1 g/L ακατανάλωτο) και τη μέγιστη συγκέντρωση της βιομάζας να λαμβάνει την τιμή των 2.1 g/L. Η μέγιστη συγκέντρωση της 2,3-βουτανοδιόλης ήταν 13.4 g/L με συντελεστή απόδοσης 0.34 g/g και 13.7 g/L με συντελεστή απόδοσης 0.35 g/g στις 80 και 180 στροφές αντίστοιχα. Επίσης, η συγκέντρωση της αιθανόλης είχε τιμή 3.5 g/L με συντελεστή απόδοσης 0.09 g/g και το γαλακτικό οξύ ήταν 1.5 g/L με συντελεστή απόδοσης 0.03 g/g και στους δύο ρυθμούς ανάδευσης. Στις καλλιέργειες με αρχική συγκέντρωση 60 g/L παρατηρούμε παρόμοια αποτελέσματα. Οι ζυμώσεις ολοκληρώθηκαν σε 48 ώρες και έμειναν ακατανάλωτα ~2-3 g/L και στις δύο περιπτώσεις. Όσον αφορά τη μέγιστη συγκέντρωση της βιομάζας, έλαβε την τιμή 2.7 g/L στις 180 στροφές έναντι των 2.2 g/L που παρατηρήθηκε στις 80 στροφές. Η συγκέντρωση της 2,3-βουτανοδιόλης ήταν 19.5 g/L με

συντελεστή απόδοσης 0.35 g/g στις 80 στροφές ενώ στις 180 στροφές ήταν 21.6 g/L με συντελεστή απόδοσης 0.37 g/g. Η αιθανόλη που παράχθηκε ήταν περίπου 8 g/L και στις δυο περιπτώσεις ενώ το γαλακτικό οξύ αυξήθηκε κατά 2.4 g/L στο μεγαλύτερο ρυθμό ανάδευσης.

Όταν το στέλεχος καλλιεργήθηκε σε αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 90 g/L, η ζύμωση που έγινε στις 80 στροφές διεκόπη στις 78 ώρες, γιατί δεν καταναλωνόταν άλλο υπόστρωμα. αφήνοντας 14.9 g/L γλυκόζης. Η μέγιστη τιμή της βιομάζας ήταν 2.2 g/L και της 2,3-βουτανοδιόλης ήταν 21.9 g/L με συντελεστή απόδοσης 0.29 g/g. Οι μέγιστες τιμές της αιθανόλης και του γαλακτικού οξέος ήταν 8.1 g/L και 3.1 g/L αντίστοιχα. Ενδιαφέρουσα ήταν η ζύμωση που πραγματοποιήθηκε στις 180 στροφές, η οποία ολοκληρώθηκε σε 48 ώρες και αφομοιώθηκαν 85.5 g/L γλυκόζης. Η μέγιστη τιμή της βιομάζας έλαβε τιμή 2.2 g/L, όπως και στην προηγούμενη περίπτωση αλλά οι συγκεντρώσεις της 2,3-βουτανοδιόλης, της αιθανόλης και του γαλακτικού οξέος αυξήθηκαν, λαμβάνοντας τιμές 26.5 g/L, 10.3 g/L και 9.0 g/L αντίστοιχα. Αξίζει να αναφέρουμε ότι η αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης του υποστρώματος στα 90 g/L μείωσε ελαφρά τον συντελεστή απόδοσης της 2,3-βουτανοδιόλης συγκριτικά με τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Παρόλα αυτά, η παραγωγικότητα της 2,3-βουτανοδιόλης ήταν μεγαλύτερη στις 180 στροφές και στις τρεις αρχικές συγκεντρώσεις και η μέγιστη τιμή της ήταν 0.55 g/L*h στην καλλιέργεια των 90 g/L.

Το αρχικό pH των καλλιεργειών αυτών κυμαινόταν από 6.1 έως 6.5 και όταν μειωνόταν σε pH=5.5 περίπου διορθωνόταν με προσθήκη καυστικού καλίου 5M. Η πτώση αυτή του pH οφείλεται στην έκκριση κυρίως γαλακτικού οξέος και σε μικρότερο βαθμό άλλων οργανικών οξέων.

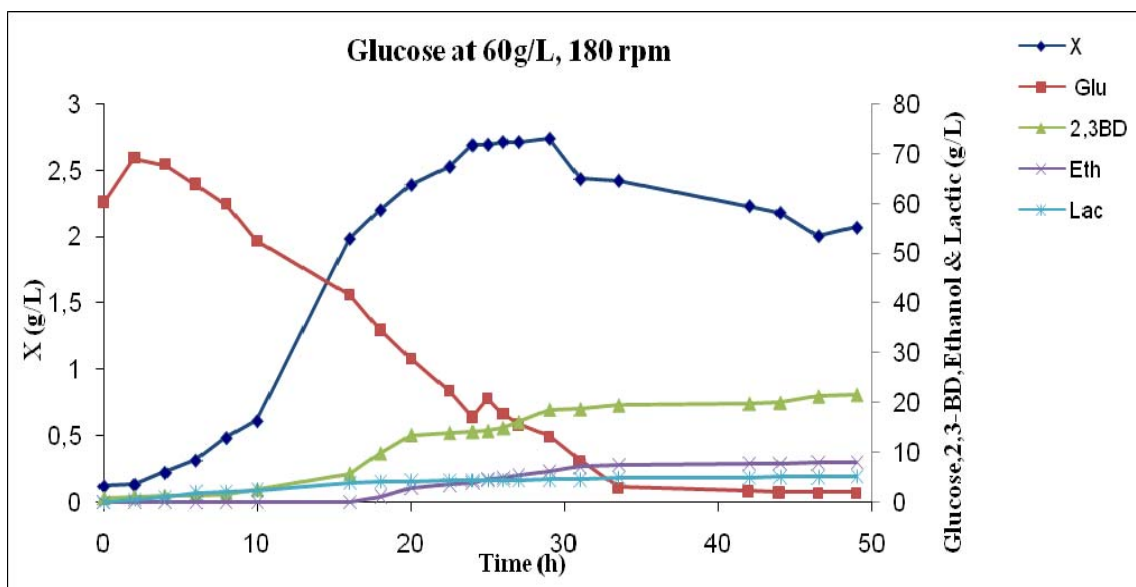
Στη συνέχεια παρουσιάζονται οι κινητικές της βακτηριακής αύξησης, της κατανάλωσης γλυκόζης και της παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης, της αιθανόλης και του γαλακτικού οξέος από το στέλεχος *Enterobacter* sp. FMCC-208 σε θρεπτικό μέσο με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 60 g/L (Γράφημα III.2.1-1 και Γράφημα III.2.1-2) και 90g/L (Γράφημα III.2.1-2 και Γράφημα III.2.1-4) υπό ανάδευση 80±5 και 180±5 rpm.



Γράφημα III.2.1-1: Κινητική της παραγωγής βιομάζας (X), της κατανάλωσης γλυκόζης (Glu) και της παραγωγής 2,3-βουτανδιόλης (2,3-BD), και λοιπών προϊόντων (Eth, Lac) σε υγρή καλλιέργεια με μοναδική πηγή άνθρακα τη γλυκόζη με συγκέντρωση 60 g/L υπό ανάδευση 80rpm.

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχείς καλλιέργειες σε φιάλες Duran 1-L, πληρωμένες κατά τα 4/5, υπό αναερόβιες συνθήκες, αρχική τιμή pH=6.5±0.2 και θερμοκρασία 30 °C.

Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν και οι παρουσιαζόμενες τιμές είναι ο μέσος όρος 2 επαναλήψεων.

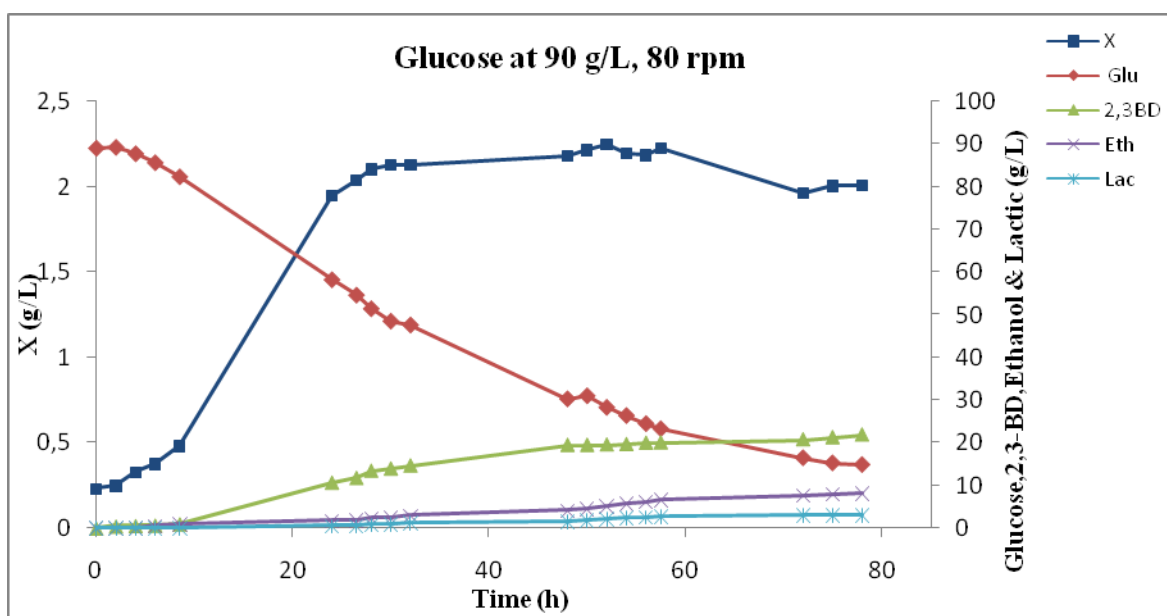


Γράφημα III.2.1-2: Κινητική της παραγωγής βιομάζας (X), της κατανάλωσης γλυκόζης (Glu) και της παραγωγής 2,3-βουτανδιόλης (2,3-BD), και λοιπών προϊόντων (Eth, Lac) σε υγρή καλλιέργεια με μοναδική πηγή άνθρακα τη γλυκόζη με συγκέντρωση 60 g/L υπό ανάδευση 180rpm.

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχείς καλλιέργειες σε φιάλες Duran 1-L, πληρωμένες κατά τα 4/5, υπό αναερόβιες συνθήκες, αρχική τιμή pH=6.5±0.2 και θερμοκρασία 30 °C.

Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν και οι παρουσιαζόμενες τιμές είναι ο μέσος όρος 2 επαναλήψεων.

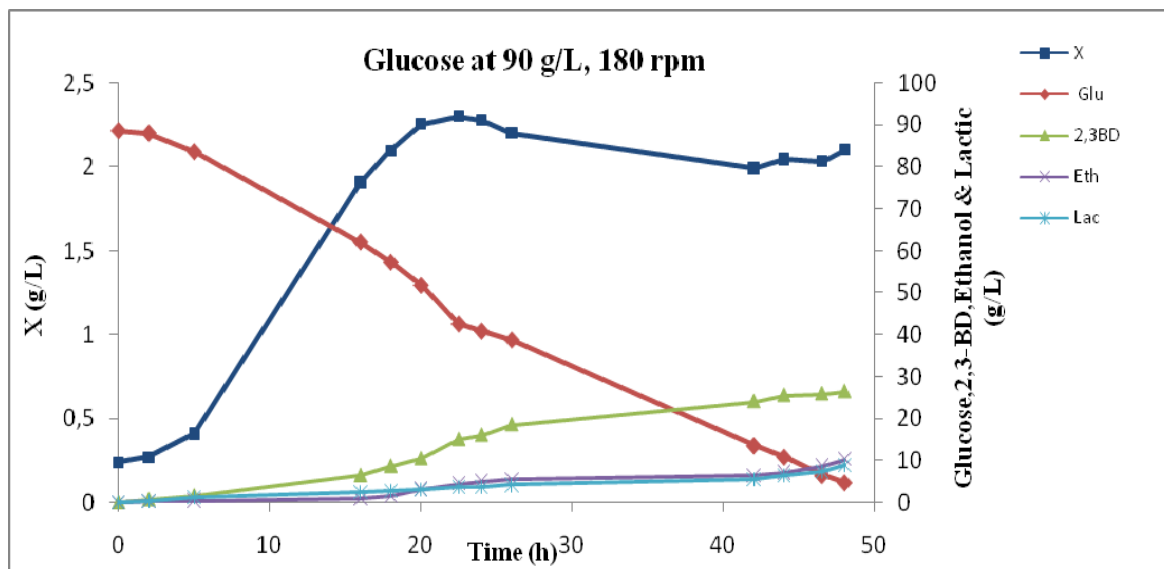
Από τα δεδομένα του Γραφήματος III.2.1-1 και III.2.1-2 προκύπτει ότι η κατανάλωση του υποστρώματος ξεκινάει λίγες ώρες μετά τον εμβολιασμό, με αξιοσημείωτη τη φάση προσαρμογής (lag phase) στον αυξητικό κύκλο. Η παραγωγή της 2,3-βουτανδιόλης ξεκινά στην αρχή της εκθετικής φάσης και η μέγιστη παραγωγή της λαμβάνει τιμή 19.5 g/L και 21.9 g/L στις 80 και στις 180 στροφές αντίστοιχα. Η παραγωγή της αιθανόλης και του γαλακτικού οξέος ξεκινά περίπου μετά τις 10 ώρες. Αξίζει να σημειωθεί πως στον μεγαλύτερο ρυθμό ανάδευσης, η κατανάλωση του υποστρώματος είναι πιο γρήγορη και η ζύμωση έχει σχεδόν ολοκληρωθεί στις 33 ώρες.



Γράφημα III.2.1-3: Κινητική της παραγωγής βιομάζας (X), της κατανάλωσης γλυκόζης (Glu) και της παραγωγής 2,3-βουτανδιόλης (2,3-BD), και λοιπών προϊόντων (Eth, Lac) σε υγρή καλλιέργεια με μοναδική πηγή άνθρακα τη γλυκόζη με συγκέντρωση 60 g/L υπό ανάδευση 80rpm.

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχείς καλλιέργειες σε φιάλες Duran 1-L, πληρωμένες κατά τα 4/5, υπό αναερόβιες συνθήκες, αρχική τιμή pH=6.5±0.2 και θερμοκρασία 30 °C.

Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν και οι παρουσιαζόμενες τιμές είναι ο μέσος όρος 2 επαναλήψεων.



Γράφημα III.2.1-4: Κινητική της παραγωγής βιομάζας (X), της κατανάλωσης γλυκόζης (Glu) και της παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης (2,3-BD), και λοιπών προϊόντων (Eth, Lac) σε υγρή καλλιέργεια με μοναδική πηγή άνθρακα τη γλυκόζη με συγκέντρωση 60 g/L υπό ανάδευση 180rpm.

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχείς καλλιέργειες σε φιάλες Duran 1-L, πληρωμένες κατά τα 4/5, υπό αναερόβιες συνθήκες, αρχική τιμή pH=6.5±0.2 και θερμοκρασία 30 °C.

Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν και οι παρουσιαζόμενες τιμές είναι ο μέσος όρος 2 επαναλήψεων.

Από τα δεδομένα του Γραφήματος III.2.1-3 και III.2.1-4 προκύπτει ότι η κατανάλωση του υποστρώματος ξεκινάει λίγες ώρες μετά τον εμβολιασμό, με φάση προσαρμογής (lag phase) στον αυξητικό κύκλο. Παρόλα αυτά, στην καλλιέργεια των 80 στροφών, η ζύμωση δεν ολοκληρώνεται ακόμα και μετά από 80 ώρες, αφήνοντας ακατανάλωτα 14.9 g/L γλυκόζης. Αντίθετα, όταν η ζύμωση γίνεται στο μεγαλύτερο ρυθμό ανάδευσης, η διάρκεια της μειώνεται αισθητά στις 48 ώρες. Η παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης ξεκινά στην αρχή της εκθετικής φάσης και η μέγιστη παραγωγή της λαμβάνει τιμή 21.9 g/L και 26.5 g/L στις 80 και στις 180 στροφές αντίστοιχα. Ο μικροοργανισμός εμφάνισε ικανοποιητική κυτταρική αύξηση με μέγιστες τιμές ~2.2 g/L και στις δύο συνθήκες. Η παραγωγή της αιθανόλης και του γαλακτικού οξέος ξεκινά πιο αργά, περί τις 10-12 ώρες μετά τον εμβολιασμό, με τις συγκεντρώσεις των εν λόγω ουσιών να είναι μεγαλύτερες στις 180 στροφές, δηλαδή η αιθανόλη 10.3 g/L και το γαλακτικό οξύ 9.0 g/L.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω αποτελέσματα, ο μεγαλύτερος ρυθμός ανάδευσης βελτιστοποιεί τις καλλιέργειες με αποτέλεσμα μεγαλύτερες συγκεντρώσεις της 2,3-βουτανοδιόλης και των άλλων προϊόντων καθώς και με μεγαλύτερους συντελεστές απόδοσης. Επίσης οι καλλιέργειες με αρχική συγκέντρωση άνω των 60g/L ολοκληρώθηκαν σε συντομότερο χρονικό διάστημα. Για το λόγο αυτό, τα επόμενα πειράματα πραγματοποιήθηκαν υπό ανάδευση 180±5 rpm.

III.2.2 Καλλιέργεια του *Enterobacter* sp. FMCC-208 στην εμπορική σακχαρόζη για την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης

Το στελέχος *Enterobacter* sp. FMCC-208 καλλιεργήθηκε σε υγρό θρεπτικό μέσο στην εμπορική σακχαρόζη με αρχική συγκέντρωση 20, 35, 55 και 80 g/L, σε αναερόβιες συνθήκες και υπό ανάδευση 180±5 rpm και μελετήθηκε η επίδραση της στην παραγωγή της βιομάζας και των μεταβολικών προϊόντων. Στον Πίνακα III.2.2-1 δίνεται η επίδραση της συγκέντρωσης του υποστρώματος στην αύξηση του στελέχους.

Πίνακας III.2.2-1: Επίδραση της συγκέντρωσης του υποστρώματος σακχαρόζης στην παραγωγή της 2,3-BD και των άλλων μεταβολικών προϊόντων κατά την αύξηση του στελέχους *Enterobacter* sp. FMCC-208 σε υγρές καλλιέργειες.

Suc_{in} (g/L)	Suc_f (g/L)	Time (h)	X_{max} (g/L)	2,3-BD_{max} (g/L)	Y_{2,3-BD} (g/g)	Eth (g/L)	Y_{Eth} (g/g)	Lac (g/L)	Y_{Lac} (g/g)
20	1.2	24	1.5	7.9	0.43	2.7	0.14	1.1	0.05
35	0.0	54	2.0	14.6	0.42	4.7	0.13	1.5	0.04
55	4.0	54	2.2	19.7	0.40	6.8	0.13	3.0	0.05
80	2.4	51	3.2	29.6	0.40	10.0	0.13	8.0	0.11

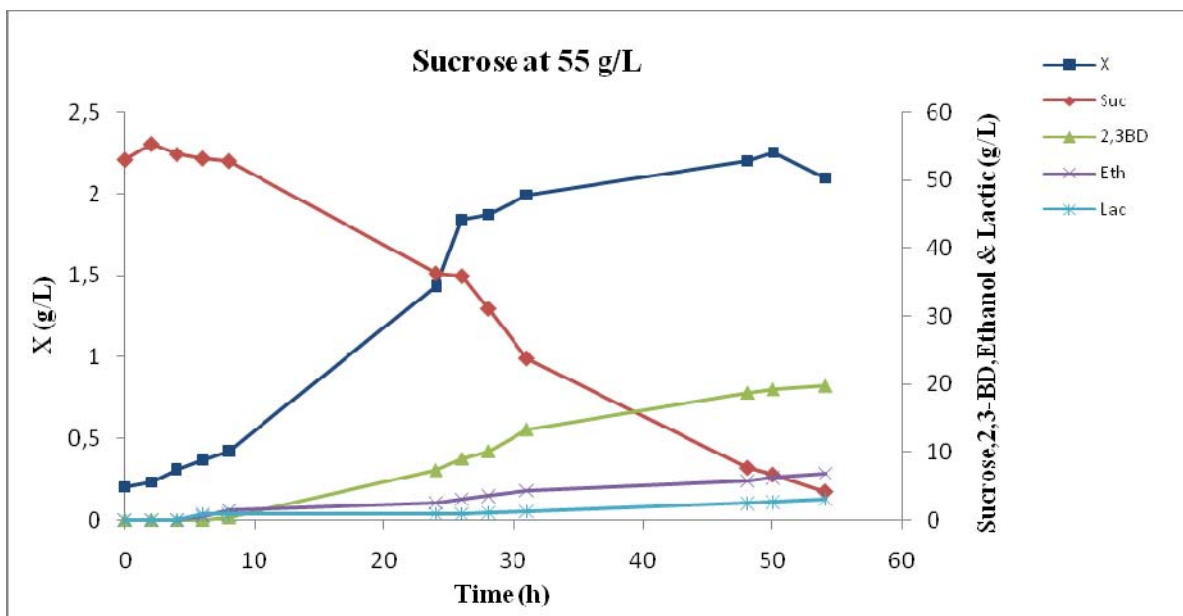
Suc_{in} η αρχική συγκέντρωση σακχαρόζης (g/L), **Suc_f**: η τελική συγκέντρωση σακχαρόζης (g/L), **Time**: η διάρκεια ζύμωσης (h), **X_{max}**: η μέγιστη βιομάζα (g/L), **2,3-BD**: η συγκέντρωση της 2,3-βουτανοδιόλης (g/L), **Y_{2,3BD}**: ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης προς καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g), **Eth**: η συγκέντρωση της αιθανόλης (g/L), **Y_{Eth}**: ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής αιθανόλης προς καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g), **Lac**: η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος (g/L), **Y_{Lac}**: ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής γαλακτικού οξέος προς καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g).

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχείς καλλιέργειες σε φιάλες Duran 1-L, πληρωμένες κατά τα 4/5, υπό αναερόβιες συνθήκες, αρχική τιμή pH=7.0±0.2 και θερμοκρασία 30 °C.

Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν και οι παρουσιαζόμενες τιμές είναι ο μέσος όρος 2 επαναλήψεων.

Από τα δεδομένα του πίνακα III.2.2-1 παρατηρούμε πως η ποσότητα της σακχαρόζης καταναλώθηκε (σχεδόν) όλη και στις τέσσερις καλλιέργειες. Όσον αφορά την κυτταρική αύξηση, προκύπτει πως αυτή αυξάνεται με την αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης και λαμβάνει μέγιστη τιμή 3.2 g/L στην καλλιέργεια των 80 g/L. Η παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης ήταν υψηλή και συγκεκριμένα είχε τιμή 7.9, 14.6, 19.7 και 29.6 g/L στις καλλιέργειες με αρχική συγκέντρωση 20, 35, 55 και 80 g/L αντίστοιχα με τον συντελεστή απόδοσης να κυμαίνεται από 0.40 έως 0.43 g/g. Η παραγωγή της συνοδεύτηκε με παραγωγή

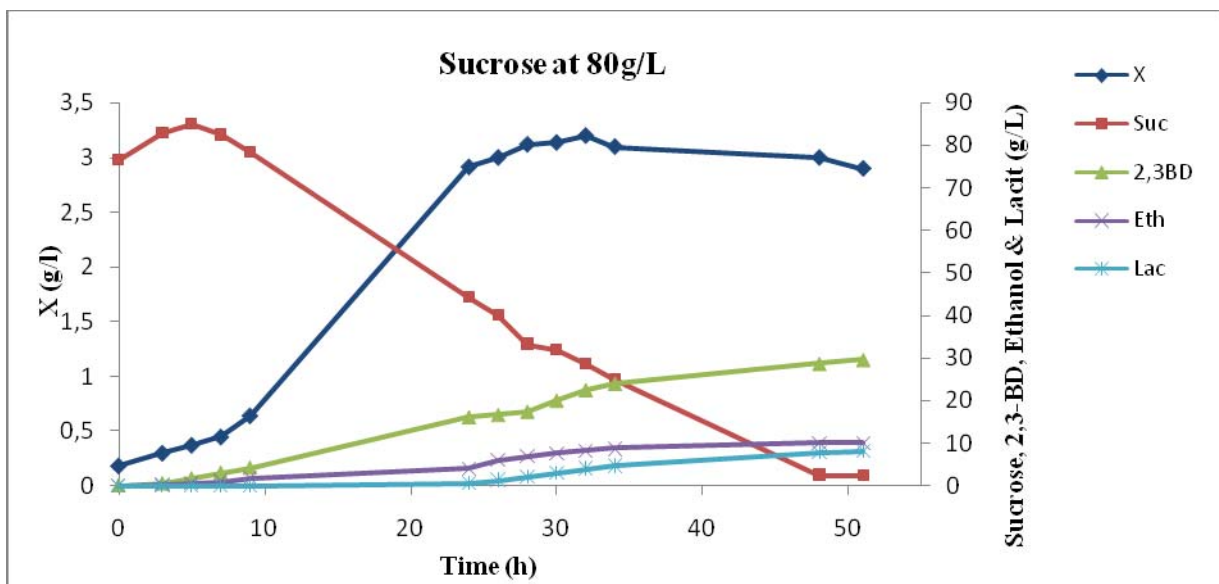
αιθανόλης, η οποία αυξανόταν με την αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης και η μέγιστη τιμή της παρατηρήθηκε στην καλλιέργεια των 80 g/L με τιμή 10 g/L, που αντιστοιχεί σε συντελεστή απόδοσης 0.13 g/g. Τέλος, η μέγιστη παραγωγή του γαλακτικού οξέος ήταν στην καλλιέργεια των 80 g/L και είχε τιμή 8 g/L με συντελεστή απόδοσης 0.11 g/g ενώ στις μικρότερες αρχικές συγκεντρώσεις ο συντελεστής απόδοσης μειώθηκε στο 0.05 g/g. Το αρχικό pH ήταν 7.0 και διορθωνόταν καθ'όλη τη διάρκεια της ζύμωσης ώστε να διατηρείται σε τιμές μεγαλύτερες του 6.0. Στα Γραφήματα III.2.2-1 και III.2.2-2 δίνονται οι κινητικές των ζυμώσεων με αρχική συγκέντρωση 55 g/L και 80 g/L.



Γράφημα III.2.2-1: Κινητική της παραγωγής βιομάζας (X), της κατανάλωσης σακχαρόζης (Suc) και της παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης (2,3-BD), και λοιπών προϊόντων (Eth, Lac) σε υγρή καλλιέργεια με μοναδική πηγή άνθρακα την σακχαρόζη με συγκέντρωση 55 g/L υπό ανάδευση 180rpm.

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχείς καλλιέργειες σε φιάλες Duran 1-L, πληρωμένες κατά τα 4/5, υπό αναερόβιες συνθήκες, αρχική τιμή pH=7.0±0.2 και θερμοκρασία 30 °C.

Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν και οι παρουσιαζόμενες τιμές είναι ο μέσος όρος 2 επαναλήψεων.



Γράφημα III.2.2-2: Κινητική της παραγωγής βιομάζας (X), της κατανάλωσης σακχαρόζης (Suc) και της παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης (2,3-BD), και λοιπών προϊόντων (Eth, Lac) σε υγρή καλλιέργεια με μοναδική πηγή άνθρακα την σακχαρόζη με συγκέντρωση 80 g/L υπό ανάδευση 180rpm.

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχείς καλλιέργειες σε φιάλες Duran 1-L, πληρωμένες κατά τα 4/5, υπό αναερόβιες συνθήκες, αρχική τιμή pH=7.0±0.2 και θερμοκρασία 30 °C.

Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν και οι παρουσιαζόμενες τιμές είναι ο μέσος όρος 2 επαναλήψεων.

Από τα δεδομένα του Γραφήματος III.2.2-1 και III.2.2-2 προκύπτει ότι και στις δύο καλλιέργειες η κατανάλωση του υποστρώματος έγινε σχεδόν ταυτόχρονα και ξεκινάει λίγες ώρες μετά τον εμβολιασμό, λόγω της ιμπερτάσης που υδρολύει τη σακχαρόζη σε ισομοριακό διάλυμα γλυκόζης και φρουκτόζης. Η παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης ξεκινά μετά τις 10 ώρες από τον εμβολιασμό, παράλληλα με την παραγωγή της αιθανόλης. Στην καλλιέργεια των 55 g/L, το γαλακτικό οξύ αρχίζει να παράγεται μετά τις 30 ώρες, ενώ στην καλλιέργεια των 80 g/L, ύστερα από 25 ώρες περίπου. Αναφορικά με την κυτταρική αύξηση, οι μέγιστες τιμές είναι 2.2 και 3.2 g/L στις αρχικές συγκεντρώσεις των 55 και 80 g/L αντίστοιχα.

III.3 Αύξηση του στελέχους *Enterobacter* sp. FMCC-208 στην απόβλητη μελάσα σε υγρές καλλιέργειες σε φιάλες Duran για την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης

Όπως αναφέραμε και στην εισαγωγή, η απόβλητη μελάσα αποτελείται από 50% σακχαρόζη και το υπόλοιπο 50% είναι κυρίως γλυκόζη και φρουκτόζη. Δεδομένου των θετικών

αποτελεσμάτων που είχαμε κατά την καλλιέργεια του μικροοργανισμού *Enterobacter* sp. FMCC-208 στα σακχαρούχα υποστρώματα κρίθηκε σκόπιμο να καλλιεργηθεί το εν λόγω στέλεχος σε υγρό θρεπτικό μέσο με πηγή άνθρακα την ακάθαρτη μελάσα (blackstrap molasses) για την μελέτη της αύξησης του και την επίδραση της συγκέντρωσης του υποστρώματος στην παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης. Οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε φιάλες Duran 1-L (Batch-Duran Cultures) με ενεργό όγκο 0.8 mL σε θερμοκρασία $T=30\text{ }^{\circ}\text{C}$ και το pH διορθωνόταν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης για να έχει τιμή 6-7.

Το στέλεχος *Enterobacter* sp. FMCC-208 καλλιεργήθηκε σε υγρό θρεπτικό μέσο στη μελάσα με αρχική συγκέντρωση 20, 35 και 65 g/L στις 180 rpm και μελετήθηκε η επίδραση της προς παραγωγή βιομάζας και μεταβολικών προϊόντων. Στον Πίνακα III.3-1 παρουσιάζεται η επίδραση της συγκέντρωσης του υποστρώματος στην αύξηση του στελέχους.

Πίνακας III.3-1: Επίδραση της συγκέντρωσης της μελάσας στην παραγωγή της 2,3-BD και των άλλων μεταβολικών προϊόντων κατά την αύξηση του στελέχους *Enterobacter* sp. FMCC-208 σε υγρές καλλιέργειες.

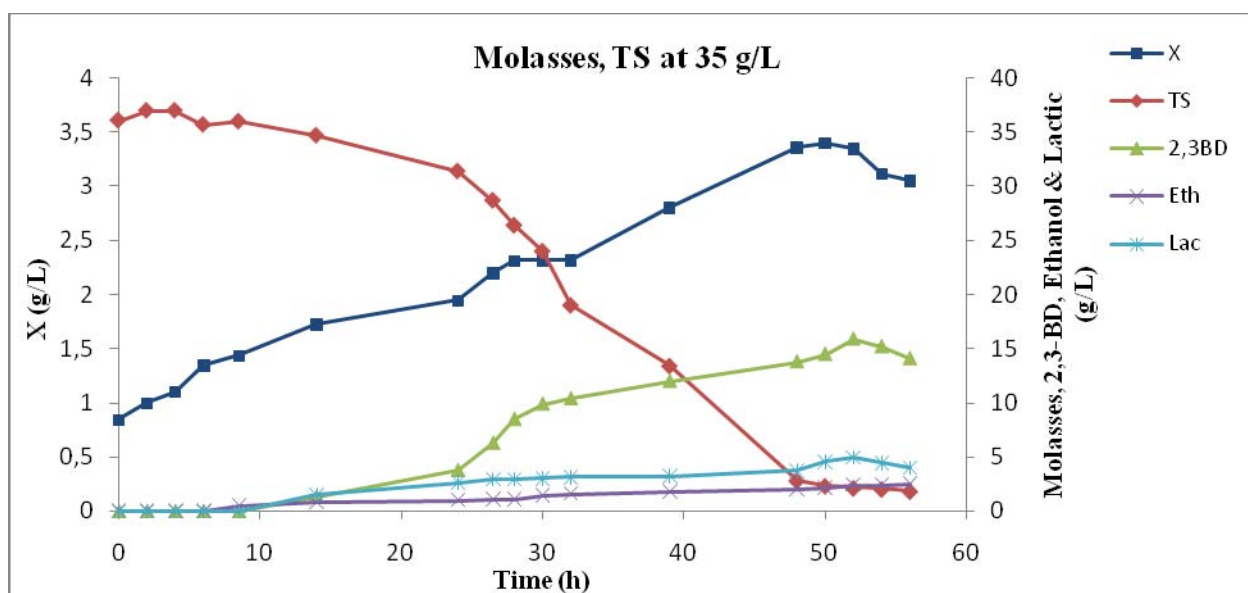
TS_{in} (g/L)	TS_f (g/L)	Time (h)	X_{max} (g/L)	2,3-BD_{max} (g/L)	Y_{2,3-BD} (g/g)	Eth (g/L)	Y_{Eth} (g/g)	Lac (g/L)	Y_{Lac} (g/g)
20	1.9	24	1.4	8.2	0.49	2.0	0.11	1.9	0.11
35	1.8	56	3.5	15.9	0.46	2.5	0.07	4.9	0.14
65	2.5	51	4.1	25.0	0.42	4.0	0.06	9.0	0.14

TS_{in}: η αρχική συγκέντρωση ολικών σακχάρων (g/L), **TS_f:** η τελική συγκέντρωση ολικών σακχάρων (g/L), **Time:** η διάρκεια ζύμωσης (h), **X_{max}:** η μέγιστη βιομάζα (g/L), **2,3-BD:** η συγκέντρωση της 2,3-βουτανοδιόλης (g/L), **Y_{2,3BD}:** ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης προς καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g), **Eth:** η συγκέντρωση της αιθανόλης (g/L), **Y_{Eth}:** ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής αιθανόλης προς καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g), **Lac:** η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος (g/L), **Y_{Lac}:** ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής γαλακτικού οξέος προς καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g).

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχείς καλλιέργειες σε φιάλες Duran 1-L, πληρωμένες κατά τα 4/5, υπό αναερόβιες συνθήκες, αρχική τιμή $\text{pH}=6.5\pm 0.2$ και θερμοκρασία $30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν και οι παρουσιαζόμενες τιμές είναι ο μέσος όρος 2 επαναλήψεων.

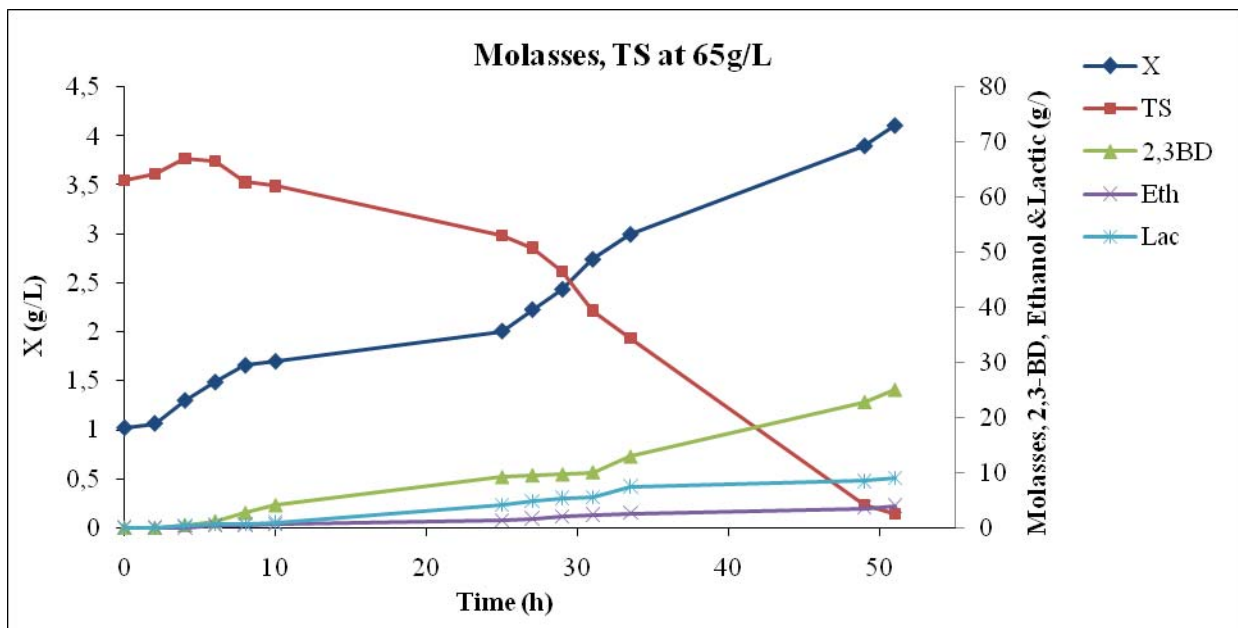
Με βάση τα αποτελέσματα του πίνακα III.3-1 είναι εμφανές πως και στις τρεις καλλιέργειες η ποσότητα της μελάσας αφομοιώνεται σχεδόν όλη (περίπου 2 g/L μένουν ακατανάλωτα). Επίσης παρατηρούμε πως τόσο η βιομάζα όσο και η 2,3-βουτανοδιόλη και τα λοιπά προϊόντα αυξάνονται με την αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης. Έτσι, η μέγιστη παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης ήταν 25 g/L όπου και επιτεύχθηκε στην καλλιέργεια των 65 g/L, που αντιστοιχεί σε συντελεστή απόδοσης 0.42 g/g. Παράλληλα, οι παραχθείσες ποσότητες της αιθανόλης και του γαλακτικού οξέος ήταν 4 και 9 g/L αντίστοιχα και η κυτταρική αύξηση εμφάνισε μέγιστη τιμή ίση με 4.1 g/L. Στη συνέχεια δίνονται οι κινητικές των καλλιεργειών με αρχική συγκέντρωση 35 και 65g/L στα αντίστοιχα Γραφήματα III.3-1 και III.3-2.



Γράφημα III.3-1: Κινητική της παραγωγής βιομάζας (X), της κατανάλωσης συνολικών σακχάρων (TS) και της παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης (2,3-BD), και λοιπών προϊόντων (Eth, Lac) σε υγρή καλλιέργεια με μοναδική πηγή άνθρακα τη μελάσα με συγκέντρωση 35 g/L υπό ανάδευση 180rpm.

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχείς καλλιέργειες σε φιάλες Duran 1-L, πληρωμένες κατά τα 4/5, υπό αναερόβιες συνθήκες, αρχική τιμή pH=6.5±0.2 και θερμοκρασία 30 °C.

Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν και οι παρουσιαζόμενες τιμές είναι ο μέσος όρος 2 επαναλήψεων.



Γράφημα III.3-1: Κινητική της παραγωγής βιομάζας (X), της κατανάλωσης ολικών σακχάρων (TS) και της παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης (2,3-BD), και λοιπών προϊόντων (Eth, Lac) σε υγρή καλλιέργεια με μοναδική πηγή άνθρακα τη μελάσα με συγκέντρωση 65g/L υπό ανάδευση 180rpm.

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχείς καλλιέργειες σε φιάλες Duran 1-L, πληρωμένες κατά τα 4/5, υπό αναερόβιες συνθήκες, αρχική τιμή pH=6.5±0.2 και θερμοκρασία 30 °C.

Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν και οι παρουσιαζόμενες τιμές είναι ο μέσος όρος 2 επαναλήψεων.

Από τα δεδομένα του Γραφήματος III.3-1 και III.3-2 προκύπτει ότι η κατανάλωση του υποστρώματος ξεκινάει λίγες ώρες μετά τον εμβολιασμό και αφομοιώνεται σχεδόν όλη η ποσότητα των ευρισκομένων στο περιβάλλον της αύξησης σακχάρων μέσα σε 53 ώρες περίπου. Η παραγωγή του κύριου μεταβολικού προϊόντος ξεκινά μετά τις 10 ώρες και η μέγιστη παραγωγή της λαμβάνει τιμή 15.9 g/L και 25 g/L στις καλλιέργειες με αρχική συγκέντρωση 35 και 65 g/L αντίστοιχα. Η παραγωγή της αιθανόλης και του γαλακτικού οξέος ξεκινά μαζί με την 2,3-βουτανοδιόλη και λαμβάνει τιμή 4 και 9 g/L αντίστοιχα στην καλλιέργεια των 65 g/L. Επίσης, παρατηρείται ικανοποιητική κυτταρική αύξηση με μέγιστες τιμές 3.5 και 4.1 g/L στις ζυμώσεις των 35 και 65 g/L αντίστοιχα.

III.4 Αύξηση του στελέχους *Enterobacter* sp. FMCC-208 σε βιοαντιδραστήρα με μοναδική πηγή άνθρακα τη μελάσα

Το επόμενο μέρος της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η καλλιέργεια του μικροοργανισμού *Enterobacter* sp. FMCC-208 και η πραγματοποίηση κινητικών σε βιοαντιδραστήρα προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αύξηση του υπό όσο το δυνατόν πιο ελεγχόμενες συνθήκες ώστε να μεγιστοποιηθεί η παραγωγή της 2,3-βουτανιοδιόλης. Για την επίτευξη αναερόβιων συνθηκών, εφαρμόστηκε εμφύσηση καθαρού αζώτου μετά την αποστείρωση και πριν τον εμβολιασμό ενώ διερευνήθηκε η επίδραση του μη ελεγχόμενου pH.

III.4.1 Αύξηση του στελέχους *Enterobacter* sp. FMCC-208 σε κλειστή καλλιέργεια (batch culture) στη μελάσα

Το στέλεχος *Enterobacter* sp. καλλιεργήθηκε σε βιοαντιδραστήρα 1-L (New Brunswick Scientific, USA) με ενεργό όγκο 0.8 L και διερευνήθηκε η επίδραση του μη ελεγχόμενου pH στο εύρος 6.0-7.0 στην παραγωγή της 2,3-βουτανιοδιόλης. Η πηγή άνθρακα που χρησιμοποιήθηκε ήταν η μελάσα σε συγκέντρωση 20 g/L. Η θερμοκρασία των ζυμώσεων ήταν σταθερή με τιμή 30°C και ο ρυθμός ανάδευσης ήταν 150 rpm.

Στον Πίνακα III.4.1-1 δίνονται συνοπτικά το αρχικό και τελικό pH, οι αρχικές και τελικές συγκεντρώσεις της βιομάζας, της μελάσας, της 2,3-βουτανιοδιόλης, της αιθανόλης και του γαλακτικού οξέος καθώς και ο συντελεστής απόδοσης και η παραγωγικότητα της 2,3-βουτανιοδιόλης κατά την έναρξη (εμβολιασμός) και το πέρας της ζύμωσης αντίστοιχα.

Πίνακας III.4.1-1: Συγκεντρώσεις βιομάζας, μελάσας (X), 2,3-βουτανιοδιόλης (2,3-BD), αιθανόλης(Eth) και γαλακτικού οξέος (Lac) κατά την αύξηση του στελέχους *Enterobacter* sp. FMCC-208 στη μελάσα με αρχική συγκέντρωση 20 g/L με ελεγχόμενο και μη ελεγχόμενο pH. Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα 1-L, με ενεργό όγκο 0.8 L, υπό αναερόβιες συνθήκες και θερμοκρασία 30 °C. Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν και οι παρουσιαζόμενες τιμές είναι ο μέσος όρος 2 επαναλήψεων

T (h)	pH	X (g/L)	TS (g/L)	2,3-BD (g/L)	Y _{BD} (g/g)	P _{BD} (g/L/h)	Eth (g/L)	Lac (g/L)
0	6.40	0.3	21.3	0.0	-	-	0.0	0.0
16	6.02	2.1	1.1	9.3	0.45	0.58	1.9	1.1

Καλλιέργεια στελέχους *Enterobacter* sp. FMCC-208 σε βιοαντιδραστήρα με συγκέντρωση μελάσας 20 g/L σε ελεγχόμενο pH

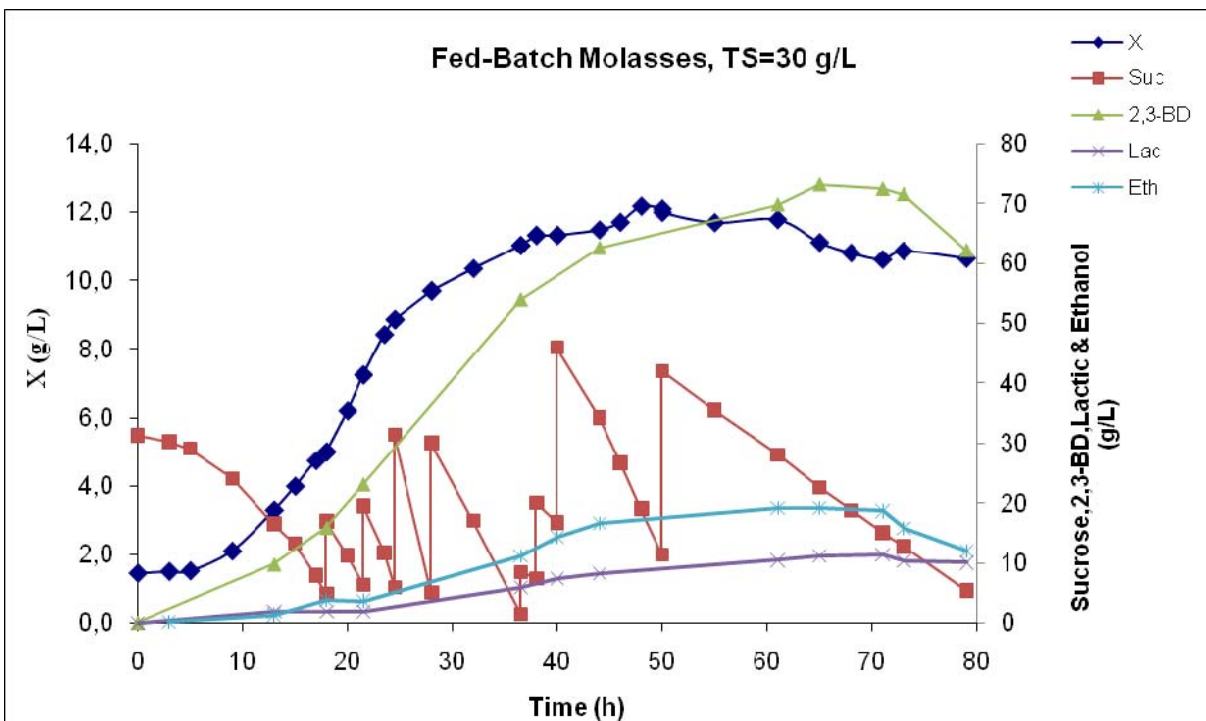
T (h)	pH	X (g/L)	TS (g/L)	2,3-BD (g/L)	Y _{BD} (g/g)	P _{BD} (g/L/h)	Eth (g/L)	Lac (g/L)
0	7.00	0.5	20.0	0.0	-	-	0.0	0.0
16	6.30	2.1	0.2	9.1	0.45	0.56	2.1	0.7

Καλλιέργεια στελέχους *Enterobacter sp.* FMCC-208 σε βιοαντιδραστήρα με συγκέντρωση μελάσας 20 g/L σε μη ελεγχόμενο pH

Από τα δεδομένα του Πίνακα III.4.1-1 διαπιστώνουμε ότι ο μικροοργανισμός και στις δυο καλλιέργειες κατανάλωσε πλήρως το υπόστρωμα και σε χρονικό διάστημα 16 ωρών. Επίσης εμφάνισε κυτταρική αύξηση με μέγιστη τιμή τα 2.1 g/L. Οι δύο ζυμώσεις ξεκινούν με διαφορετική αρχική τιμή pH αλλά η τελική του τιμή δεν είναι μικρότερη από 6. Φαίνεται πως το ιδανικό pH για το στέλεχος *Enterobacter sp.* είναι 6.0-6.3, δηλαδή η παραγωγή της 2,3-βουτανودیολης ευνοείται σε ελαφρώς όξινες συνθήκες. Οι μέγιστες συγκεντρώσεις της 2,3-βουτανودیολης αλλά και των οργανικών οξέων έχουν περίπου τις ίδιες τιμές. Πιο συγκεκριμένα, στην καλλιέργεια με ελεγχόμενο pH, η 2,3-βουτανοδιόλη έλαβε τιμή 9.3 g/L με συντελεστή απόδοσης 0.45 g/g και παραγωγικότητα 0.58 g/L/h, η αιθανόλη ήταν 1.9 g/L και το γαλακτικό οξύ 1.1 g/L. Παρόμοια, στην καλλιέργεια με μη ελεγχόμενο pH, η 2,3-βουτανοδιόλη έφτασε τα 9.1 g/L (με συντελεστή απόδοσης 0.45 g/g και παραγωγικότητα 0.56 g/L/h), η αιθανόλη τα 2.1 g/L και τέλος το γαλακτικό οξύ τα 0.7 g/L. Συμπεραίνουμε πως το εύρος του pH από 6.0-6.5 είναι ιδανικό για την ανάπτυξη του στελέχους και την παραγωγή των επιθυμητών προϊόντων.

III.4.2 Αύξηση του στελέχους *Enterobacter sp.* FMCC-208 σε ημισυνεχής τροφοδοτούμενη καλλιέργεια (fed-batch culture) στη μελάσα

Τα παραπάνω πειράματα έδωσαν αρκετά καλά αποτελέσματα και για το λόγο αυτό κρίθηκε σκόπιμο η διεξαγωγή αύξησης του εν λόγω στελέχους σε ημι-συνεχές σύστημα καλλιέργειας. Έτσι, το στέλεχος *Enterobacter sp.* FMCC-208 καλλιεργήθηκε σε βιοαντιδραστήρα 3-L (New Brunswick Scientific, USA) με ενεργό όγκο 1.5 L με υλικό εκκίνησης τη μελάσα όπου η αρχική συγκέντρωση ήταν 30 g/L. Μετά την μερική κατανάλωση της μελάσας (ακατανάλωτο υπόστρωμα 5-10 g/L), γινόταν προσθήκη πυκνού διαλύματος εμπορικής σακχαρόζης υπό ασηπτικές συνθήκες ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Το pH ήταν ελεγχόμενο, σε τιμή 6.0-6.3 και αυτό το πετυχαίναμε με προσθήκη καυστικού νατρίου NaOH 5M. Στο Γράφημα III.4.2-1 παρουσιάζεται η κινητική αύξησης του βακτηρίου *Enterobacter sp.* σε ημι-συνεχή καλλιέργεια με αρχική συγκέντρωση 30 g/L μελάσας.

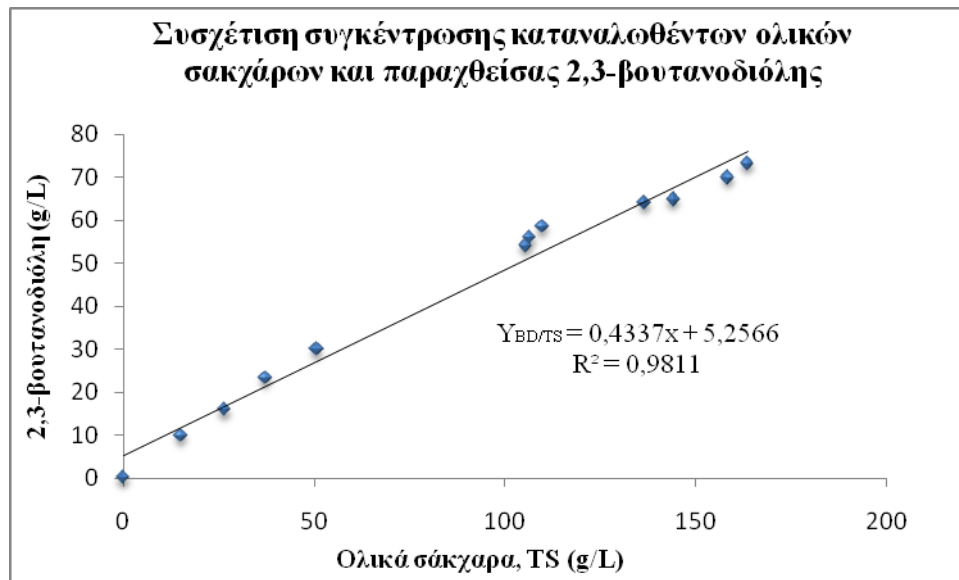


Γράφημα III.4.2-1: Κινητική αύξησης της βιομάζας (X), κατανάλωσης ολικών σακχάρων (TS) και παραγωγής της 2,3-βουτανοδιόλης (2,3-BD), αιθανόλης (Eth) και γαλακτικού οξέος (Lac) κατά την ημισυνεχή καλλιέργεια του βακτηρίου *Enterobacter* sp σε βιοαντιδραστήρα 3L, με ενεργό όγκο 1.5 L σε θερμοκρασία 30 °C και υπό ανάδευση 150rpm.

Συνθήκες καλλιέργειας: ημι-συνεχής καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα 3-L, με ενεργό όγκο 1.5 L, υπό αναερόβιες συνθήκες, αρχική τιμή pH=7.0±0.2 και θερμοκρασία 30 °C.

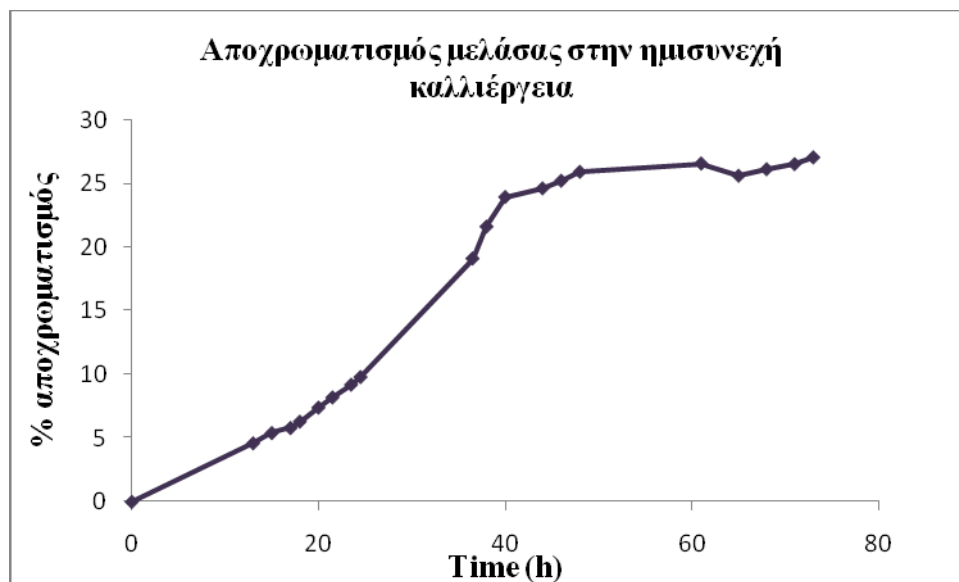
Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν και οι παρουσιαζόμενες τιμές είναι ο μέσος όρος 2 επαναλήψεων.

Από τα δεδομένα του Γραφήματος III.4.2-1 παρατηρούμε πως κατά τις πρώτες ώρες της ζύμωσης ο ρυθμός κατανάλωσης της μελάσας αυξάνεται καθώς προσθέτουμε πυκνό διάλυμα μελάσας και φτάνει μέχρι και τα 2.8 g/L/h. Μετά τις 50 ώρες αρχίζει και μειώνεται με ρυθμό κατανάλωσης περίπου 1.2 g/L/h. Η ζύμωση ολοκληρώνεται στις 73 ώρες όπου ο μικροοργανισμός έχει καταναλώσει συνολικά 180.7 g/L μελάσας, αφήνοντας ακατανάλωτα 12.8 g/L. Η μέγιστη παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης παρατηρείται στις 65 ώρες με τιμή 73.2 g/L και συντελεστή απόδοσης 0.44 g/g (Γράφημα III.4.2-2). Επίσης σε αυτό το χρονικό σημείο, η αιθανόλη είχε μέγιστη τιμή 19.2 g/L και το γαλακτικόξύ 11.3 g/L. Τέλος, υπήρξε ικανοποιητική κυτταρική αύξηση με μέγιστη τιμή 4.7 g/L στις 50 ώρες.



Γράφημα III.4.2-2: Συσχέτιση συγκέντρωσης καταναλωθέντων ολικών σακχάρων (TS) και παραχθείσας 2,3-βουτανολιόλης (2,3-BD, g/L) κατά την αύξηση του στελέχους *Enterobacter* sp. FMCC-208 σε ημι-συνεχή καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα 3-L, υπό αναερόβιες συνθήκες.

Μετά το τέλος της ζύμωσης πραγματοποιήθηκε και αποχρωματισμός του θρεπτικού μέσου, ο οποίος φαίνεται στο Γράφημα III.4.2-3. Ο μέγιστος αποχρωματισμός που παρατηρήθηκε ήταν 27% στις 73 ώρες. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει την ικανότητα διάσπασης των μελανοϊδινών και των άλλων χρωστικών από το στέλεχος *Enterobacter* sp. FMCC-208.



Γράφημα III.4.2-3: Αποχρωματισμός μελάσας στην ημισυνεχή καλλιέργεια στον 3-L βιοαντιδραστήρα.

IV. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα απόβλητα επεξεργασίας τροφίμων θεωρούνται εδώ και πολύ καιρό ένα μεγάλο πρόβλημα λόγω των επιπτώσεων τους κατά τη διάθεση τους στο περιβάλλον. Παρόλα αυτά όμως, δύναται να αποτελούν πηγή πολύτιμων θρεπτικών συστατικών (Schieber, Stintzing, & Carle, 2001; Sonja, Canadanovic Brunet, & Cetkovic, 2009) με μεγάλες προοπτικές αξιοποίησης (Parfitt, Barthel, & Macaughton, 2010). Οι προοπτικές αυτές αποσκοπούν στην ανάκτηση, ανακύκλωση και βιωσιμότητα των συστατικών των αποβλήτων και των παραπροϊόντων σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας. Η βιοτεχνολογία προσφέρει πολλούς εναλλακτικούς τρόπους αξιοποίησης των παραπροϊόντων, οι οποίοι είναι γενικώς ιδιαιτέρως φιλικόι στο περιβάλλον, εμφανίζοντας επίσης μεγάλη εκλεκτική εξειδίκευση. Πολλές βιοτεχνολογικές διεργασίες έχουν αναπτυχθεί, με σπουδαιότερες τις μικροβιακές ζυμώσεις, για την αξιοποίησή των παραπροϊόντων, αφού αυτά δύνανται να αντικαταστήσουν τα καθαρά σάκχαρα ως πρώτη ύλη στις μικροβιακές ζυμώσεις, συμβάλλοντας τα μέγιστα στη μείωση του κόστους των βιοδιεργασιών. Γίνεται κατανοητό, συνεπώς, ότι η χρήση των γεωργο-βιομηχανικών προϊόντων και παραπροϊόντων ως υποστρώματα για την παραγωγή μικροβιακών προϊόντων προστιθέμενης αξίας παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον λόγω της αλματώδους αύξησης της γεωργο-βιομηχανικής παραγωγής και διότι τα διάφορα παραπροϊόντα αυτά παράγονται σε πολύ μεγάλες ποσότητες, με τη διαχείρισή τους να αποτελεί δυσεπίλυτο (ή εν πολλοίς άλυτο) πρόβλημα για τη βιομηχανία. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η απαγωγή αποβλήτων της Βιομηχανίας Τροφίμων (πχ απόβλητα αρτοποιίας, απόβλητες ύλες κτλ) που έχουν υψηλή συγκέντρωση σακχάρων επιβαρύνουν οικονομικά τη βιομηχανία (0.1-0.7 €/kg αποβλήτων) με αποτέλεσμα να πρέπει να παρθούν κατάλληλα μέτρα για την μετέπειτα επεξεργασία τους.

Η 2,3-βουτανοδιόλη αποτελεί μια χημική ουσία προστιθέμενης αξίας, που παράγεται ετησίως σε μεγάλες ποσότητες (bulk chemical) και δύναται να χρησιμοποιηθεί είτε αυτούσια είτε μέσω των παραγώγων της από τις βιομηχανίες καυσίμων, πλαστικών και τροφίμων. Η μεγάλη πληθώρα εφαρμογών της 2,3-βουτανοδιόλης βρίσκουν εφαρμογή τόσο στη χημική βιομηχανία όσο στη βιομηχανία των τροφίμων. Το ενδιαφέρον λοιπόν για τις βιοτεχνολογικές διεργασίες εστιάζεται στη χρήση υποστρωμάτων χαμηλής αξίας, που θα μειώσει το κόστος παραγωγής, καθώς και στην εξεύρεση νέων μη-παθογόνων στελεχών. Κατά συνέπεια, η διαθεσιμότητα μιας φθηνής πηγής άνθρακα είναι ουσιαστική για την ανάπτυξη μιας οικονομικά συμφέρουσας μικροβιακής ζύμωσης. Ιδανική λύση για την βιομετατροπή αυτή αποτελούν τα παραπροϊόντα πλούσια σε σάκχαρα και τα απόβλητα όπως η μελάσα. Η παραγωγή της 2,3-

βουτανοδιόλης από λιγνοκυτταρινούχα απόβλητα θεωρείται ως εναλλακτική λύση στη μετατροπή των υποστρωμάτων βιομάζας σε υγρά καύσιμα και σε πρώτες ύλες χημικής προέλευσης. Το κυριότερο υπόστρωμα που έχει χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή της είναι η γλυκόζη ενώ έχουν μελετηθεί και παραπροϊόντα και απόβλητα από τις βιομηχανίες τροφίμων, που είναι πλούσια σε σάκχαρα, όπως υδρολύματα αμύλου, η μελάσα, ο ορός γάλακτος, ακόμα και μέρος του φυτού αγκινάρα της Ιερουσαλήμ που είναι πλούσιο σε ινουλίνη και σουκρόζη (Syu, 2001).

Στην παρούσα πτυχιακή μελέτη 6 βακτηριακά στελέχη της οικογένειας Enterobacteriaceae (το στέλεχος *Citrobacter farmeri* FMCC-7, το στέλεχος *farmeri* FMCC-5, το στέλεχος *freudii* FMCC-8, το στέλεχος *Enterobacter aerogenes* FMCC-9, το στέλεχος *Enterobacter* sp. FMCC-208 και το στέλεχος *Klebsiella oxytoca* FMCC-197) ερευνήθηκαν για την ικανότητα τους να μεταβολίζουν την εμπορική γλυκόζη υπό αναερόβιες συνθήκες προς παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης. Τα στελέχη *farmeri* FMCC-7, *farmeri* FMCC-5 και *freudii* FMCC-8 άφησαν ακατανάλωτα 3-8 g/L εμπορικής γλυκόζης και ο μεταβολισμός τους στράφηκε προς παραγωγή οργανικών οξέων και κυρίως γαλακτικού και οξικού οξέος. Αντιθέτως, τα στελέχη *aerogenes* FMCC-9, *Enterobacter* sp. FMCC-208 και *Klebsiella oxytoca* FMCC-197 αφομοίωσαν πλήρως το υπόστρωμα και παρήγαγαν ικανοποιητική ποσότητα 2,3-βουτανοδιόλης. Παρόλα αυτά, το στέλεχος *Enterobacter* sp. FMCC-208 είχε τον μεγαλύτερο συντελεστή απόδοσης και επιλέχτηκε για τη συνέχεια της πειραματικής διαδικασίας. Το εν λόγω στέλεχος (όπως και τα υπόλοιπα) ανήκει στη συλλογή του εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και απομονώθηκε από το φλοιό και τη σάρκα ώριμων καρπών σταφυλής προσβεβλημένων από τον μύκητα *Botrytis* sp.. Ο μικροοργανισμός παρουσίασε ικανοποιητική αύξηση και παραγωγή τόσο της βιομάζας όσο και των μεταβολικών προϊόντων και οι μέγιστες τιμές τους δίνονται στον Πίνακα IV-1 και IV-2.

Πίνακας IV-1: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της παρούσας μελέτης σε φιάλες Duran

Ρυθμός ανάδευσης (rpm)	Είδος καλλιέργειας	T (h)	S _{in} (g/L)	S _f (g/L)	X _{max} (g/L)	2,3-BD (g/L)	Y _{BD} (g/g)	Eth (g/L)	Y _{Eth} (g/g)	Lac (g/L)	Y _{Lac} (g/g)
Εμπορική γλυκόζη											
80	Ασυνεχής	48	40	1.5	2.1	13.4	0.34	3.5	0.08	1.4	0.03
180	Ασυνεχής	48	40	1.0	2.1	13.7	0.35	3.6	0.09	1.5	0.03
80	Ασυνεχής	48	60	3.0	2.2	19.5	0.35	8.6	0.15	2.7	0.04
180	Ασυνεχής	48	60	2.0	2.7	21.6	0.37	8.0	0.13	5.1	0.08
80	Ασυνεχής	78	90	14.9	2.2	21.9	0.29	3.7	0.05	2.3	0.03
180	Ασυνεχής	48	90	4.5	2.2	26.5	0.33	10.3	0.12	9.0	0.11
Εμπορική σακχαρόζη											
180	Ασυνεχής	24	20	1.2	1.5	7.9	0.43	2.7	0.14	1.1	0.05
180	Ασυνεχής	54	35	0.0	2.0	14.6	0.42	4.7	0.13	1.5	0.04
180	Ασυνεχής	54	55	4.0	2.2	19.7	0.40	6.8	0.13	3.0	0.05
180	Ασυνεχής	51	80	2.4	3.2	29.6	0.40	10.0	0.13	8.0	0.11
Μελάσα											
180	Ασυνεχής	24	20	1.9	1.4	8.2	0.49	2.0	0.11	1.9	0.11
180	Ασυνεχής	56	35	1.8	3.5	15.9	0.46	2.5	0.07	4.9	0.14
180	Ασυνεχής	51	65	2.5	4.1	25.0	0.42	4.0	0.06	9.0	0.14

Πίνακας IV-2: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της παρούσας μελέτης σε βιοαντιδραστήρα

Μελάσα										
Συνθήκες ζύμωσης	Είδος καλλιέργειας	T (h)	TS _c (g/L)	2,3-BD (g/L)	Y _{BD} (g/g)	Eth (g/L)	Y _{Eth} (g/g)	Lac (g/L)	Y _{Lac} (g/g)	
Controlled pH	Ασυνεχής	16	18.0	9.3	0.45	1.9	0.10	1.1	0.06	
Uncontrolled pH	Ασυνεχής	16	18.0	9.1	0.45	2.1	0.11	0.7	0.03	
Controlled pH	Ημι-συνεχής	79	~180.0	73.2	0.44	19.2	0.11	11.3	0.06	

TS_c (g/L): καταναλωθέντα ολικά σάκχαρα

Συνθήκες καλλιέργειας: α) Οι ασυνεχείς καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε βιοαντιδραστήρα 1-L, με ενεργό όγκο 0.8 L

β) Η ημισυνεχής καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε βιοαντιδραστήρα 3-L, με ενεργό όγκο 1.5 L

Το πρώτο μέρος της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση του ρυθμού ανάδευσης στην ανάπτυξη του στελέχους *Enterobacter* sp. και η επίδραση της συγκέντρωσης της εμπορικής

γλυκόζης στην παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης. Η ταχύτητα ανάδευσης σχετίζεται άμεσα με τη διαθεσιμότητα του οξυγόνου, δεδομένου ότι μπορεί να αυξήσει την απόδοση της ζύμωσης με τη συνεχή έκθεση νέου υποστρώματος στην καλλιέργεια και τη διάδοση των μεταβολικών προϊόντων σε όλο τον όγκο του μέσου (Long and Patrick, 1963; Garg and Jain, 1995). Ως εκ τούτου, αυξάνεται και η απόδοση της 2,3-βουτανοδιόλης που είναι και το ζητούμενο. Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, η αύξηση του ρυθμού ανάδευσης από 0 rpm σε 220 rpm, αύξησε την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης έως και 5 φορές σε καλλιέργειες που πραγματοποιήθηκαν από τα στελέχη *E. aerogenes* και *K. pneumoniae* σε υπόστρωμα γλυκόζης. Οι ρυθμοί ανάδευσης που επιλέχθηκαν στην πειραματική αυτή διαδικασία ήταν των 80 ± 5 rpm και των 180 ± 5 rpm.

Συγκρίνοντας την εκάστοτε αρχική συγκέντρωση στους 2 ρυθμούς ανάδευσης παρατηρούμε πως η συγκέντρωση της 2,3-βουτανοδιόλης (και κατ'επέκταση ο συντελεστής απόδοσης) είναι μεγαλύτερη στον υψηλότερο ρυθμό ανάδευσης. Έτσι, στην καλλιέργεια με αρχική συγκέντρωση 40 g/L, η συγκέντρωση της διόλης έλαβε τιμή 13.7 g/L με συντελεστή απόδοσης 0.35 g/g, στην καλλιέργεια των 60 g/L η 2,3-βουτανοδιόλη έφτασε τα 21.6 g/L με συντελεστή απόδοσης 0.37 g/g και τέλος όταν η αρχική συγκέντρωση γλυκόζης ήταν 90 g/L, η 2,3-βουτανοδιόλη που παράχθηκε ήταν 26.5 g/L με απόδοση 0.33 g/g, με τον μέγιστο θεωρητικό συντελεστή απόδοσης να είναι 0.50 g/g. Παράλληλα όμως, εξετάστηκε και η επίδραση της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Παρατηρούμε πως αύξηση της συγκέντρωσης έως και τα 60 g/L έχει θετική επίδραση στην παράγωγη της 2,3-βουτανοδιόλης με τον συντελεστή απόδοσης να λαμβάνει τιμή 0.37 g/g. Αντίθετα, σε καλλιέργεια με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 90 g/L, ο συντελεστής απόδοσης μειώνεται κατά 0.05 g/g. Φαίνεται πως η αύξηση του υποστρώματος σε αυτή τη συγκέντρωση αρχίζει να δρα παρεμποδιστικά προς την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης και ο μεταβολισμός στρέφεται προς την παραγωγή αιθανόλης και οργανικών οξέων και ειδικά προς γαλακτικό οξύ.

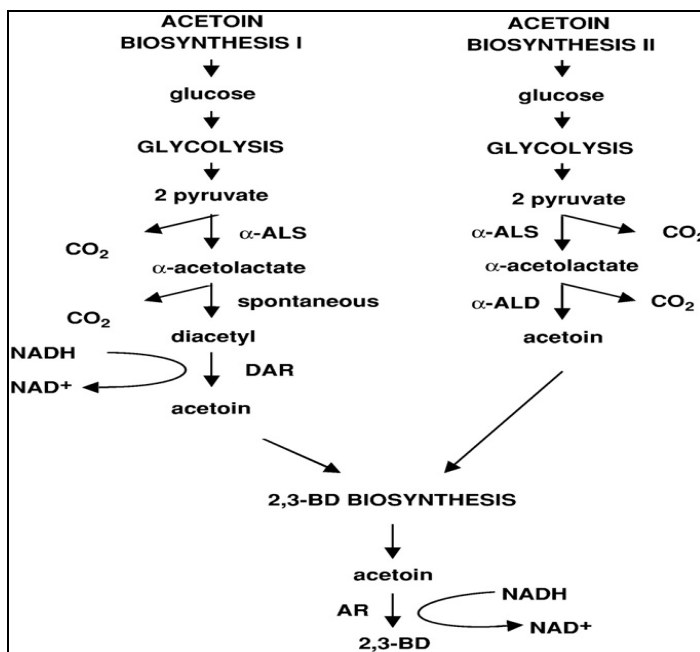
Κατόπιν, ακολούθησε καλλιέργεια του στελέχους σε εμπορική σακχαρόζη. Από τα δεδομένα του Πίνακα IV-1 παρατηρούμε ότι η αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης του υποστρώματος έδρασε θετικά στην παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης. Ακόμη και στην καλλιέργεια των 80 g/L, είχαμε ικανοποιητική παραγωγή του μεταβολικού προϊόντος, χωρίς να μειωθεί ο συντελεστής απόδοσης όπως έγινε στην καλλιέργεια του *Enterobacter* sp. FMCC-208 σε υπόστρωμα γλυκόζης. Ο συντελεστής απόδοσης της 2,3-βουτανοδιόλης κυμάνθηκε και στις 4 καλλιέργειες από 0.40-0.43 g/g, ενώ όπως ειπώθηκε και στα προηγούμενα ο μέγιστος θεωρητικός συντελεστής της ζύμωσης είναι 0.50 g/g. Επιπλέον, η παραγόμενη αιθανόλη αυξανόταν αναλογικά με την εκάστοτε αρχική συγκέντρωση και ο συντελεστής απόδοσης της

ήταν 0.13 g/g σε όλες τις καλλιέργειες. Όσον αφορά το γαλακτικό οξύ, παρατηρείται αύξηση του συντελεστή απόδοσης κατά 0.06 g/g στην καλλιέργεια των 80 g/L σε σχέση με τις υπόλοιπες, χωρίς να επηρεάζεται η παραγωγή του κύριου μεταβολικού προϊόντος.

Δεδομένου των θετικών αποτελεσμάτων που είχαμε κατά την καλλιέργεια του μικροοργανισμού *Enterobacter* sp. FMCC-208 στα σακχαρούχα υποστρώματα και ειδικά στην εμπορική σακχαρόζη, κρίθηκε σκόπιμο σε επόμενο στάδιο να καλλιεργηθεί το εν λόγω στέλεχος σε υγρό θρεπτικό μέσο με πηγή άνθρακα τη μελάσα. Όπως έχουμε αναφέρει και στην εισαγωγή, η μελάσα, αποτελώντας ένα φτηνό υπόστρωμα, περιέχει μεγάλη ποσότητα σακχάρων (50% σάκχαρα επί ξηρού, κυρίως σακχαρόζη και σημαντικές ποσότητες γλυκόζης και φρουκτόζης) καθώς και άλλες νιτρογενείς ουσίες, βιταμίνες και ιχνοστοιχεία με αποτέλεσμα να αποτελεί ιδανικό υπόστρωμα στις ζυμωτικές διεργασίες. Όπως φαίνεται και στον Πίνακα IV-1, η παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης αυξάνεται με την αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης. Ο συντελεστής απόδοσης κυμαίνεται από 0.42-0.49 g/g με μέγιστο θεωρητικό τα 0.50 g/g. Συνεπώς, η σύσταση της μελάσας έπαιξε θετικό ρόλο στην παραγωγή του μεταβολικού προϊόντος και είχαμε καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με τις καλλιέργειες κατά τις οποίες χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα η εμπορική σακχαρόζη και ακόμα καλύτερα όταν χρησιμοποιήθηκε η εμπορική γλυκόζη. Από την άλλη μεριά όμως παρατηρούμε ότι η μελάσα δεν ευνόησε τη σύνθεση της αιθανόλης, ο συντελεστής απόδοσης της οποίας μειώθηκε στο 0.07 g/g (συγκριτικά με το 0.13g/g που παρατηρήθηκε στην εμπορική σακχαρόζη). Σημαντικό είναι να αναφέρουμε ότι ο μεταβολισμός στράφηκε και προς τη σύνθεση του γαλακτικού οξέος, με συντελεστή απόδοσης 0.14g/g. Αναφορικά με την κυτταρική αύξηση, η τελευταία ευνοήθηκε κατά την καλλιέργεια του μικροοργανισμού σε πηγή άνθρακα τα 65 g/L μελάσας, λαμβάνοντας τιμή 4.1 g/L.

Στο τελευταίο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας, μελετήθηκε η αύξηση του μικροοργανισμού σε βιοαντιδραστήρα υπό όσο το δυνατόν πιο ελεγχόμενες συνθήκες (pH και αερισμός). Η πηγή άνθρακα που χρησιμοποιήθηκε ήταν η μελάσα, λόγω των θετικών αποτελεσμάτων που είχαμε στις ασυνεχείς καλλιέργειες σε φιάλες Duran. Ο Πίνακας IV-2 παρουσιάζει τις ασυνεχείς καλλιέργειες με αρχική συγκέντρωση μελάσας 20 g/L και την ημισυνεχή καλλιέργεια που πραγματοποιήθηκε στη συνέχεια. Η παράμετρος που εξετάστηκε στις ασυνεχείς καλλιέργειες ήταν η επίδραση του μη ελεγχόμενου pH. Σύμφωνα με τους Biebl et al. (1998) οι ελαφρώς όξινες συνθήκες βοηθούν την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης λόγω της έκκρισης του ενζύμου συνθάση του α-ακετογαλακτικού, που σχετίζεται με την σύνθεση της 2,3-βουτανοδιόλης (Γράφημα IV-1). Για το στέλεχος *Enterobacter aerogenes* (Converti et al., 2003),

το ιδανικό pH για τη σύνθεση της 2,3-βουτανοδιόλης βρέθηκε να είναι το pH=6. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν πως το ιδανικό pH για την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης ήταν στο εύρος 6.0-6.3. Στην ημι-συνεχή καλλιέργεια το pH ελεγχόταν στο εύρος αυτό και η παραγόμενη 2,3-βουτανοδιόλη έλαβε τιμή 73.2 g/L με συντελεστή απόδοσης 0.44 g/g ενώ καταναλώθηκαν περίπου 180 g/L σακχάρων που υπήρχαν στο υποπροϊόν. Παράλληλα παράχθηκε ικανοποιητική ποσότητα αιθανόλης (19.2 g/L) και γαλακτικού οξέος (11.3 g/L).



Γράφημα IV-1: Δύο εναλλακτικά μεταβολικά μονοπάτια σύνθεσης της 2,3-βουτανοδιόλης από γλυκόζη. α -ALS: συνθάση του α -ακετογαλακτικού, α -ALD: αποκαρβοξυλάση του α -ακετογαλακτικού, DAR: αναγωγή του διακετυλίου, AR: αναγωγή της ακετοΐνης (Celinska & Grajek, 2009)

Με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία, αρκετοί μικροοργανισμοί μπορούν να συνθέσουν τη 2,3-βουτανοδιόλη αλλά λίγοι μπορούν να παράγουν ικανοποιητικές ποσότητες. Σε αυτούς ανήκουν τα γένη *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Bacillus* και *Serratia*. Τα στελέχη με τις ικανοποιητικότερες αποδόσεις ανήκουν στα είδη *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Paenibacillus polymyxa* ενώ τα είδη *E. aerogenes* και *Serratia marcescens* θεωρούνται αρκετά υποσχόμενοι μικροοργανισμοί. Στον Πίνακα IV-3 παρουσιάζονται τα κυριότερα βακτηριακά στελέχη που έχουν μελετηθεί για την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης.

Πίνακας IV-3: Παραγωγή 2,3-βουτανιοδιόλης από βακτηριακά στελέχη σε ποικίλες συνθήκες αύξησης με διαφορετικές πηγές άνθρακα

Μικροοργανισμός	Πηγή άνθρακα	2,3-BD (g/L)	Y _{BD/S} (g/g)	Pr (g/L/h)	Είδος καλλιέργειας	Αναφορά
<i>K. pneumoniae</i> SDM	Γλυκόζη	150.0	0.43	4.21	Ημι-συνεχής	Ma et al. (2009)/ Ji et al. (2011)
<i>K. oxytoca</i> ME-XJ-8 ^a		130.0	0.48	1.63	Ημι-συνεχής	Ji et al. (2010)
<i>K. oxytoca</i> ME-UD-3 ^a		95.5	0.47	1.71	Ασυνεχής	Ji et al. (2009)
<i>K. pneumoniae</i> CICC 10011		92.4	- ^β	2.10	Ημι-συνεχής	Qin et al. (2006)
<i>K. oxytoca</i> ME-XJ-8 ^a		90.7	0.48	1.51	Ασυνεχής	Ji et al. (2010)
<i>K. oxytoca</i> ME-303		39.0	- ^β	- ^β	Ασυνεχής	Ji et al. (2008)
<i>B. amyloliquefaciens</i>		33.0	0.33	- ^β	Ασυνεχής	Alam et al. (1990)/ Ji et al. (2011)
<i>E. aerogenes</i> NCIMB-10102		33.0	0.33	- ^β	Ασυνεχής	Pergo et al. (2000)
<i>E. aerogenes</i> KCTC 2190		15.9	0.31	1.59	Ασυνεχής	Jung et al. (2013)
<i>B. lincheniformis</i>		8.7	0.12	0.47	Ασυνεχής σε φιάλες	Nilegaonkar et al. (1992)
<i>Enterobacter</i> sp. FMCC-208		26.5	0.33	0.55	Ασυνεχής σε φιάλη Duran	Παρούσα μελέτη
<i>K. oxytoca</i> ME-UD-3 ^a	Γλυκόζη/Ξυλόζη	23.2	0.43	-	Ασυνεχής	Ji et al. (2009b)
<i>Serratia marcescens</i> H30 ^a	Σακχαρόζη	139.9	0.41	3.49	Ημι-συνεχής	Zhang et al. (2010)
<i>Enterobacter</i> sp. FMCC-208		29.6	0.40	0.58	Ασυνεχής σε φιάλη Duran	Παρούσα μελέτη
<i>K. oxytoca</i>	Μελάσα	118.0	0.42	2.40	Ανακύκλωση κυττάρων	Afschar et al. (1993)
<i>E. aerogenes</i> DSM 30053		110.0	0.49		Ημι-συνεχής	Zeng & Biebl (1991)
<i>Enterobacter</i> sp. FMCC-208		25.0	0.42	0.49	Ασυνεχής σε φιάλη Duran	Παρούσα μελέτη
<i>Enterobacter</i> sp. FMCC-208		73.2	0.44	1.12	Ημι-συνεχής	Παρούσα μελέτη
<i>K. pneumoniae</i> CICC 10011	Αγκινάρα της Ιερουσαλήμ	84.0	0.32	2.29	Ημι-συνεχής	Sun et al. (2009)
<i>K. pneumoniae</i>		67.4	- ^β	1.18	Ημι-συνεχής	Li et al. (2010)/ Ji et al. (2011)
<i>Paenibacillus polymyxa</i> ZJ-9		36.9	0.50	0.88	Ημι-συνεχής	Gao et al. (2010)/ Ji et al. (2011)
<i>K. oxytoca</i> ACCC10370	Άμυλο αραβόσιτου	35.7	0.50	0.59	Ημι-συνεχής	Cheng et al. (2010)

<i>K. pneumoniae</i> G31	Καθαρή γλυκερόλη	70.0	0.53	0.47	Ημι-συνεχής	Petrov & Petrova (2010)
--------------------------	---------------------	------	------	------	-------------	----------------------------

α: ανασυνδυσμένο στέλεχος

β: δεν δίνονται στοιχεία στην αντίστοιχη δημοσίευση

Με βάση τα στοιχεία του Πίνακα IV-3, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις της 2,3-βουτανοδιόλης κυμαίνονται από 90-150 g/L με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη. Επίσης, αρκετά υψηλή είναι η παραγωγή της σε υπόστρωμα σακχαρόζης από το στέλεχος *Serratia marcescens* H30 καθώς και σε υπόστρωμα μελάσας από τα στελέχη *K. oxytoca* και *E aerogenes* DSM 30053. Χαμηλότερες συγκεντρώσεις παρατηρήθηκαν σε υποστρώματα από τα συστατικά του φυτού αγκινάρα της Ιερουσαλήμ, από το άμυλο του αραβόσιτου και από την καθαρή γλυκερόλη. Όλα τα παραπάνω στελέχη είναι είτε παθογόνα (όπως στελέχη του είδους *Klebsiella pneumoniae*) είτε μεταλλαγμένα είτε και γενετικώς τροποποιημένα (όπως τα στελέχη *Klebsiella oxytoca* ME-XJ-8 και ME-UD-3, *Klebsiella pneumoniae* DSM, *Klebsiella oxytoca* ME-303, *Enterobacter aerogenes* DSM-30053, *Serratia marcescens* H30), ειδικά προσαρμοσμένα στις διαδικασίες της ζύμωσης. Σε βιομηχανική κλίμακα, το κίνητρο για τη βελτίωση των στελεχών είναι κυρίως οικονομικό μιας που τα στελέχη φυσικού τύπου έχουν συνήθως χαμηλότερους ρυθμούς παραγωγής του ζητούμενου μεταβολικού προϊόντος με αποτέλεσμα να είναι οικονομικά ασύμφορα. Τα παθογόνα στελέχη δεν είναι επιθυμητά από τις βιομηχανίες και όταν χρησιμοποιούνται πρέπει να λαμβάνονται τα κατάλληλα μέτρα προστασίας των εργαζομένων. Για το λόγο αυτό, είναι απαραίτητη η διερεύνηση μη παθογόνων μικροοργανισμών, οι οποίοι θα μπορούν να παράγουν στις μέγιστες δυνατές ποσότητες τα επιθυμητά μεταβολικά προϊόντα. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ένα προσφάτως απομονωμένο στέλεχος, δυνητικά παθογόνο και μη γενετικώς τροποποιημένο. Έτσι οι συγκεντρώσεις και οι συντελεστές απόδοσης είναι χαμηλότεροι συγκριτικά με αυτά των τροποποιημένων στελεχών, αλλά σε ικανοποιητικό βαθμό. Αρκετά καλή απόδοση έδωσε η ημι-συνεχής καλλιέργεια με παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης 73.2 g/L και συντελεστή απόδοσης 0.44 g/g.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε ο αποχρωματισμός της μελάσας, ο οποίος έφτασε το ποσοστό του 27% στην ημι-συνεχή καλλιέργεια. Όπως έχει αναφερθεί εκτενώς στο κεφάλαιο της εισαγωγής, η μελάσα περιέχει μεγάλο ποσοστό μελανοϊδίων οι οποίες θεωρούνται περιβαλλοντικοί ρύποι. Ως εκ τούτου η επεξεργασία των αποβλήτων, πλούσιων σε μελανοϊδίνες πριν την διάθεση τους στο περιβάλλον κρίνεται ουσιαστική. Οι Dahiya et al., 2001a αναφέρουν ότι ο μικροοργανισμός *Pseudomonas fluorescense* αποχρωμάτισε απόβλητο μελανοϊδίων σε ποσοστό έως 76% σε μη ασηπτικές συνθήκες και έως 90% σε ασηπτικές συνθήκες. Οι Dahiya et

al., 2001b αναφέρουν 80% αποχρωματισμό από το στέλεχος *Phanerochaete chrysosporium* JAG-40 μετά από ζύμωση 6 ημερών. Οι Kumar & Chandra, 2006 αναφέρουν τον αποχρωματισμό διαλύματος συνθετικών μελανοιδίων σε ποσοστό 1-31% από στελέχη του γένους *Bacillus* sp., ενώ το ποσοστό ανήλθε στο 2-50% όταν χρησιμοποιήθηκε μικτή καλλιέργεια και των τριών στελεχών. Επομένως το ποσοστό του αποχρωματισμού στην παρούσα μελέτη κρίνεται ικανοποιητικό αν ληφθεί υπόψη το γεγονός ότι οι δεδομένες πειραματικές συνθήκες ευνοούσαν την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης και όχι την ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Επιπλέον το ποσοστό του αποχρωματισμού αυξάνεται σταδιακά στην διάρκεια της ζύμωσης. Ενδεχομένως αν η καλλιέργεια είχε μεγαλύτερη χρονική διάρκεια να παρατηρούσαμε μεγαλύτερο ποσοστό αποχρωματισμού.

Στη βιβλιογραφία, γενικά σε ό,τι αφορά τον αποχρωματισμό της μελάσας έχουν μελετηθεί κυρίως στελέχη των βασιδιομυκήτων *Phanerochaete chrysosporium* και *Trametes versicolor* (μύκητες την επονομαζόμενης λευκής σήψης – white rot fungi). Είναι γνωστό ότι μύκητες της εν λόγω ομάδας διαθέτουν ένζυμα σχετιζόμενα με την αποικοδόμηση της λιγνίνης (π χ υπεροξειδάσες του μαγγανίου, υπεροξειδάσες της λιγνίνης, λακκάσες) υπεύθυνα για την διάσπαση των μορίων της λιγνίνης (Αγγελής, 2007). Το σκούρο χρώμα της μελάσας οφείλεται, όπως ήδη αναφέρθηκε, σε μόρια τύπου μελανοιδίων, των οποίων η χημική σύσταση μοιάζει με τις λιγνίνες, ως εκ τούτου τα ανωτέρω ένζυμα είναι υπεύθυνα για τη βιοδιάσπαση των συστατικών αυτών και το συνακόλουθο αποχρωματισμό του αποβλήτου. Παρόλα αυτά, το βακτήριο *Enterobacter* sp. δεν έχει αναφερθεί ως δυνητικός παραγωγός των ανωτέρω ενζύμων, ως εκ τούτου ο αποχρωματισμός των αποβλήτων είναι αρκετά πιο πιθανό να οφείλεται σε προσρόφηση μέρους των μελανοιδίων στην κυτταρική μεμβράνη του βακτηρίου ή/και σε χρησιμοποίηση των συστατικών αυτών ως πηγή άνθρακα από το βακτήριο αυτό. Σε κάθε περίπτωση πάντως, η παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης (και των οργανικών οξέων) συνοδευόμενη με τον ταυτόχρονο μερικό αποχρωματισμό (και, συνεπώς, μερική αποτοξίνωση) του αποβλήτου συνιστά ενδιαφέρον εύρημα, το οποίο χρήζει περαιτέρω μελέτης.

Στην παρούσα μελέτη επιτεύχθηκε η παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης αξιοποιώντας χαμηλού κόστους υποστρώματα (εμπορική γλυκόζη, εμπορική σακχαρόζη και μελάσα). Οι συντελεστές απόδοσης και οι συγκεντρώσεις κρίνονται ικανοποιητικές με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία δεδομένου ότι πρόκειται για δυνητικά παθογόνο, προσφάτως απομονωμένο και μη γενετικώς τροποποιημένο στέλεχος. Προοπτικές για την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης επικεντρώνονται στις συνεχείς καλλιέργειες με στόχο την περαιτέρω παραγωγή των μεταβολικών προϊόντων και στην εξέταση της επίδρασης αερόβιων συνθηκών και την εφαρμογή

του σταθερού pH καθώς αποτελούν παραμέτρους, σημαντικούς για τη σύνθεση της 2,3-βουτανοδιόλης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Αγγελής Γ.** (2007). Μικροβιολογία και Μικροβιακή Τεχνολογία. 1^η έκδοση. Εκδόσεις Σταμούλης Α.Ε., Αθήνα.
2. **Παπανικολάου Σ.:** Αρχές Βιοτεχνολογίας Τροφίμων. Πανεπιστημιακές παραδόσεις ΓΠΑ, Αθήνα
3. **Παπανικολάου Σ.:** Βιομηχανικές Ζυμώσεις. Πανεπιστημιακές παραδόσεις ΓΠΑ, Αθήνα
4. **Παπανικολάου Σ.:** Επεξεργασία Αποβλήτων Βιομηχανιών Τροφίμων. Πανεπιστημιακές παραδόσεις ΓΠΑ, Αθήνα
5. **Adham N.Z.** (2002). Attempts at improving citric acid fermentation by *Aspergillus niger* in beet-molasses medium. *Bioresource Technology*. 84:97–100.
6. **Afschar AS., Vaz Rosell CE, Jonas R, Quesada Chanto A, Schaller K.** (1993). Microbial production and downstream processing of 2,3-butanediol. *Journal of Biotechnology*, 27:317-329.
7. **Alam S, Capit F, Weigand WA, Hong J.** (1990). Kinetics of 2,3-butanediol fermentation by *Bacillus amyloliquefaciens*: effect of initial substrate concentration and aeration. *J Chem Technol Biotechnol*; 47:71–84.
8. **Arvanitoyannis Ioannis S., Kassaveti Aikaterini, Ladas Demetrios** (2008). Food Waste Treatment Methodologies. Academic Press, p 345-410.
9. **Bampidis V.A., Robinson P.H.** (2006). Citrus by-products as ruminant feeds: A review. *Animal Feed Science and Technology* 128:175–217.
10. **Baruah, A.K., Sharma, R.N., Borah, G.C.** (1993). Impact of sugar mill and distillery effluents on water quality of river Gelabil, Assam. *Indian Journal of Environmental Health* 35:288–293.
11. **Barrett EL, Collins EB, Hall BJ, Matoi SH.** (1983). Production of 2,3-butylene glycol from whey by *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter aerogenes*. *J Dairy Sci*; 66:2507–14.
12. **Biebl H, Zeng AP, Menzel K, Deckwer WD.** (1998). Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol and 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. *Appl Microbiol Biotechnol*; 50: 24–9.

13. **Blomqvist K, Nikkola M, Lehtovaara P, Suihko ML, Airaksinen U, Straby KB, et al.** (1993). Characterization of the genes of the 2,3-butanediol operons from *Klebsiella terrigena* and *Enterobacter aerogenes*. *J Bacteriol* 1993;175:1392–404.
14. **Blood Ruth M., Curtis G. D. W.** (1995). Media fot 'total' Enterobacteriaceae, coliforms and *Echerichia coli*. *International Journal of Food Microbiology* 26:93-115.
15. **Celińska E., Grajek W.** (2009). Biotechnological production of 2,3-butanediol—Current state and prospects. *Biotechnology Advances* 27:715–725.
16. **Chandra Ram, Bharagava Ram Naresh, Rai Vibhuti** (2008). Melanoidins as major colourant in sugarcane molasses based distillery effluent and its degradation. *Bioresource Technology* 99:4648–4660.
17. **Chatzifragkou A, Fakas S., Galiotou-Panagiotou M, Komaitis M., Aggelis G., Papanikolaou S.** (2010). Commercial sugars as substrates for lipid accumulation by *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina* fungi. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112:1048-1057.
18. **Chen Chia-Lung, Qi Wei, Wang Jing-Yuan** (2013). Microbial cocktail for bioconversion of green waste to reducing sugars. *Journal of Bioscience and Bioengineering* Volume 115, Issue 1, Pages 82–85.
19. **Cheng KK, Liu Q, Zhang JA, Li JP, Xu JM, Wang GH** (2010). Improved 2,3-butanediol production from corncob acid hydrolysate by fed-batch fermentation using *Klebsiella oxytoca*. *Process Biochemistry*, 45:613-616
20. **Combes Didier and Monsan Pierpe** (1983). Sucrose hydrolysis by invertase. Characterization of products and substrate inhibition. Elsevier Science Publishers B.V., 117:215-22X.
21. **Converti A, Perego P, Del Borghi M.** (2003). Effect of specific oxygen uptake rate on *Enterobacter aerogenes* energetics: carbon and reduction degree balances in batch cultivations. *Biotechnol Bioeng*; 82:370–7.
22. **Curtin L.V.**, (1983). Molasses-general considerations. In: *Molasses in Animal Nutrition*. National Feed Ingredients Association, West Des Moines, IA.
23. **Dahiya, J., Singh, D., Nigam, P.** (2001). Decolorization of molasses wastewater by cells of *Pseudomonas fluorescens* immobilized on porous cellulose carrier. *Bioresource Technology* 78:111–114.
24. **Danner H, Braun R.** (1999). Biotechnology for the production of commodity chemicals from biomass. *Chem Soc Rev*, 28:395–405.

25. **de Mas CD, Jansen NB, Tsao GT.** (1988). Production of optically active 2,3-butanediol by *Bacillus polymyxa*. *Biotechnol Bioeng*; 31:366–77.
26. **da Silva Gervásio Paulo, Mack Matthias , Contiero Jonas** (2009). Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances* 27:30–39.
27. **El-Enshasy H.A., Mohamed N.A., Farid M.A., El-Diwany A.I.** (2008). Improvement of erythromycin production by *Saccharopolyspora erythraea* in molasses based medium through cultivation medium optimization. *Bioresource Technology*. 99:4263–4268.
28. **Esser K., Schmidt U., Stahl U.** (1982). Ethanol and biomass production of wild strains and respiratory deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae* under anaerobic and aerobic conditions. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*. 16:161-164.
29. **Evershed R.P., Bland H.A., Van Bergen P.F., Carter J.F., Horton M.C., Rowley-Conwy P.A.** (1997). Volatile compounds in archaeological plant remains and the Maillard reaction during decay of organic matter. *Science*. 278:432–433.
30. **Fernández F.J., Villasenor J., Infantes D.** (2011). Kinetic and stoichiometric modelling of acidogenic fermentation of glucose and fructose. *Biomass and Bioenergy* 35:3877-3883.
31. **FitzGibbon, F., Singh, D., McMullan, G., Marchant, R.** (1998). The effect of phenolic acids and molasses spentwash concentration on distillery wastewater remediation by fungi. *Process Biochemistry* 33:799–803.
32. **Frazer FR, McCaskey TA.** (1991). Effect of components of acid-hydrolysed hardwood on conversion of D-xylose to 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. *Enzyme Microb Technol*; 13:110–5.
33. **Galanakis Charis M.** (2012). Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends in Food Science & Technology* 26:68-87.
34. **Gao J, Xu H, Li QJ, Feng XH, Li S.** (2010). Optimization of medium for one-step fermentation of inulin extract from Jerusalem artichoke tubers using *Paenibacillus polymyxa* ZJ-9 to produce R,R-2,3-butanediol. *Bioresource Technology*, 101:7087-7093.
35. **Garg S. K. and Jain A.** (1995). Fermentative production of 2,3-butanediol: a review. *Bioresource Technology* 5:03-109.

36. **Gaston M. A.** (1998). Enterobacter: an emerging nosocomial pathogen. *Journal of Hospital Infection* 11,197-208.
37. **Ghosh M., Ganguli A., Tripathi A.K.** (2009). Decolorization of Anaerobically Digested Molasses Spent Wash by *Pseudomonas putida*. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 45:68–73.
38. **Godbole J.,** (2002). Ethanol from cane molasses, Fuel Ethanol Workshop, Honolulu, Hawaii.
39. **Gottshalk G.** (1986). Bacterial metabolism. New York: Springer-Verlag.
40. **Hespell RB.** (1996). Fermentation of xylan, corn fiber, or sugars to acetoin and butanediol by *Bacillus polymyxa* strains. *Curr Microbiol*; 32:291–6.
41. **Ikram-ul H., Ali S., Qadeer M.A., Iqbal J.** (2004). Citric acid production by selected mutants of *Aspergillus niger* from cane molasses. *Bioresource Technology*. 93:125–130.
42. **Jacobus P.H. van Wyk** (2001). Biotechnology and the utilization of biowaste as a resource for bioproduct development. *TRENDS in Biotechnology* Vol.19 No.5.
43. **Ji XJ, Huang H, Du J, Zhu JG, Ren LJ, Hu N, et al.** (2009a). Enhanced 2,3-butanediol production by *Klebsiella oxytoca* using a two-stage agitation speed control strategy. *Bioresource Technology*, 100:3410-3414.
44. **Ji XJ, Huang H, Du J, Zhu JG, Ren LJ, Hu N, et al.** (2009b). Development of an industrial medium for economical 2,3-butanediol production through co-fermentation of glucose and xylose by *Klebsiella oxytoca*. *Bioresource Technology*, 100:5214-5218.
45. **Ji Xiao-Jun, Huang He, Ouyang Ping-Kai** (2011). Microbial 2,3-butanediol production: A state-of-the-art review. *Biotechnology Advances* 29:351–364.
46. **Jung Moo-Young, Park Bu-Soo, Lee Jinwon, Oh Min-Kyu** (2013). Engineered *Enterobacter aerogenes* for efficient utilization of sugarcane molasses in 2,3-butanediol production. *Bioresource Technology* 139:21-27.
47. **Kalavathi D.F., Uma L., Subramanian G.** (2001). Degradation and metabolization of the pigment-melanoidin in distillery effluent by the marine cyanobacterium *Oscillatoria boryana* BDU 92181. *Enzyme Microbiol. Technol.* 29:246–251.
48. **Kamm B, Kamm M.** (2004). Principles of biorefineries. *Appl Microbiol Biotechnol* 64:137–45.
49. **Karadag Dogan, Puhakka Jaakko A.** (2010). Direction of glucose fermentation towards hydrogen or ethanol production through on-line pH control. *International journal of hydrogen energy* 35:10245-10251.

50. **Kim S.B., Hayase F., Kato H.** (1985). Decolourisation and degradation products of melanoidins on ozonolysis. *Agric. Biol. Chem.* 49:785–792.
51. **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.* 77:19-196.
52. **Kovanda Jan, Weinzettel Jan** (2013). The importance of raw material equivalents in economy-wide material flow accounting and its policy dimension. *Environmental science & policy* 29:71–80.
53. **Kumar, P., Chandra, R.** (2006). Decolourisation and detoxification of synthetic molasses melanoidins by individual and mixed cultures of *Bacillus* spp. *Bioresource Technology* 97:2096–2102.
54. **Laufenberg Gunthern, Kunz Benno, Nystroem Marianne** (2003). Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. *Bioresource Technology* Volume 87, Issue 2, April 2003, Pages 167–198.
55. **Li D, Dai JY, Xiu ZL.**(2010). A novel strategy for integrated utilization of Jerusalem artichoke stalk and tuber for production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. *BioresourTechnol* 2010a;101:8342–7.
56. **Liu Y.P., Zheng P., Sun Z.H., Ni Y., Dong J.J., Zhu L.L.** (2008). Economical succinic acid production from cane molasses by *Actinobacillus succinogenes*. *Bioresource Technology.* 99:1736–1742.
57. **Maddox IS.** (1996). Microbial production of 2,3-butanediol. In: Rehm HJ, Reed G, editors. *Biotechnology*, Vol. 6. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH; p. 269–91.
58. **Metsoviti Maria, Paramithiotis Spiros, Drosinos Eleftherios H., Skandamis Panagiotis N., Galiotou-Panayotou Maria and Papanikolaou Seraphim** (2011). Biotechnological valorization of low-cost sugar-based media for bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* E131. *New Biotechnology* 28:600-608.
59. **Migo V., Matsumura M., Rosario E.J., Kataoka H.** (1993). Decolorization of molasses wastewater using an inorganic flocculant. *J. Fermentation Bioeng.*, 75: 438–442.
60. **Miranda P.M., Benito G.G., Cristobal N.S., Nieto C.H.** (1996). Colour elimination from molasses wastewater by *Aspergillus niger*. *Biores.Technol.* 57:229–235.

61. **Mohana Sarayu, Acharya Bhavik K., Madamwar Datta** (2009). Distillery spent wash: Treatment technologies and potential applications. *Journal of Hazardous Materials* 163:12–25.
62. **Morin André, Christine Moresoli Christine, Rodrigue Natalie, Dumontt Johanne, Racine Monique and Poitras Elyse** (1993). Effect of carbon, nitrogen, and agitation on exopolysaccharide production by *Enterobacter agglomerans* grown on low grade maple sap. *Enzyme Microbial Technology*, Vol. 15.
63. **Mossel D. A. A.** (1985). Media for Enterobacteriaceae. *International Journal of Food Microbiology*, 2:27-32.
64. **Nahvi Iraj, Emtiazi Giti, Alkabi Lila** (2002). Isolation of a flocculating *Saccharomyces cerevisiae* and investigation of its performance in the fermentation of beet molasses to ethanol. *Biomass and Bioenergy* 23:481–486.
65. **Nakashimada Y, Marwoto B, Kashiwamura T, Kakizono T, Nishio N.** (2000). Enhanced 2,3- butanediol production by addition of acetic acid in *Paenibacillus polymyxa*. *J Biosci Bioen*; 90:661–4.
66. **Nilegaonkar SS, Bhosale SB, Kshirsagar DC, Kapadi AH.** (1992). Production of 2,3- butanediol from glucose by *Bacillus licheniformis*. *World J Microbiol Biotechnol*; 8:378–81.
67. **Ohmomo S., Aoshima I., Tozawa Y., Sakurada N., Ueda K.** (1985). Purification and some properties of melanoidin decolourizing enzymes, P-3 and P-4, from mycelia of *Coriolus vericolour* Ps4a. *Agric Biol.Chem.* 49:2047–2053.
68. **Ohmomo S., Kainuma M., Kamimura K., Sirianuntapiboon S., Oshima I., Atthasumpunna P.** (1988). Adsorption of melanoidin to the mycelia of *Aspergillus oryzae* Y-2-32. *Agric. Biol. Chem.* 52:381– 386.
69. **Painter T.J.** (1998). Carbohydrates polymers in food preservation: an intergrated view of the maillard reaction with special reference to discoveries of preserved foods in *Sphagnum*-dominated peat bogs. *Carbohydr. Polym.*, 36:335-347.
70. **Pant Deepak, Adholeya Alok** (2007). Biological approaches for treatment of distillery wastewater: A review. *Bioresource Technology* 98:2321–2334.
71. **Patel, A., Pawar, R., Mishra, S., Tewari, A.** (2001). Exploitation of marine cyanobacteria for removal of color from distillery effluent. *Indian Journal of Environmental Protection* 21:1118–1121.

72. **Parfitt, J., Barthel, M., & Macnaughton, S.** (2010). Food waste within food supply chains: quantification and potential for change to 2050. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 465, 3065-3081.
73. **Pefia M., Gonzfilez B., San Cristobal N., Heras N.C.** (1996). Color elimination from molasses wastewater by *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*. 57:229-235.
74. **Perego P., Converti A., Del Borghi A., Canepa P.** (2000). 2,3-Butanediol production by *Enterobacter aerogenes*: selection of the optimal conditions and application to food industries residues. *Bioprocess Engineering*, 23:613-620.
75. **Peters D.** (2007). Raw Materials. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology* 105, 1-30.
76. **Petrov K., Petrova P.** (2009). High production of 2,3-butanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* G31. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84:659-665.
77. **Petrov K., Petrova P.** (2010). Enhanced production of 2,3-butanediol from glycerol by forced pH fluctuations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87:943-949.
78. **Plavsic M., Cosovic B., Lee C.** (2006). Copper complexing properties of melanoidins and marine humic material. *Science. Total Environ.* 366:310-319.
79. **Ragauskas AJ, Williams CK, Davison BH, Britovsek G, Cairney J, Eckert CA, et al.** (2006). The path forward for biofuels and biomaterials. *Science*; 311:484–98.
80. **Raghukumar C., Rivonkar G.** (2001). Decolourisation of molasses spent wash by white-rot fungus *Flavodon flavus*, isolated from a marine habitat. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55:510–514.
81. **Roukas T.** (1994). Ethanol Production from Non-sterilized Beet Molasses by Free and Immobilized *Saccharomyces cerevisiae* Cells Using Fed-batch Culture. *Journal of Food Engineering* 21:87-96.
82. **Saha BC** (2003). Hemicellulose bioconversion. *J Ind Microbiol Biotechnol*; 30:279–91.
83. **Saha BC, Bothast RJ.** (1999). Production of 2,3-butanediol by newly isolated *Enterobacter cloacae*. *Appl Microbiol Biotechnol*; 52:321–6.
84. **Satyawali Y., Balakrishnan M.** (2008) Wastewater treatment in molasses-based alcohol distilleries for COD and color removal: A review. *Journal of Environmental Management* 86:481–497.
85. **Schieber, A., Stintzing, F. C., & Carle,R.** (2001). By-products of plant food processing as a source of functional compounds recent developments. *Trends in Food Science & Technology*, 12, 401-413.

86. **Shin H.T., Baig S.Y., Lee S.W., Suh D.S., Kwon S.T., Lim Y.B., Lee J.H.** (2004). Production of fructo-oligosaccharides from molasses by *Aureobasidium pullulans* cells. *Bioresource Technology*. 93: 59–62.
87. **Silvan J.M., Lagemaat J.V.D., Olano A., Castillo M.D.D.** (2006). Analysis and biological properties of amino acid derivatives formed by Maillard reaction in foods. *J. Pharma. Biomed. Anal.* 41: 1543–1551.
88. **Soltys KA, Batta AK, Koneru B.** (2001). Successful nonfreezing, subzero preservation of rat liver with 2,3-butanediol and type I antifreeze protein. *J Surg Res*; 96:30–4.
89. **Speckman RA, Collins EB.** (1982). Microbial production of 2,3-butylene glycol from cheese whey. *Appl Environ Microbiol*; 43:1216–8.
90. **Störmer FC.** (1977). Evidence for regulation of *Aerobacter aerogenes* pH 6 acetolactate-forming enzyme by acetate ion. *Biochem Biophys Res Commun*; 74:898–902.
91. **Sun LH, Wang XD, Dai JY, Xiu ZL.** (2009). Microbial production of 2,3-butanediol from Jerusalem artichoke tubers by *Klebsiella pneumoniae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82:847-852.
92. **Syu MJ.** (2001). Biological production of 2,3-butanediol. *Appl Microbiol Biotechnol*; 55:10–8.
93. **Tondee T., Sirianuntapiboon, S** (2008). Decolorization of molasses wastewater by *Lactobacillus plantarum* No. PV71-1861. *Bioresource Technology*, 99:6258–6265.
94. **Tondee T., Sirianuntapiboon S., Ohmomo S.** (2008). Decolorization of molasses wastewater by yeast strain, *Issatchenkia orientalis* No. SF9-246. *Bioresource Technology*, 99:5511–5519.
95. **van Houdt R, Aertsen A, Michiels CW** (2007). Quorum-sensing-dependent switch to butanediol fermentation prevents lethal medium acidification in *Aeromonas hydrophila* AH-1N. *Res Microbiol*; 158:379–85.
96. **Voloch M, Jansen NB, Ladisch MR, Tsao GT, Narayan R, Rodwell VW** (1985). 2,3-Butanediol. In: Moo-Young M, Cooney CL, Humphrey AE, editors. *Comprehensive biotechnology*. Oxford: Pergamon/Elsevier; p. 933–47.
97. **Wang AL, Wang Y, Jiang TY, Li LX, Ma CQ, Xu P.** (2010). Production of 2,3-butanediol from corncob molasses, a waste by-product in xylitol production. *Appl Microbiol Biotechnol*; 87:965–70.
98. **Wang He-Ya, Qian He, Yao Wei-Rong** (2011). Melanoidins produced by the Maillard reaction: Structure and biological activity. *Food Chemistry* 128:573–584.

99. **Wedzicha, B. L. and Kaputo, M. T.** (1992). Melanoidins from glucose and glycine: Composition, characteristics and reactivity towards sulphite ion. *Food Chem.* 43:359-367.
100. **Willke TH, Vorlop KD.** (2004). Industrial bioconversion of renewable resources as an alternative to conventional chemistry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66:131-142.
101. **Wu KJ, Saratale GD, Lo YC, Chen WM, Tseng ZJ, Chang MC, et al.** (2008). Simultaneous production of 2,3-butanediol, ethanol and hydrogen with a *Klebsiella* sp. strain isolated from sewage sludge. *Bioresour Technol*; 99:7966–70.
102. **Yaylayan V.A., Kaminsky E.** (1998). Isolation and structural analysis of Maillard polymers: caramel and melanoidins formation in glycine / glucose model system. *Food Chem.* 63, 25–31.
103. **Zahari Mior Ahmad Khushairi Mohd, Zakaria Mohd Rafein, Ariffin Hidayah, Mokhtar Mohd Noriznan, Salihon Jailani, Shirai Yoshihito, Hassan Mohd Ali** (2012). Renewable sugars from oil palm frond juice as an alternative novel fermentation feedstock for value-added products. *Bioresource Technology* 110:566–571.
104. **Zeng AP, Biebl H, Deckwer WD.** (1990b). 2,3-Butanediol production by *Enterobacter aerogenes* in continuous culture: role of oxygen supply. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 33:264-268.
105. **Zeng AP, Biebl H, Deckwer WD.** (1991). Production of 2,3-butanediol in a membrane bioreactor with cell recycle. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 34:463-468.
106. **Zhang G, Yang G, Wang X, Guo Q, Li Y, Li j.** (2012). Influence of Blocking of 2,3-Butanediol Pathway on Glycerol Metabolism for 1,3-Propanediol Production By *Klebsiella oxytoca*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* In press DOI 10.1007/s120101-011-9363-3.
107. **www.wikipedia.gr**