



Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών  
Agricultural University of Athens

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

«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ 2,3ΒΟΥΤΑΝΟΔΙΟΛΗΣ  
ΜΕΣΩ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΖΥΜΩΣΕΩΝ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ  
ΜΑΡΚΟΠΟΥΛΟΥ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ

Επιβλέπων: ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ ΣΕΡΑΦΕΙΜ (Επίκουρος Καθηγητής)

Επιτροπή:

ΚΟΥΤΙΝΑΣ ΑΠΟΣΤΟΛΗΣ (Επίκουρος Καθηγητής)

ΣΤΟΦΟΡΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ (Αναπληρωτής Καθηγητής)

ΑΘΗΝΑ

ΙΟΥΛΙΟΣ 2014

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

«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ 2,3ΒΟΥΤΑΝΟΔΙΟΛΗΣ  
ΜΕΣΩ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΖΥΜΩΣΕΩΝ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ  
ΜΑΡΚΟΠΟΥΛΟΥ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ

Επιβλέπων: ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ ΣΕΡΑΦΕΙΜ (Επίκουρος Καθηγητής)

Επιτροπή:

ΚΟΥΤΙΝΑΣ ΑΠΟΣΤΟΛΗΣ (Επίκουρος Καθηγητής)

ΣΤΟΦΟΡΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ (Αναπληρωτής Καθηγητής)

ΑΘΗΝΑ

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση 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 όσους συνέβαλαν στη προσπάθεια ολοκλήρωσης του μεταπτυχιακού μου.

Θα ήθελα να εκφράσω τις βαθύτερες ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα της πτυχιακής μελέτης κ. Παπανικολάου Σεραφείμ, Επίκουρο καθηγητή του Γ.Π.Α, καθώς και τον κ. Κουτίνα Απόστολο, Επίκουρο καθηγητή του Γ.Π.Α για τις γνώσεις και την εμπειρία που απέκτησα κατά τη διάρκεια εκπόνησης του μεταπτυχιακού μου, καθώς και για τις για την καθοδήγησή τους στη σύλληψη και υλοποίηση της παρούσας μελέτης. Ακόμη, Θα ήθελα, να ευχαριστήσω τον κ. Στοφόρο Νικόλαο, Αναπληρωτή καθηγητή του Γ.Π.Α, για τη βοήθεια του κατά τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας πτυχιακής μελέτης.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα παιδιά του εργαστηρίου για την ουσιαστική βοήθεια και υποστήριξη τους κατά τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων μου.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω το μεγαλύτερο ευχαριστώ στην οικογένεια μου, στους γονείς μου Επαμεινώνδα και Αναστασία, και την αδερφή μου Ευσταθία για την υποστήριξη τους σε κάθε νέο μου εγχείρημα.

Μαρκοπούλου Αικατερίνη

Αθήνα, 2014

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</b>	4
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	6
<b>Abstract</b>	7
<b>I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	8
I.1 Τα γεωργό-βιομηχανικά παραπροϊόντα και απόβλητα	8
I.1.1 Ανανεώσιμοι υδατάνθρακες ως πηγή άνθρακα	11
I.2 Μελάσα	14
I.2.1 Σύσταση της μελάσας και τα χαρακτηριστικά της	16
I.2.2 Παραγωγή βιοτεχνολογικών προϊόντων	19
I.3 Η ένωση “2,3-βουτανοδιόλη”	22
I.3.1 Χαρακτηριστικά και βιομηχανικές εφαρμογές 2,3-βουτανοδιόλης	23
I.3.2 Παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης	25
I.3.3 Υποστρώματα για την βιοτεχνολογική παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης	28
I.3.4 Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης	29
I.4 Η οικογένεια <i>Raenibacillaceae</i>	34
<b>Σκοπός μεταπτυχιακής μελέτης</b>	35
<b>II. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	36
II.1 Βιολογικό υλικό	36
II.2 Υποστρώματα	36
II.3 Συνθήκες καλλιέργειας	37
II.4 Αναλύσεις	38
II.4.1. Προσδιορισμός pH	38
II.4.2. Προσδιορισμός βιομάζας	39
II.4.3. Προσδιορισμός αναγωγικών σακχάρων, 2,3-βουτανοδιόλης, αιθανόλης & οξέων	41
<b>III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	45
III.1 Μελέτη νέων ειδών βακτηρίων σε διάφορες πηγές άνθρακα για τη παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης	45
III.1.1 Καλλιέργεια του μ/ο <i>A1</i> σε διάφορες πηγές άνθρακα για τη παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης	46
III.1.2 Καλλιέργεια του μ/ο <i>A2</i> σε διάφορες πηγές άνθρακα για τη παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης	50
III.1.3 Καλλιέργεια του μ/ο <i>A3</i> σε διάφορες πηγές άνθρακα για τη παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης	53
III.2 Καλλιέργεια του μ/ο <i>A3</i> σε ημισυνεχή καλλιέργεια (fed-batch culture) με πηγή άνθρακα τη μελάσα	57
<b>IV. ΣΥΝΟΨΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ</b>	61

IV.1 Μελέτη των μικροοργανισμών σε καλλιέργεια σακχαρόζη με συγκέντρωση ολικών σακχάρων 30 g/L για παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης	61
IV.2 Μελέτη των μικροοργανισμών σε καλλιέργεια σακχαρόζη με συγκέντρωση ολικών σακχάρων 60 g/L για παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης	63
IV.3 Μελέτη των μικροοργανισμών σε καλλιέργεια μελάσας με συγκέντρωση ολικών σακχάρων 30 g/L για παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης	65
<b>V. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	68
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	76

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα πτυχιακή μελέτη μελετήθηκαν τρία νέα βακτηριακά στελέχη για την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης. Τα παραπάνω στελέχη ονομάστηκαν για την παρούσα πτυχιακή *A1*, *A2* & *A3* και ανήκουν στη συλλογή του εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Αρχικά οι τρεις μικροοργανισμοί καλλιεργήθηκαν σε φιάλες Duran, με πηγή άνθρακα την εμπορική σακχαρόζη. Για κάθε μικροοργανισμό, έγιναν δύο καλλιέργειες, η πρώτη έγινε με αρχική συγκέντρωση σακχαρόζης 30 g/L και η δεύτερη με αρχική συγκέντρωση σακχαρόζης 60 g/L. Στη συνέχεια, έγιναν ζυμώσεις με τις ίδιες συνθήκες σε φιάλες Duran, με πηγή άνθρακα την ακάθαρτη γλυκερόλη σε συγκέντρωση 30 g/L. Και τέλος, πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις με πηγή άνθρακα την μελάσα, με συγκέντρωση ολικών σακχάρων 30 g/L (μελάσα 60 g/L).

Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν κλειστές καλλιέργειες (Batch cultures) υπό αναερόβιες συνθήκες, σε φιάλες Duran 1-L με ενεργό όγκο 0,8 L. Οι πηγές άνθρακα που χρησιμοποιήθηκαν είναι η εμπορική σακχαρόζη, η μελάσα και η ακάθαρτη γλυκερόλη. Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με πηγή άνθρακα την ακάθαρτη γλυκερόλη, δεν παρατηρήθηκε κατανάλωση του υποστρώματος.

Ακόμη, με βάση τα δεδομένα των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν σε κλειστές καλλιέργειες (Batch cultures) για τους μικροοργανισμούς *A1*, *A2* & *A3*, παρατηρούμε ότι ο μικροοργανισμός *A3* παρουσιάζει τους μεγαλύτερους συντελεστές απόδοσης παράγωγης 2,3-βουτανοδιόλης. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε ημισυνεχής καλλιέργεια (Fed-Batch culture) του μικροοργανισμού *A3*, σε βιοαντιδραστήρα με πηγή άνθρακα τη μελάσα. Ο μικροοργανισμός *A3* κατανάλωσε συνολικά 87,5 g/L σάκχαρα, και η μέγιστη παραχθείσα ποσότητα 2,3-βουτανοδιόλης είναι 40 g/L. Η απόδοση της ζύμωσης είναι ιδιαίτερα ικανοποιητική  $Y_{2,3BD} = 0,46$  g/g, με δεδομένο ότι η θεωρητική απόδοση για την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης είναι 0,52 g/L, και παραγωγικότητα της ζύμωσης είναι  $P_{2,3BD} = 0,62$  g/L/h.

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

## **ABSTACT**

At the present study, three new bacterial strains were studied for the production of 2,3-butanediol. These strains named for this thesis as *A1*, *A2* & *A3* and belong to the collection of the Laboratory of Microbiology and Biotechnology of the department of Food Science and Human Nutrition at the Agricultural University of Athens.

The three microorganisms were initially cultured in Duran flasks, with commercial sucrose as carbon source. Each microorganism was cultivated with 30 g/L and 60 g/L sucrose concentration. Then fermentations were carried out under the same conditions in Duran bottles, using 30 g/L of crude glycerol concentration as carbon source. Finally fermentations were carried out with molasses as carbon source, at a concentration of total sugars of 30 g/L (molasses 60 g/L).

Batch cultures were carried out under anaerobic conditions in 1 L, Duran bottles with a working volume of 0,8 L at 30°C. The pH value at the beginning of fermentation was  $6.8 \pm 0.2$  and it was reduced during fermentation to  $6.3 \pm 0.2$ . The carbon sources used were commercial sucrose, molasses and crude glycerol. In the experiments carried out with crude glycerol, no consumption of the substrate was observed.

Based on the experimental data in Batch cultures for microorganisms *A1*, *A2* & *A3*, the strain *A3* presents the greatest potential for 2,3-butanediol production. For this reason, a fed-batch culture was carried out with the microorganism *A3* in the bioreactor with molasses as carbon source. The microorganism *A3* consumed 87,5 g/L of sugars and the maximum quantity of 2,3-butanediol produced was 40 g/L. The fermentation yield achieved was 0,46 g/g and the productivity 0,62 g/L/h.

**Keywords:** Agro-industrial byproducts and wastes, molasses, 2,3-butanediol

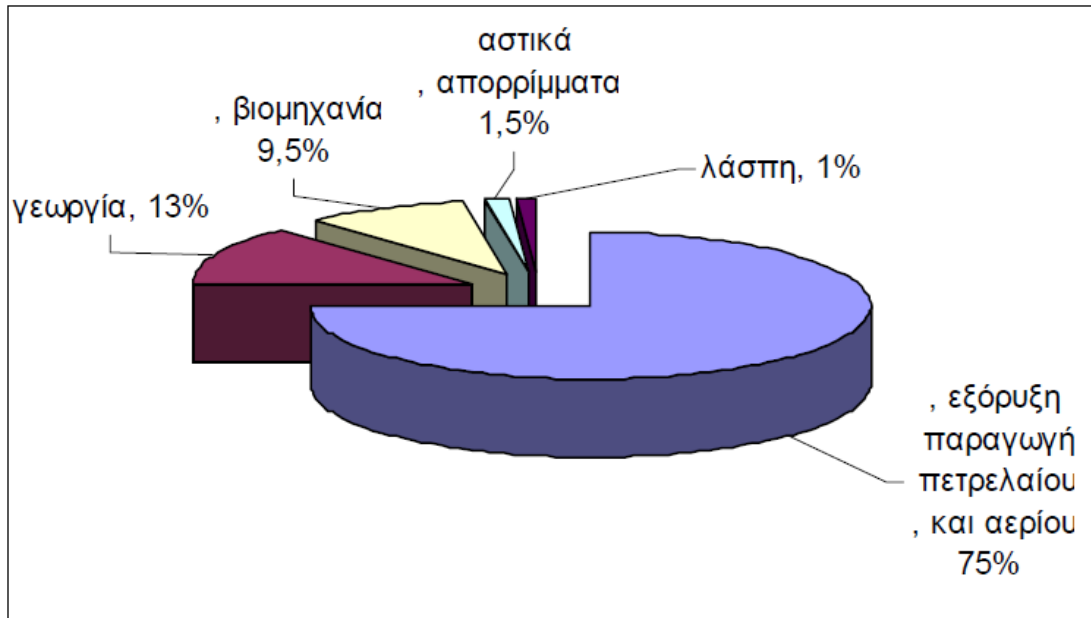


## **I.ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

### **I.1 Τα γεωργό-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 (Environmental Science (Chapter 11). G. Tyler Miller, 1997). Στην (Εικόνα I.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:** Κατανομή των στερεών αποβλήτων στις ΗΠΙΑ 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 τη 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, ποτάμια, λίμνες, έλη) 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, 2007). 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, βιοπλαστικά, βιοαιθανόλη, 1,3-προπανοδιόλη, και πληθώρα άλλων προϊόντων (Peters, 2006).

### **I.1.1 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 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 μέσω 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 από αερόβιους μικροοργανισμούς και από αναερόβιους.

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 ( $\beta$ -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 οξείδωσης 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, και στη συνέχεια 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 κομμάδια 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 βιο-διυληστηρίων. Η λιγνοκυτταρίνη είναι ένα αρκετά πολύπλοκο υπόστρωμα, που αποτελείται από μίγμα υδατανθράκων κυτταρίνης, ημικυτταρίνης 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 (απόβρα) πλούσια σε υδατάνθρακες: Στη 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. Βιοαιθανόλης,
4. Γαλακτικού οξέος,
5. Μικροβιακής προέλευσης διαλυτών,
6. Αμινοξέων με κυριότερο το γλουταμινικό,
7. Μονοκυτταρικού λίπους,
8. Ενζύμων

## **I.2 Μελάσα**

Η μελάσα αποτελεί το κύριο παραπροϊόν κατά την παραγωγική διαδικασία ζάχαρης. Ταυτόχρονα, είναι ιδανικό υπόστρωμα για τις ζυμωτικές διεργασίες διότι περιέχει μεγάλη ποσότητα σακχάρων, περίπου 50% σάκχαρα επί ξηρού βάρους, κυρίως σακχαρόζη και σημαντικές ποσότητες γλυκόζης και φρουκτόζης. Χρησιμοποιείται σαν υπόστρωμα στις ζυμωτικές διεργασίες, κυρίως 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, σκουρόχρωμο σιρόπι, με γλυκόπικρη γεύση και έντονο χαρακτηριστικό άρωμα.



**Εικόνα I.2-1:** Μελάσα ([www.wikipedia.gr](http://www.wikipedia.gr))

Η μελάσα αποτελεί το κύριο παραπροϊόν από την επεξεργασία του ζαχαροκάλαμου ή του ζαχαρότευτλου κατά τη διαδικασία παραγωγής της κρυσταλλικής ζάχαρης. Επομένως, διακρίνεται εξ'αρχής σε δυο διαφορετικά είδη μελάσας. Η μελάσα που προέρχεται από το ζαχαροκάλαμο (cane molasses) και η μελάσα που προέρχεται από ζαχαρότευτλο (beet molasses). Η ποιότητα της μελάσας εξαρτάται από την ωριμότητα του φυτού από το οποίο προέρχεται, την ποσότητα της ζάχαρης που εξάγεται, καθώς και από τη μέθοδο της εξόρυξης. Υπάρχουν τρία είδη μελάσας: 1) η ήπια ή πρώτη μελάσα, 2) το «σκοτάδι» ή δεύτερη μελάσα και 3) η blackstrap μελάσα.

Κατά τη διαδικασία παραγωγής της κρυσταλλικής ζάχαρης, αρχικά συγκομίζονται τα φυτά ζαχαροκάλαμο ή ζαχαρότευτλο που χρησιμοποιούνται ως πρώτη ύλη, 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. Το «σκοτάδι» ή δεύτερη μελάσα παραλαμβάνεται μετά από δεύτερο βρασμό και απομάκρυνση της ζάχαρης και έχει μια ελαφρώς πικρή γεύση. Τέλος, ο τρίτος βρασμός και η απομάκρυνση των κρυστάλλων ζάχαρης δίνει τη blackstrap μελάσα. Η blackstrap μελάσα, εξακολουθεί να περιέχει μια μικρή ποσότητα σακχαρόζη, παρόλο που το μεγαλύτερο μέρος της έχει ήδη αφαιρεθεί και κρυσταλλοσκοπηθεί.



### **I.2.1 Σύσταση της μελάσας και τα χαρακτηριστικά της**

Αρχικά, η σύσταση της μελάσας ποικίλλει ανάλογα με την προέλευση της, από ζαχαροκάλαμο ή ζαχαρότευτλο. Το ζαχαροκάλαμο είναι ποώδες φυτό, και ανήκει στην οικογένεια των Ποοειδών (Poaceae) ή Αγρωστωδών (Gramineae). Αναπτύσσεται κατά συστάδες και παράγει έναν αριθμό καλαμιών που το ύψος τους είναι από 2 έως 7 μέτρα. Το καλάμι είναι το σημαντικότερο τμήμα του φυτού αφού εκεί αποθηκεύεται η ζάχαρη στο στάδιο της ωρίμανσης. Το ζαχαρότευτλο είναι ένα διετές, ποώδες λαχανικό και ανήκει στην οικογένεια των χηνοποδιδών (Chenopodiaceae) ([www.wikipedia.gr](http://www.wikipedia.gr)). Η κονδυλώδης ρίζα του, περιέχει μια υψηλή συγκέντρωση σακχαρόζη. Η καλλιέργεια του ζαχαροκάλαμου, όπως και του ζαχαρότευτλου, γίνεται για την εξαγωγή της ζάχαρης, ενώ πολύ χρήσιμη είναι και η μελάσα, που είναι υποπροϊόν της βιομηχανίας ζάχαρης. Επίσης, διαφέρουν ανάλογα με την ποικιλία των ζαχαροκάλαμων και ζαχαρότευτλων, τις αγρό-κλιματολογικές συνθήκες της περιοχής, τη διακίνηση και αποθήκευση της, καθώς και τη παραγωγική διαδικασία ζάχαρης (Godbole, 2002). Τα υπολείμματα των καλλιεργειών και της επεξεργασίας των φυτών, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή βιοκαυσίμων.



**Εικόνα I.2.1-1:** Καλλιέργεια ζαχαροκάλαμου ([www.wikipedia.gr](http://www.wikipedia.gr))



Εικόνα I.2.1-2: Καλλιέργεια ζαχαροτεύτλου (www.wikipedia.gr)

Στον Πίνακα I.2.1-1 παρουσιάζεται η χημική σύσταση της μελάσας από ζαχαροκάλαμο και από ζαχαρότευτλο (Curtin, 1983; Chen and Chou, 1993; Godbole, 2002).

Χαρακτηριστικό	Ζαχαροκάλαμο	Ζαχαρότευτλο
Brix (%)	79.5 85-92 <sup>b</sup>	79.5
Ειδικό βάρος	1.41 1.38-1.52 <sup>a</sup>	1.41
Συνολικά Στερεά (%)	75.0 75-88 <sup>a</sup>	77.0
Συνολικά Σάκχαρα (%)	46.0 44-46 <sup>a</sup> 50-90 <sup>b</sup>	48.0
Πρωτεΐνες (%)	3.0 2.5-4.5 <sup>b</sup>	6.0
Συνολικά λιπαρά (%)	0.0	0.0
Συνολικές ίνες (%)	0.0	0.0
Τέφρα (%)	8.1 7-15 <sup>b</sup>	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

<sup>a</sup> Godbole(2002)

<sup>b</sup> 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 & Karuto, 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).

### 1.2.2 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 ημισυνεχής 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*, σε 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 βιοαποικοδομίσματα πλαστικά (Willke and Vorlop, 2004). Η ζύμωση που πραγματοποιήθηκε από το βακτήριο *Actinobacillus succinogenes*, έδωσε μετά από 60 ώρες  $44.2 \pm 1.0$  g/L ηλεκτρικού οξέος. Σημαντικά παραπροϊόντα της όλης διαδικασίας ήταν το οξικό οξύ ( $6,2 \pm 0,3$  g/L) και το μυρμηκικό οξύ ( $1.7 \pm 0.1$  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 “2,3-Βουτανοδιόλη”**

Καθώς τα αποθέματα του αργού πετρελαίου γίνονται όλο και πιο σπάνια, τα βιο-δυσλιστηρία 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.

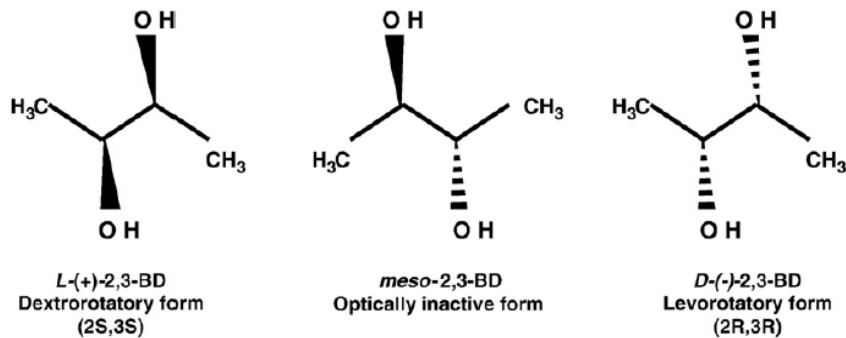
### 1.3.1 Χαρακτηριστικά και βιομηχανικές εφαρμογές 2,3-βουτανοδιόλης

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 1.3.1-1 παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά της 2,3-βουτανοδιόλης, και τα στερεοϊσομερή της. (Celińska & Grajek, 2009)

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-βουταδιένιο, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην παραγωγή συνθετικού καουτσούκ. Η σύνθεση αυτή ήταν ιδιαίτερα σημαντική στον 2<sup>ο</sup> 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.

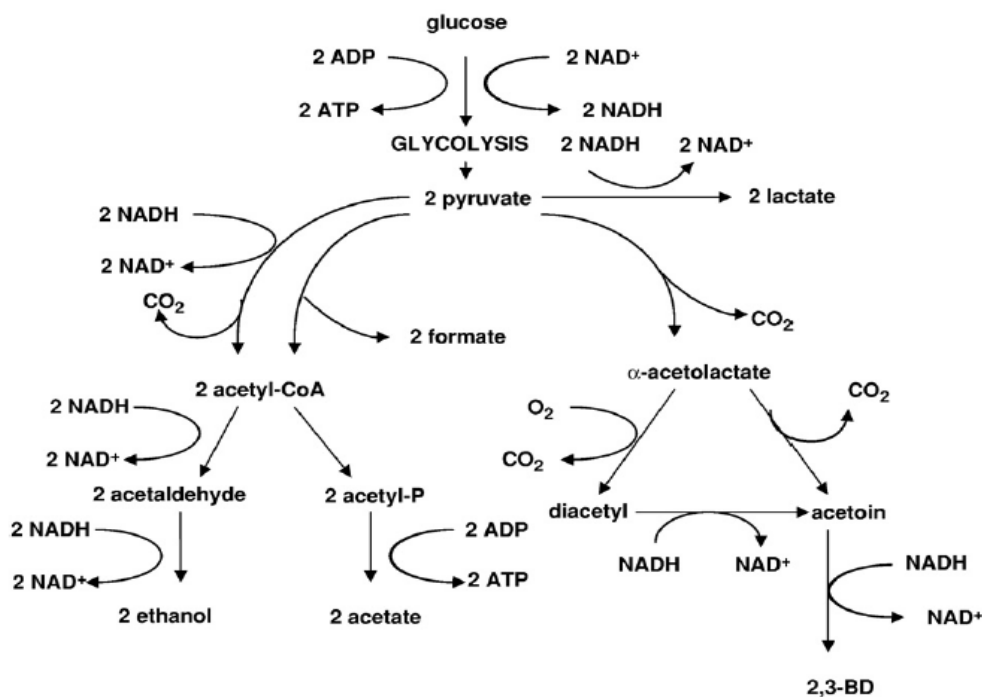
Μία άλλη χρήση της είναι η μετατροπή της με αφυδάτωση σε μεθυλ-αιθυλ-κετόνη (MEK), η οποία χρησιμοποιείται ως υγρό πρόσθετο στα καύσιμα, αλλά και ως διαλύτης στην σύνθεση ρητίνων (Celińska & Grajek, 2009). Η εστεροποίηση της 2,3-βουτανοδιόλης έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή προϊόντων που μπορούν να 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).

### **I.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 ακόλουθο σχήμα (Σχήμα I.3.2-1):



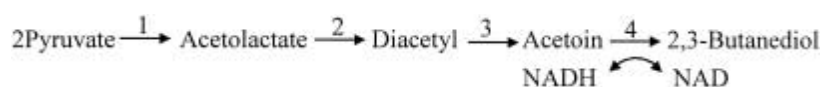
**Σχήμα 1.3.2-1:** Μεταβολισμός πυροσταφυλικού οξέος από τον μικροοργανισμό *Lactococcus lactis* προς παραγωγή αιθανόλης, 2,3-βουτανодиόλης, οξικού, γαλακτικού και μυρμηκικού οξέος (Celińska & Grajek, 2009).

Πολλοί μονοσακχαρίτες (εξόζες ή πόντιζες) είναι ικανοί να ζυμωθούν προς παραγωγή της 2,3-βουτανодиόλης (A, 2001). Στο βακτηριακό μεταβολισμό, οι μονοσακχαρίτες πρέπει αρχικά να μετατραπούν σε προστατευτικό, το οποίο σχηματίζεται μέσω της οδού Emden-Epedorf-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 προστατευτικό οξύ εμπλέκονται τρία βασικά ένζυμα, η συνθετάση του α-ακετογαλακτικού ( $\alpha$ -ALS, EC 4.1.3.18), η αποκαρβοξυλάση του α-ακετογαλακτικού ( $\alpha$ -ALD, EC 4.1.1.5) και η αφυδρογονάση της 2,3-BD (BDH, EC 1.1.1.76). Το ένζυμο  $\alpha$ -ALS δρα καλύτερα σε ελαφρώς όξινες συνθήκες (αναφέρεται και ως pH 6 ένζυμο) και έτσι διαφέρει από το αναβολικό  $\alpha$ -ALS, ή «pH 8 ένζυμο» (Gottshalk, 1986). Το pH 6 ένζυμο διεξάγει μια αντίδραση δύο σταδίων: στο πρώτο στάδιο, το προστατευτικό συμπλέκεται με τη πυροφωσφορική θειαμίνη (TPP) για το σχηματισμό του ακέτυλο-TPP, το οποίο σε

δεύτερο στάδιο συμπυκνώνεται με ένα δεύτερο μόριο του πυροσταφυλικού για το σχηματισμό του α-ακετογαλακτικού (Magee and Kosaric, 1987).

Αρχικά, το προστατευτικό 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  $Y_{\text{BD}/\text{Glu}}$  παραχθείσας 2,3-βουτανοδιόλης ανά καταναλωθείσα γλυκόζη είναι 0.5 g/g (Nilegaonkar et al., 1992).

Οι μικροοργανισμοί που μπορούν να ζυμώσουν το προστατευτικό οξύ σε 2,3-βουτανοδιόλη είναι: *Aeromonas hydrophila*, *B. subtilis*, *Brevibacillus brevis* S1, *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).

### **1.3.3. 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 σακχαρόζη), 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.

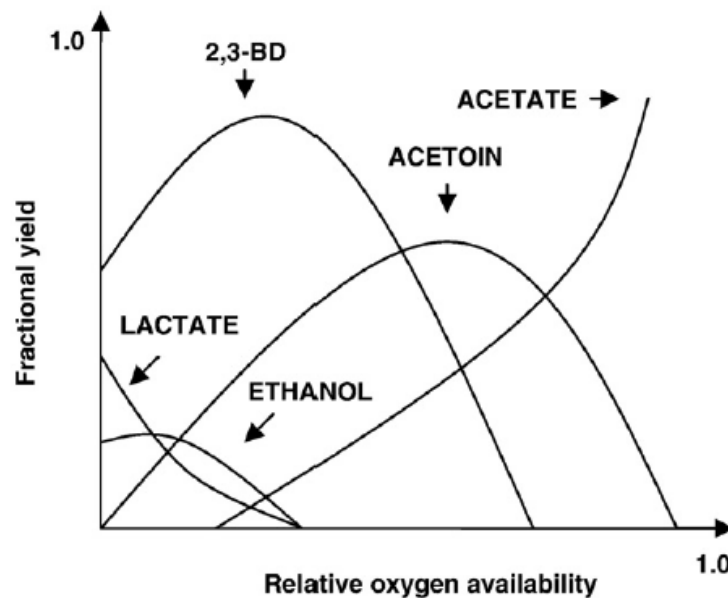
2. Λιγνοκυτταρινούχα υποστρώματα. Η λιγνίνη και η κυτταρίνη, αποτελούν συστατικά του ξύλου που είναι η πιο άφθονη βιομάζα στη γη, και έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον ως εναλλακτική πρώτη ύλη για βιολογικές διεργασίες λόγω της μεγάλης διαθεσιμότητά της στη φύση. Η μεγαλύτερη εφαρμογή των λιγνοκυτταρινούχων 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 πόντιζες συμπεριλαμβανομένων της ξυλόζης, της αραβινόζης και της ριβόζης (Saha, 2003; Yan et al., 2009).

### **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 επίρροή 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 (Voloch 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. Θερμοκαρασία

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 Η οικογένεια Paenibacillaceae**

Η παρούσα μελέτη διερευνά τις φυσιολογικές και βιοχημικές δυνατότητες τριών νέων βακτηριακών στελεχών της οικογένεια Paenibacillaceae, τα στελέχη για την παρούσα μελέτη ονομάζονται *A1*, *A2* και *A3*, με στόχο τη παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης κατά την αύξηση τους σε ανανεώσιμες πηγές άνθρακα.

Η οικογένεια Paenibacillaceae οριοθετείται βάσει των φυλογενετικών αναλύσεων των αλληλουχιών 16S rRNA και περιλαμβάνει το γένος Paenibacillus και στενούς συγγενείς του. Η οικογένεια αυτή διανέμεται μεταξύ δύο φυλογενετικών δικτύων. Τη πρώτη μονοφυλετική ομάδα αποτελούν οι βάκιλοι των γενών Paenibacillus, Brevibacillus, Cohnella και Thermobacillus. Η δεύτερη μονοφυλετική ομάδα αποτελείται από τα γένη Aneurini-bacillus, Ammoniphilus, και Oxalophagus. Αν και οι δύο συστάδες υποθετικά συνδέονται μεταξύ τους, σε διάφορες αναλύσεις δεν εμφανίζονται κοινά στοιχεία που να ενώσουν τις δύο ομάδες. Ωστόσο, ελλείψει σαφών ενδείξεων για το διαχωρισμό, η δεύτερη συστάδα συγκρατείται εντός της οικογένειας. Τα κύτταρα είναι ραβδόμορφα, και το μέγεθος τους είναι 0,5-1,0 × 2-6 μm. Ακόμη, ο τύπος του κυτταρικού τοιχώματος είναι κατά gram-θετικός, σχηματίζουν ενδοσπόρια σχήματος ελλειψοειδές ή οβάλ, μπορεί να έχουν δυνατότητα κίνησης με περίτριχα μαστίγια ή να είναι ακίνητα. Μπορεί να είναι αυστηρά αερόβια, μικροαερόφιλα, προαιρετικά αερόβια ή αναερόβια. Μπορεί να παρουσιάζουν καταλάση θετική ή αρνητική. Είναι όργανο-ετερότροφα, χρησιμοποιώντας πολύπλοκα μέσα, υδατάνθρακες και αμινοξέα. Μερικά είδη χρησιμοποιούν μόνο οξαλικό οξύ ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας. Δύναται να απομονωθούν από χώμα, ρίζες, κόπρανα, αίμα, και άλλες πηγές (Paul De Vos et al., 2009).

## 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 γεωργό-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 τριών νέων βακτηριακών στελεχών *A1*, *A2*, και *A3* της οικογένειας *Raenibacillaceae*, με στόχο τη παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης κατά την αύξηση τους σε ανανεώσιμες πηγές άνθρακα (σακχαρόζη, μελάσα, γλυκερόλη). Για το σκοπό αυτό, οι μικροοργανισμοί καλλιεργούνται σε αναδεδυόμενες φιάλες Duran υπό αναερόβιες συνθήκες σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και υποστρώματα. Ακόμη, ο μικροοργανισμός (*A3*) με την μεγαλύτερο συντελεστή απόδοσης παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης, αναπτύχθηκε σε βιοαντιδραστήρα σε συνθήκες ημισυνεχούς καλλιέργειας (fed-batch culture), με πηγή άνθρακα τη μελάσα.

## II. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### II.1 Βιολογικό υλικό

Στην παρούσα πτυχιακή μελέτη μελετήθηκαν τρία νέα βακτηριακά στελέχη, *A1*, *A2*, και *A3* της οικογένειας *Raenibacillaceae*, για την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης. 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 ρίζες φυτών στο έδαφος και θαλάσσια ιζήματα. Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ανανεώνονταν τακτικά και επωάζονταν σε θερμοστατούμενο επωαστικό κλίβανο στους  $30\pm 1$  °C για  $24\pm 1$  h σε βιδωτούς δοκιμαστικούς σωλήνες πεπληρωμένους με θρεπτικό μέσο MRS Broth και διατηρούνταν σε θερμοκρασία  $4\pm 1$  °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
$K_2HPO_4$	2.00
$CH_3COONa$	5.00
$MgSO_4$	0.41
Γλυκόζη	10.00

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	30-60

Ως πηγές άνθρακα χρησιμοποιήθηκαν η εμπορική σακχαρόζη σε συγκεντρώσεις 30g/L και 60g/L, η γλυκερόλη, και η μελάσα.

### Π.3 Συνθήκες καλλιέργειας

Τα πειράματα της παρούσας μελέτης, πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις ακόλουθες συνθήκες. Όλες οι καλλιέργειες που πραγματοποιήθηκαν ήταν ασυνεχείς καλλιέργειες βυθού 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. Πιο αναλυτικά, οι φιάλες Duran υφίσταντο σπαργή με καθαρό άζωτο για 15 min ώστε να απομακρυνθεί ποσότητα οξυγόνου από το μέσο καλλιέργειας και να επιτευχθούν αναερόβιες συνθήκες. Στην συνέχεια, οι φιάλες Duran τοποθετούνταν σε αυτόκαυστο όπου και αποστειρώνονταν (121 °C/ 20 min). Το pH του θρεπτικού μέσου μετά την αποστείρωση είχε τιμή  $7.0 \pm 0.1$ . Οι φιάλες εμβολιάζονταν υπό ασηπτικές συνθήκες με 10% (κ.ο.) εναιωρήματος κυττάρων και τοποθετούνταν για επώαση σε ανακινούμενο επωαστικό κλίβανο τύπου Labline, υπό ανάδευση 180 rpm. Η θερμοκρασία επώασης ήταν για όλα τα στελέχη 30 °C.



**Εικόνα Π.3-1:** Φιάλη Duran 1-L, πληρωμένες κατά τα 4/5 της.

## 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 (σακχαρόζης, μελάσας), της 2,3-βουτανοδιόλης, της αιθανόλης και των οργανικών οξέων και τέλος τον αποχρωματισμό της μελάσας.

### Π.4.1. Προσδιορισμός pH

Το pH των καλλιεργειών προσδιορίστηκε με pH-μέτρο τύπου Jenway 3020 pHmeter. Για κάθε σημείο της κινητικής πραγματοποιήθηκε μέτρηση του pH.

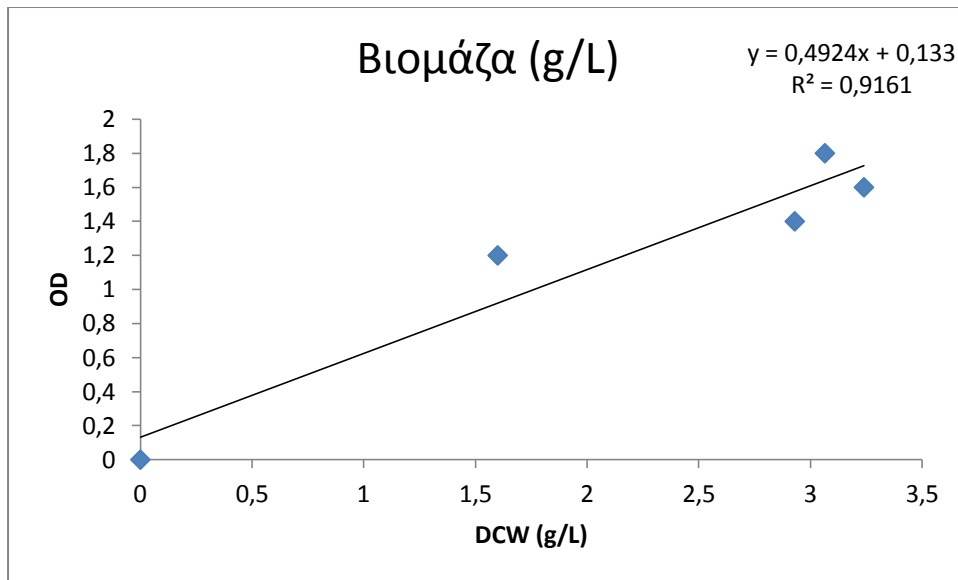
Η τιμή του pH στην αρχή των ζυμώσεων ήταν  $\text{pH}=6,8\pm,2$ , στη συνέχεια κατά τη διάρκεια της ζύμωσης διαμορφωνόταν από τους ίδιους τους μικροοργανισμούς, όπου λάμβανε τη τιμή  $\text{pH}=6,3\pm 0,2$ . Σε κάποιες περιπτώσεις, πραγματοποιήθηκε διόρθωση του pH στο θρεπτικό μέσο, όπου ήταν αναγκαίο, ώστε η τιμή του να κυμαίνεται 6,3-

7. Η διόρθωση του pH έγινε με προσθήκη καυστικού καλίου KOH 5M υπό ασηπτικές συνθήκες.

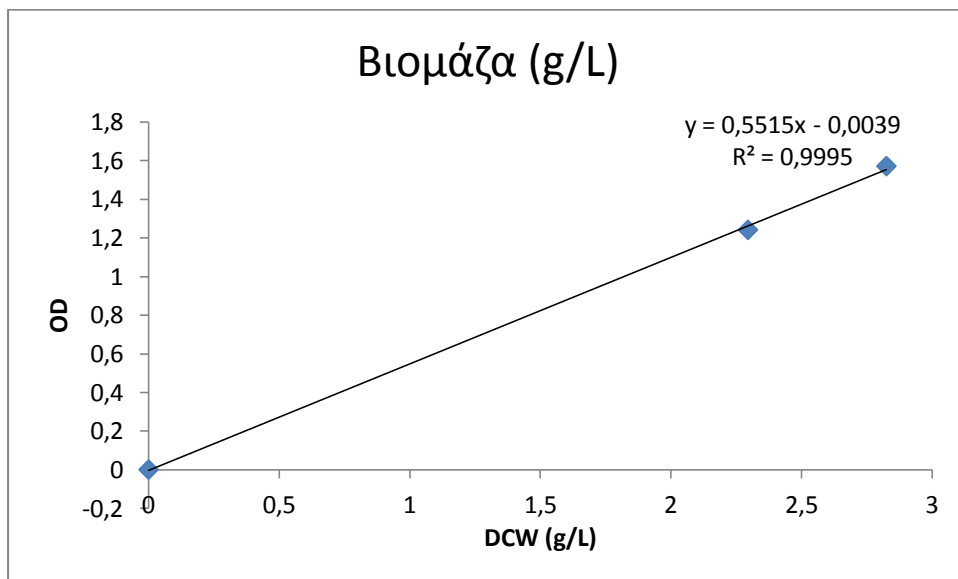
#### **Π.4.2. Προσδιορισμός βιομάζας**

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, 15 min, 5 °C). Το υπερκείμενο απορρίπτεται 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 στα γραφήματα που ακολουθούν. Για κάθε έναν από τους υπό εξέταση μικροοργανισμούς δημιουργήθηκε το αντίστοιχο γράφημα.

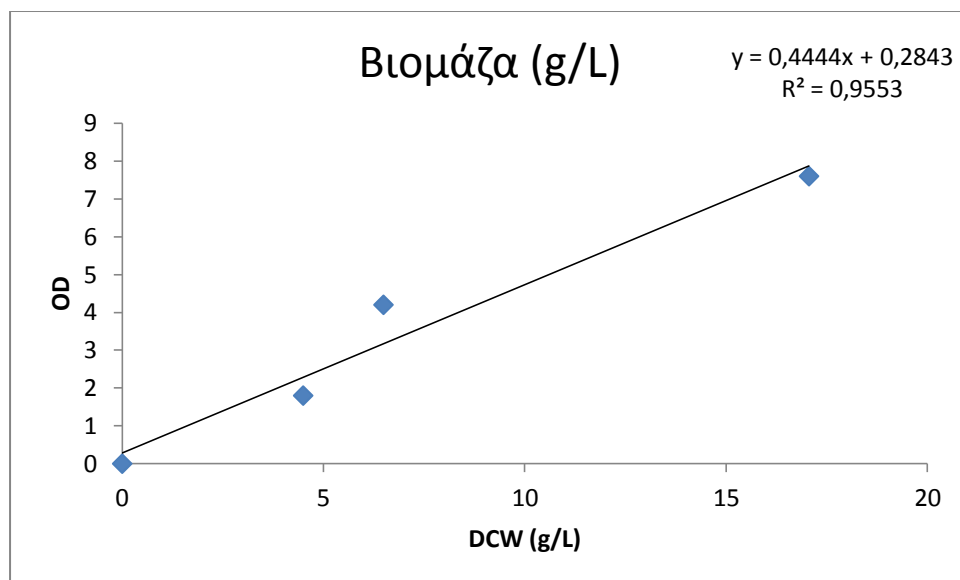




**Γράφημα Π.4.2-1:** Γράφημα συσχέτισης ξηρού βάρους και οπτικής πυκνότητας για τον προσδιορισμό της βιομάζας, για το μικροοργανισμό *A1*.



**Γράφημα Π.4.2-2:** Γράφημα συσχέτισης ξηρού βάρους και οπτικής πυκνότητας για τον προσδιορισμό της βιομάζας, για το μικροοργανισμό *A2*.



**Γράφημα Π.4.2-3:** Γράφημα συσχέτισης ξηρού βάρους και οπτικής πυκνότητας για τον προσδιορισμό της βιομάζας, για το μικροοργανισμό *A3*.

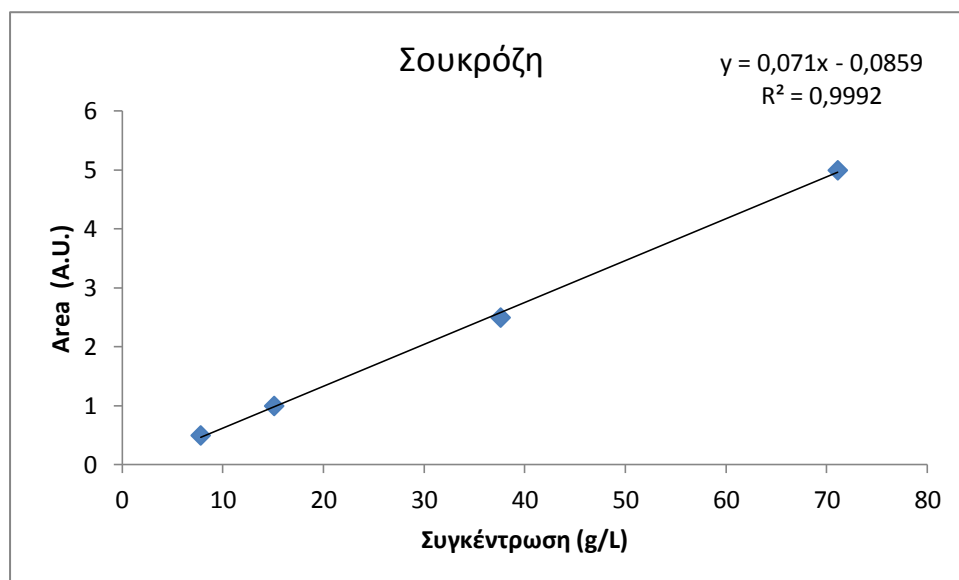
### Π.4.3 Προσδιορισμός αναγόντων σακχάρων, 2,3-βουτανοδιόλης, αιθανόλης & οξέων

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των αναγόντων σακχάρων, 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 Watres 410), ενώ των οργανικών οξέων σε ανιχνευτή UV (Waters 486).

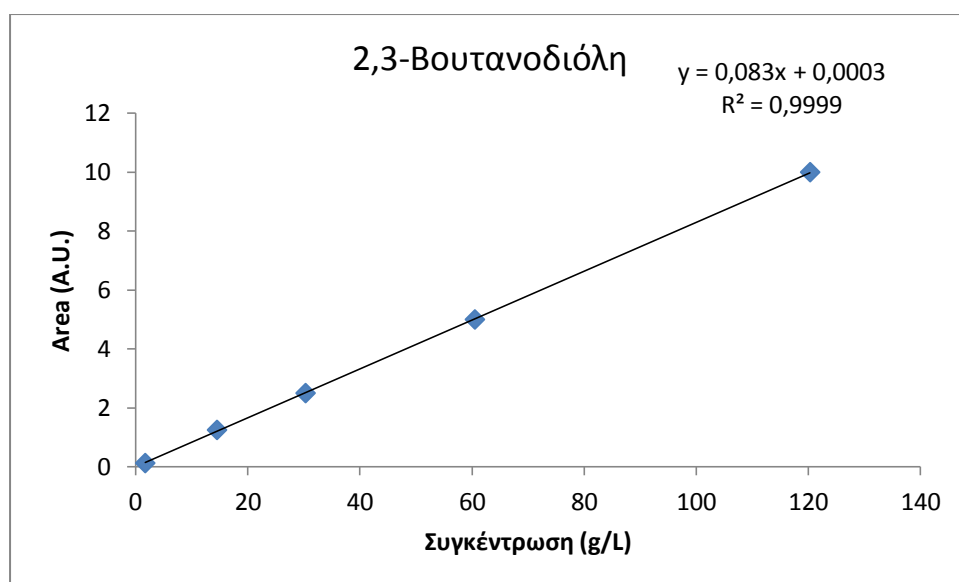
Η ταυτοποίηση των μεταβολικών προϊόντων βασίστηκε στον χρόνο κατακράτησης, ο οποίος συγκρίθηκε με πρότυπα δείγματα των αντίστοιχων ουσιών. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε αραιό διάλυμα  $H_2SO_4$  (0,005 M) και η ροή της ρυθμίστηκε στα 0,6 mL/min. Η στήλη με την οποία έγινε ο διαχωρισμός του δείγματος ήταν τύπου Aminex HPX-87H (BIO-Rad) και θερμοκρασίας 60 °C. Από τη στήλη περνούσαν 20  $\mu$ L δείγματος και η διάρκεια της ανάλυσης ήταν 20 λεπτά.

Με τη χρήση προτύπων διαλυμάτων προέκυψαν τα ακόλουθα διαγράμματα, και οι εξισώσεις (Πίνακας Π.4.3-1) με την βοήθεια των οποίων υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις των υπό εξέταση ουσιών.

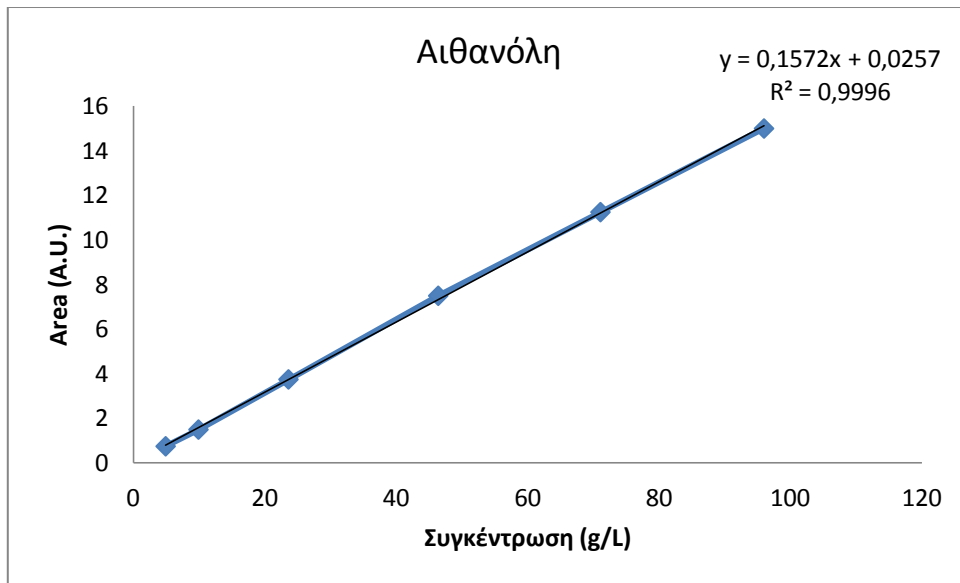
## Διαγράμματα



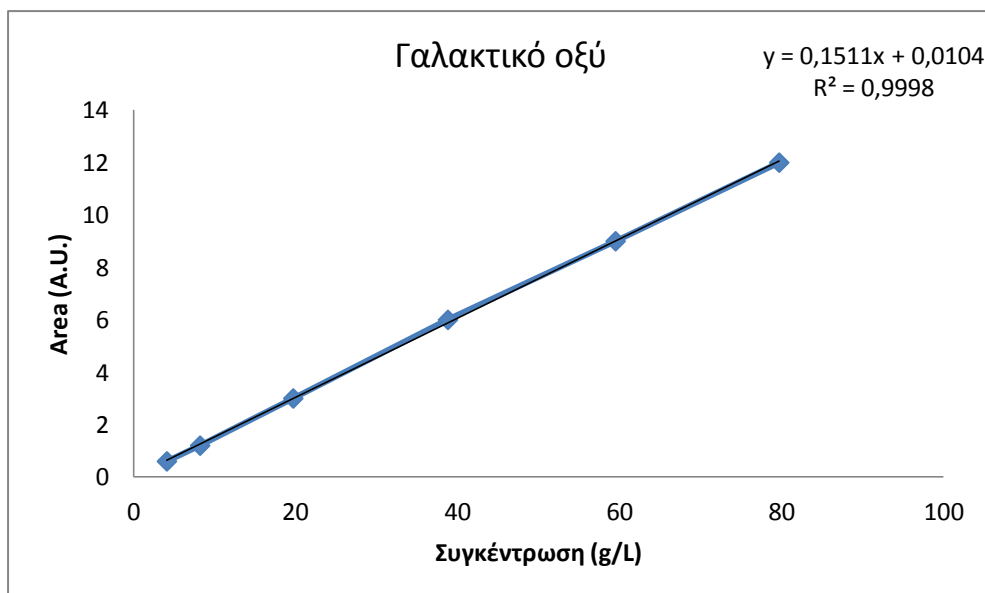
**Γράφημα Π.4.3-1:** Πρότυπη καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης σακχαρόζη. Η μέτρηση των πρότυπων διαλυμάτων έγινε με την χρήση Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Αποδόσεως (HPLC) σε σύστημα Waters 600E. Τα “Area” των δειγμάτων παρουσιάζονται σε αυθαίρετες μονάδες (A.U.).



**Γράφημα Π.4.3-2:** Πρότυπη καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης 2,3-βουτανοδιόλης. Η μέτρηση των πρότυπων διαλυμάτων έγινε με την χρήση Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Αποδόσεως (HPLC) και η ανίχνευση της 2,3-βουτανοδιόλης έγινε σε ανιχνευτή RI (RI Watres 410). Τα “Area” των δειγμάτων παρουσιάζονται σε αυθαίρετες μονάδες (A.U.).



**Γράφημα Π.4.3-3:** Πρότυπη καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης αιθανόλης. Η μέτρηση των πρότυπων διαλυμάτων έγινε με την χρήση Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Αποδόσεως (HPLC) και η ανίχνευση της 2,3αιθανόλης έγινε σε ανιχνευτή RI (RI Watres 410). Τα “Area” των δειγμάτων παρουσιάζονται σε αυθαίρετες μονάδες (A.U.).



**Γράφημα Π.4.3-4:** Πρότυπη καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης γαλακτικού οξέος. Η μέτρηση των πρότυπων διαλυμάτων έγινε με την χρήση Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Αποδόσεως (HPLC) και η ανίχνευση του γαλακτικού οξέος έγινε σε ανιχνευτή UV (Waters 486). Τα “Area” των δειγμάτων παρουσιάζονται σε αυθαίρετες μονάδες (A.U.).

**Πίνακας Π.4.3-1:** Εξισώσεις με τις οποίες υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις των υπό εξέταση ουσιών.

**Εξισώσεις**

<b>Σακχαρόζη</b>	$Y=0,071x-0,0859$
<b>2,3-Βουτανοδιόλη</b>	$Y=0,083x+0,0003$
<b>Αιθανόλη</b>	$Y=0,1572x+0,0257$
<b>Γαλακτικό οξύ</b>	$Y=0,1511x+0,0104$

### III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### III.1 Μελέτη νέων ειδών βακτηρίων σε διάφορες πηγές άνθρακα για την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης

Η παρούσα μελέτη έχει σαν στόχο τη διερεύνηση των βιοχημικών δυνατοτήτων τριών νέων ειδών βακτηρίων, των *A1*, *A2* & *A3* της οικογένειας *Raenibacillaceae*, για την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης.

Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν κλειστές καλλιέργειες (Batch cultures) υπό αναερόβιες συνθήκες, σε φιάλες Duran 1-L με ενεργό όγκο 0.8 L, υπό ανάδευση 180 rpm, με εμφύσηση αζώτου για 15 λεπτά και σε θερμοκρασία  $T=30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Η τιμή του pH στην αρχή των ζυμώσεων ήταν  $\text{pH}=6.8\pm 0.2$ , στη συνέχεια κατά τη διάρκεια της ζύμωσης διαμορφωνόταν από τους ίδιους τους μικροοργανισμούς, όπου λάμβανε τη τιμή  $\text{pH}=6.3\pm 0.2$ . Οι πηγές άνθρακα που χρησιμοποιήθηκαν είναι εμπορική σακχαρόζη, η μελάσα και ακάθαρτη γλυκερόλη.

Με βάση τα πειραματικά αποτελέσματα πραγματοποιήθηκαν κινητικές στις οποίες μετρήθηκαν οι εξής παράμετροι της μικροβιακής αύξησης:

- Το **pH** της καλλιέργειας
- Η παραγωγή βιομάζας **DCW** (g/L)
- Η κατανάλωση των συνολικών σακχάρων **TS** (g/L)
- Η παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης **2,3-BD** (g/L)
- Η παραγωγή αιθανόλης **Ethanol** (g/L), και γαλακτικού οξέος **Lactic acid** (g/L)

Ακόμη κατά τη βιοδιεργασία υπολογίστηκαν οι παρακάτω παράμετροι 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), ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής

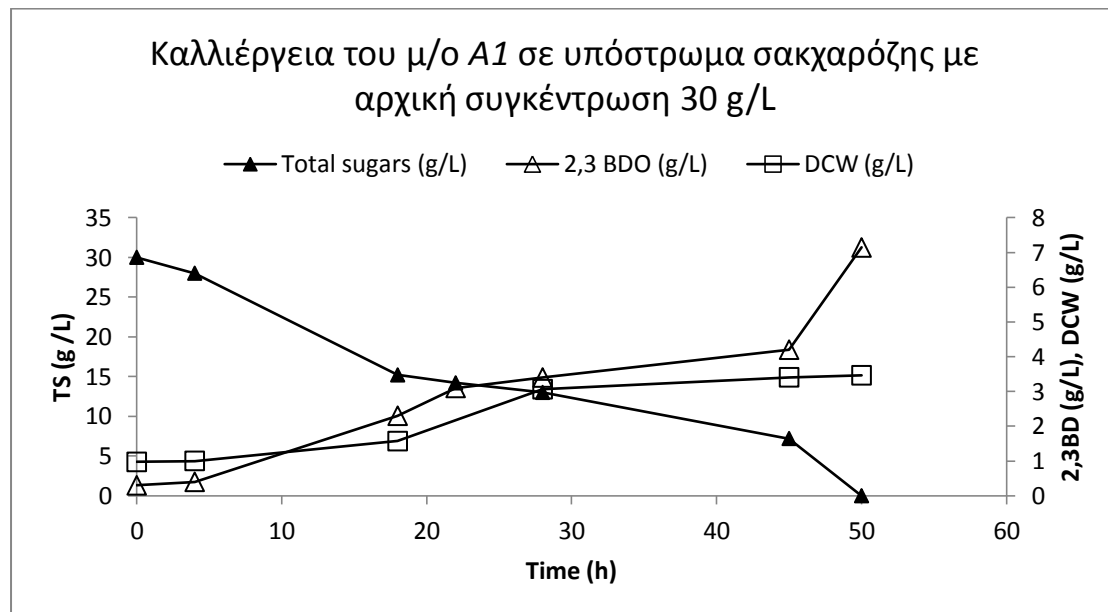
γαλακτικού οξέος  $Y_{Lac}$  (g παραχθείσας γαλακτικού οξέος ανά g καταναλωθέντος υποστρώματος).

- Η παραγωγικότητα της 2,3-βουτανοδιόλης,  $P_{2,3-BD}$  (g/L παραχθείσας 2,3-βουτανοδιόλης ανά ώρα).

Αρχικά οι τρεις μικροοργανισμοί καλλιεργήθηκαν σε φιάλες Duran, με πηγή άνθρακα την εμπορική σακχαρόζη. Για κάθε μικροοργανισμό, έγιναν δύο καλλιέργειες, η πρώτη έγινε με αρχική συγκέντρωση σακχαρόζης 30 g/L και η δεύτερη με αρχική συγκέντρωση σακχαρόζη 60 g/L. Στη συνέχεια, έγιναν ζυμώσεις με τις ίδιες συνθήκες σε φιάλες Duran, με πηγή άνθρακα την ακάθαρτη γλυκερόλη σε συγκέντρωση 30 g/L. Και τέλος, πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις με πηγή άνθρακα την μελάσα, με συγκέντρωση ολικών σακχάρων 30 g/L(μελάσα 60 g/L).

### III.1.1 Καλλιέργεια του μ/ο A1 σε διάφορες πηγές άνθρακα για την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης

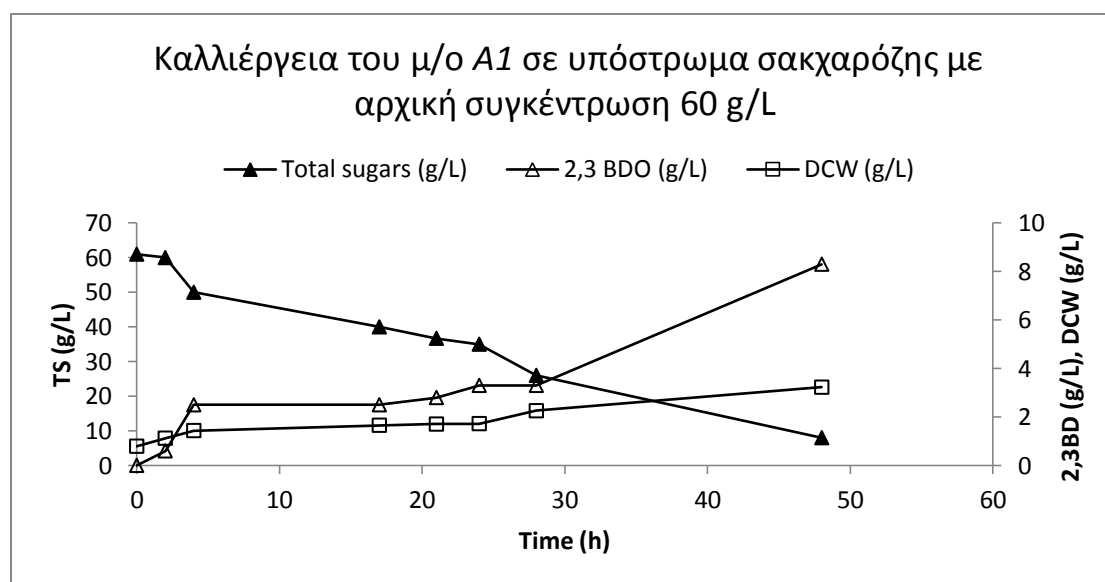
Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζεται η κατανάλωση σακχαρόζης με αρχική συγκέντρωση 30 g/L και η παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης, από το βάκιλο A1.



**Γράφημα III.1.1-1:** Κινητική της παραγωγής βιομάζας (DCW), της κατανάλωσης σακχαρόζης (TS) και της παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης (2,3-BD) σε υγρή καλλιέργεια με πηγή άνθρακα τη σακχαρόζη σε συγκέντρωση 30 g/L.

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα, παρατηρούμε ότι ο μικροοργανισμός *A1* κατανάλωσε 30 g/L σακχαρόζη σε χρονικό διάστημα 50 ωρών, και η μέγιστη παραχθείσα ποσότητα 2,3-βουτανοδιόλης είναι 7,2 g/L. Ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης είναι  $Y_{2,3BD} = 0,24$  g/g και η παραγωγικότητα 2,3-βουτανοδιόλης είναι  $P_{2,3BD} = 0,14$  g/L/h. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, παρατηρούμε αύξηση της βιομάζας (DCW), με τελική τιμή 3,4 g/L.

Στη συνέχεια ακολούθησε ζύμωση με τον μικροοργανισμό *A1*, σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα σακχαρόζης, με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 60 g/L.



**Γράφημα III.1.1-2:** Κινητική της παραγωγής βιομάζας (DCW), της κατανάλωσης σακχαρόζης (TS) και της παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης (2,3-BD) σε υγρή καλλιέργεια με πηγή άνθρακα τη σακχαρόζη σε συγκέντρωση 60 g/L.

Στη παραπάνω ζύμωση παρατηρούμε ότι ο μικροοργανισμός *A1*, κατανάλωσε συνολικά 53 g/L σακχαρόζη σε 48ώρες, και η μέγιστη παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης είναι 8,3 g/L. Η απόδοση της ζύμωσης είναι  $Y_{2,3BD} = 0,16$  g/g και η παραγωγικότητα  $P_{2,3BD} = 0,17$  g/L/h. Ακόμη, παρατηρούμε ικανοποιητική κυτταρική ανάπτυξη του μικροοργανισμού, με μέγιστη τιμή 1,26 g/L.

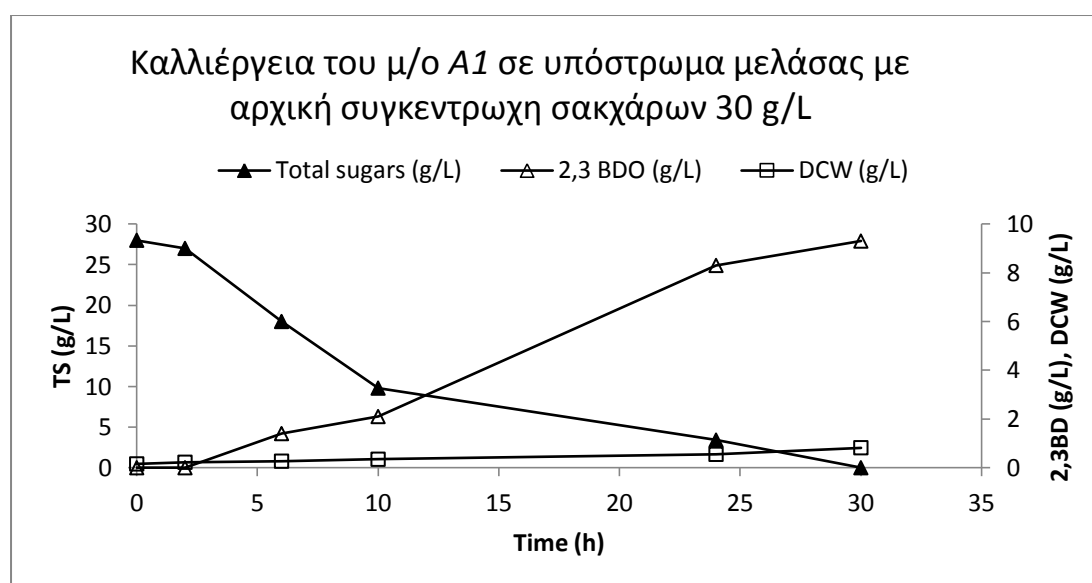
Συγκρίνοντας τις δύο παραπάνω ζυμώσεις, παρατηρούμε ότι, ενώ στη δεύτερη ζύμωση σχεδόν διπλασιάστηκε η καταναλωθείσα ποσότητα σακχάρων, η παραγόμενη ποσότητα 2,3-βουτανοδιόλης παρέμεινε και στις δύο ζυμώσεις στα ίδια επίπεδα



(περίπου 8 g/L). Καθιστώντας έτσι τη πρώτη ζύμωση πιο αποδοτική σε σχέση με τη δεύτερη.

Στη συνέχεια ακολούθησε ζύμωση του μικροοργανισμού *A1* σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα την ακάθαρτη γλυκερόλη σε συγκέντρωση 30 g/L. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης τα σάκχαρα παρέμειναν στο ίδιο επίπεδο, επομένως δεν παρατηρήθηκε κατανάλωση του υποστρώματος. Επίσης δεν υπήρξε παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης. Έτσι λοιπόν, συμπεραίνουμε ότι ο μικροοργανισμός δεν καταναλώνει γλυκερόλη.

Το τρίτο υπόστρωμα, όπου μελετήθηκε η ανάπτυξη του βάκιλου *A1* είναι η μελάσα, με αρχική συγκέντρωση ολικών σακχάρων 30 g/L.

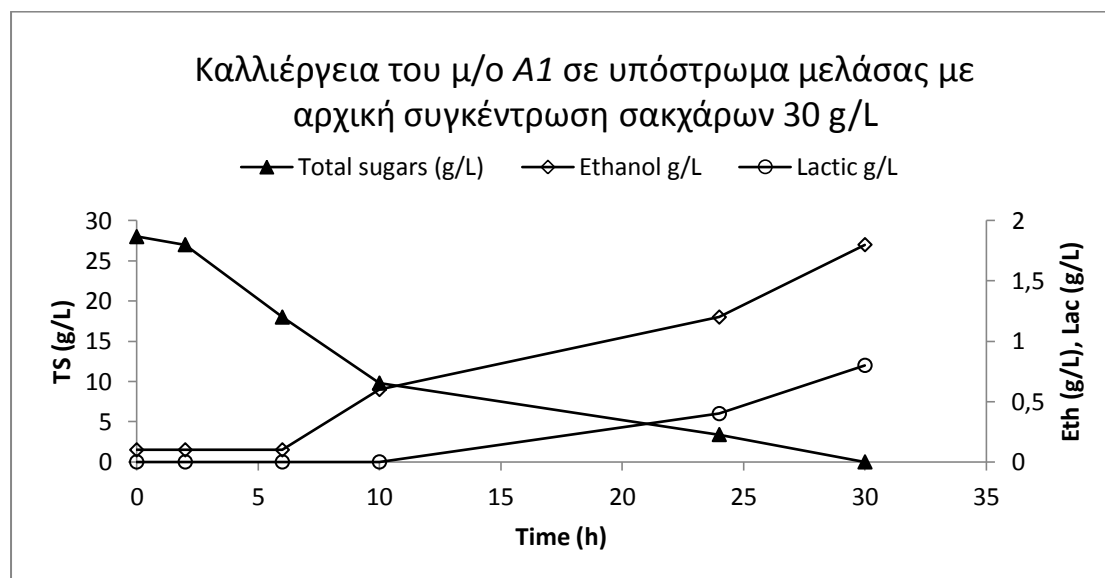


**Γράφημα III.1.1-3:** Κινητική της παραγωγής βιομάζας (DCW), της κατανάλωσης μελάσας (TS), και της παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης (2,3-BDO) σε γρήγη καλλιέργεια με πηγή άνθρακα τη μελάσα, με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 30 g/L.

Η παραπάνω καλλιέργεια του μικροοργανισμού *A1* πραγματοποιήθηκε σε υπόστρωμα ακάθαρτης μελάσας συγκέντρωσης 60 g/L. Όπως αναφέραμε και στην εισαγωγή, η μελάσα αποτελείται από 50% σάκχαρα και το υπόλοιπο 50% από άλλα συστατικά. Επομένως, η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων που χρησιμοποιήθηκε στη παραπάνω ζύμωση είναι 30 g/L. Σύμφωνα με το διάγραμμα ο μικροοργανισμός κατανάλωσε πλήρως τα διαθέσιμα σάκχαρα σε χρονικό διάστημα 30 ωρών, και η μέγιστη παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης είναι 9,3 g/L. Η απόδοση της ζύμωσης είναι

$Y_{2,3BD} = 0,33$  g/g και η παραγωγικότητα  $P_{2,3BD} = 0,31$  g/L/h. Επίσης, παρατηρούμε ικανοποιητική κυτταρική ανάπτυξη του μικροοργανισμού, με τη μέγιστη τιμή κυτταρικής μάζας να φτάνει τα 0,82 g/L.

Στο διάγραμμα που ακολουθεί, παρατηρούμε τη παραγωγή των δευτερογενών προϊόντων, από το βάκιλο *A1*, στην ίδια καλλιέργεια με θρεπτικό υπόστρωμα τη μελάσα με συγκέντρωση ολικών σακχάρων 30 g/L.



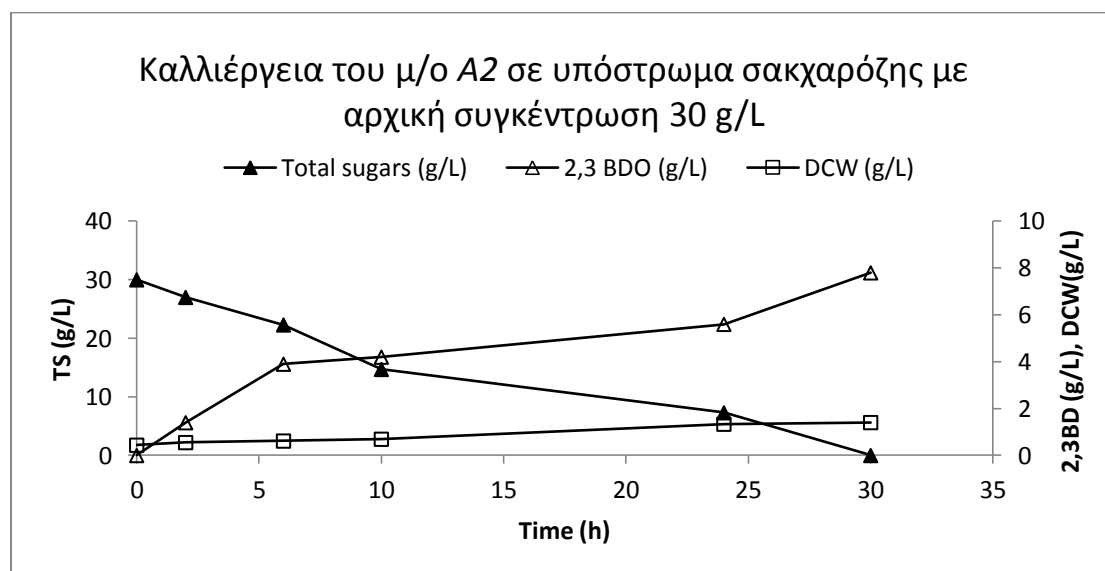
**Γράφημα III.1.1-4:** Κινητική της παραγωγής αιθανόλης (Ethanol), της κατανάλωσης μελάσας (TS) και της παραγωγής γαλακτικού οξέος (Lactic) σε υγρή καλλιέργεια με πηγή άνθρακα τη μελάσα, με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 30 g/L.

Συμφώνα με το διάγραμμα ο μικροοργανισμός κατανάλωσε πλήρως τα διαθέσιμα σάκχαρα σε χρονικό διάστημα 30 ωρών. Η μέγιστη παραγωγή αιθανόλης είναι 1,8 g/L, με συντελεστή απόδοσης αιθανόλης  $Y_{Eth} = 0,06$  g/g. Ακόμη, η μέγιστη παραγωγή γαλακτικού οξέος είναι 0,8 g/L με συντελεστή απόδοσης γαλακτικού οξέος  $Y_{Lac} = 0,03$  g/g.

Σε σχέση με την πρώτη ζύμωση, όπου η συγκέντρωση των ολικών σακχάρων είναι ίδια (σακχαρόζη 30 g/L), παρατηρούμε ότι ο βάκιλος *A1* κατανάλωσε ευκολότερα τα διαθέσιμα σάκχαρα, σε χρονικό διάστημα 30 ωρών έναντι των 50 ωρών στη πρώτη ζύμωση. Ακόμη η απόδοση της ζύμωσης είναι υψηλότερη  $Y_{2,3BD} = 0,33$  g/g σε σχέση με την απόδοση της πρώτης ζύμωσης  $Y_{2,3BD} = 0,24$  g

### III.1.2 Καλλιέργεια του μ/ο A2 σε διάφορες πηγές άνθρακα για την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης

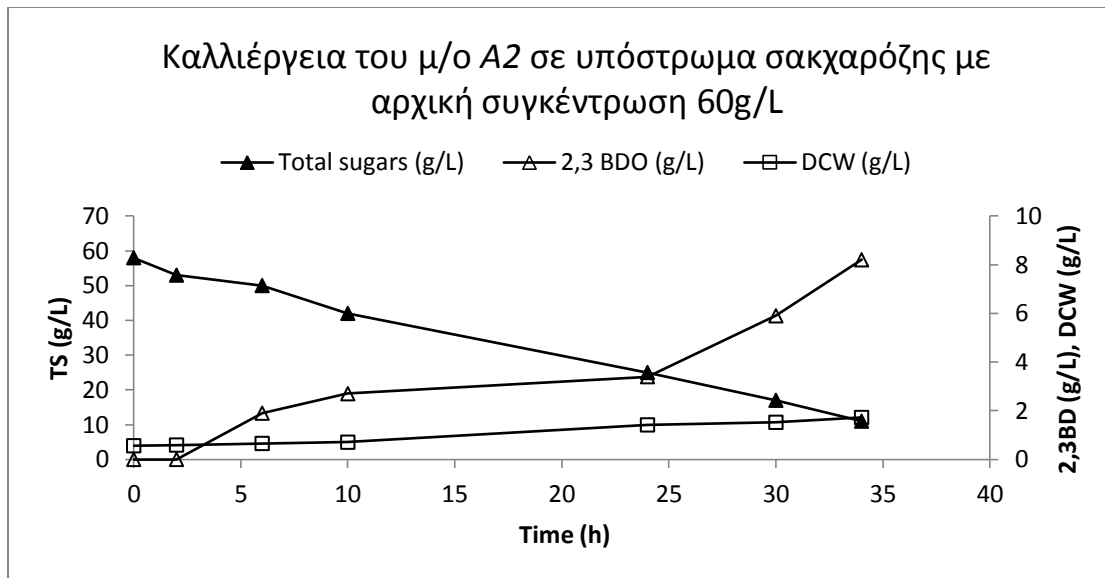
Ο δεύτερος μικροοργανισμός ο οποίος μελετήθηκε για την ικανότητα του να παράγει 2,3-βουτανοδιόλη, είναι ο βάκιλος *A2*, ο οποίος ανήκει στην οικογένεια *Raenibacillaceae*.



**Γράφημα III.1.2-1:** Κινητική της παραγωγής βιομάζας (DCW), της κατανάλωσης σακχαρόζης (TS) και της παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης (2,3-BD) σε υγρή καλλιέργεια με πηγή άνθρακα τη σακχαρόζη σε συγκέντρωση 30 g/L.

Στο παραπάνω διάγραμμα παρουσιάζεται η κατανάλωση σακχαρόζης με αρχική συγκέντρωση 30 g/L και η παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης, από το βάκιλο *A2*. Σύμφωνα με το διάγραμμα, παρατηρούμε ότι ο μικροοργανισμός *A2* κατανάλωσε 30 g/L σακχαρόζη σε χρονικό διάστημα 30 ωρών, και η μέγιστη παραχθείσα ποσότητα 2,3-βουτανοδιόλης είναι 7,8 g/L. Η απόδοση της ζύμωσης είναι  $Y_{2,3BD} = 0,26$  g/g και η παραγωγικότητα  $P_{2,3BD} = 0,2$  g/L/h. Επίσης, κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, παρατηρούμε αύξηση της βιομάζας (DCW), με τελική τιμή 1,4 g/L.

Στη συνέχεια ακολούθησε ζύμωση με τον βάκιλο *A2*, σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα σακχαρόζης με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 60 g/L.

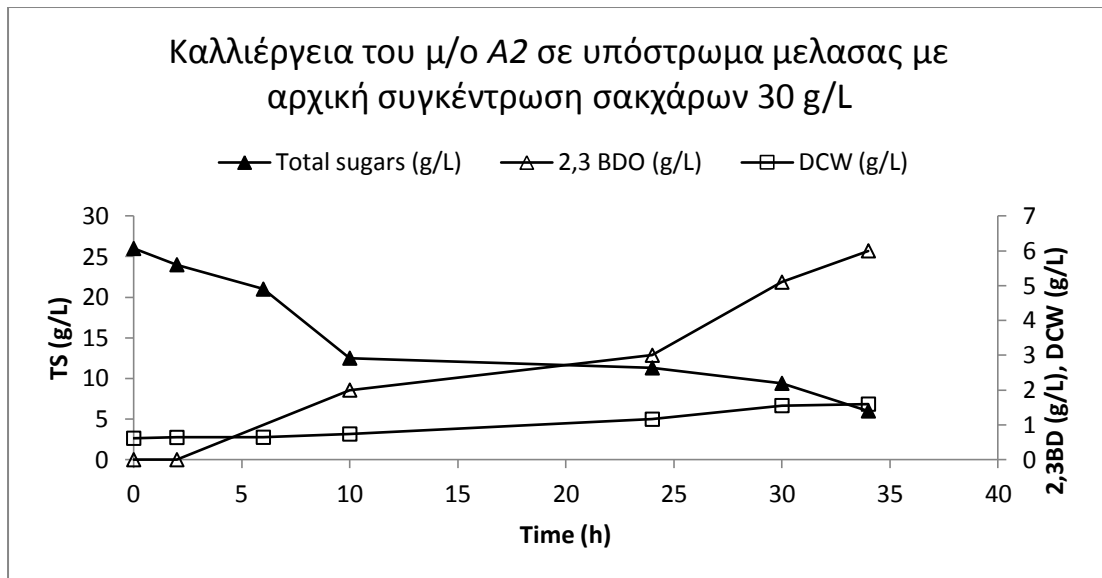


**Γράφημα III.1.2-2:** Κινητική της παραγωγής βιομάζας (DCW), της κατανάλωσης σακχαρόζης (TS) και της παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης (2,3-BD) σε υγρή καλλιέργεια με πηγή άνθρακα τη σακχαρόζη σε συγκέντρωση 60 g/L.

Στη παραπάνω ζύμωση παρατηρούμε ότι ο μικροοργανισμός **A2**, κατανάλωσε συνολικά 47 g/L σακχαρόζη σε 34 ώρες, και η μέγιστη παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης είναι 8,2 g/L. Με δεδομένο ότι η αρχική συγκέντρωση σακχαρόζης είναι 58 g/L, παρατηρούμε ότι παρέμειναν ακατανάλωτα από το μικροοργανισμό 11 g/L. Η απόδοση της ζύμωσης είναι  $Y_{2,3BD}=0,17$  g/g και η παραγωγικότητα  $P_{2,3BD}=0,24$  g/L/h. Ο μικροοργανισμός παρουσίασε ικανοποιητική κυτταρική ανάπτυξη, με μέγιστη τιμή 1,72 g/L.

Στη συνέχεια ακολούθησε ζύμωση του μικροοργανισμού **A2** σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα την ακάθαρτη γλυκερόλη σε συγκέντρωση 30 g/L. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης δεν παρατηρήθηκε κατανάλωση του υποστρώματος. Επίσης δεν υπήρξε παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης. Επομένως, ο μικροοργανισμός δεν καταναλώνει γλυκερόλη.

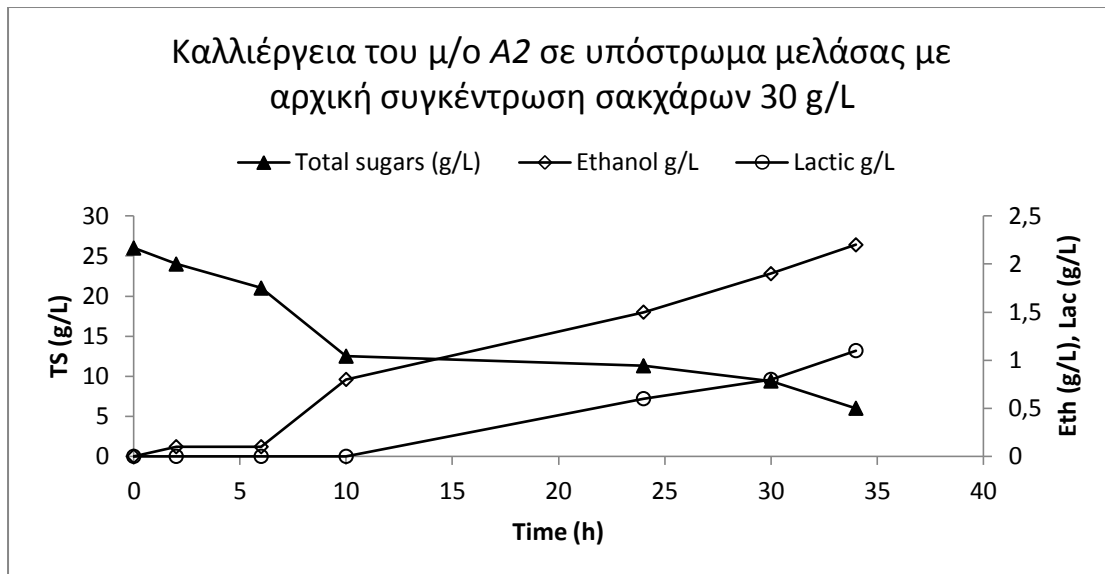
Το τρίτο υπόστρωμα, όπου μελετήθηκε η ανάπτυξη του μικροοργανισμού **A2** είναι η μελάσα, με συγκέντρωση ολικών σακχάρων 30g/L.



**Γράφημα III.1.2-3:** Κινητική της παραγωγής βιομάζας (DCW), της κατανάλωσης μελάσας (TS), και της παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης (2,3-BDO) σε γρήγη καλλιέργεια με πηγή άνθρακα τη μελάσα, με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 30 g/L.

Η παραπάνω καλλιέργεια του μικροοργανισμού *A2* πραγματοποιήθηκε σε υπόστρωμα απόβλητης μελάσας συγκέντρωσης 60 g/L, όπως έχει ήδη αναφερθεί μόνο το 50% της απόβλητης μελάσας αποτελείται από σάκχαρα και το υπόλοιπο 50% αποτελείται από άλλα συστατικά. Επομένως, η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων που χρησιμοποιήθηκε στη παραπάνω ζύμωση είναι 26 g/L. Σύμφωνα με το διάγραμμα ο μικροοργανισμός δεν κατανάλωσε πλήρως τα διαθέσιμα σάκχαρα, η καταναλωθείσα ποσότητα σακχάρων είναι 20 g/L και η μέγιστη παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης είναι 9,3 g/L. Η απόδοση της ζύμωσης είναι  $Y_{2,3BD} = 0,3$  g/g και η παραγωγικότητα  $P_{2,3BD} = 0,17$  g/L/h. Ο μικροοργανισμός παρουσίασε ικανοποιητική κυτταρική ανάπτυξη, με μέγιστη τιμή 1,26 g/L.

Στη συνέχεια, ακολουθεί διάγραμμα της ίδιας ζύμωσης, όπου παρουσιάζεται η παραγωγή των δευτερογενών μεταβολιτών.



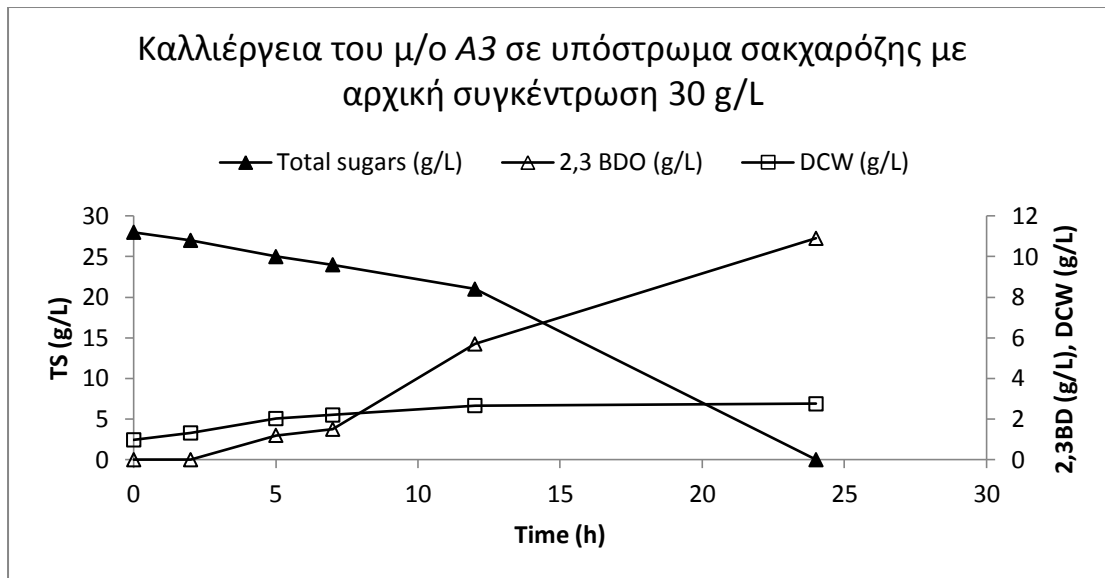
**Γράφημα III.1.2-4:** Κινητική της παραγωγής αιθανόλης (Ethanol), της κατανάλωσης μελάσας (TS), και της παραγωγής γαλακτικού οξέος (Lactic) σε υγρή καλλιέργεια με πηγή άνθρακα τη μελάσα, με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 30 g/L.

Συμφώνα με το διάγραμμα ο μικροοργανισμός δεν κατανάλωσε πλήρως τα διαθέσιμα σάκχαρα, η καταναλωθείσα ποσότητα σακχάρων είναι 20 g/L. Η μέγιστη παραγωγή αιθανόλης είναι 2,2 g/L, με συντελεστή απόδοσης αιθανόλης  $Y_{Eth}=0,11$  g/g. Ακόμη η μέγιστη παραγωγή γαλακτικού οξέος είναι 1,1 g/L με συντελεστή απόδοσης γαλακτικού οξέος  $Y_{Lac}=0,06$  g/g.

### III.1.3 Καλλιέργεια του μ/ο A3 σε διάφορες πηγές άνθρακα για την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης

Ο τρίτος μικροοργανισμός που μελετήθηκε για τις βιοχημικές του δυνατότητες, με στόχο την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης είναι ο βάκιλος A3.

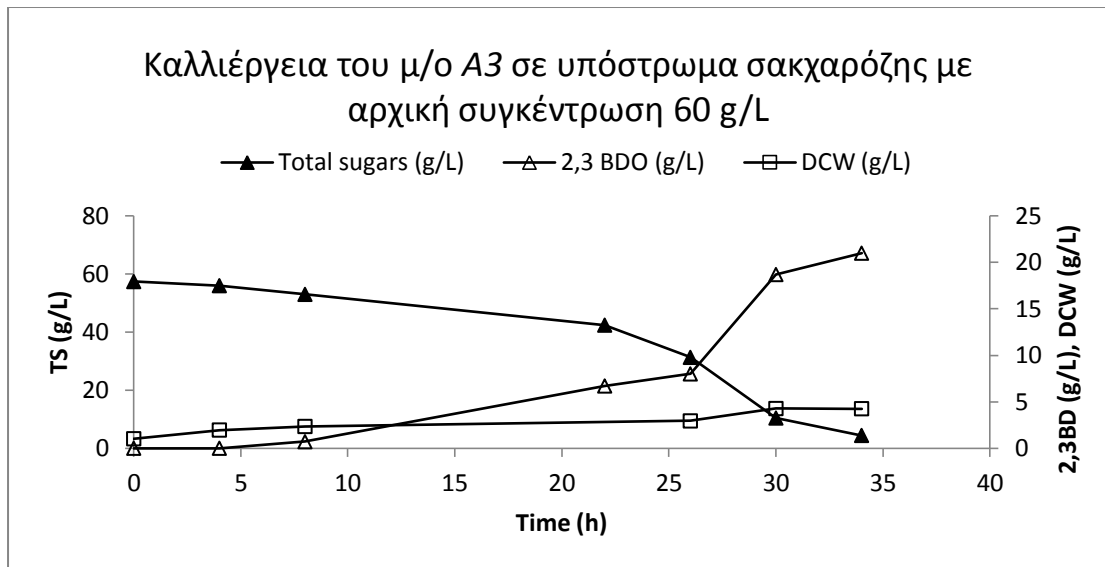
Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζεται η κατανάλωση σακχαρόζης με αρχική συγκέντρωση 30 g/L και η παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης, από το βάκιλο A3.



**Γράφημα III.1.3-1:** Κινητική της παραγωγής βιομάζας (DCW), της κατανάλωσης σακχαρόζης (TS) και της παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης (2,3-BD) σε υγρή καλλιέργεια με πηγή άνθρακα τη σακχαρόζη σε συγκέντρωση 30 g/L.

Παρατηρούμε ότι ο μικροοργανισμός *A3* κατανάλωσε πλήρως τα διαθέσιμα σάκχαρα της ζύμωσης (28 g/L σακχαρόζη) σε χρονικό διάστημα 24 ωρών, και η μέγιστη παραχθείσα ποσότητα 2,3-βουτανοδιόλης είναι 10,9 g/L. Η απόδοση της ζύμωσης είναι αρκετά ικανοποιητική  $Y_{2,3BD} = 0,4$  g/g και η παραγωγικότητα  $P_{2,3BD} = 0,45$  g/L/h. Επίσης, σημειώνεται αύξηση της κυτταρικής μάζας (DCW), με τελική τιμή 2,75 g/L.

Στη συνέχεια ακολούθησε ζύμωση με τον μ/ο *A3*, σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα σακχαρόζης, με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 60 g/L.



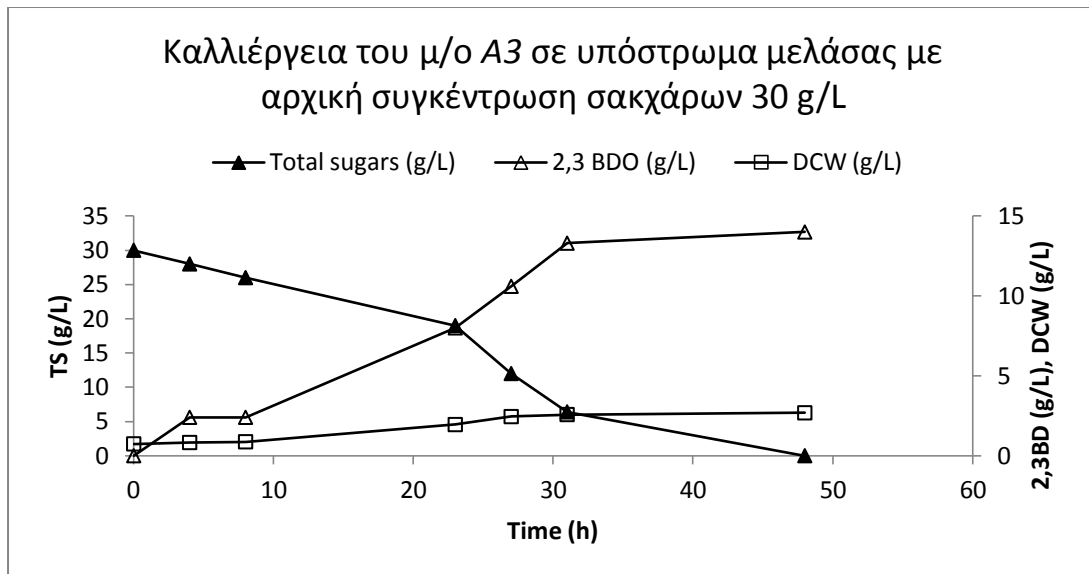
**Γράφημα III.1.3-2:** Κινητική της παραγωγής βιομάζας (DCW), της κατανάλωσης σακχαρόζης (TS) και της παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης (2,3-BD) σε υγρή καλλιέργεια με πηγή άνθρακα τη σακχαρόζη σε συγκέντρωση 60 g/L.

Παρατηρούμε ότι ο μικροοργανισμός *A3* κατανάλωσε 53 g/L σακχαρόζη σε χρονικό διάστημα 34 ωρών, και μέγιστη παραχθείσα ποσότητα 2,3-βουτανοδιόλης είναι 21 g/L. Η απόδοση της ζύμωσης είναι αρκετά ικανοποιητική  $Y_{2,3BD} = 0,4$  g/g και η παραγωγικότητα  $P_{2,3BD} = 0,62$  g/L/h. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, παρατηρούμε αύξηση της κυτταρικής μάζας (DCW), με τελική τιμή 4,26 g/L.

Στη συνέχεια ακολούθησε ζύμωση του μικροοργανισμού *A3* σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα την ακάθαρτη γλυκερόλη σε συγκέντρωση 30 g/L. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης δεν παρατηρήθηκε κατανάλωση του υποστρώματος, και δεν υπήρξε παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης. Επομένως, και αυτός ο μικροοργανισμός δεν καταναλώνει γλυκερόλη.

Το επόμενο σακχαρούχο υπόστρωμα, στο οποίο καλλιεργήθηκε ο μικροοργανισμός *A3* είναι η μελάσα, με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 30 g/L.

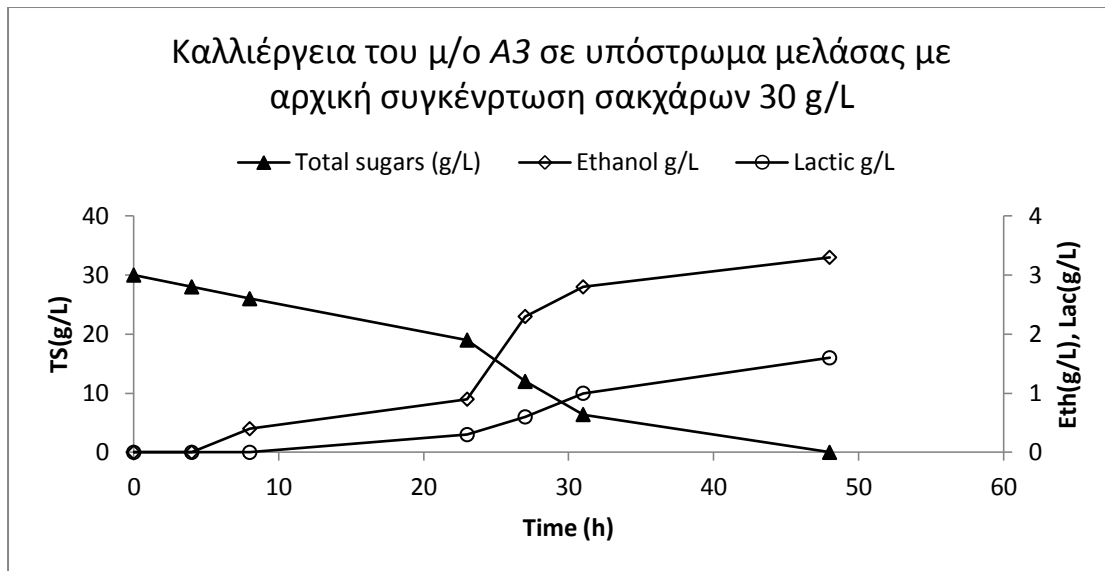




**Γράφημα III.1.3-3:** Κινητική της παραγωγής βιομάζας (DCW), της κατανάλωσης μελάσας (TS), και της παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης (2,3-BDO) σε γρήγη καλλιέργεια με πηγή άνθρακα τη μελάσα, με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 30 g/L.

Η παραπάνω καλλιέργεια του μικροοργανισμού *A3* πραγματοποιήθηκε σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα τη μελάσα, με συγκέντρωση 60 g/L. Με δεδομένο ότι, η απόβλητη μελάσα αποτελείται από 50% σάκχαρα και το υπόλοιπο 50% είναι άλλα συστατικά σε μικρότερες συγκεντρώσεις, η αρχική συγκέντρωση των διαθέσιμων σακχάρων στη παραπάνω ζύμωση είναι 30 g/L. Σύμφωνα με το διάγραμμα, ο *A3* κατανάλωσε πλήρως τη ποσότητα των διαθέσιμων σακχάρων σε χρονικό διάστημα 48 ωρών, και η μέγιστη παραχθείσα ποσότητα 2,3-βουτανοδιόλης είναι 14 g/L. Η απόδοση της ζύμωσης είναι ιδιαίτερα ικανοποιητική  $Y_{2,3BD} = 0,46$  g/g, με δεδομένο ότι η θεωρητική απόδοση για την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης είναι 0,5 g/L. Ακόμη, η παραγωγικότητα της ζύμωσης είναι  $P_{2,3BD} = 0,29$  g/L/h, και η κυτταρικής μάζα (DCW) είναι αυξανόμενη με μέγιστη τιμή 2,68 g/L.

Στη συνέχεια, ακολουθεί διάγραμμα της ίδιας ζύμωσης, όπου παρουσιάζεται η παραγωγή των δευτερογενών μεταβολιτών.



**Γράφημα III.1.3-4:** Κινητική της παραγωγής αιθανόλης (Ethanol), της κατανάλωσης μελάσας (TS), και της παραγωγής γαλακτικού οξέος (Lactic) σε υγρή καλλιέργεια με πηγή άνθρακα τη μελάσα, με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 30 g/L.

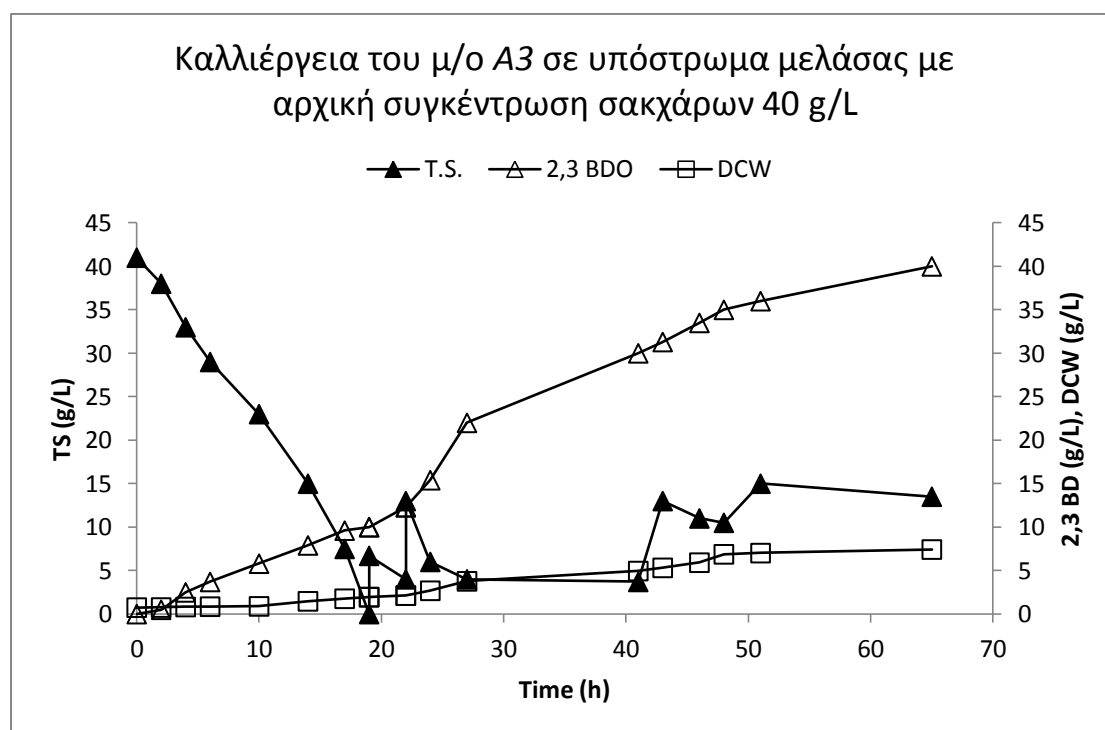
Συμφώνα με το διάγραμμα ο μικροοργανισμός κατανάλωσε πλήρως τα διαθέσιμα σάκχαρα (30 g/L), σε χρονικό διάστημα 48 ωρών. Η μέγιστη παραγωγή αιθανόλης είναι 3,3 g/L, με συντελεστή απόδοσης αιθανόλης  $Y_{Eth}=0,11$  g/g. Ακόμη η μέγιστη παραγωγή γαλακτικού οξέος είναι 1,6 g/L με συντελεστή απόδοσης γαλακτικού οξέος  $Y_{Lac}=0,05$  g/g.

### III.2 Ανάπτυξη του μ/ο A3 σε ημισυνεχή καλλιέργεια (fed-Batch culture) για την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης

Με βάση τα δεδομένα των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν σε κλειστές καλλιέργειες (Batch cultures) για τους μικροοργανισμούς *A1*, *A2* & *A3*, παρατηρούμε ότι ο μικροοργανισμός *A3* παρουσιάζει τους μεγαλύτερους συντελεστές απόδοσης παράγωγης 2,3-βουτανοδιόλης. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε ημισυνεχής καλλιέργεια (Fed-Batch culture) του μικροοργανισμού *A3* με πηγή άνθρακα τη μελάσα.

Η ημισυνεχής καλλιέργεια έγινε σε βιοαντιδραστήρα προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αύξηση του υπό εξέταση στελέχους, σε όσο το δυνατόν πιο

ελεγχόμενες συνθήκες ώστε να μεγιστοποιηθεί η παραγωγή της 2,3-βουτανοιδιόλης. Για την επίτευξη αναερόβιων συνθηκών, εφαρμόστηκε εμφύσηση καθαρού αζώτου μετά την αποστείρωση και πριν τον εμβολιασμό. Ο μικροοργανισμός *A3* καλλιεργήθηκε σε βιοαντιδραστήρα 3-L (New Brunswick Scientific, USA) με ενεργό όγκο 1.5 L με υλικό εκκίνησης τη μελάσα με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 40 g/L. Κατά τη διάρκεια της ημισυνεχούς καλλιέργειας γινόταν προσθήκη πυκνού διαλύματος εμπορικής σακχαρόζης υπό ασηπτικές συνθήκες. Στη συνέχεια, από τις 22 ώρες και μετά, ενεργοποιήθηκε αυτόματη ρήψη πυκνού διαλύματος σακχαρόζης. Το pH ήταν ελεγχόμενο, σε τιμή 6.0-6.3 και αυτό το πετυχαίναμε με προσθήκη καυστικού νατρίου NaOH 5M. Στο γράφημα που ακολουθεί, παρουσιάζεται η κινητική αύξησης του βάκιλου *A3* σε ημι-συνεχή καλλιέργεια σε υπόστρωμα μελάσας με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 40 g/L.



**Γράφημα III.4-1:** Κινητική της παραγωγής βιομάζας (DCW), της κατανάλωσης μελάσας (TS), και της παραγωγής 2,3-βουτανοιδιόλης (2,3-BDO) σε ημισυνεχή καλλιέργεια (Fed-Batch) με πηγή άνθρακα τη μελάσα, με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 40 g/L.

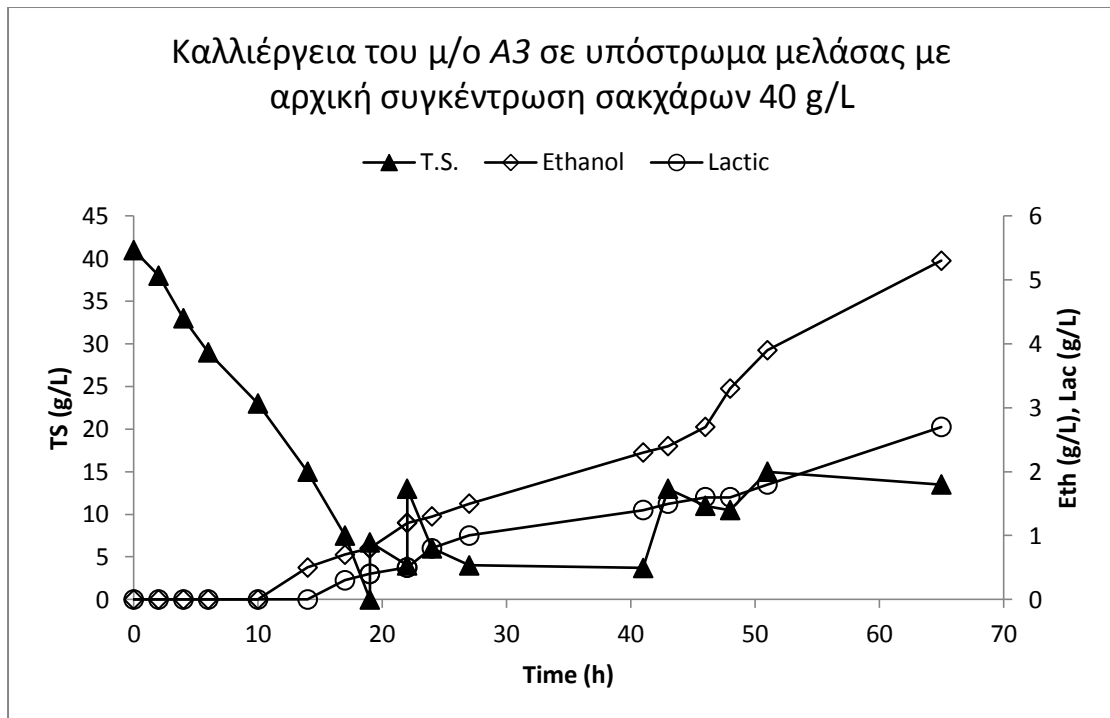
Σύμφωνα με το παραπάνω γράφημα ο μικροοργανισμός *A3* κατανάλωσε πλήρως τα διαθέσιμα σάκχαρα (40 g/L) σε χρονική διάρκεια 19 ωρών. Στη συνέχεια

πραγματοποιήθηκε προσθήκη πυκνού διαλύματος εμπορικής σακχαρόζης (feeding) 6,7 g/L. Μετά από 3 ώρες, ο μικροοργανισμός είχε ήδη καταναλώσει 2,7 g/L σάκχαρα, κι έτσι πραγματοποιήθηκε ένα ακόμα feeding 9 g/L.

Από τις 22 ώρες και μετά, ενεργοποιήθηκε αυτόματη ρήψη πυκνού διαλύματος σακχαρόζης, ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Για τις επόμενες 43 ώρες, εφαρμόστηκε συνεχής ροή πυκνού διαλύματος εμπορικής σακχαρόζης 2,5 g/L. Στις 22 ώρες όπου ξεκίνησε η εφαρμογή της συνεχούς ροής, υπήρχαν ήδη στο βιοαντιδραστήρα 13 g/L σάκχαρα. Επομένως, τα διαθέσιμα σάκχαρα από τις 22 ώρες και μετά είναι 120,5 g/L. Τα σάκχαρα που δεν καταναλώθηκαν είναι σύμφωνα με το γράφημα 76,7 g/L. Έτσι τα καταναλωθέντα σάκχαρα από τις 22 ώρες και μετά είναι 43,8 g/L. Άρα, τα συνολικά καταναλωθέντα σάκχαρα, συμπεριλαμβάνοντας και τα σάκχαρα που καταναλώθηκαν στην αρχή πριν την εφαρμογή της συνεχούς ροής, είναι 87,5 g/L.

Ακόμη, σύμφωνα με το παραπάνω γράφημα, η μέγιστη παραχθείσα ποσότητα 2,3-βουτανοδιόλης είναι 40 g/L σε χρονική διάρκεια 65 ωρών. Η απόδοση της ζύμωσης είναι ιδιαίτερα ικανοποιητική  $Y_{2,3BD} = 0,46$  g/g, με δεδομένο ότι η θεωρητική απόδοση για την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης είναι 0,52 g/L. Η παραγωγικότητα της ζύμωσης είναι  $P_{2,3BD} = 0,62$  g/L/h, και η κυτταρικής μάζας (DCW) είναι αυξανόμενη με μέγιστη τιμή 7,43 g/L.

Στη συνέχεια, ακολουθεί διάγραμμα της ίδιας ζύμωσης, όπου παρουσιάζεται η παραγωγή των δευτερογενών μεταβολιτών.



**Γράφημα III.4-2:** Κινητική της παραγωγής αιθανόλης (Ethanol), της κατανάλωσης μελάσας (TS), και της παραγωγής γαλακτικού οξέος (Lactic) σε ημισυνεχή καλλιέργεια (Fed-Batch) με πηγή άνθρακα τη μελάσα, με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 40 g/L.

Συμφώνα με το παραπάνω διάγραμμα ο μικροοργανισμός κατανάλωσε συνολικά 87,5 g/L, σε χρονικό διάστημα 65 ωρών. Η παραγωγή αιθανόλης άρχισε μετά από 14 ώρες, και η μέγιστη παραγωγή αιθανόλης είναι 5,3 g/L, με συντελεστή απόδοσης αιθανόλης  $Y_{Eth} = 0,06$  g/g. Ενώ η παραγωγή γαλακτικού οξέος, παρατηρείται μετά από 17 ώρες ζύμωσης, και η μέγιστη παραγωγή γαλακτικού οξέος είναι 2,7 g/L με συντελεστή απόδοσης γαλακτικού οξέος  $Y_{Lac} = 0,03$  g/g.

## IV. ΣΥΝΟΨΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

### IV.1 Μελέτη των μικροοργανισμών σε καλλιέργεια σακχαρόζης με συγκέντρωση ολικών σακχάρων 30 g/L για παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης

Αρχικά και οι τρεις μικροοργανισμοί, *A1*, *A2* & *A3*, αναπτύχθηκαν σε υγρή καλλιέργεια με θρεπτικό υπόστρωμα τη σακχαρόζη με συγκέντρωση ολικών σακχάρων 30 g/L. Οι ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν ήταν κλειστές καλλιέργειες (Batch cultures) υπό αναερόβιες συνθήκες, σε φιάλες Duran 1-L με ενεργό όγκο 0,8 L, υπό ανάδευση 180 rpm, με εμφύσηση αζώτου για 15 λεπτά και σε θερμοκρασία  $T=30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Η τιμή του pH στην αρχή των ζυμώσεων ήταν  $\text{pH}=6,8\pm 0,2$ , στη συνέχεια κατά τη διάρκεια της ζύμωσης διαμορφωνόταν από τους ίδιους τους μικροοργανισμούς, όπου λάμβανε τη τιμή  $\text{pH}=6,3\pm 0,2$ .

Στον παρακάτω πίνακα, παρουσιάζεται η κατανάλωση των σακχάρων, η παραγωγή του κύριου μεταβολικού προϊόντος (2,3-βουτανοδιόλη) και η αύξηση της βιομάζας για κάθε έναν από τους μικροοργανισμούς.

**Πίνακας IV.1-1:** Παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης κατά την αύξηση των βακτηρίων σε θρεπτικό υπόστρωμα σακχαρόζης με συγκέντρωση 30 g/L.

<b>μ/ο</b>	<b>Χρόνος (h)</b>	<b>Κατ. Υπόστρωμα (g/L)</b>	<b>Βιομάζα (g/L)</b>	<b>2,3BD (g/L)</b>	<b>Y<sub>2,3BD</sub> (g/g)</b>
<i>A1</i>	50	30	3,4	7,14	0,24
<i>A2</i>	30	30	1,4	7,8	0,26
<i>A3</i>	24	28	2,75	10,9	0,4

**Χρόνος:** η διάρκεια της ζύμωσης (h), **Κατ. Υπόστρωμα:** συγκέντρωση ολικών σακχάρων που καταναλώθηκαν (g/L) **Βιομάζα:** η μέγιστη βιομάζα (g/L), **2,3BD:** η συγκέντρωση της 2,3-βουτανοδιόλης (g/L), **Y<sub>2,3BD</sub>:** ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης προς καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g).

Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα (Πίνακας IV.1-1), παρατηρούμε ότι ο μικροοργανισμός με τη μεγαλύτερη παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης, είναι ο *A3*. Ο οποίος παράγαγε 10,9 g/L 2,3-βουτανοδιόλης σε χρονική διάρκεια 24 ωρών. Επίσης,

ο ίδιος βάκιλος, παρουσίασε και το μεγαλύτερο συντελεστή απόδοσης παράγωγης 2,3-βουτανοδιόλης,  $Y_{2,3BD} = 0,4$  g/g. Ο συγκεκριμένος συντελεστής απόδοσης είναι αρκετά ικανοποιητικός, με δεδομένο ότι ο θεωρητικός συντελεστής απόδοσης 2,3-βουτανοδιόλης είναι 0,52 g/L. Αντίθετα, οι άλλοι δύο μικροοργανισμοί *A1* και *A2*, σημείωσαν χαμηλότερη παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης, περίπου 7,5 g/L σε μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε σχέση με τον *A3*. Επίσης, οι δυο μικροοργανισμοί παρουσίασαν πολύ χαμηλό συντελεστή απόδοσης παράγωγης 2,3-βουτανοδιόλης, με τιμές  $Y_{2,3BD} = 0,24$  g/g για τον *A1* και  $Y_{2,3BD} = 0,26$  g/g για τον *A2*.

Ακόμη, τη μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας, παρουσιάζει ο βάκιλος *A1* (3,46 g/L), ακολουθεί ο βάκιλος *A3* (2,75 g/L), και τέλος ο μικροοργανισμός *A2* με τη μικρότερη παραγωγή βιομάζας (1,4 g/L).

Στη συνέχεια, ακολουθεί ο πίνακας (Πίνακας IV.1-2), όπου παρουσιάζεται η παραγωγή δευτερογενών μεταβολικών προϊόντων, αιθανόλης και γαλακτικού οξέος, με υπόστρωμα τη σακχαρόζη με συγκέντρωση ολικών σακχάρων 30g/L.

**Πίνακας IV.1-2:** Παραγωγή αιθανόλης και γαλακτικού οξέος κατά την αύξηση των βακτηρίων σε θρεπτικό υπόστρωμα σακχαρόζης με συγκέντρωση ολικών σακχάρων 30g/L.

μ/ο	Χρόνος (h)	Κατ. Υπόστρωμα (g/L)	Αιθανόλη (g/L)	$Y_{Eth}$ (g/g)	Γαλακτικό οξύ (g/L)	$Y_{Lac}$ (g/g)
<i>A1</i>	50	30	1,7	0,06	0,7	0,02
<i>A2</i>	30	30	1,6	0,05	0,8	0,03
<i>A3</i>	24	28	2,4	0,09	0,9	0,03

**Χρόνος:** η διάρκεια της ζύμωσης (h), **Κατ. Υπόστρωμα:** συγκέντρωση ολικών σακχάρων που καταναλώθηκαν (g/L), **Αιθανόλη:** η συγκέντρωση αιθανόλης (g/L),  **$Y_{Eth}$ :** ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής αιθανόλης προς καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g), **Γαλακτικό οξύ:** η συγκέντρωση γαλακτικού οξέος (g/L),  **$Y_{Lac}$ :** ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής γαλακτικού οξέος προς καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g).

Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα, παρατηρούμε ότι ο βάκιλος με τη μέγιστη παραχθείσα ποσότητα αιθανόλης είναι ο *A3*, με παραγωγή 2,4 g/L, και ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής αιθανόλης είναι  $Y_{Eth} = 0,09$  g/g. Ενώ, οι βάκιλοι *A1* & *A2*, παράγαγαν περίπου 1,6 g/L αιθανόλη, και ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής αιθανόλης λαμβάνει τη τιμή  $Y_{Eth} = 0,05$  g/g. Επίσης, η παραγωγή γαλακτικού οξέος

είναι περίπου 1 g/L, και για τους τρεις μικροοργανισμούς, και ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής γαλακτικού οξέος είναι  $Y_{Lac}=0,03$  g/g.

#### IV.2 Μελέτη των μικροοργανισμών σε καλλιέργεια σακχαρόζης με συγκέντρωση ολικών σακχάρων 60 g/L για παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης

Στη συνέχεια, οι τρεις μικροοργανισμοί *A1*, *A2* & *A3*, αναπτύχθηκαν σε υγρή καλλιέργεια με θρεπτικό υπόστρωμα τη σακχαρόζη με συγκέντρωση ολικών σακχάρων 60 g/L. Οι συνθήκες καλλιέργειας παρέμειναν ακριβώς ίδιες με τις προηγούμενες ζυμώσεις. Η μοναδική διαφορά αυτών των ζυμώσεων με τις προηγούμενες, είναι ο διπλασιασμός της αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων στο θρεπτικό υπόστρωμα των καλλιεργειών.

Στον παρακάτω πίνακα, παρουσιάζεται η κατανάλωση των σακχάρων η παραγωγή του κύριου μεταβολικού προϊόντος (2,3-βουτανοδιόλη), και η ανάπτυξη της βιομάζας για κάθε έναν από τους μικροοργανισμούς.

**Πίνακας IV.2-1:** Παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης κατά την αύξηση των βακτηρίων σε θρεπτικό υπόστρωμα σακχαρόζης με συγκέντρωση 60 g/L.

<b>μ/ο</b>	<b>Χρόνος (h)</b>	<b>Κατ. Υπόστρωμα (g/L)</b>	<b>Βιομάζα (g/L)</b>	<b>2,3BD (g/L)</b>	<b><math>Y_{2,3BD}</math> (g/g)</b>
<i>A1</i>	48	53	3,23	8,3	0,16
<i>A2</i>	34	47	1,72	8,2	0,17
<i>A3</i>	34	53	4,26	21	0,4

**Χρόνος:** η διάρκεια της ζύμωσης (h), **Κατ. Υπόστρωμα:** συγκέντρωση ολικών σακχάρων που καταναλώθηκαν (g/L) **Βιομάζα:** η μέγιστη βιομάζα (g/L), **2,3BD:** η συγκέντρωση της 2,3-βουτανοδιόλης (g/L),  **$Y_{2,3BD}$ :** ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης προς καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g).

Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα (Πίνακας IV.2-1), παρατηρούμε ότι ο μικροοργανισμός με τη μεγαλύτερη παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης, είναι ο *A3*. Ο



οποίος παρήγαγε 21 g/L 2,3-βουτανοδιόλης σε χρονική διάρκεια 34 ωρών. Επίσης, ο ίδιος βάκιλος, παρουσίασε και το μεγαλύτερο συντελεστή απόδοσης παράγωγης 2,3-βουτανοδιόλης,  $Y_{2,3BD} = 0,4$  g/g. Ο συγκεκριμένος συντελεστής απόδοσης είναι αρκετά ικανοποιητικός, με δεδομένο ότι ο θεωρητικός συντελεστής απόδοσης 2,3-βουτανοδιόλης είναι 0,52 g/L. Αντίθετα, οι άλλοι δύο μικροοργανισμοί *A1* και *A2*, σημείωσαν πολύ χαμηλότερη παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης, περίπου 8 g/L. Επίσης, οι δυο μικροοργανισμοί παρουσίασαν πολύ χαμηλό συντελεστή απόδοσης παράγωγης 2,3-βουτανοδιόλης, με τιμές  $Y_{2,3BD} = 0,16$  g/g για τον *A1* και  $Y_{2,3BD} = 0,17$  g/g για τον *A2*. Ακόμη, τη μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας, παρουσιάζει ο μ/ο *A3* (4,26 g/L), ακολουθεί ο μ/ο *A1* (3,23 g/L), και τέλος ο μ/ο *A2* με τη μικρότερη παραγωγή βιομάζας (1,72 g/L).

Στη συνέχεια, ακολουθεί ο πίνακας (Πίνακας IV.2-2), όπου παρουσιάζεται η παραγωγή των δευτερογενών μεταβολικών προϊόντων, της αιθανόλης και του γαλακτικού οξέος, με πηγή άνθρακα τη σακχαρόζη με συγκέντρωση ολικών σακχάρων 60 g/L.

**Πίνακας IV.2-2:** Παραγωγή αιθανόλης και γαλακτικού οξέος κατά την αύξηση των βακτηρίων σε θρεπτικό υπόστρωμα σακχαρόζης με συγκέντρωση ολικών σακχάρων 30g/L.

μ/ο	Χρόνος (h)	Κατ. Υπόστρωμα (g/L)	Αιθανόλη (g/L)	$Y_{Eth}$ (g/g)	Γαλακτικό οξύ (g/L)	$Y_{Lac}$ (g/g)
<i>A1</i>	48	53	2,4	0,05	1,9	0,04
<i>A2</i>	34	47	2,2	0,05	1,7	0,04
<i>A3</i>	34	53	3,6	0,07	1,3	0,02

**Χρόνος:** η διάρκεια της ζύμωσης (h), **Κατ. Υπόστρωμα:** συγκέντρωση ολικών σακχάρων που καταναλώθηκαν (g/L), **Αιθανόλη:** η συγκέντρωση αιθανόλης (g/L),  **$Y_{Eth}$ :** ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής αιθανόλης προς καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g), **Γαλακτικό οξύ:** η συγκέντρωση γαλακτικού οξέος (g/L),  **$Y_{Lac}$ :** ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής γαλακτικού οξέος προς καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g).

Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα (Πίνακας IV.2-2), παρατηρούμε ότι ο βάκιλος με τη μεγαλύτερη παραγωγή αιθανόλης είναι ο *A3*, με παραχθείσα ποσότητα 3,6 g/L, και ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής αιθανόλης είναι  $Y_{Eth} = 0,07$  g/g. Ενώ,

οι βάκιλοι *A1* & *A2*, παρήγαγαν περίπου 2,3 g/L αιθανόλη, και ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής αιθανόλης λαμβάνει τη τιμή  $Y_{Eth}=0,05$  g/g. Επίσης, η παραγωγή γαλακτικού οξέος είναι περίπου 1,8 g/L και για τους δύο μικροοργανισμούς, *A1* & *A2*, και ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής γαλακτικού οξέος είναι  $Y_{Lac}=0,04$  g/g. Ενώ, ο *A3*, παρήγαγε μικρότερη ποσότητα γαλακτικού οξέος, ίση με 1,3 g/L, και ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής γαλακτικού οξέος είναι  $Y_{Lac}=0,02$  g/g.

### IV.3 Μελέτη των μικροοργανισμών σε καλλιέργεια μελάσας με συγκέντρωση ολικών σακχάρων 30 g/L για παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης.

Το επόμενο υπόστρωμα στο οποίο πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις με τους μικροοργανισμούς *A1*, *A2* & *A3*, είναι η μελάσα με συγκέντρωση ολικών σακχάρων 30 g/L. Οι συνθήκες καλλιέργειας παρέμειναν ακριβώς ίδιες με τις προηγούμενες ζυμώσεις. Δηλαδή, πραγματοποιήθηκαν κλειστές καλλιέργειες (Batch cultures) υπό αναερόβιες συνθήκες, σε φιάλες Duran 1-L με ενεργό όγκο 0.8 L, υπό ανάδευση 180 rpm, με εμφύσηση αζώτου για 15 λεπτά και σε θερμοκρασία  $T=30$  °C.

Στον παρακάτω πίνακα, παρουσιάζεται η κατανάλωση των σακχάρων, η παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης, και η ανάπτυξη της βιομάζας για κάθε έναν από τους μικροοργανισμούς.

**Πίνακας IV.3-1:** Παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης κατά την αύξηση των βακτηρίων σε θρεπτικό υπόστρωμα μελάσας με συγκέντρωση ολικών σακχάρων 30g/L.

μ/ο	Χρόνος (h)	Κατ. Υπόστρωμα (g/L)	Βιομάζα (g/L)	2,3BD (g/L)	$Y_{2,3BD}$ (g/g)
<i>A1</i>	30	28	0,82	9,3	0,33
<i>A2</i>	34	20	1,26	6	0,3
<i>A3</i>	48	30	2,68	14	0,46

**Χρόνος:** η διάρκεια της ζύμωσης (h), **Κατ. Υπόστρωμα:** συγκέντρωση ολικών σακχάρων που καταναλώθηκαν (g/L) **Βιομάζα:** η μέγιστη βιομάζα (g/L), **2,3BD:** η συγκέντρωση της 2,3-βουτανοδιόλης (g/L), **Y<sub>2,3BD</sub>:** ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης προς καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g).

Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα (Πίνακας IV.3-1), παρατηρούμε ότι ο μικροοργανισμός με τη μεγαλύτερη παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης, είναι και πάλι ο **A3**. Ο οποίος παρήγαγε 14 g/L 2,3-βουτανοδιόλης σε χρονική διάρκεια 48 ωρών. Επίσης, ο ίδιος βάκιλος, παρουσίασε και το μεγαλύτερο συντελεστή απόδοσης παράγωγης 2,3-βουτανοδιόλης,  $Y_{2,3BD} = 0,46$  g/g. Ο συγκεκριμένος συντελεστής απόδοσης θα μπορούσε να χαρακτηριστεί παρά πολύ υψηλός, με δεδομένο ότι ο θεωρητικός συντελεστής απόδοσης 2,3 βουτανοδιόλης είναι 0,5 g/L. Αντίθετα, οι άλλοι δύο μικροοργανισμοί **A1** και **A2**, σημείωσαν πολύ χαμηλότερη παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης. Πιο συγκεκριμένα, ο **A1**, σημείωσε παραγωγή 9,3 g/L 2,3-βουτανοδιόλης, και ο **A2** παρήγαγε 6 g/L 2,3-βουτανοδιόλης. Επίσης, οι δυο μικροοργανισμοί παρουσίασαν χαμηλότερο συντελεστή απόδοσης παράγωγης 2,3-βουτανοδιόλης, με τιμή και για τους δύο  $Y_{2,3BD} = 0,3$  g/g. για τον **A1** και  $Y_{2,3BD} = 0,17$  g/g για τον **A2**. Τέλος, τη μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας, παρουσιάζει ο μικροοργανισμός **A3** (2,68 g/L), ακολουθεί ο βάκιλος **A2** (1,26 g/L), και τέλος ο μικροοργανισμός **A1** με τη μικρότερη παραγωγή βιομάζας (0,82 g/L).

Στη συνέχεια, ακολουθεί ο πίνακας (Πίνακας IV.3-2), όπου παρουσιάζεται η παραγωγή των δευτερογενών μεταβολικών προϊόντων, της αιθανόλης και του γαλακτικού οξέος, με πηγή άνθρακα τη μελάσα.

**Πίνακας IV.3-2:** Παραγωγή αιθανόλης και γαλακτικού οξέος κατά την αύξηση των βακτηρίων σε θρεπτικό υπόστρωμα μελάσας με συγκέντρωση ολικών σακχάρων 30g/L.

μ/ο	Χρόνος (h)	Κατ. Υπόστρωμα (g/L)	Αιθανόλη (g/L)	Y <sub>Eth</sub> (g/g)	Γαλακτικό οξύ (g/L)	Y <sub>Lac</sub> (g/g)
<b>A1</b>	30	28	1,8	0,06	0,8	0,03
<b>A2</b>	34	20	2,2	0,11	1,1	0,06
<b>A3</b>	48	30	3,3	0,11	1,6	0,05

**Χρόνος:** η διάρκεια της ζύμωσης (h), **Κατ. Υπόστρωμα:** συγκέντρωση ολικών σακχάρων που καταναλώθηκαν (g/L), **Αιθανόλη:** η συγκέντρωση αιθανόλης (g/L),  $Y_{Eth}$ : ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής αιθανόλης προς καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g), **Γαλακτικό οξύ:** η συγκέντρωση γαλακτικού οξέος (g/L),  $Y_{Lac}$ : ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής γαλακτικού οξέος προς καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g).

Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα (Πίνακας IV.3-2), παρατηρούμε ότι ο βάκιλος με τη μεγαλύτερη παραγωγή αιθανόλης είναι ο **A3**, με παραχθείσα ποσότητα 3,3 g/L, και ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής αιθανόλης είναι  $Y_{Eth}=0,11$  g/g. Ακολουθεί, ο μ/ο **A2**, με παραγωγή αιθανόλης 2, 2g/L και συντελεστή απόδοσης παραγωγής αιθανόλης  $Y_{Eth}=0,11$  g/g, ίδιο με τον μ/ο **A3**. Και, τέλος ο μ/ο ***Raenibacillus polymyxa***, με παραγωγή αιθανόλης 1,8 g/L, και συντελεστή απόδοσης παραγωγής αιθανόλης  $Y_{Eth}=0,06$  g/g. Επίσης, η παραγωγή γαλακτικού οξέος για τον μ/ο **A3**, λαμβάνει τη τιμή 1,6 g/L, και ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής γαλακτικού οξέος είναι  $Y_{Lac}=0,05$  g/g. Ενώ, οι βάκιλοι **A1 & A2**, παρήγαγαν και οι δυο, περίπου 1 g/L γαλακτικού οξέος, και ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής γαλακτικού οξέος λαμβάνει τη τιμή  $Y_{Lac}=0,03$  g/g για τον μ/ο **A1**, ενώ ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής γαλακτικού οξέος, για τον μ/ο **A2** είναι  $Y_{Lac}=0,06$  g/g.

## V. 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 ιδιαίτερος φιλικό 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. Επομένως, η χρήση των γεωργο-βιομηχανικών προϊόντων και παραπροϊόντων ως υποστρώματα για την παραγωγή μικροβιακών προϊόντων προστιθέμενης αξίας παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον, για δύο λόγους, διότι τα διάφορα παραπροϊόντα αυτά παράγονται σε πολύ μεγάλες ποσότητες, και επιπλέον η διαχείρισή τους αποτελεί μεγάλο 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 (Παπανικολάου & Αγγελής 2010).

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 (Koutinas et al 2014). 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 σακχαρόζη (Syu, 2001).

Στην παρούσα μελέτη μελετήθηκαν τρία νέα βακτηριακά στελέχη *A1*, *A2* & *A3* της οικογένειας *Raenibacillaceae*, για την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης. Τα παραπάνω στελέχη ανήκουν στη συλλογή του εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Αρχικά οι τρεις μικροοργανισμοί καλλιεργήθηκαν σε φιάλες Duran, με πηγή άνθρακα την εμπορική σακχαρόζη. Για κάθε μικροοργανισμό, έγιναν δύο καλλιέργειες, η πρώτη έγινε με αρχική συγκέντρωση σακχαρόζης 30 g/L και η δεύτερη με αρχική συγκέντρωση σακχαρόζης 60 g/L. Στη συνέχεια, έγιναν ζυμώσεις με τις ίδιες συνθήκες σε φιάλες Duran, με πηγή άνθρακα την ακάθαρτη γλυκερόλη σε συγκέντρωση 30 g/L. Και τέλος, πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις με πηγή άνθρακα την μελάσα, με συγκέντρωση ολικών σακχάρων 30 g/L.(μελάσα 60 g/L).

Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν κλειστές καλλιέργειες (Batch cultures) υπό αναερόβιες συνθήκες, σε φιάλες Duran 1-L με ενεργό όγκο 0.8 L, υπό ανάδευση 180 rpm, με εμφύσηση αζώτου για 15 λεπτά και σε θερμοκρασία  $T=30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Η τιμή του pH στην αρχή των ζυμώσεων ήταν  $\text{pH}=6.8\pm 0.2$ , στη συνέχεια κατά τη διάρκεια της ζύμωσης διαμορφωνόταν από τους ίδιους τους μικροοργανισμούς, όπου λάμβανε τη τιμή  $\text{pH}=6.3\pm 0.2$ . Οι πηγές άνθρακα που χρησιμοποιήθηκαν είναι εμπορική σακχαρόζη, η μελάσα και ακάθαρτη γλυκερόλη. Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με πηγή άνθρακα την ακάθαρτη γλυκερόλη, δεν παρατηρήθηκε κατανάλωση του υποστρώματος, και δεν υπήρξε παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης.

Επομένως, συμπεραίνουμε ότι κανένας από τους υπό εξέταση βάκιλους, δεν καταναλώνει την γλυκερόλη.

Στη συνέχεια, παρουσιάζονται τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζεται η παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης, από τους βάκιλους *A1*, *A2* και *A3*, σε πηγές άνθρακα τη σακχαρόζη και τη μελάσα.

**Πίνακας V-1:** Παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης κατά την αύξηση των βακτηρίων σε σακχαρούχα υποστρώματα σακχαρόζης και μελάσας.

<b>μ/ο</b>	<b>Χρόνος (h)</b>	<b>Κατ. Υπόστρωμα (g/L)</b>	<b>Υπόστρωμα</b>	<b>2,3BD (g/L)</b>	<b>Y<sub>2,3BD</sub> (g/g)</b>	<b>P (g/L/h)</b>
<i>A1</i>	50	30	σακχαρόζη	7,14	<b>0,24</b>	0,14
<i>A1</i>	48	53	σακχαρόζη	8,3	<b>0,16</b>	0,17
<i>A1</i>	30	28	μελάσα	9,3	<b>0,33</b>	0,31
<i>A2</i>	30	30	σακχαρόζη	7,8	<b>0,26</b>	0,26
<i>A2</i>	34	47	σακχαρόζη	8,2	<b>0,17</b>	0,24
<i>A2</i>	34	20	μελάσα	6,0	<b>0,30</b>	0,18
<i>A3</i>	24	28	σακχαρόζη	10,9	<b>0,40</b>	0,45
<i>A3</i>	34	53	σακχαρόζη	21,0	<b>0,40</b>	0,62
<i>A3</i>	48	30	μελάσα	14,0	<b>0,46</b>	0,30

**Χρόνος:** η διάρκεια της ζύμωσης (h), **Κατ. Υπόστρωμα:** συγκέντρωση ολικών σακχάρων που καταναλώθηκαν (g/L), **2,3BD:** η συγκέντρωση της 2,3-βουτανοδιόλης (g/L), **Y<sub>2,3BD</sub>:** ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης προς καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g), και **P<sub>2,3-BD</sub>:** η παραγωγικότητα, g/L παραχθείσας 2,3-βουτανοδιόλης ανά ώρα.

Σύμφωνα, με τον παραπάνω πίνακα, παρατηρούμε ότι, ο μικροοργανισμός με τους υψηλότερους συντελεστές απόδοσης είναι ο βάκιλος *A3*. Πιο αναλυτικά, παρατηρούμε ότι στη ζύμωση με θρεπτικό υπόστρωμα τη μελάσα, ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης για τον μ/ο *A3* είναι  $Y_{2,3BD} = 0,46$  g/g. Ο συγκεκριμένος συντελεστής απόδοσης είναι ο υψηλότερος, και θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ιδιαίτερα ικανοποιητικός, με δεδομένο ότι ο θεωρητικός συντελεστής απόδοσης 2,3-βουτανοδιόλης είναι 0,52 g/L. Ακόμη, ο μ/ο *A3* παρουσιάζει το

μεγαλύτερο συντελεστή απόδοσης και στις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν με υπόστρωμα τη σακχαρόζη ( $Y_{2,3BD} = 0,4$  g/g). Επομένως, ο μ/ο **A3** αποδεικνύεται ο πιο αποδοτικός μικροοργανισμός.

Ακόμη, παρατηρούμε ότι οι συντελεστές απόδοσης των άλλων δύο μικροοργανισμών **A1** και **A2**, κυμαίνονται γενικά στα ίδια επίπεδα. Πιο συγκεκριμένα, και οι δύο μικροοργανισμοί παρουσιάζουν ικανοποιητικό συντελεστή απόδοσης παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης στις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν σε σακχαρούχο υπόστρωμα τη μελάσα, με τιμή  $Y_{2,3BD} = 0,3$  g/g. Επίσης, και οι δύο βάκιλοι παρουσίασαν χαμηλούς συντελεστές απόδοσης παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης, στις καλλιέργειες που πραγματοποιήθηκαν με πηγή άνθρακα τη σακχαρόζη. Πιο αναλυτικά, στις ζυμώσεις με συγκέντρωση καταναλωθέντων σακχάρων 30 g/L, ο συντελεστής απόδοσης έλαβε τη τιμή  $Y_{2,3BD} = 0,25$  g/g, ενώ στις ζυμώσεις με συγκέντρωση καταναλωθέντων σακχάρων περίπου 60 g/L ο συντελεστής απόδοσης έλαβε ακόμη πιο χαμηλή τιμή  $Y_{2,3BD} = 0,16$  g/g.

Με βάση τα δεδομένα των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν σε κλειστές καλλιέργειες (Batch cultures) για τους μικροοργανισμούς **A1**, **A2** & **A3**, παρατηρούμε ότι ο μικροοργανισμός **A3** παρουσιάζει τους μεγαλύτερους συντελεστές απόδοσης παράγωγης 2,3-βουτανοδιόλης. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε ημισυνεχής καλλιέργεια (Fed-Batch culture) του μικροοργανισμού **A3** με πηγή άνθρακα τη μελάσα. Η ημισυνεχής καλλιέργεια έγινε σε βιοαντιδραστήρα προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αύξηση του υπό εξέταση στελέχους, σε όσο το δυνατόν πιο ελεγχόμενες συνθήκες ώστε να μεγιστοποιηθεί η παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης. Με βάση τα πειραματικά δεδομένα ο μικροοργανισμός **A3** κατανάλωσε συνολικά 87,5 g/L σάκχαρα, και η μέγιστη παραχθείσα ποσότητα 2,3-βουτανοδιόλης είναι 40 g/L. Η απόδοση της ζύμωσης είναι ιδιαίτερα ικανοποιητική  $Y_{2,3BD} = 0,46$  g/g, με δεδομένο ότι η θεωρητική απόδοση για την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης είναι 0,52 g/L, και παραγωγικότητα της ζύμωσης είναι  $P_{2,3BD} = 0,62$  g/L/h.

Ακόμη, μια αξιοσημείωτη παρατήρηση με βάση τα δεδομένα του παραπάνω πίνακα, είναι ότι στις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν με θρεπτικό υπόστρωμα τη μελάσα, όλοι οι μικροοργανισμοί παρουσίασαν μεγαλύτερο συντελεστή απόδοσης, σε σχέση με τις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν με πηγή άνθρακα τη σακχαρόζη.



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. 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.

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* ενώ τα είδη *E. aerogenes* και *Serratia marcescens* θεωρούνται αρκετά υποσχόμενοι μικροοργανισμοί. Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακα V-2) παρουσιάζονται τα κυριότερα βακτηριακά στελέχη που έχουν μελετηθεί για την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης.

**Πίνακας V-2:** Παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης από βακτηριακά στελέχη σε ποικίλες συνθήκες αύξησης με διαφορετικές πηγές άνθρακα.

Μικροοργανισμός	Πηγή άνθρακα	2,3-BD (g/L)	Y <sub>BD/S</sub> (g/g)	Pr (g/L/h)	Είδος καλλιέργειας	Αναφορά
<i>K. pneumoniae</i> SDM	Γλυκόζη	150,0	0,43	4,21	Ημισυνεχής	Ma et al. (2009)/ Ji et al. (2011)
<i>K. oxytoca</i> ME-XJ-8 <sup>a</sup>		130,0	0,48	1,63	Ημισυνεχής	Ji et al. (2010)
<i>K. oxytoca</i> ME-UD-3 <sup>a</sup>		95,5	0,47	1,71	Ασυνεχής	Ji et al. (2009)
<i>K. pneumoniae</i> CICC 10011		92,4	- <sup>β</sup>	2,10	Ημισυνεχής	Qin et al. (2006)
<i>K. oxytoca</i> ME-XJ-8 <sup>a</sup>		90,7	0,48	1,51	Ασυνεχής	Ji et al. (2010)
<i>K. oxytoca</i> ME-303		390	- <sup>β</sup>	- <sup>β</sup>	Ασυνεχής	Ji et al. (2008)
<i>B. amyloliquefaciens</i>		33,0	0,33	- <sup>β</sup>	Ασυνεχής	Alam et al. (1990)/ Ji et al. (2011)
<i>E. aerogenes</i> NCIMB-10102		33,0	0,33	- <sup>β</sup>	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	Παρασκευαΐδη K. (2013)
<i>K. oxytoca</i> ME-UD-3 <sup>a</sup>	Γλυκόζη/Ξυλόζη	23,2	0,43	-	Ασυνεχής	Ji et al. (2009b)
<i>Serratia marcescens</i> H30 <sup>a</sup>	Σακχαρόζη	139,9	0,41	3,49	Ημισυνεχής	Zhang et al. (2010)
<i>Enterobacter</i> sp. FMCC-208		29,6	0,40	0,58	Ασυνεχής σε φιάλη Duran	Παρασκευαΐδη K. (2013)
<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		Ημισυνεχής	Zeng & Biebl (1991)
<i>Enterobacter</i> sp. FMCC-208		25,0	0,42	0,49	Ασυνεχής σε φιάλη Duran	Παρασκευαΐδη K. (2013)
<i>Enterobacter</i> sp. FMCC-208		73,2	0,44	1,12	Ημισυνεχής	Παρασκευαΐδη K. (2013)
<b>A3</b>		14,0	0,46	0,33	Ασυνεχής	Παρούσα μελέτη
<b>A3</b>		40	0,46	0,62	Ημισυνεχής	Παρούσα μελέτη
<b>A1</b>		9,3	0,33	0,30	Ασυνεχής	Παρούσα μελέτη

<i>A2</i>		6,0	0,30	0,18	Ασυνεχής	Παρούσα μελέτη
<i>K. pneumoniae</i> CICC 10011	Αγκινάρα της Ιερουσαλήμ	84,0	0,32	2,29	Ημισυνεχής	Sun et al. (2009)
<i>K. pneumoniae</i>		674	β	1,18	Ημισυνεχής	Li et al. (2010)/ Ji et al. (2011)
<i>P. polymyxa</i> ZJ-9		36,9	0,50	0,88	Ημισυνεχής	Gao et al. (2010)/ Ji et al. (2011)
<i>K. oxytoca</i> ACCC10370	Άμυλο αραβόσιτου	35,7	0,50	0,59	Ημισυνεχής	Cheng et al. (2010)
<i>K. pneumoniae</i> G31	Καθαρή γλυκερόλη	70,0	0,53	0,47	Ημισυνεχής	Petrov & Petrova (2010)

α: ανασυνδυασμένο στέλεχος

β: δεν δίνονται στοιχεία στην αντίστοιχη δημοσίευση

Με βάση τα στοιχεία του (Πίνακα V-2), οι υψηλότερες συγκεντρώσεις της 2,3-βουτανодиόλης 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 επιτεύχθηκε η παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης αξιοποιώντας χαμηλού κόστους υποστρώματα (εμπορική σακχαρόζη και μελάσα). Οι συντελεστές απόδοσης και οι συγκεντρώσεις κρίνονται χαμηλές με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία. Όμως είναι αξιοσημείωτο το γεγονός, ότι πρόκειται για νέα μη παθογόνα βακτηριακά στελέχη. 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<sup>η</sup> 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. **Παρασκευαΐδη Κ.** (2013). Μεταπτυχιακή Διατριβή. Κινητικές και φυσιολογικές μελέτες παραγωγής της 2,3-βουτανοδιόλης κατά την αύξηση επιλεγμένων βακτηριακών στελεχών σε ανανεώσιμες πηγές άνθρακα., Αθήνα.
6. **Adham N.Z.** (2002). Attempts at improving citric acid fermentation by *Aspergillus niger* in beet-molasses medium. *Bioresource Technology*. 84:97–100.
7. **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.
8. **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.
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 *Cunnighamella 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. **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.
27. **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.
28. **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.
29. **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.
30. **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.
31. **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.
32. **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.
33. **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 *AI ZJ-9* to produce R,R-2,3-butanediol. *Bioresource Technology*, 101:7087-7093.
34. **Garg S. K. and Jain A.** (1995). Fermentative production of 2,3-butanediol: a review. *Bioresource Technology* 5:03-109.

35. **Gaston M. A.** (1998). Enterobacter: an emerging nosocomial pathogen. *Journal of Hospital Infection* 11,197-208.
36. **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.
37. **Godbole J.,** (2002). Ethanol from cane molasses, Fuel Ethanol Workshop, Honolulu, Hawaii.
38. **Gottshalk G.** (1986). Bacterial metabolism. New York: Springer-Verlag.
39. **Hespell RB.** (1996). Fermentation of xylan, corn fiber, or sugars to acetoin and butanediol by *Bacillus polymyxa* strains. *Curr Microbiol*; 32:291–6.
40. **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.
41. **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.
42. **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.
43. **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.
44. **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.
45. **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.
46. **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.
47. **Kamm B, Kamm M.** (2004). Principles of biorefineries. *Appl Microbiol Biotechnol* 64:137–45.



48. **Kim S.B., Hayase F., Kato H.** (1985). Decolourisation and degradation products of melanoidins on ozonolysis. *Agric. Biol. Chem.* 49:785– 792.
49. **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.
50. **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.
51. **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.
52. **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.
53. **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.
54. **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.
55. **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.
56. **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.
57. **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.

58. **Mohana Sarayu, Acharya Bhavik K., Madamwar Datta** (2009). Distillery spent wash: Treatment technologies and potential applications. *Journal of Hazardous Materials* 163:12–25.
59. **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.
60. **Mossel D. A. A.** (1985). Media for Enterobacteriaceae. *International Journal of Food Microbiology*, 2:27-32.
61. **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.
62. **Nakashimada Y, Marwoto B, Kashiwamura T, Kakizono T, Nishio N.** (2000). Enhanced 2,3- butanediol production by addition of acetic acid in *AI*. *J Biosci Bioen*; 90:661–4.
63. **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.
64. **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.
65. **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.
66. **Pant Deepak, Adholeya Alok** (2007). Biological approaches for treatment of distillery wastewater: A review. *Bioresource Technology* 98:2321–2334.
67. **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.
68. **Paul De Vos, George M. Garrity, Dorothy Jones, Noel R. Krieg, Wolfgang Ludwig, Fred A. Rainey, Karl-Heinz Schleifer and William B. Whitman** (2009). *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology Second Edition*

Volume Three The Firmicutes, 296.

69. **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
70. **Peters D.** (2007). Raw Materials. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology* 105, 1-30.
71. **Petrov K., Petrova P.** (2010). Enhanced production of 2,3-butanediol from glycerol by forced pH fluctuations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87:943-949.
72. **Plavsic M., Cosovic B., Lee C.** (2006). Copper complexing properties of melanoidins and marine humic material. *Sci. Total Environ.* 366:310-319.
73. **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.
74. **Saha BC** (2003). Hemicellulose bioconversion. *J Ind Microbiol Biotechnol*; 30:279–91.
75. **Saha BC, Bothast RJ.** (1999). Production of 2,3-butanediol by newly isolated *Enterobacter cloacae*. *Appl Microbiol Biotechnol*; 52:321–6.
76. **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.
77. **Speckman RA, Collins EB.** (1982). Microbial production of 2,3-butanediol from cheese whey. *Appl Environ Microbiol*; 43:1216–8.
78. **Störmer FC.** (1977). Evidence for regulation of *Aerobacter aerogenes* pH 6 acetolactate-forming enzyme by acetate ion. *Biochem Biophys Res Commun*; 74:898–902.
79. **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.
80. **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.

81. **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.
82. **Wang AL, Wang Y, Jiang TY, Li LX, Ma CQ, Xu P.** (2010). Production of 2,3-butanediol from corn cob molasses, a waste by-product in xylitol production. *Appl Microbiol Biotechnol*; 87:965–70.
83. **Wang He-Ya, Qian He, Yao Wei-Rong** (2011). Melanoidins produced by the Maillard reaction: Structure and biological activity. *Food Chemistry* 128:573–584.
84. **Willke TH, Vorlop KD.** (2004). Industrial bioconversion of renewable resources as an alternative to conventional chemistry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66:131-142.
85. **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.
86. **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.