

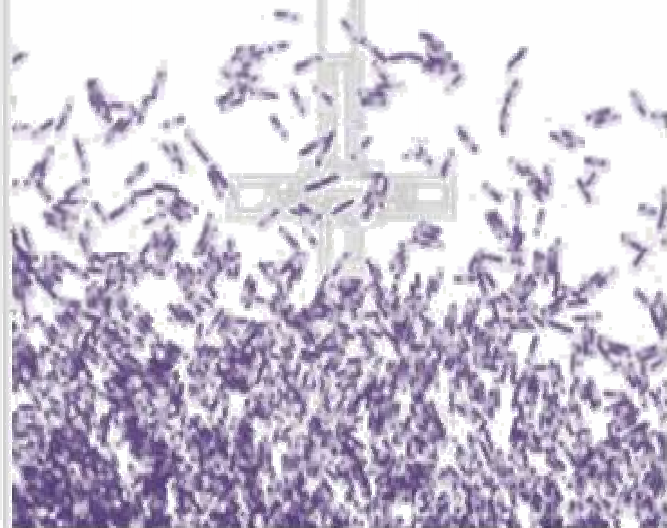
ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

«Μελέτη της βιοτεχνολογικής παραγωγής της 1,3-
προπανοδιόλης κατά την αύξηση του
μικροοργανισμού *Clostridium butyricum* σε
υποστρώματα με βάση την βιομηχανική γλυκερόλη»

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΦΡΟΔΙΤΗ ΧΑΤΖΗΦΡΑΓΚΟΥ

Γεωπόνος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων



ΑΘΗΝΑ
ΑΠΡΙΛΙΟΣ 2012

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

«Μελέτη της βιοτεχνολογικής παραγωγής της 1,3-
προπανοδιόλης κατά την αύξηση του
μικροοργανισμού *Clostridium butyricum* σε
υποστρώματα με βάση την βιομηχανική γλυκερόλη»

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΦΡΟΔΙΤΗ ΧΑΤΖΗΦΡΑΓΚΟΥ

Γεωπόνος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

ΑΘΗΝΑ
ΑΠΡΙΛΙΟΣ 2012

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2).

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ ΣΕΡΑΦΕΙΜ, Επίκουρος Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Τροφίμων-Βιοδιεργασιών,
Τμήμα Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών
(Επιβλέπων)

ΑΓΓΕΛΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ, Καθηγητής Μικροβιολογίας,
Τμήμα Βιολογίας Πανεπιστημίου Πατρών
(Μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής)

ΚΩΜΑΪΤΗΣ ΜΙΧΑΗΛ, Καθηγητής Χημείας και Ανάλυσης Τροφίμων,
Τμήμα Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών
(Μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής)

ΚΕΚΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ, Καθηγητής Ενζυμικής και Μικροβιακής Τεχνολογίας,
Σχολή Χημικών Μηχανικών, Ε.Μ.Π.

ΛΥΜΠΕΡΑΤΟΣ ΓΕΡΑΣΙΜΟΣ, Καθηγητής Βιοχημικής Μηχανικής,
Σχολή Χημικών Μηχανικών, Ε.Μ.Π.

ΝΥΧΑΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ-ΙΩΑΝΝΗΣ, Καθηγητής Μικροβιολογίας Τροφίμων,
Τμήμα Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

ΚΟΥΤΙΝΑΣ ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ, Λέκτορας Σχεδιασμού Βιομηχανιών Τροφίμων,
Τμήμα Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

Στους γονείς μου, Γιώργο και Βάνα,

στην αδερφή μου Ηλιάνα,

στον Χρήστο.

*«Σα βγεις στον πηγαιμό για την Ιθάκη,
να εύχεται να' ναι μακρύς ο δρόμος,
γεμάτος περιπέτειες, γεμάτος γνώσεις....*

*Πάντα στον νου σου να' χεις την Ιθάκη.
Το φθάσιμον εκεί ειν' ο προορισμός σου..»*

Καβάφης Κ. «Ιθάκη» (1911)

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Έχοντας φτάσει στο τέλος αυτής της υπέροχης διαδρομής, δύσκολα μπορεί κανείς να αποφύγει μια νοερή ανασκόπηση σε πρόσωπα, γεγονότα και συναισθήματα, τα οποία αποτέλεσαν κινητήριο δύναμη κατά την διάρκεια της εκπόνηση μιας διδακτορικής διατριβής. Ως εκ τούτου, δράττομαι της ευκαιρίας να μνημονεύσω όλους όσους συνέβαλλαν με τον δικό τους τρόπο στην ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής.

Πρωτίστως, θα ήθελα εκφράσω τις θερμότερες και εγκάρδιες ευχαριστίες μου στον διδάσκαλο και Επιβλέποντα μου, Επίκουρο Καθηγητή κ. Σεραφείμ Παπανικολάου. Ο κ. Παπανικολάου υπήρξε ο μέντοράς μου στον συναρπαστικό κόσμο της έρευνας, μεταδίδοντας μου απλόχερα τις γνώσεις, την αγάπη και το μεράκι του για την επιστήμη. Η υποστήριξη του προς το πρόσωπό μου ήταν αμέριστη και η καθοδήγηση του καίρια και ουσιαστική, καθ' όλη την διάρκεια της παρούσας διατριβής. Νιώθω ευγνώμων για την δυνατότητα που μου προσέφερε να αποκτήσω πολύτιμες γνώσεις, εμπειρία και επιστημονικό τρόπο σκέψης.

Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή κ. Γεώργιο Αγγελή, μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής, για την εξαιρετική συνεργασία του και την ουσιαστική βοήθεια που μου προσέφερε κατά την επιτέλεση της διδακτορικής μου διατριβής.

Επίσης, ευχαριστώ τον Καθηγητή κ. Μιχαήλ Κωμαΐτη, μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής, για τις εύστοχες παρατηρήσεις και συμβουλές του, καθώς επίσης την Δρ. Χρυσανγή Γαρδέλη για την προθυμία και βοήθειά της κατά τις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν στην αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον Καθηγητή κ. Γεώργιο-Ιωάννη Νυχά και την Δρ. Αγάπη Δουλγεράκη για την άμεση ανταπόκριση και βοήθεια τους κατά την εφαρμογή μοριακών τεχνικών.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Δημήτριο Κέκο, τον Καθηγητή κ. Γεράσιμο Λυμπεράτο και τον Λέκτορα κ. Απόστολο Κουτίνα, για την τιμή που μου έκαναν να συμμετάσχουν στην κρίση της διδακτορικής μου διατριβής.

Μέρος των πειραμάτων πραγματοποιήθηκαν στο Institute of Bioprocess and Biosystems Engineering, του Hamburg University of Technology της Γερμανίας. Ως εκ τούτου, ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή κ. An-Ping Zeng, για την συνεργασία του και την δυνατότητα που μου προσέφερε να

εργαστώ στο εργαστήριο του, αποκομίζοντας γνώσεις και εμπειρία, που αποτέλεσαν πολύτιμα εφόδια για την διεκπεραίωση της παρούσας διατριβής. Ich würde Prof. An-Ping Zeng für Ihre wertvolle Hilfe und Ratschläge herzlichsten danken. Ευχαριστώ επίσης τον φίλο και συνεργάτη Dr. David Dietz για την βοήθεια και την στήριξή του κατά την παραμονή μου στο Αμβούργο. Vielen Dank für alles David.

Ευχαριστώ θερμά όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, τους υποψήφιους διδάκτορες κ. Δημήτριο Σαρρή, κα. Μαρία Μετσοβίτη, κα. Κατερίνα Μπέλκα, κα. Βασιλική Καχριμανίδου και κα. Σοφία Τσάκωνα, καθώς επίσης και τον Δρ. Νικόλαο Κουφαχίλη, για την συνεχή στήριξη και συνεργασία τους. Μαζί περάσαμε πολλά και η παρουσία τους συνέβαλλε σημαντικά στην ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής. Επίσης, ευχαριστώ θερμά την κα. Ουρανία Καλαντζή για την στήριξη, την προθυμία και την βοήθεια που μου προσέφερε όλο αυτό το διάστημα. Ακόμη, δεν θα μπορούσα να παραλείψω τις ευχαριστίες μου στα μέλη του Εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και ιδιαίτερα στους υποψήφιους διδάκτορες κ. Νικόλαο Ανδρίτσο, κα. Νατάσα Καπετανάκου, κ. Σταύρο Μανιό, καθώς επίσης και στον Δρ. Σπύρο Παραμυθιώτη.

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να αναφερθώ σε ένα αξιόλογο και ιδιαίτερα αγαπητό μέλος του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, που έφυγε προσφάτως από την ζωή, την Καθηγήτρια κα Μαρία Γαλιώτου-Παναγιώτου. Η κα Γαλιώτου υπήρξε ένας δυναμικός άνθρωπος, που αγαπούσε την διδασκαλία και την έρευνα. Παρ' όλες τις δυσκολίες που αντιμετώπιζε τα τελευταία χρόνια της ζωής της, ήταν κοντά μου και παρακολουθούσε στενά την πορεία του διδακτορικού μου. Αισθάνομαι τυχερή που την γνώρισα και θα θυμάμαι πάντα με αγάπη την παρουσία της και τις συμβουλές της.

Τέλος, επιθυμώ να ευχαριστήσω τους δικούς μου ανθρώπους, τους γονείς μου Γιώργο και Βάνα και την αδερφή μου Ηλιάνα, για την αγάπη τους και την στήριξή τους σε κάθε απόφαση της ζωής μου. Αποτελούν πηγή δύναμης για μένα και τους είμαι ευγνώμων για όλα όσα μου έχουν προσφέρει. Ευχαριστώ ακόμη τον Χρήστο για την υπομονή, την κατανόηση και την ηθική υποστήριξη του σε αυτή μου την προσπάθεια. Η παρούσα διατριβή αφιερώνεται στα αγαπημένα μου αυτά πρόσωπα.

Αφροδίτη Χατζηφράγκου

Αθήνα 2012

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Σελίδα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	i
ABSTRACT.....	v
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 Εισαγωγικά στοιχεία για την γλυκερόλη.....	2
1.1.1 Παραγωγή βιολογικών καυσίμων πρώτης γενιάς.....	3
1.1.2 Παραγωγή βιολογικών καυσίμων δεύτερης γενιάς.....	6
1.1.3 Το ζήτημα της βιομηχανικής γλυκερόλης.....	8
1.2 Η χημική ένωση 1,3-προπανοδιόλη.....	10
1.2.1 Ιστορικό υπόβαθρο.....	10
1.2.2 Χημικές διεργασίες για την παραλαβή της 1,3-προπανοδιόλης.....	11
1.2.3 Βιοτεχνολογική παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης.....	12
1.2.3.1. Μικροοργανισμοί-παραγωγοί της 1,3-προπανοδιόλης.....	13
1.2.3.2 Βιοχημεία σύνθεσης της 1,3-προπανοδιόλης.....	14
1.2.4 Εξελίξεις στην τεχνολογία παραγωγής της 1,3-προπανοδιόλης.....	21
1.2.4.1 Συστήματα καλλιέργειας για την παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης.....	22
1.2.4.2 Δημιουργία βελτιωμένων στελεχών με την συνδρομή της γενετικής μηχανικής.....	26
1.2.4.3 Εφαρμογή μαθηματικών μοντέλων στην διεργασία παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης.....	29
1.2.4.4 Δυνατότητες εφαρμογής της προπανοδιολικής ζύμωσης σε βιομηχανική κλίμακα.....	32
1.3 Το γένος <i>Clostridium</i> sp.....	38
1.4 Σκοπός της διδακτορικής διατριβής.....	41
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	43
2.1 Η ακάθαρτη γλυκερόλη ως πηγή άνθρακα και ενέργειας για την μικροβιακή αύξηση.....	44
2.2 Ο μικροοργανισμός <i>Clostridium butyricum</i> VPI 1718.....	45
2.3 Συνθήκες καλλιέργειας του μικροοργανισμού.....	46
2.4 Συνθήκες λειτουργίας βιοαντιδραστήρα.....	49
2.5 Προσδιορισμός βιομάζας.....	52
2.6 Προσδιορισμός γλυκερόλης, 1,3-προπανοδιόλης και οργανικών οξέων.....	53
2.7 Προσδιορισμός ενεργότητας του ενζύμου της γαλακτικής αφυδρογονάσης (EC 1.1.1.27)....	57

2.8 Παραλαβή και ανάλυση κυτταρικών λιπιδίων του βακτηρίου <i>C. butyricum</i> VPI 1718.....	60
2.9 Συνθήκες αέριας χρωματογραφίας (G.C.).....	61
2.10 Συνθήκες αέριας χρωματογραφίας-φασματοσκοπίας μάζας (G.C.-M.S.).....	62
2.11 Έλεγχος καθαρότητας των μικροβιακών καλλιιεργειών.....	63
2.12 Υπολογισμός ποσοστού ανάκτησης άνθρακα.....	65
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	66
3.1 Επίδραση των προσμίξεων της ακάθαρτης γλυκερόλης στην αύξηση του βακτηρίου <i>C. butyricum</i> VPI 1718 και στην παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης.....	67
3.1.1 Επίδραση των αλάτων στην μικροβιακή αύξηση και παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης- Ασυνεχείς καλλιέργειες σε στατικές φιάλες αναεροβίωσης χωρίς έλεγχο της τιμής του pH.....	68
3.1.2 Επίδραση των προσμίξεων της ακάθαρτης γλυκερόλης στην αύξηση και παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης-Καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου με έλεγχο της τιμής του pH.....	72
3.1.2.1 Επίδραση της προσθήκης χλωριούχου νατρίου (NaCl).....	72
3.1.2.2 Επίδραση της προσθήκης ελαϊκού οξέος και στεατικού οξέος.....	73
3.1.2.3 Επίδραση της προσθήκης μεθανόλης.....	77
3.1.3 Επίδραση των προσμίξεων της ακάθαρτης γλυκερόλης στην αύξηση και παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης σε μονοβάθμιο συνεχές σύστημα καλλιέργειας.....	78
3.2 Επίδραση της στρατηγικής αναεροβίωσης και της γεωμετρίας του βιοαντιδραστήρα στην βιοχημική απόκριση του βακτηρίου <i>C. butyricum</i> VPI 1718 κατά την ζύμωση της 1,3- προπανοδιόλης.....	84
3.2.1 Καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου με εφαρμογή διαφορετικών στρατηγικών αναεροβίωσης.....	84
3.2.2 Μέτρηση της ενεργότητας του ενζύμου της γαλακτικής αφυδρογονάσης (Lactate dehydrogenase).....	91
3.2.3 Ημι-συνεχείς καλλιέργειες με εφαρμογή διαφορετικών στρατηγικών αναεροβίωσης	95
3.3 Επίδραση της 1,3-προπανοδιόλης στην μικροβιακή αύξηση και στην σύσταση των κυτταρικών λιπιδίων του βακτηρίου <i>C. butyricum</i> VPI 1718 κατά την καλλιέργεια του σε υπόστρωμα γλυκερόλης.....	99
3.3.1 Επίδραση της εξωγενώς προστιθέμενης 1,3-προπανοδιόλης στην μικροβιακή αύξηση, την κατανάλωση της ακάθαρτης γλυκερόλης και την παραγωγή 1,3- προπανοδιόλης.....	99

3.3.1.1 Ασυνεχείς καλλιέργειες σε αναερόβιες φιάλες Duran.....	99
3.3.1.2 Καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου.....	105
3.3.1.3 Συνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα.....	108
3.3.2 Επίδραση της εξωγενώς προστιθέμενης 1,3-προπανοδιόλης στην σύσταση των κυτταρικών λιπιδίων του βακτηρίου <i>C. butyricum</i> VPI 1718.....	112
3.3.2.1. Μελέτη της σύστασης των κυτταρικών λιπιδίων του βακτηρίου <i>C. butyricum</i> VPI 1718.....	112
3.3.2.2 Επίδραση της εξωγενώς προστιθέμενης 1,3-προπανοδιόλης στην σύσταση των κυτταρικών λιπιδίων του βακτηρίου <i>C. butyricum</i> VPI 1718 κατά την καλλιέργεια του σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου και σε συνεχείς καλλιέργειες.....	118
3.4 Μελέτη της παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης και της σύστασης των κυτταρικών λιπιδίων του βακτηρίου <i>C. butyricum</i> VPI 1718 κατά την συνεχή καλλιέργεια του σε υπόστρωμα ακάθαρτης γλυκερόλης.....	126
3.4.1 Παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης κατά την συνεχή καλλιέργεια του βακτηρίου <i>C.</i> <i>butyricum</i> VPI 1718, υπό συνθήκες διαρκούς εμφύσησης αζώτου.....	127
3.4.2 Παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης κατά την συνεχή καλλιέργεια του βακτηρίου <i>C.</i> <i>butyricum</i> VPI 1718 υπό συνθήκες αυτό-παραγόμενης αναεροβίωσης.....	132
3.4.3 Παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης κατά την συνεχή καλλιέργεια του βακτηρίου <i>C.</i> <i>butyricum</i> VPI 1718 με σταθερό ρυθμό αραίωσης και αυξανόμενη αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης.....	137
3.4.4 Σύσταση των κυτταρικών λιπιδίων του βακτηρίου <i>C. butyricum</i> VPI 1718 κατά την συνεχή καλλιέργεια του σε υπόστρωμα ακάθαρτης γλυκερόλης.....	140
3.5 Παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης κατά την αύξηση του βακτηρίου <i>C. butyricum</i> VPI 1718 σε υπόστρωμα ακάθαρτης γλυκερόλης υπό μη-στείρες συνθήκες καλλιέργειας.....	146
3.5.1 Καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου με υπόστρωμα ακάθαρτης γλυκερόλης, διαφορετικής σύστασης, υπό στείρες ή μη συνθήκες ζύμωσης.....	147
3.5.2 Ημι-συνεχείς καλλιέργειες σε υπόστρωμα ακάθαρτης γλυκερόλης υπό μη στείρες συνθήκες ζύμωσης.....	150
3.5.3 Συνεχείς καλλιέργειες σε υπόστρωμα ακάθαρτης γλυκερόλης υπό μη στείρες συνθήκες ζύμωσης.....	152
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ.....	161
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	171

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ.....	191
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ.....	192

Περίληψη

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη της φυσιολογικής συμπεριφοράς του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 κατά την καλλιέργεια του σε υποστρώματα με βάση την βιομηχανική γλυκερόλη. Η γλυκερόλη είναι μια ανανεώσιμη πηγή άνθρακα η οποία παράγεται σε διεθνές επίπεδο ως το κύριο υποπροϊόν των βιομηχανιών παραγωγής σαπώνων και οιοπνευματωδών ποτών. Η αλματώδης ανάπτυξη που σημειώνει τα τελευταία χρόνια η βιομηχανία παραγωγής εναλλακτικού τύπου καυσίμων, όπως το βιολογικό πετρέλαιο (βιοντήζελ) και η βιολογική αιθανόλη, έχει ως απόρροια την σημαντική αύξηση των αποθεμάτων της γλυκερόλης, ως ενός υποπροϊόντος (ή/και αποβλήτου) χρήζοντος ανάγκης για περαιτέρω επεξεργασία. Υπό αυτό το πρίσμα, προκειμένου να διαπιστωθεί η καταλληλότητα της βιομηχανικής γλυκερόλης ως υπόστρωμα για την αύξηση του εν λόγω μικροοργανισμού, εξετάστηκε αρχικά η επίδραση που ασκούν οι διάφορες προσμίξεις που δύνανται να βρεθούν στην σύσταση της βιομηχανικής γλυκερόλης. Οι προσμίξεις που εξετάστηκαν αφορούσαν στα φωσφορικά άλατα του καλίου και του νατρίου (Na_2HPO_4 , K_2HPO_4), στο χλωριούχο νάτριο (NaCl), στη μεθανόλη, καθώς επίσης και στο ελαϊκό οξύ. Κατά την καλλιέργεια του μικροοργανισμού σε στατικές αναερόβιες φιάλες, διαπιστώθηκε ότι, σε αντίθεση με τα φωσφορικά άλατα, η παρουσία του χλωριούχου νατρίου σε συγκέντρωση ίση με 4.5% (κ.β. επί της γλυκερόλης) στο θρεπτικό μέσο άσκησε προφανή παρεμποδιστική επίδραση τόσο επί της αύξησης του βακτηρίου *C. butyricum*, όσο και της παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης. Ωστόσο, κατά την τέλεση της βιοδιεργασίας σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου και την προσθήκη αυξημένων ποσοτήτων χλωριούχου νατρίου (έως 30% κ.β.), δεν παρατηρηθήκαν φαινόμενα επίσχεσης της μικροβιακής αύξησης. Επίσης, ο εν λόγω μικροοργανισμός εμφάνισε ανεκτικότητα στην παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων μεθανόλης κατά την καλλιέργεια του σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου, αλλά και σε συνεχές σύστημα καλλιέργειας, όπου τελέστηκε προσθήκη μεθανόλης, στην κατάσταση δυναμικής ισορροπίας. Ωστόσο, η ύπαρξη του ελαϊκού οξέος στο θρεπτικό μέσο επέδρασε εμφανώς παρεμποδιστικά στην βιοχημική απόκριση του μικροοργανισμού, ενώ το όριο ανεκτικότητας του ως προς το εν λόγω λιπαρό οξύ προσδιορίστηκε στο 1% (κ.β.). Επιπρόσθετα, η απουσία αρνητικής επίδρασης της ύπαρξης στεαρίνης (μια λιπαρή ύλη με περιεκτικότητα 80% κ.β. σε στεατικό οξύ) στο μέσο της καλλιέργειας, υποδηλώνει ότι η ύπαρξη του διπλού δεσμού στο μόριο του ελαϊκού οξέος εμπλέκεται στον μηχανισμό παρεμπόδισης που ασκεί η παρουσία του μονοακόρεστου λιπαρού οξέος στο βακτήριο *C. butyricum*.

Το δεύτερο στάδιο του πειραματικού σχεδιασμού περιλάμβανε την διερεύνηση της στρατηγικής αναεροβίωσης και της γεωμετρίας του βιοαντιδραστήρα, στην αύξηση του βακτηρίου *C. butyricum* και την δυνατότητα παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης, σε βιοαντιδραστήρες διαλείποντος και ημι-διαλείποντος έργου, συνολικού όγκου 1-, 3- και 4.5-L. Εν προκειμένω, κατά την καλλιέργεια του μικροοργανισμού σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου, με συνεχή εμφύσηση αερίου αζώτου, διαπιστώθηκε η ικανότητα της επιτυχούς τέλεσης της προπανοδιολικής ζύμωσης, ανεξάρτητα από την αρχική συγκέντρωση της ακάθαρτης γλυκερόλης και την γεωμετρία του βιοαντιδραστήρα. Αντιθέτως, κατά την απουσία εμφύσησης αερίου αζώτου (ήτοι υπό συνθήκες «αυτό-παραγόμενης» αναεροβίωσης μέσω των αερίων που παράγονται κατά το μεταβολισμό), σημειώθηκαν αξιόλογες διαφοροποιήσεις στην βιοχημική απόκριση του βακτηρίου. Συγκεκριμένα, σε βιοαντιδραστήρα 1-L, η απουσία της εμφύσησης αερίου αζώτου ευνόησε την σύνθεση γαλακτικού οξέος, μέσω του ενζύμου της γαλακτικής αφυδρογονάσης. Το φαινόμενο αυτό εντοπίστηκε μόνο κατά την τέλεση της βιοδιεργασίας σε βιοαντιδραστήρα μικρού όγκου, οφειλόμενο πιθανότατα στην μερική παρεμπόδιση της φωσφοροκλαστικής αντίδρασης, εξαιτίας της επίτευξης ανεπαρκούς αναερόβιου περιβάλλοντος εντός του βιοαντιδραστήρα. Έτσι, κατά την ημι-συνεχή καλλιέργεια του βακτηρίου *C. butyricum* υπό συνεχή εμφύσηση αζώτου επετεύχθη μέγιστη παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης ίση με 70.8 g/L, ενώ υπό συνθήκες αυτό-παραγόμενης αναεροβίωσης, παρήχθησαν μόνο 30.5 g/L της εν λόγω διόλης. Ως εκ τούτου, από τα ανωτέρω αποτελέσματα τεκμαίρεται ότι ο συνδυασμός της στρατηγικής αναεροβίωσης και της γεωμετρίας του βιοαντιδραστήρα, δύναται να μεταβάλλει την βιοχημική συμπεριφορά του εν λόγω στελέχους.

Ιδιαίτερη μνεία δόθηκε στην εύρεση του μέγιστου σημείου ανεκτικότητας του μικροοργανισμού στην παρουσία της 1,3-προπανοδιόλης (παραγόμενης και εξωγενώς προστιθέμενης), αλλά και της επίδρασης που αυτή ασκεί στο προφίλ των κυριότερων λιπαρών οξέων των κυτταρικών λιπιδίων του βακτηρίου. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου, κατά τα οποία προστίθεντο διάφορες συγκεντρώσεις 1,3-προπανοδιόλης στην εκθετική φάση της αύξησης του βακτηρίου *C. butyricum*. Διαπιστώθηκε η ικανότητα του μικροοργανισμού να ανθίσταται στην ύπαρξη 70 g/L και πλέον βιολογικώς παραχθείσης και εξωγενώς προστιθέμενης 1,3-προπανοδιόλης. Η δυναμική προσαρμογής του μικροοργανισμού σε περιβάλλον με υψηλές συγκεντρώσεις 1,3-προπανοδιόλης αξιολογήθηκε και κατά την αύξηση του σε συνεχή συστήματα καλλιέργειας. Όσον αφορά στην σύσταση των κυτταρικών λιπιδίων του βακτηρίου, διαπιστώθηκε ότι η προσθήκη της εν λόγω διόλης κατά την ασυνεχή καλλιέργεια του μικροοργανισμού ευνόησε την σύνθεση ακόρεστων λιπιδίων. Αντιθέτως, κατά την συνεχή καλλιέργεια του βακτηρίου, η

προστιθέμενη 1,3-προπανοδιόλη κατά την κατάσταση δυναμικής ισορροπίας, ευνόησε την βιοσύνθεση κορεσμένων λιπαρών οξέων. Ωστόσο, η επαγόμενη αύξηση του ποσοστού των κορεσμένων λιπαρών οξέων από την προσθήκη της 1,3-προπανοδιόλης, βρέθηκε να αίρεται κατά το μεταβατικό στάδιο της καλλιέργειας και μέχρι την επίτευξη στάσιμου σταδίου, ως αποτέλεσμα της βαθμιαίας απομάκρυνσης της διόλης από τον χημειοστάτη.

Εν συνεχεία, ακολούθησε η μελέτη της βιοχημικής απόκρισης του βακτηρίου *C. butyricum* κατά την συνεχή καλλιέργεια του, υπό διαφορετικούς ρυθμούς αραίωσης και συγκεντρώσεως γλυκερόλης, τόσο σε συνάρτηση με την παραγόμενη 1,3-προπανοδιόλη, όσο και με την μεταβολή της σύστασης των κυτταρικών λιπιδίων του μικροοργανισμού. Αρχικά, ο πειραματικός σχεδιασμός προέβλεπε την εφαρμογή διαφορετικών ρυθμών αραίωσης (*D*) με σταθερή συγκέντρωση της ακάθαρτης γλυκερόλης στο θρεπτικό μέσο εισόδου της συνεχούς καλλιέργειας, υπό συνθήκες συνεχούς εμφύσησης αζώτου αλλά και αυτό-παραγόμενης αναερόβιωσης. Διαπιστώθηκε ότι η απόδοση του μικροοργανισμού ήταν σαφώς καλύτερη κατά την επίτευξη αναερόβιου περιβάλλοντος με συνεχή παροχή αερίου αζώτου, ενώ κατά την αυτό-παραγόμενη αναερόβιωση σημειώθηκαν αξιοσημείωτες βιοχημικές μεταβολές, οφειλόμενες ως επί το πλείστον στην αύξηση της συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέος. Μάλιστα, στις εν λόγω συνθήκες καλλιέργειας, η παραγωγή του γαλακτικού οξέος βρέθηκε να ευνοείται κατά την εφαρμογή χαμηλών ρυθμών αραίωσης. Επιπρόσθετα, κατά εφαρμογή αυξανόμενων συγκεντρώσεων της ακάθαρτης γλυκερόλης στον χημειοστάτη με ταυτόχρονη διατήρηση σταθερού ρυθμού αραίωσης, ο μικροοργανισμός εμφάνισε ικανοποιητική επίδοση κατά την καλλιέργεια του με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης στο θρεπτικό μέσο εισόδου ίση με 80 g/L. Συγκεκριμένα, κατά την επίτευξη κατάστασης δυναμικής ισορροπίας, εντός του χημειοστάτη βρισκόνταν 31.1 g/L 1,3-προπανοδιόλης, με τον αντίστοιχο συντελεστή απόδοσης να λαμβάνει την τιμή των 0.54 g ανά g καταναλωθέντος υποστρώματος. Επιπροσθέτως, μελετήθηκε η επίδραση των συνθηκών καλλιέργειας (ρυθμός αραίωσης, αρχική συγκέντρωση ακάθαρτης γλυκερόλης και στρατηγική της εφαρμογής αναερόβιου περιβάλλοντος στον βιοαντιδραστήρα) στην σύσταση των κυτταρικών λιπιδίων του μικροοργανισμού. Ως εκ τούτου, παρουσιάστηκαν διαφοροποιήσεις, σχετιζόμενες με την συνεχή εμφύσηση ή μη αερίου αζώτου κατά την διάρκεια της συνεχούς καλλιέργειας του. Ειδικότερα, η ύπαρξη αερίου αζώτου στο περιβάλλον της καλλιέργειας κατέστησε το κλάσμα των κυτταρικών λιπιδίων του μικροοργανισμού πιο κορεσμένο, εν συγκρίσει με την αντίστοιχη κατανομή της σύστασης των λιπιδίων κατά την επίτευξη στάσιμου σταδίου υπό συνθήκες αυτό-παραγόμενης αναερόβιωσης. Ακόμη, διαπιστώθηκε ότι κατά την συνεχή καλλιέργεια του βακτηρίου, η αύξηση της αρχικής

συγκέντρωσης της πηγής άνθρακα είχε ως αποτέλεσμα να καταστεί η σύσταση των κυτταρικών λιπιδίων του βακτηρίου σαφώς πιο κορεσμένη.

Τέλος, στη παρούσα διατριβή διερευνήθηκε και προτάθηκε η δυνατότητα της διεξαγωγής της προπανοδιολικής ζύμωσης υπό μη στείρες συνθήκες καλλιέργειας, ως μια αξιοποιήσιμη μέθοδος στο εγχείρημα της βιομηχανικής εφαρμογής της εν λόγω βιοδιεργασίας. Για τον σκοπό αυτό αξιολογήθηκε η επίδοση του βακτηρίου *C. butyricum* σε διάφορα συστήματα καλλιέργειας. Συγκεκριμένα, κατά την καλλιέργεια του μικροοργανισμού σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου, διαπιστώθηκε η επιτυχής ολοκλήρωση της βιοδιεργασίας, τόσο κατά την χρήση διαφόρων ακάθαρτων γλυκερολών ποικίλης σύστασης και προελεύσεως, όσο και κατά την τέλεση της προπανοδιολικής ζύμωσης με αυξανόμενες αρχικές συγκεντρώσεις υποστρώματος. Ιδιαίτερα ικανοποιητική κρίθηκε η επίδοση του μικροοργανισμού κατά την ημι-συνεχή καλλιέργεια του, όπου παρήχθησαν τελικώς 67.9 g/L 1,3-προπανοδιόλης, με τον συντελεστή απόδοσης $Y_{PDO/S}$ να λαμβάνει την τιμή 0.55 g/g. Τέλος, η δυνατότητα εφαρμογής της προπανοδιολικής ζύμωσης υπό μη στείρες συνθήκες αξιολογήθηκε κατά την συνεχή καλλιέργεια του μικροοργανισμού, όπου και διαπιστώθηκε η σταθερότητα της βιοδιεργασίας ενώ καθαρότητα της καλλιέργειας επικυρώθηκε με την εφαρμογή της ανάλυσης της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και της ηλεκτροφόρησης σε διαβαθμισμένο αποδιατακτικό πήκτωμα (PCR-DGGE).

Abstract

Aim of the present PhD thesis was to investigate the physiological behavior of the bacterial strain *C. butyricum* VPI 1718 during its growth on crude glycerol-based media. Crude glycerol comprises a renewable carbon source and its production is carried out on international basis as the main by-product of soap and alcohol industries. The recently rapid development of alternative fuel production industries, such as biodiesel and bioethanol, has led into the significant increment of crude glycerol reserves. The latter can be considered as a by-product (or/and waste) in need for further purification-process. Therefore, in order to ascertain the suitability of crude glycerol as growth substrate for the strain *C. butyricum* VPI 1718, it was firstly decided to investigate the impact of various impurities which are found in crude glycerol composition upon microbial growth. These impurities corresponded to sodium and potassium phosphate salts (Na_2HPO_4 , K_2HPO_4), sodium chloride (NaCl), methanol, as well as oleic acid. During growth of the strain in anaerobic static flasks, it was observed that, with the exception of phosphate salts, the presence of sodium chloride at concentration of 4.5% (w/w of glycerol) had an evident inhibitory effect not only in terms of microbial growth, but also in terms of 1,3-propanediol production. However, the realization of the bioprocess in batch bioreactor experiments with increased sodium chloride amounts (up to 30% w/w), did not revealed any signs of growth restriction. Moreover, *C. butyricum* presented tolerance against various concentrations of methanol during batch bioreactor, as well as continuous cultures where alcohol additions were carried out at steady states. Nevertheless, the existence of oleic acid in the culture medium was found to negatively influence the biochemical response of the strain, while its tolerance threshold against the monounsaturated fatty acid was determined at 1% (w/w). Additionally, the absence of inhibitory effects during stearin presence in the culture medium (a fatty material composed of 80 % w/w in stearic acid), suggested that the presence of the double bond may play a key role in the growth behavior of the bacterial strain *C. butyricum*.

The second step of the experimental planning anticipated the investigation of the impact of anaerobiosis strategy and the bioreactor geometry upon microbial growth and 1,3-propanediol production. Experimental work was carried out in bioreactors varying in total volume (1-, 3- and 4.5-L) during batch and fed-batch cultivation modes. In batch trials with N_2 gas infusion, the 1,3-propanediol fermentation was successfully accomplished, regardless of initial glycerol concentration imposed and bioreactor geometry. However, in the absence of N_2 continual infusion (and hence in conditions of “self-generated” anaerobiosis culture environment), significant variations concerning the biochemical response of the strain were observed. Specifically, at 1-L bioreactor, the absence of N_2 infusion at high initial glycerol concentration

induced lactate dehydrogenase activity and thus lactic acid synthesis, probably due to partial blockage of phosphoroclastic reaction caused by insufficient self-generated anaerobiosis environment. During fed-batch cultivation with continual N₂ infusion, the strain produced 70.8 g/L of 1,3-propanediol, whereas under self-generated anaerobiosis, 1,3-propanediol pathway was evidently restricted, as only 30.5 g/L of 1,3-propanediol were finally produced. Apparently, N₂ infusion strategy paired with bioreactor geometry can alter the biochemical behavior of the particular strain.

Special attention was paid to the evaluation of the tolerance threshold of the microorganism, regarding the presence of 1,3-propanediol (exogenous and biologically produced), as well as the effect that the aforementioned diol could have upon the fatty acid profile of cellular lipids of *C. butyricum*. For this reason, batch bioreactor trial were conducted in which various additions of 1,3-propanediol were performed during exponential growth phase of the microorganism. Indeed, the strain proved capable of withstanding more than 70 g/L of exogenous and biologically produced 1,3-propanediol. The adaptation dynamics of the strain in high diol content media was further validated during continuous cultivation trials. As far as fatty acid composition of cellular lipids is concerned, the experimental procedure revealed that 1,3-propanediol additions during batch bioreactor trials favored unsaturated fatty acid synthesis. On the contrary, when the diol in question was added during achieved steady-states of continuous cultures, was found to render the cellular fatty acids more saturated. However, by monitoring of the transitory phases, it was noticed that the gradual diol washout had an evident impact in the fatty acid composition, by reverting them more unsaturated similarly to the composition obtained at previously obtained steady-states.

The next step undertaken involved the study of the biochemical response of the strain *C. butyricum* VPI 1718 during its cultivation in continuous mode, under different dilution rates (*D*) and glycerol concentrations, in terms of both 1,3-propanediol production and cellular lipid profile variations. Firstly, a series of continuous cultivations were realized, in which different dilution rates were imposed whereas initial crude glycerol concentration in the inlet medium was maintained constant, while anaerobic cultivation conditions were achieved either by continual N₂ infusion, or through “self-anaerobiosis” environment. The performance of the microorganism was by far better during anaerobic cultivation with constant N₂ infusion, while in a self-anaerobiosis” environment significant biochemical alterations were observed. In fact, during cultivation in the above-mentioned conditions, the production of lactic acid was favored in culture runs with low dilution rates. Additionally, when increasing concentrations of crude glycerol were performed at culture runs of constant dilution rate, the microorganism exhibited

satisfactory production of 1,3-propanediol. In particular, during runs with crude glycerol inlet concentration of 80 g/L, the effluent 1,3-propanediol concentration was 31.1 g/L, accompanied by a bioconversion yield equal to 0.54 g per g of consumed glycerol. Moreover, insights were given in relation to the effect of cultivation conditions (dilution rate, crude glycerol concentration, aeration strategy) upon cellular lipid composition of the strain *C. butyricum* VPI 1718. It was observed that the presence of N₂ infusion rendered the cellular lipids more saturated, in comparison to their composition under “self-anaerobiosis” environment conditions. Furthermore, the increment of crude glycerol inlet concentration rendered the fatty acid composition of bacterial cellular lipids by far more saturated.

Finally, the present PhD thesis evaluated and proposed the possibility of 1,3-propanediol fermentation application under non-sterile cultivation conditions, as an exploitable aspect in the attempt of an industrial application of the process. For this reason, the performance of the strain *C. butyricum* was evaluated during its growth at different cultivation modes. Specifically, in batch bioreactor trials, the microorganism was able of to successful 1,3-propanediol fermentation completion, during utilization of glycerol feedstock of various origin and composition, as well as during increasing concentrations of crude glycerol. Of particular importance was the performance of the strain in fed-batch trials, where 67.9 g/L were finally produced with a bioconversion yield of 0.55 g per g of consumed substrate. Last but not least, the potential application of 1,3-propanediol fermentation under non-sterile conditions was validated during continuous cultivation of the microorganism. Indeed, the sustainability of the proposed bioprocess was established through a continuous run of nearly a month, whereas the stability of the process was validated by the elaboration of PCR-DGGE analysis.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Εισαγωγικά στοιχεία για την γλυκερόλη

Η γλυκερόλη αποτελεί την εμπειρική ονομασία της χημικής οργανικής ένωσης προπανο-1,2,3-τριόλη, η οποία είναι μία τρισθενής αλκοόλη. Η γλυκερόλη περιέχει στο μόριο της τρεις υδροξυλομάδες, στις οποίες οφείλει την υδατοδιαλυτή της ικανότητα και την υδρόφιλη φύση της (Rahmat et al., 2010). Αποτελεί ένα βιομηχανικό προϊόν με ένα ευρύ φάσμα χρήσεων μεταξύ των οποίων ως διαλύτης, μέσο διαβροχής, πλαστικοποιητής, καθώς επίσης και ως πρώτη ύλη στην παραγωγή φαρμάκων, καλλυντικών, βερνικιών, σαπώνων και εκρηκτικών υλών (όπως η νιτρογλυκερίνη) (Wang et al., 2001). Επιπλέον, ένα ποσοστό αυτής χρησιμοποιείται ως υποκατάστατο της ζάχαρης σε διαβητικούς ή ως καθαρτικό (Wang et al., 2001; da Silva et al., 2009).

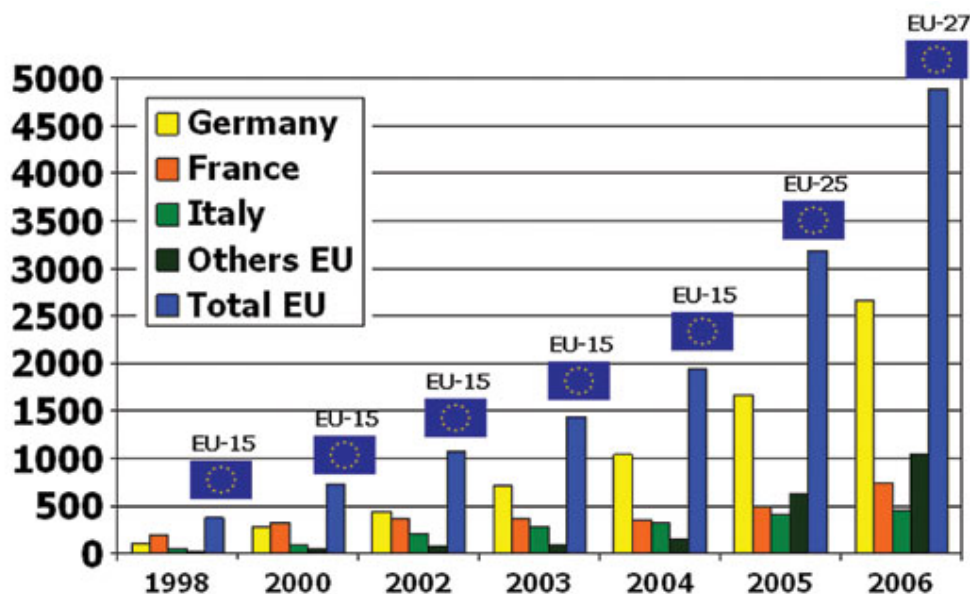
Η παραγωγή της γλυκερόλης επιτυγχάνεται είτε μέσω των μικροβιακών ζυμώσεων, με πιο γνωστή την περίπτωση της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae* κατά την τέλεση της αλκοολικής ζύμωσης και συγκεκριμένα κατά τον σχηματισμό των δευτερογενών μεταβολικών προϊόντων της αλκοολικής ζύμωσης μέσω της γλυκεροπυροσταφυλικής ζύμωσης, είτε χημικά από την επεξεργασία πρώτων υλών πετροχημικής φύσεως, με την μέθοδο της επιχλωρυδίνης (Pagliaro et al., 2007). Παραδοσιακά, η γλυκερόλη παράγεται μέσω της υδρόλυσης των λιπών κατά την διαδικασία παρασκευής σαπώνων. Ωστόσο, η αντικατάσταση των σαπώνων με μη σαπωνοειδούς φύσεως απορρυπαντικά, έχει μειώσει σημαντικά την παραγωγή της γλυκερόλης από τη βιομηχανία σαπώνων σε παγκόσμιο επίπεδο. Γενικά, η γλυκερόλη αποτελεί υλικό εκκινήσεως για μια πληθώρα χημικών μετατροπών, μέσω δύο διακριτών οδών. Η πρώτη οδός περιλαμβάνει την οξείδωση ή την αναγωγή της γλυκερόλης σε προϊόντα με τρία άτομα άνθρακα, ενώ η δεύτερη οδός περιλαμβάνει την αντίδραση της γλυκερόλης με άλλα μόρια για τη δημιουργία νέων προϊόντων (Pagliaro et al., 2007). Από την επιλεκτική οξείδωση ή αναγωγή της γλυκερόλης, δύναται να παραληφθούν χαρακτηριστικά προϊόντα όπως η δι-υδροξυακετόνη, το γαλακτικό οξύ, το πυροσταφυλικό οξύ, η

προπανόλη, η ισοπροπανόλη, η ακετόνη, η ακρολεΐνη, η προπιοναλδεΐδη, αλλά και το υδροξυ-πυροσταφυλικό οξύ (Claude, 1999; da Silva et al., 2009; Rahmat et al., 2010). Ενδιαφέρον παρουσιάζει, εξάλλου, η παραγωγή της ανθρακικής γλυκερόλης (glycerol carbonate) η οποία επιτυγχάνεται μέσω της κατεργασίας της γλυκερόλης παρουσία διοξειδίου του άνθρακα (Pagliaro et al., 2007; Rahmat et al., 2010).

1.1.1 Παραγωγή βιολογικών καυσίμων πρώτης γενιάς

Ως γνωστόν, η ανησυχία της διεθνούς κοινότητας σχετικά με τις επιπτώσεις της αλόγιστης χρήσης των αποθεμάτων πετρελαίου, τόσο σε επίπεδο παγκόσμιας οικονομίας, όσο και σε επίπεδο περιβάλλοντος και κλιματικής αλλαγής, έστρεψε το ενδιαφέρον των ερευνητών προς την αναζήτηση εναλλακτικών τύπων καυσίμων, φιλικότερων προς το περιβάλλον. Το γεγονός αυτό οδήγησε στην άνθηση και την ανάπτυξη της βιομηχανίας παραγωγής βιολογικών καυσίμων πρώτης γενιάς, καταλαμβάνοντας ολοένα και περισσότερο χώρο στην παγκόσμια αγορά καυσίμων τις τελευταίες δεκαετίες. Ο όρος βιολογικά καύσιμα πρώτης γενιάς αναφέρεται στην παραγωγή εναλλακτικού τύπου καυσίμων από διαθέσιμες ενεργειακές καλλιέργειες πλούσιες σε σάκχαρα, καθώς επίσης και σε βρώσιμες ή μη φυτικές καλλιέργειες με υψηλή περιεκτικότητα σε λίπος, μέσω της χρήσης συμβατικών μεθόδων καλλιέργειας. Από το σύνολο των βιολογικών καυσίμων πρώτης γενιάς, ευρείας χρήσεως και εφαρμογής τυγχάνουν το βιολογικό πετρέλαιο (biodiesel) και η βιολογική αιθανόλη (bioethanol).

Το βιολογικό πετρέλαιο αποτελεί το συνηθέστερα απαντώμενο βιολογικό καύσιμο στην Ευρώπη, με κυριότερες χώρες-παραγωγούς την Γερμανία και την Γαλλία, ενώ αξιοσημείωτες παραγωγικότητες εμφανίζουν τα τελευταία χρόνια χώρες όπως η Λιθουανία, η Πολωνία και η Ρουμανία (Γράφημα 1.1). Χαρακτηριστικό είναι άλλωστε το γεγονός ότι η Ευρωπαϊκή Ένωση με κοινοτική οδηγία της (2003/30/EC) έθεσε ως στόχο για το έτος 2010 την χρήση βιολογικών καυσίμων για κάθε κράτος-μέλος σε ποσοστό 5.75% επί του συνόλου των καυσίμων κινήσεως.



Γράφημα 1.1. Παραγωγή βιολογικού πετρελαίου στις Ευρώπη των 27 χωρών (σε χιλιάδες τόνους) (Πηγή:

<http://www.biofuelsdigest.com>)

Εξάλλου, η τεχνολογία που ακολουθείται για την παραγωγή βιολογικού πετρελαίου περιλαμβάνει την εστεροποίηση (*trans-esterification*) των τριγλυκεριδίων των φυτικών ελαίων (φοινικέλαιου, ηλιέλαιου, καλαμποκέλαιου, σογιέλαιου και ελαίου της ελαιοκράμβης) παρουσία βραχείας αλύσου αλκοόλης (συνηθέστερα μεθανόλης ή αιθανόλης), με τελικό προϊόν τους μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων. Η εν λόγω διεργασία δύναται να περιλαμβάνει τη χρήση χημικών καταλυτών (NaOH ή KOH), βιολογικών καταλυτών, ήτοι ενζύμων και ειδικότερα λιπασών, ενώ κατά περίπτωση η εν λόγω διεργασία τελείται και απουσία καταλυτών, με ταυτόχρονη εστεροποίηση των τριγλυκεριδίων και εστεροποίηση των λιπαρών οξέων (μέθοδος υπερκρίσιμης μεθανόλης) (Saka and Kusdiana, 2001). Αξίζει να σημειωθεί ότι κατά τη χημική ή ενζυμική διεργασία παραγωγής βιολογικού πετρελαίου, η μεθυλεστεροποίηση των λιπαρών υλών έχει ως απόρροια τη γένεση ενός απόνερου (απόβλητου), το οποίο είναι πλούσιο σε γλυκερόλη (2-10% κ. ο.). Το απόνερο αυτό μπορεί να συμπυκνωθεί και να καθαριστεί (μέχρις ενός ορίου, καθόσον η διεργασία καθαρισμού γενικά είναι ιδιαίτερος ακριβή), ενώ η ποσότητα καθαρής γλυκερόλης (90% κ. β.) που δύναται να παραχθεί από 10 kg ελαίου το οποίο υφίσταται μεθανόλυση

προκειμένου να παραχθεί βιολογικό πετρέλαιο είναι της τάξεως του 1 kg (Mu et al., 2006; Amaral et al., 2009; da Silva et al., 2009; Papanikolaou et al., 2009).

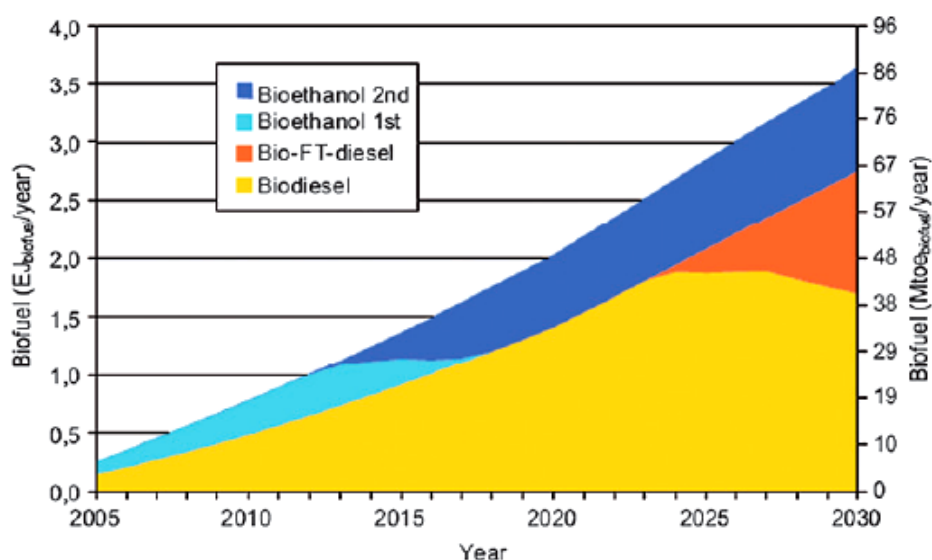
Επόμενο σύνθητες βιολογικό καύσιμο αποτελεί η βιολογική αιθανόλη, χρησιμοποιούμενη ως μίγμα με το συμβατικό πετρέλαιο σε μηχανές εσωτερικής καύσεως, με συχνότερα απαντώμενη την αναλογία 85%-15% βιοαιθανόλης-πετρελαίου, γνωστή και ως E85. Επί του παρόντος, οι Ηνωμένες Πολιτείες αποτελούν τη μεγαλύτερη παραγωγό χώρα σε παγκόσμιο επίπεδο, με τη Βραζιλία να καταγράφει τον μεγαλύτερο όγκο εξαγωγών βιολογικής αιθανόλης στον κόσμο. Συνηθέστερες πρώτες ύλες για την παραγωγή της βιολογικής αιθανόλης αποτελούν ενεργειακές καλλιέργειες καλαμποκιού, καλαμοσάκχαρων, ζαχαρότευτλων, αλευριού, και εναλλακτικά το σόργο και οι κόκκοι δημητριακών (Draye et al., 2001). Η τεχνολογία παραγωγής της βιολογικής αιθανόλης πρώτης γενιάς βασίζεται στην βιοτεχνολογική μετατροπή των πρώτων υλών στο εν λόγω βιολογικό καύσιμο μέσω δυο σταδίων. Το πρώτο στάδιο συνίσταται στην ενζυμική υδρόλυση των πρώτων υλών και την παραλαβή κλάσματος σακχάρων. Εν συνεχεία, σε δεύτερο στάδιο λαμβάνει χώρα η βιομετατροπή των σακχάρων από στελέχη ζυμών και βακτηρίων ανήκοντα στα είδη *Saccharomyces cerevisiae* και *Zymomonas mobilis* αντιστοίχως, σε αιθανόλη, μέσω της τέλεσης της αλκοολικής ζυμώσεως (Gray et al., 2006; Balat et al., 2008). Για την παραλαβή του τελικού κλάσματος της βιολογικής αιθανόλης απαιτείται απόσταξη και συμπύκνωση αυτής, πριν την χρήση της ως καύσιμο (Luque et al., 2008).

Τεκμαίρεται συνεπώς ότι τα εν λόγω βιολογικά καύσιμα συγκεντρώνουν έναν αριθμό πλεονεκτημάτων ως αντικαταστάτες του συμβατικού πετρελαίου, από πλευράς οικονομίας, σεβασμού προς το περιβάλλον και εξοικονόμησης φυσικών πόρων. Ωστόσο, η εφαρμογή αυτών των τεχνολογιών συνοδεύεται και από μια σειρά μειονεκτημάτων. Εξ' αυτών, άξια αναφοράς κρίνεται η συσχέτιση της παραγωγής των βιολογικών καυσίμων με την καλλιέργεια φυτών τα οποία προορίζονται για σίτιση, γεγονός που συνεπάγεται την μείωση των προς αγροτική εκμετάλλευση αρόσιμων χερσαίων εκτάσεων, με άμεσο επακόλουθο την αύξηση των τιμών των

τροφίμων. Ως εκ τούτου, κατέστη επιτακτική η ανάγκη της εύρεσης εναλλακτικών μεθόδων παραγωγής βιολογικών καυσίμων, που να συμπεριλαμβάνουν την αξιοποίηση φθηνότερων πρώτων υλών, η φύση των οποίων δεν θα ανταγωνίζεται τις εδώδιμες καλλιέργειες (Luque et al., 2008). Έτσι, εισηχθη η τεχνολογία παραγωγής βιολογικών καυσίμων δεύτερης γενιάς στον τομέα των εναλλακτικών τύπων καυσίμων.

1.1.2 Παραγωγή βιολογικών καυσίμων δεύτερης γενιάς

Τα βιολογικά καύσιμα δεύτερης γενιάς προέρχονται από την αξιοποίηση εναλλακτικών πρώτων υλών, όπως αποβλήτων λιπών και ελαίων, καθώς επίσης και πηγών βιομάζας (φυτικής ή μικροβιακής προελεύσεως). Η παραγωγή τους συνοδεύεται από μια σειρά τεχνολογικών καινοτομιών και διαφοροποιήσεων, βρισκόμενων ακόμα εν εξελίξει, και η πλήρης διάθεση τους σε εμπορική κλίμακα αναμένεται να λάβει χώρα στο εγγύς μέλλον (Γράφημα 1.2).



Γράφημα 1.2 Προβλεπόμενη παραγωγή βιολογικών καυσίμων πρώτης και δεύτερης γενιάς στην Ευρώπη των 27 χωρών (πηγή: Luque et al., 2008)

Ειδικότερα, η παραγωγή βιολογικού πετρελαίου δεύτερης γενιάς συνίσταται στην χρήση πρώτων υλών προερχόμενων από μη βρώσιμες φυτικές καλλιέργειες, όπως για παράδειγμα τα φυτά

Brassica carinata και *Jatropha curcas*, με σύσταση πλούσια σε φυτικό λίπος, των οποίων η καλλιέργεια δύναται να λάβει χώρα σε μη οργώσιμες εκτάσεις (Dorado et al., 2004; Achten et al., 2007; Tiwari et al., 2007). Ωστόσο, η τεχνολογία που εφαρμόζεται για την μετατροπή του φυτικού λίπους και την παραλαβή του βιολογικού πετρελαίου, ομοιάζει με εκείνη της παραδοσιακής μετεστεροποίησης των τριγλυκεριδίων που ακολουθείται για την παρασκευή βιολογικού πετρελαίου πρώτης γενιάς. Ακόμη, σημαντική κρίνεται και η δυνατότητα χρήσης απόβλητων λιπών και ελαίων ως πρώτων υλών, αφού πρωτίστως υποστούν επεξεργασία με οξύ για την απομάκρυνση του υψηλού ποσοστού των ελεύθερων λιπαρών οξέων που περιέχουν (Zong et al., 2007; Berchmans and Hirata, 2008). Επιπλέον, ιδιαίτερο ενδιαφέρον συγκεντρώνει η χρήση του μικροβιακού λίπους ως υλικό εκκινήσεως για την παρασκευή βιολογικού πετρελαίου δεύτερης γενιάς. Το εν λόγω μικροβιακό λίπος δύναται να παραχθεί από φύκη, καθώς επίσης και από ζύμες ή μύκητες (Ratledge and Cohen, 2008; Vincente et al., 2009; Subramaniam et al., 2010; Papanikolaou and Aggelis, 2011). Για την μεν καλλιέργεια φυκών, μελέτες δεικνύουν ότι η παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους που δύναται να προκύψει μπορεί να φτάσει έως το 75% επί ξηρού βάρους (αρκετά υψηλότερη σε σχέση με τις αποδόσεις των διαφόρων φυτικών καλλιεργειών), ενώ η καλλιέργεια αυτών απαιτεί την εκμετάλλευση σημαντικά μικρότερων εκτάσεων. Αναφορικά με την καλλιέργεια μικροοργανισμών για την παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους, η εν λόγω διεργασία εμφανίζεται ελπιδοφόρα, δοθείσης της ικανότητας των μικροοργανισμών να αναπτύσσονται σε φθηνά, γεωργο-βιομηχανικά υπολείμματα και παραπροϊόντα, μειώνοντας σημαντικά το κόστος της βιομετατροπής (Papanikolaou and Aggelis, 2011).

Τέλος, στην περίπτωση της βιολογικής αιθανόλης δεύτερης γενιάς, οι αλλαγές στην τεχνολογία παραγωγής της συνίστανται στην αξιοποίηση κυτταρινούχων και ημι-κυτταρινούχων υλικών μέσω του σταδίου της υδρόλυσης και της μικροβιακής ζύμωσης (Tilman et al., 2006; Lange, 2008). Ακόμη, παραπροϊόντα των υλικών αυτών, όπως για παράδειγμα η λιγνίνη, δύνανται να χρησιμοποιηθούν για παραγωγή ενέργειας και θέρμανσης στις εκάστοτε εργοστασιακές

εγκαταστάσεις, με άμεση μείωση στα λειτουργικά κόστη των βιομηχανικών μονάδων (Luque et al., 2008).

1.1.3 Το ζήτημα της βιομηχανικής γλυκερόλης

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα ανωτέρω, καθίσταται σαφές ότι η παραγωγή βιολογικών καυσίμων συγκεντρώνει μια σειρά από οφέλη, δίνοντας το έναυσμα για την αποδέσμευση της ανθρωπότητας από την αλόγιστη χρήση των υπό εξάντληση κοιτασμάτων πετρελαίου, καθώς επίσης και για την προστασία του περιβάλλοντος και τον περιορισμό του φαινομένου του θερμοκηπίου. Ωστόσο, η εν λόγω διεργασία συνοδεύεται και από μια σειρά από προκλήσεις-ανησυχίες σχετικά με την βιωσιμότητά της. Συγκεκριμένα, η ραγδαία ανάπτυξη της βιομηχανίας παραγωγής βιολογικού πετρελαίου τις τελευταίες δεκαετίες, οδήγησε στην εναπόθεση τεράστιων αποθεμάτων βιομηχανικής γλυκερόλης, με άμεσο επακόλουθο την μείωση της τιμής της γλυκερόλης και την δημιουργία περιβαλλοντικών ανησυχιών. Σε οικονομικό επίπεδο, η μείωση της τιμής της γλυκερόλης επέφερε αρνητικές επιπτώσεις τόσο στην βιομηχανία παραγωγής γλυκερόλης, όσο και στην βιομηχανία παραγωγής βιολογικών καυσίμων, δεδομένου ότι η βιομηχανική γλυκερόλη κατέστη ένα απόβλητο, με μηδενικό ή και αρνητικό κόστος. Μάλιστα, εξαιτίας του γεγονότος ότι το εν λόγω απόβλητο δύναται να περιέχει πλήθος υπολειμμάτων, όπως αλκοόλη, άλατα, βαρέα μέταλλα ή ελεύθερα λιπαρά οξέα, καθίσταται υποχρεωτικό το στάδιο της εξυγίανσής του, πριν την αξιοποίηση της εναπομείνουσας γλυκερόλης σε διάφορες συμβατικές εφαρμογές (Johnson and Taconi, 2007). Ως εκ τούτου, η βιομηχανική γλυκερόλη δύναται να αποτελέσει μια πρώτη ύλη για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας, μέσω της αξιοποίησής της με χημικές και βιοτεχνολογικές μεθόδους.

Αναφορικά με τις χημικές μεθόδους αξιοποίησης της βιομηχανικής γλυκερόλης, αυτές δύναται να περιλαμβάνουν την μετατροπή της σε χημικά συστατικά ή καύσιμα, μέσω διαφόρων ειδών χημειο-επιλεκτικής κατάλυσης. Παραδείγματα τέτοιων καταλύσεων αποτελούν η επιλεκτική

οξειδωση για την παραγωγή γλυκερικού οξέος, δι-υδροξυ-ακετόνης ή μεσοξαλικού οξέος, η καταλυτική αφυδάτωση για την παραγωγή ακρολεΐνης, η πυρόλυση και εξαέρωση της για την παραγωγή μονοξειδίου του άνθρακα και υδρογόνου, αλλά και η επιλεκτική *trans*-εστεροποίηση της γλυκερόλης για την παραγωγή μονογλυκεριδίων-γαλακτωματοποιητών (Johnson and Taconi, 2007). Ωστόσο, οι εν λόγω μέθοδοι δεν επιτρέπουν την απευθείας χρήση της βιομηχανικής γλυκερόλης, στη περίπτωση που στην τελευταία περιέχονται υψηλά ποσά διαφόρων υπολειμμάτων-ακαθαρσιών (Fan and Burton, 2009).

Αντιθέτως, μια από της πλέον ελπιδοφόρες μεθόδους αξιοποίησης της ακάθαρτης γλυκερόλης αποτελεί η δυνατότητα της βιομετατροπής της σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας, μέσω των μικροβιακών ζυμώσεων. Παραδείγματα τέτοιων προϊόντων αποτελούν η δι-υδροξυ-ακετόνη, το ηλεκτρικό οξύ, το κιτρικό οξύ, το προπιονικό οξύ, το μικροβιακό λίπος, η αιθανόλη, τα πολύ-υδροξυ-αλκανοϊκά οξέα καθώς επίσης και η 1,3-προπανοδιόλη (Papanikolaou and Aggelis, 2002; Lee et al., 2004; Ito et al., 2005; Koller et al., 2005; Yazdani and González, 2007; Papanikolaou et al., 2008; Pyle et al., 2008; Amaral et al., 2009; da Silva et al., 2009; André et al., 2010; Fan et al., 2010; Chatzifragkou et al., 2011). Επιπλέον, είναι εφικτή η αναερόβια αποικοδόμηση της βιομηχανικής γλυκερόλης μέσω της διεργασίας της οξεογένεσης, με επόμενο στάδιο την μεθανογένεση, για την παραγωγή βιολογικού αερίου, αποτελούμενου από μεθάνιο και διοξείδιο του άνθρακα (Antoni et al., 2007). Εξ' αυτών των κατευθύνσεων, το μεγαλύτερο ενδιαφέρον και ιδιαίτερος από πλευράς δυνατότητας εφαρμογής της διεργασίας σε βιομηχανική κλίμακα, συγκεντρώνει η βιοτεχνολογική μετατροπή της βιομηχανικής γλυκερόλης σε 1,3-προπανοδιόλη, συμπεριλαμβανομένων και άλλων δευτερευόντων προϊόντων όπως οξικό οξύ, βουτυρικό οξύ, αιθανόλη, 2,3-βουτανοδιόλη και υδρογόνο (Deckwer, 1995; Biebl et al., 1999; Zeng and Biebl, 2002; Zeng and Sabra, 2011).

1.2 Η γημική ένωση 1,3-προπανοδιόλη

1.2.1 Ιστορικό υπόβαθρο

Η 1,3-προπανοδιόλη αποτελεί ένα από τα πιο γνωστά προϊόντα των μικροβιακών ζυμώσεων. Ανακαλύφθηκε τυχαία από τον August Freund το 1881, σε μια μικτή καλλιέργεια με υπόστρωμα γλυκερόλης, στην οποία περιλαμβάνονταν το βακτήριο *Clostridium pasteurianum* ως ενεργός μικροοργανισμός (Freund, 1881). Η παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης από βακτήρια του γένους *Clostridium* περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1983, ως μια επιμέρους διαδικασία για την παραλαβή εκλεπτυσμένων προϊόντων από φύκη που εκκρίνουν γλυκερόλη (Nakas et al. 1983).

Γενικά, η εν λόγω διόλη αποτελεί μια οργανική ουσία, δυνάμενη να χρησιμοποιηθεί σε χημικές αντιδράσεις συνθέσεως για την παραγωγή βιοαποικοδομήσιμων πλαστικών τύπου πολυεστέρων, πολυαιθέρων και πολυουρεθανών, εξαιτίας της παρουσίας δυο υδροξυλομάδων στις θέσεις 1 και 3 στο μόριό της (Biebl et al., 1999). Ωστόσο, η υψηλή τιμή της στο πρόσφατο παρελθόν [περί τα 20 U.S.\$/ kg, σύμφωνα με τους Millet et al. (1993)] δεν της επέτρεπε να ανταγωνιστεί άλλες διόλες με χαμηλότερη τιμή, προερχόμενες από την βιομηχανία πετρελαιοειδών, όπως η 1,3-αιθανοδιόλη, η 1,2-προπανοδιόλη και η 1,4-βουτανοδιόλη, με τιμές περί τα 2 U.S.\$/ kg. Ως εκ τούτου, η χρήση της 1,3-προπανοδιόλης περιοριζόταν για την παραγωγή διαλυτών ή πολυμερών, σε βιομηχανίες που κατείχαν ένα πολύ μικρό ποσοστό επί του παγκοσμίου συνόλου παραγωγής και αγοράς χημικών ειδών (Sullivan, 1993; Biebl et al. 1999). Το διάστημα μεταξύ 1995-1996 αποτέλεσε ορόσημο για την θέση της 1,3-προπανοδιόλης σε επίπεδο αγοράς, όταν οι δύο κύριες εταιρίες παραγωγής χημικών, η “Shell” και η “Dupont”, ανακοίνωσαν την διάθεση στο εμπόριο ενός νέου πολυεστέρα, βασιζόμενου στο τερεφθαλικό οξύ και την 1,3-προπανοδιόλη (polytrimethylene terephthalate), φέροντας τα εμπορικά ονόματα “PTT” για την “Shell” και “3GT” για την “Dupont” (Zeng and Biebl, 2002). Το εν λόγω πολυμερές αποτελεί έναν βιοδιασπώμενο πολυεστέρα, κατάλληλο για την βιομηχανία παραγωγής ινών, υφασμάτων και συσκευασίας, κατέχοντας μια σειρά από εξαιρετικές φυσικές ιδιότητες, όπως καλή ελαστικότητα, αντοχή στην

βαφή και χαμηλή ηλεκτροστατικότητα, ενώ παράλληλα η διαδικασία παραγωγής του λαμβάνει χώρα σε ήπιες για το περιβάλλον συνθήκες κατασκευής (Biebl et al. 1999; Zeng and Biebl, 2002; Saxena et al., 2009). Επίσης, οι αξιόλογες μηχανικές ιδιότητες του παραγόμενου “PTT” πλαστικού (αντοχή σε δυνάμεις εφελκυσμού και σε υψηλές θερμοκρασίες) αλλά και η συμφέρουσα τιμή παραγωγής του, δύνανται να αντικαταστήσουν τα παραδοσιακά πλαστικά “PET” (polyethylene terephthalate) και “PBT” (polybutylene terephthalate) (Zeng and Biebl, 2002). Λαμβάνοντας υπ’ όψιν τα ανωτέρω, καθίσταται σαφής η αιτία για την οποία η 1,3-προπανοδιόλη εξελίχθηκε τα τελευταία χρόνια από ένα εκλεπτυσμένο χημικό προϊόν, σε ένα χημικό προϊόν ευρείας παραγωγής.

Επιπρόσθετα, εκτός από τις δυνατότητες της χρήσης της 1,3-προπανοδιόλης ως μονομερές, η εν λόγω οργανική ένωση παρουσιάζει πλήθος συμπληρωματικών ιδιοτήτων, καθιστώντας την χρήσιμη και σε άλλους τομείς της βιομηχανίας. Ειδικότερα, η 1,3-προπανοδιόλη προσδίδει βελτιωμένες ιδιότητες κατά την προσθήκη της σε διαλύτες, κόλλες, ρητίνες, απορρυπαντικά και καλλυντικά. Ακόμη, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε προϊόντα εργοστασιακών απολυμάνσεων και σε βιομηχανικά συστήματα ανακύκλωσης νερού, ως υλικό αποπαγοποίησης στην αεροπορία, ως αντιψυκτικό σε βιομηχανικές εγκαταστάσεις μύρας και γαλακτοκομικών προϊόντων, αλλά και ως μη-τοξικός αντικαταστάτης της αιθυλενογλυκόλης σε μηχανές εσωτερικής καύσεως (Zeng and Biebl, 2002; Zeng and Sabra, 2011).

1.2.2 Χημικές διεργασίες για την παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης

Η βιομηχανική παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης βασίζεται στην τέλεση χημικών διεργασιών και διενεργείται μέσω δύο διακριτών μεθόδων. Η πρώτη μέθοδος, ονομαζόμενη ως “Degussa” και ανήκουσα στην εταιρία “Dupont”, περιλαμβάνει σε πρώτο στάδιο την ενυδάτωση της ακρολεΐνης σε 3-υδροξυ-προπιοναλδεΐδη υπό μέτριες συνθήκες πίεσεως και θερμοκρασίας και ακόλουθα την καταλυτική υδρογόνωση της τελευταίας παρουσία ρουβιδίου σε 1,3-προπανοδιόλη, υπό συνθήκες υψηλής πίεσεως (90 bar) (Papanikolaou, 2009; Liu et al., 2010). Η δεύτερη μέθοδος

εφαρμόζεται από την εταιρία “Shell”, έχοντας ως υλικό εκκινήσεως το οξείδιο του αιθυλενίου παραγόμενο από την οξείδωση του αιθυλενίου. Το οξείδιο του αιθυλενίου μετατρέπεται σε 3-υδροξυ-προπιοναλδεΰδη, υπό την άσκηση ιδιαίτερα υψηλών συνθηκών πίεσεως (περίπου 150 bar). Εν συνεχεία, η αλδεΰδη εξάγεται από την οργανική φάση παρουσία νερού και υπόκειται σε υδρογόνωση, με την χρήση νικελίου ως καταλύτη, υπό συνθήκες υψηλών πιέσεων, για την παραλαβή του τελικού προϊόντος (1,3-προπανοδιόλη) (Zeng and Biebl, 2002; Papanikolaou, 2009; Liu, 2010). Αναφορικά με το τελικό προϊόν των ανωτέρω διεργασιών σε σχέση με το υλικό εκκινήσεως, η πρώτη διεργασία δίδει ως συντελεστή μετατροπής περί το 65% της αρχικής ποσότητας ακρολεΐνης, ενώ η δεύτερη μέθοδος φτάνει το 80% στην περίπτωση της χρήσης του οξειδίου του αιθυλενίου (Zeng and Biebl, 2002; Papanikolaou, 2009).

Το βασικό μειονέκτημα που χαρακτηρίζει και τις δυο μεθόδους της χημικής σύνθεσης της 1,3-προπανοδιόλης, έγκειται στη χρήση υψηλών συνθηκών πίεσεως και θερμοκρασίας. Ακόμη, για την παραγωγική διαδικασία απαιτούνται ακριβοί καταλύτες, ενώ ταυτόχρονα χρησιμοποιούνται τοξικά ενδιάμεσα των καταλυτών (ακρολεΐνη, ρουβίδιο) (Zeng and Biebl, 2002; Raynaud et al., 2003; da Silva et al., 2009; Papanikolaou, 2009). Για τον λόγο αυτό, καθίσταται επιτακτική η ανάγκη εύρεσης νέων μεθόδων, φιλικότερων προς το περιβάλλον και το προσωπικό εργασίας, για τη παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης. Υπό το πρίσμα τούτο, η εξέλιξη της τεχνολογίας και ειδικότερα της επιστήμης της Βιοτεχνολογίας τα τελευταία χρόνια, οδήγησε στη ανάπτυξη των βιοτεχνολογικών μεθόδων παραγωγής της 1,3-προπανοδιόλης, οι οποίες συγκροτούν μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική οδό για την σύνθεση της εν λόγω οργανικής ένωσης (Zeng and Biebl, 2002; Jonson and Taconi, 2007; Papanikolaou, 2009; Zeng and Sabra, 2011).

1.2.3 Βιοτεχνολογική παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης

Στις αρχές της δεκαετίας του 2000, η βιοτεχνολογική παραγωγή του “PTT” εισήχθη εμπορικά στην παγκόσμια αγορά από τις εταιρίες “Dupont” και “Genencor” με την ανάπτυξη ενός

ανασυνδυασμένου στελέχους *Escherichia coli* για την παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης, με την χρήση της γλυκόζης ως υπόστρωμα ανάπτυξης (Nakamura and Whited, 2003; Zeng and Sabra, 2011). Ωστόσο, η παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης δύναται να πραγματοποιηθεί από φυσικά στελέχη βακτηρίων μέσω της μικροβιακής μετατροπής της γλυκερόλης. Η εν λόγω βιοτεχνολογική οδός είχε μελετηθεί ευρέως στο παρελθόν από την επιστημονική κοινότητα και τα τελευταία χρόνια ελκύει ξανά το ενδιαφέρον των ερευνητών, εξαιτίας της αύξησης των αποθεμάτων γλυκερόλης, ως απόρροια της παγκόσμιας μεταστροφής προς εναλλακτικού τύπου καύσιμα, φιλικότερα στο περιβάλλον, όπως το βιολογικό πετρέλαιο. Σημειώνεται ότι κατά την παραγωγή 100 kg βιολογικού πετρελαίου, 10 kg ακάθαρτης-βιομηχανικής γλυκερόλης παράγονται ως παραπροϊόν της διεργασίας αυτής (Meesters et al., 1996; Papanikolaou et al., 2000). Υπό αυτό το πρίσμα, ένας σημαντικός αριθμός μελετών στην διεθνή βιβλιογραφία σχετίζεται με την αξιοποίηση της ακάθαρτης γλυκερόλης ως υπόστρωμα για την τέλεση μικροβιακών ζυμώσεων (Papanikolaou and Aggelis, 2002; Ito et al., 2005; Song and Lee, 2006; Papanikolaou et al., 2008; da Silva et al., 2008; Pyle et al., 2008; André et al., 2010). Συγκεκριμένα, ενδιαφέρον συγκεντρώνει η χρήση της ακάθαρτης γλυκερόλης ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας από ένα πλήθος προκαρυωτικών μικροοργανισμών, δυνάμενων να παράγουν μεταβολίτες υψηλής προστιθέμενης αξίας για την βιομηχανία χημικών, όπως η 1,3-προπανοδιόλη (Zeng and Sabra, 2011).

1.2.3.1 Μικροοργανισμοί-παραγωγοί της 1,3-προπανοδιόλης

Η βιοτεχνολογική μετατροπή της γλυκερόλης σε 1,3-προπανοδιόλη επιτυγχάνεται με την χρήση προκαρυωτικών μικροοργανισμών υπό αναερόβιες ή μικρο-αερόφιλες συνθήκες καλλιέργειας. Η πλειονότητα των μικροοργανισμών αυτών συγκαταλέγεται στο γένος *Clostridium* sp., την οικογένεια Enterobacteriaceae και την ομάδα των γαλακτικών βακτηρίων. Από το γένος *Clostridium* sp., το μη-παθογόνο, υποχρεωτικά αναερόβιο βακτήριο *Clostridium butyricum* θεωρείται ως ο καταλληλότερος μικροοργανισμός για την εν λόγω βιοδιεργασία (Abbad-

Andaloussi et al. 1995; Zeng, 1996; Biebl et al. 1999; Papanikolaou et al., 2000; 2004; Gonzáles-Rajuelo et al., 2006), ακολουθούμενος από μικροοργανισμούς γνωστούς για την ικανότητα τους να τελούν την ζύμωση ακετόνης/βουτανόλης όπως τα βακτήρια *C. acetobutylicum*, *C. pasteurianum* και *C. beijerinckii* (Forsberg, 1987; Dabrock et al., 1992; Biebl, 2001). Από την οικογένεια των Enterobacteriaceae, τα δυνητικά αναερόβια βακτήρια *Klebsiella pneumoniae* και *Citrobacter freundii* φέρονται ως κατάλληλα για την τέλεση της προπανοδιολικής ζύμωσης (Homman et al., 1990; Boenigk et al., 1993; Pflugmacher and Gottschalk, 1994; Menzel et al., 1997; Barbirato et al., 1998; Huang et al., 2002; Nementh et al., 2003; Yang et al., 2007). Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι ενώ οι συνθήκες καλλιέργειας των εν λόγω βακτηρίων ως μικρο-αερόφιλα τα καθιστούν σχετικά εύκολα στον χειρισμό τους, απαιτούνται ειδικές προφυλάξεις για την καλλιέργεια τους, καθώς συγκαταλέγονται στους δυνητικά παθογόνους μικροοργανισμούς. Εξάλλου, στην ίδια οικογένεια βακτηρίων περιλαμβάνονται και άλλα είδη ικανά να μεταβολίσουν την γλυκερόλη προς 1,3-προπανοδιόλη, όπως τα βακτήρια *Klebsiella oxytoca* (Homman, 1990; Yang et al., 2007; Metsoviti et al., 2012) και *Enterobacter agglomerans* (Barbirato et al., 1995; 1997). Τέλος, όσον αφορά στην ομάδα των γαλακτικών βακτηρίων, στελέχη όπως *Lactobacillus brevis*, *L. buchneri* και *L. reuteri* φέρονται στην διεθνή βιβλιογραφία ως ικανά να παράγουν 1,3-προπανοδιόλη, αλλά απαιτείται η παρουσία σακχάρου ως πηγή άνθρακα και ενέργειας (γλυκόζη, μαλτόζη, φρουκτόζη κ.α.), ενώ η γλυκερόλη χρησιμοποιείται ως τελικός αποδέκτης ηλεκτρονίων (NADH_2) (Schülz and Radler 1984; Veiga da Cunha and Foster, 1992; Lüthi-Peng et al., 2002).

1.2.3.2 Βιοχημεία σύνθεσης της 1,3-προπανοδιόλης

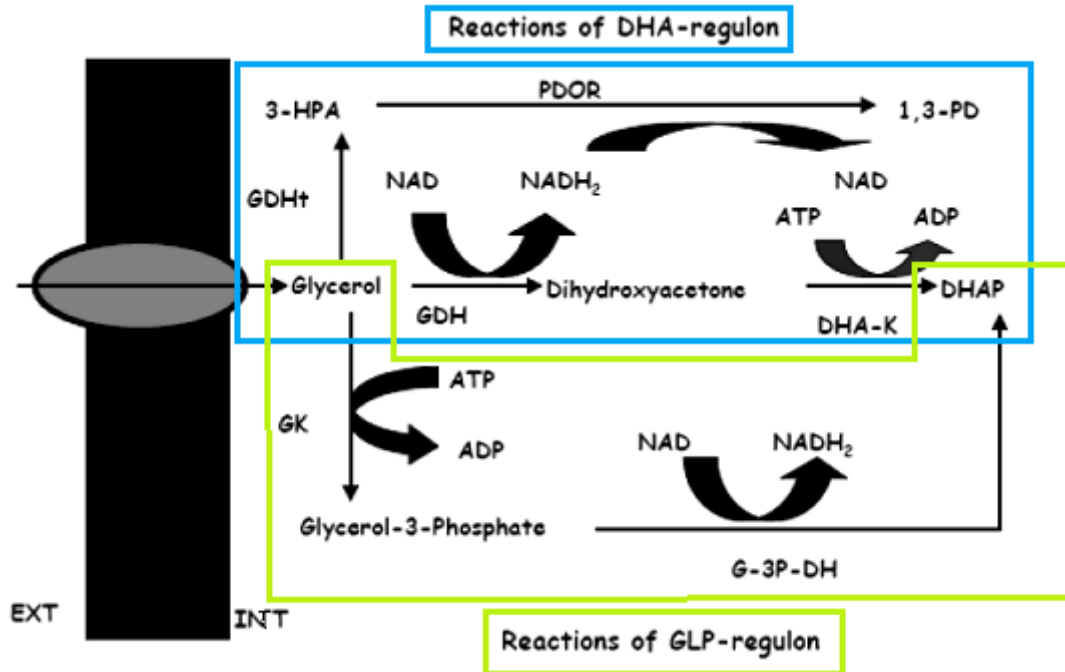
I). Είσοδος γλυκερόλης στο προκαρυωτικό κύτταρο

Εν γένει, οι προκαρυωτικοί μικροοργανισμοί δυνάμενοι να τελέσουν την ζύμωση της 1,3-προπανοδιόλης, χρησιμοποιούν δύο διαφορετικούς μηχανισμούς για την είσοδο της γλυκερόλης εντός του μικροβιακού κυττάρου. Ως εκ τούτου, η γλυκερόλη εισέρχεται είτε μέσω της παθητικής

διάχυσης ως μη φορτισμένο μικρομόριο, είτε μέσω της διευκολυνόμενης μεταφοράς (Voegelé et al., 1993; da Silva et al., 2009). Η τελευταία τελείται με την συνδρομή μιας διαμεμβρανικής πρωτεΐνης (glycerol transport facilitator GlpF, TC 1.A.8.1.1), η οποία σχηματίζει πόρους κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης, επιτρέποντας επιλεκτικά την παθητική μεταφορά τόσο της γλυκερόλης, όσο και άλλων ουδέτερων, μικρών μορίων όπως η ουρία και η δι-υδρόξυακετόνη (DHA) (Sun et al., 2003; Maervoet et al., 2011).

Εν συνεχεία, δεδομένης της εισόδου της γλυκερόλης στο κυτταρόπλασμα, τα βιοχημικά και μεταβολικά γεγονότα που ακολουθούν, εξαρτώνται άμεσα από την παρουσία ή απουσία οξυγόνου στο περιβάλλον της καλλιέργειας. Υπενθυμίζεται ότι τα ανήκοντα στην οικογένεια των Enterobacteriaceae βακτήρια, δύνανται να αποικοδομήσουν την γλυκερόλη προς παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης υπό αναερόβιες ή μικρο-αερόφιλες συνθήκες καλλιέργειας (Menzel et al., 1997; Biebl, 1999; Zeng and Biebl, 2002; Hao et al., 2008), ενώ στην περίπτωση που η ζύμωση τελείται παρουσία βακτηρίων του γένους *Clostridium* sp., η διεργασία λαμβάνει χώρα υπό αυστηρά αναερόβιες συνθήκες (Abbad-Andaloussi et al., 1995; Biebl et al., 1999; Papanikolaou et al., 2000; 2004; Papanikolaou, 2009). Συνεπώς, κατά την τέλεση της προπανοδιολικής ζύμωσης παρουσία οξυγόνου (συνήθως από μικροοργανισμούς ανήκοντες στην οικογένεια Enterobacteriaceae), η εισερχόμενη στο κυτταρόπλασμα γλυκερόλη μετατρέπεται σε 3-φωσφο-γλυκερόλη (glycerol-3-phosphate, 3GP) μέσω της δράσης του ενζύμου κινάση της γλυκερόλης (glycerol kinase, GK) (EC 2.7.1.30). Ακολούθως, η 3-φωσφο-γλυκερόλη οξειδώνεται σε φωσφο-δι-υδρόξυακετόνη (dihydroxyacetone phosphate, DHA-P), μέσω μίας αερόβιας αφυδρογονάσης (G-3P-DH). Τα γονίδια των ανωτέρω ενζύμων απαρτίζουν ένα σύμπλεγμα (regulon), γνωστό ως σύμπλεγμα GLP (Forage and Lin, 1982; Papanikolaou, 2009) (Σχήμα 1.1). Αξίζει δε να σημειωθεί, ότι το βιοχημικό μονοπάτι του συμπλέγματος GLP, δύναται να τελεστεί και κατά την αποικοδόμηση της γλυκερόλης υπό αναερόβιες συνθήκες, αλλά με την προϋπόθεση της παρουσίας ενός εξωγενούς αποδέκτη ηλεκτρονίων, όπως για παράδειγμα νιτρικό ή φουμαρικό οξύ. Ωστόσο, στην περίπτωση αυτή, η

μετατροπή της 3-φωσφο-γλυκερόλης σε φωσφο-δι-υδροξυακετόνη (dihydroxyacetone phosphate, DHA-P), πραγματοποιείται με την επίδραση μιας αναερόβιας αφυδρογονάσης (Ruch and Lin, 1975; Papanikolaou, 2009).



Σχήμα 1.1 Είσοδος γλυκερόλης στο εσωτερικό του προκαρυωτικού κυττάρου και βιοσύνθεση 1,3-προπανοδιόλης. Σύμπλεγμα DHA: Ένζυμα: GDHt: αφυδατάση της γλυκερόλης, PDOR: οξειδοοξειδοκτάση της 1,3-προπανοδιόλης, GDH: NAD-εξαρτημένη αφυδρογονάση της γλυκερόλης, DHA-K: κινάση της δι-υδροξυακετόνης. Σύμπλεγμα GLF: Ένζυμα: GK: κινάση της γλυκερόλης, G-3P-DH: αφυδρογονάση της 3-φωσφο-γλυκερόλης (Papanikolaou, 2009).

Εναλλακτικά, η απουσία εξωγενών αποδεκτών ηλεκτρονίων σηματοδοτεί την έναρξη ενός τελείως διαφορετικού βιοχημικού μηχανισμού, κατά τον οποίο η γλυκερόλη καθίσταται ως τελικός αποδέκτης ηλεκτρονίων. Έτσι, ο καταβολισμός της γλυκερόλης συνοδεύεται από την βιοσύνθεση της 1,3-προπανοδιόλης, διεργασία τελούμενη με σκοπό την αναγέννηση των αναγωγικών παραγόντων (NADH₂) εντός του κυττάρου. Συγκεκριμένα, ο καταβολισμός της γλυκερόλης λαμβάνει χώρα μέσω δύο μεταβολικών μονοπατιών, ενός αναγωγικού και ενός οξειδωτικού. Στο αναγωγικό μονοπάτι, η γλυκερόλη αφυδατώνεται σε 3-υδροξυ-προπιοναλδεΐδη (3-HPA) με την επίδραση της B-12 εξαρτημένης αφυδατάσης της γλυκερόλης (GDHt) (Σχήμα 1.3). Εν συνεχεία, η 3-υδροξυ-προπιοναλδεΐδη ανάγεται σε 1,3-προπανοδιόλη, μέσω του ενζύμου της

οξειδοαναγωγιάσης της 1,3-προπανοδιόλης (PDOR), μια διαδικασία συνοδευόμενη από την αναγέννηση των αναγωγικών παραγόντων (NADH₂). Το γεγονός αυτό δεικνύει ότι το εν λόγω μεταβολικό μονοπάτι συμβάλλει μεταξύ άλλων στην διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας του κυττάρου και αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι των βιοχημικών γεγονότων που διέπουν την αύξηση μικροοργανισμών υπό αναερόβιες συνθήκες, χρησιμοποιώντας την γλυκερόλη ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας. Στην περίπτωση του οξειδωτικού μονοπατιού, η γλυκερόλη μετατρέπεται σε δι-υδροξυακετόνη μέσω της επίδρασης του ενζύμου της NAD-εξαρτημένη αφυδρογονάσης της γλυκερόλης (GDH) και εν συνεχεία, φωσφορυλιώνεται σε φωσφο-δι-υδρόξυακετόνη μέσω της κινάσης της δι-υδρόξυακετόνης (DHA-K), η οποία εισέρχεται στο βιοχημικό μονοπάτι της γλυκόλυσης. Ως εκ τούτου, τα τέσσερα γονίδια υπεύθυνα για την κωδικοποίηση των τεσσάρων ενζύμων που λαμβάνουν μέρος στο οξειδωτικό και αναγωγικό μονοπάτι καταβολισμού της γλυκερόλης, αποτελούν το σύμπλεγμα DHA (DHA-regulon) (Biebl, 1999; Papanikolaou, 2009). Στην περίπτωση του βακτηρίου *Clostridium butyricum*, το σύμπλεγμα DHA αποτελείται από τρία γονίδια: μια αφυδατάση της γλυκερόλης (dhaB1) που είναι εξαιρετικά ευαίσθητη στην παρουσία οξυγόνου, εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη και εξαρτάται από την παρουσία της βιταμίνης B12, ένας ενεργοποιητής της εν λόγω πρωτεΐνης (dhaB2) καθώς και το γονίδιο υπεύθυνο για την κωδικοποίηση της οξειδοαναγωγιάσης της 1,3-προπανοδιόλης (dhaT) (Raynaud et al., 2003; Gonzalez-Pajuelo et al., 2004; 2006).

II. Καταβολισμός γλυκερόλης και βιοσύνθεση 1,3-προπανοδιόλης

Ανεξάρτητα από την τέλεση των διαφόρων αντιδράσεων που διέπουν την λειτουργία των συμπλεγμάτων DHA ή GLP, ο καταβολισμός της γλυκερόλης μέχρι το επίπεδο του πυροσταφυλικού οξέος είναι ίδιος, τόσο για τα βακτηρία του γένους *Clostridium* sp., όσο και για την ομάδα των εντεροβακτηρίων. Ωστόσο, τα βιοχημικά γεγονότα που ακολουθούν αναφορικά με την τύχη του πυροσταφυλικού οξέος εξαρτώνται αποκλειστικά από το εκάστοτε είδος του

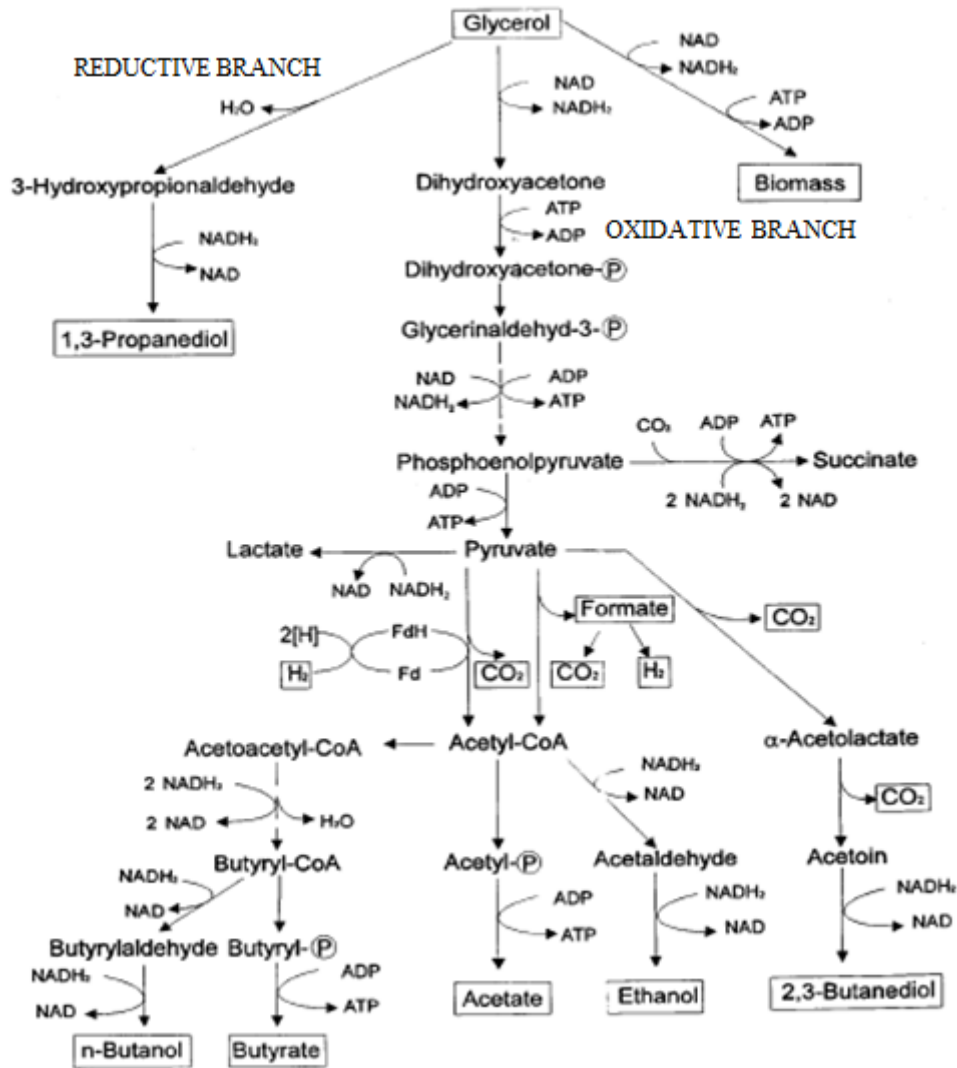
μικροοργανισμού. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση των εντεροβακτηρίων, το πυροσταφυλικό οξύ διασπάται σε ακετυλο-συνένζυμο Α (acetyl-CoA) και μυρμηγκικό οξύ, από την δράση του ενζύμου της λυάσης του πυροσταφυλικού-μυρμηγκικού οξέος (Σχήμα 1.2). Εξάλλου, από την αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού οξέος, δύναται να παραχθεί 2,3-βουτανοδιόλη, με ενδιάμεσο προϊόν την ακετοΐνη, γεγονός που παρατηρείται και κατά την ζύμωση σακχάρων από τους εν λόγω μικροοργανισμούς (Biebl et al., 1999). Ακολούθως, το μυρμηγκικό οξύ διασπάται σε διοξειδίο του άνθρακα και υδρογόνο, μέσω του ενζύμου της υδρογονο-λυάσης του μυρμηγκικού οξέος (formate hydrogen lyase, FHL). Αντίθετα, από το ακετυλο-συνένζυμο Α προκύπτει η σύνθεση οξικού οξέος με την παραγωγή μορίων ATP, καθώς επίσης και αιθανόλης, με ενδιάμεσο στάδιο την δημιουργία ακεταλδεΐδης και την οξείδωση δυο μορίων NADH. Ακόμη, από την συμπύκνωση του ακετυλο-συνένζυμου Α προέρχεται η σύνθεση της βουτανόλης (Dabrock et al., 1992; Biebl et al., 1999).

Επιπλέον, ως τελικά προϊόντα της μικροβιακής ζυμώσεως των εντεροβακτηρίων δύναται να παραχθούν τόσο το γαλακτικό οξύ μετά από αναγωγή του πυροσταφυλικού οξέος, όσο και το ηλεκτρικό οξύ (Biebl et al., 1999; Zeng and Biebl, 2002; Chen et al., 2003; Papanikolaou, 2009). Τεκμαίρεται συνεπώς, ότι από την ομάδα των εντεροβακτηρίων δύναται να συντεθεί μια πληθώρα μεταβολικών προϊόντων πλην της 1,3-προπανοδιόλης, κατά την ζύμωση της γλυκερόλης. Πρακτικά, τα εν λόγω βακτήρια σχετίζονται με δύο είδη ζυμώσεων, την ζύμωση της βουτανόλης και την ζύμωση μίγματος οξέων (Αγγελής, 2007; Papanikolaou, 2009), μια ιδιότητα εξαρτώμενη αποκλειστικά από το εκάστοτε στέλεχος και τις συνθήκες καλλιέργειας που εφαρμόζονται.

Εν αντιθέσει, στην περίπτωση της τέλεσης της προπανοδιολικής ζύμωσης από στελέχη του βακτηρίου *C. butyricum*, η διάσπαση του πυροσταφυλικού οξέος σε διοξειδίο του άνθρακα και ακετυλο-συνένζυμο Α, διέπεται από τη δράση του ενζύμου της φερρεδοξίνης οξεινοαναγωγής του πυροσταφυλικού οξέος, κατά την τέλεση της φωσφοροκλαστικής αντίδρασης (Σχήμα 1.2) (Petitdemange et al., 1976; Zeng, 1996; Papanikolaou, 2009). Επιπλέον, δυο είναι τα κύρια

παραπροϊόντα που συνοδεύουν την σύνθεση της 1,3-προπανοδιόλης, ήτοι το βουτυρικό και το οξικό οξύ. Ειδικότερα, το βουτυρικό οξύ συντίθεται από την συμπύκνωση δυο μορίων του ακετυλο-συνένζυμου A, με ταυτόχρονη οξείδωση δύο μορίων NADH₂ και παραγωγή ATP. Αντίθετα, η σύνθεση του οξικού οξέος προκύπτει από το ακέτυλο-συνένζυμο A, συνοδευόμενη από παραγωγή ATP (Zeng, 1996; Biebl et al., 1999).

Από όλα τα παραπάνω, διαπιστώνεται ότι τα μεταβολικά μονοπάτια που σχετίζονται με την παραγωγή βουτυρικού και οξικού οξέος είναι απαραίτητα για την δημιουργία μορίων ATP, αναγκαίων για την σύνθεση βιομάζας (Zeng and Biebl, 2002). Συγκεκριμένα, η βιοσύνθεση του βουτυρικού οξέος παράγει μεγαλύτερες ποσότητες ενέργειας (ATP), γεγονός που συνεπάγεται την παραγωγή μεγαλύτερων ποσοτήτων βιομάζας. Ωστόσο, το εν λόγω μονοπάτι είναι ανταγωνιστικό ως προς την αναγέννηση αναγωγικών παραγόντων, σε σχέση με το μεταβολικό μονοπάτι γλυκερόλης – 1,3-προπανοδιόλης, καθιστώντας το βουτυρικό οξύ μη-επιθυμητό προϊόν της προπανοδιολικής ζύμωσης. Αντίθετα, η σύνθεση του οξικού οξέος συνοδεύεται μεν από την παραγωγή ενέργειας, αλλά δεν απαιτεί την κατανάλωση αναγωγικών παραγόντων (NADH) (Zeng, 1996; Papanikolaou et al., 2000; 2004; Papanikolaou, 2009). Συνεπώς, για τους μικροοργανισμούς που δύνανται να ζυμώσουν την γλυκερόλη προς παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης σε αναερόβιο περιβάλλον, η σύνθεση και άλλων μεταβολικών προϊόντων αποτελεί αναπόφευκτο γεγονός, καθώς το μονοπάτι γλυκερόλης – 1,3-προοπανοδιόλης δεν σχετίζεται με την παραγωγή ενέργειας, δεδομένου ότι χρησιμοποιείται από τους μικροοργανισμούς αποκλειστικά για την αναγέννηση των αναγωγικών παραγόντων (NADH₂) (Zeng and Biebl, 2002).



Σχήμα 1.2 Μεταβολικά μονοπάτια καταβολισμού της γλυκερόλης από βακτήρια της οικογένειας *Enterobacteriaceae* και του γένους *Clostridium* sp. (Biebl, 1999).

Ακόμη ένα βιοχημικό γεγονός που σχετίζεται με την συμπληρωματική παραγωγή αναγωγικών παραγόντων αποκλειστικά στο βακτήριο *C. butyricum*, αποτελεί η τέλεση της φωσφοροκλαστικής αντίδρασης. Ειδικότερα, από την αποκαρβοξυλίωση ενός mol πυροσταφυλικού οξέος, παράγεται ένα mol ακέτυλο-συνένζυμου A, με ταυτόχρονη απελευθέρωση ενός mol διοξειδίου του άνθρακα και ενός mol υδρογόνου (Petitdemange et al., 1976). Θεωρητικά, κατά την τέλεση της φωσφοροκλαστικής αντίδρασης, ο λόγος υδρογόνου/ διοξειδίου του άνθρακα είναι ίσος με την μονάδα. Ωστόσο, η ενεργότητα του ενζυμικού συμπλέγματος της οξειδοαναγωγής της

φερρεδοξίνης, επιφέρει αλλαγές στην εν λόγω αναλογία. Έτσι, κατά την καλλιέργεια του βακτηρίου *C. butyricum* σε γλυκόζη κατά την ζύμωση της ακετόνης-βουτανόλης-αιθανόλης, ο λόγος υδρογόνου/ διοξειδίου του άνθρακα είναι μεγαλύτερος από την μονάδα, δεικνύοντας ότι οι παραγόμενοι αναγωγικοί παράγοντες απελευθερώνονται υπό μορφή υδρογόνου με την επίδραση του ενζύμου της οξειδοαναγωγής της φερρεδοξίνης (Solomon et al., 1994; Zeng and Biebl, 2002; Papanikolaou, 2009). Αντιθέτως, κατά την καλλιέργεια του εν λόγω μικροοργανισμού σε υπόστρωμα γλυκερόλης, ο λόγος υδρογόνου/ διοξειδίου του άνθρακα είναι μικρότερος από την μονάδα, υποδηλώνοντας αντίστροφη δράση της οξειδοαναγωγής της φερρεδοξίνης, κατά την οποία τα μόρια του υδρογόνου εγκλωβίζονται υπό μορφή αναγωγικών παραγόντων (NADH_2), δυνάμενα να αναγεννηθούν μέσω του μεταβολικού μονοπατιού της γλυκερόλης – 1,3-προπανοδιόλης (Biebl et al., 1992). Υπό αυτό το πρίσμα, δύναται να λάβει χώρα η δημιουργία επιπλέον αναγωγικών παραγόντων μέσω της φωσφοροκλαστικής αντίδρασης, με άμεσο επακόλουθο την αύξηση της παραγόμενης 1,3-προπανοδιόλης (Papanikolaou, 2009).

Τεκμαίρεται συνεπώς ότι η απόδοση κάθε μικροοργανισμού σε 1,3-προπανοδιόλη εξαρτάται άμεσα από τον συνδυασμό και την στοιχειομετρία τόσο του οξειδωτικού, όσο και του αναγωγικού μεταβολικού μονοπατιού του καταβολισμού της γλυκερόλης. Στην ιδανική περίπτωση όπου η σύνθεση της 1,3-προπανοδιόλης συνοδεύεται με αποκλειστικό παραπροϊόν της διεργασίας το οξικό οξύ και απουσία υδρογόνου, ο μέγιστος θεωρητικός συντελεστής απόδοσης της 1,3-προπανοδιόλης είναι ίσος με 0.67 mol ανά mol καταναλωθείσας γλυκερόλης (Zeng and Biebl, 2002).

1.2.4 Εξελίξεις στην τεχνολογία παραγωγής της 1,3-προπανοδιόλης

Στην διεθνή βιβλιογραφία συναντάται ένας ικανός αριθμός μελετών σχετιζόμενος με την ανάπτυξη διαφόρων στρατηγικών για την βελτιστοποίηση της τεχνολογίας της βιοτεχνολογικής παραγωγής της 1,3-προπανοδιόλης. Ειδικότερα, η αύξηση των αποθεμάτων της ακάθαρτης

γλυκερόλης εξαιτίας της ραγδαίας ανάπτυξης της βιομηχανίας παραγωγής βιολογικού πετρελαίου, καθιστά την ακάθαρτη γλυκερόλη ως ένα πολλά υποσχόμενο υπόστρωμα για την παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης, και κατ' επέκταση την παραγωγή πολυμερών (PPT). Επιπλέον, με την εφαρμογή της μοντελοποίησης της εν λόγω βιοδιεργασίας, επιχειρείται η εύρεση των ικανών και αναγκαίων συνθηκών για τη βελτιστοποίηση της παραγωγής της εν λόγω διόλης. Επιπρόσθετα, με την συνδρομή της γενετικής μηχανικής, καθίσταται δυνατή η δημιουργία βελτιωμένων στελεχών βακτηρίων, με αυξημένη αντοχή σε υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος και μεταβολικών προϊόντων, μέσω της απαλοιφής μεταβολικών μονοπατιών που ανταγωνίζονται τα αντίστοιχα της σύνθεσης της 1,3-προπανοδιόλης. Τέλος, σημαντικά βήματα σημειώνονται και στο πεδίο εφαρμογής της εν λόγω βιοδιεργασίας σε ημι-βιομηχανική και βιομηχανική κλίμακα. Όλα τα παραπάνω αποτελούν το πεδίο σχολιασμού στις παραγράφους του παρόντος κεφαλαίου που ακολουθούν.

1.2.4.1 Συστήματα καλλιέργειας για την παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η βιοτεχνολογική παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης τελείται με την χρήση διαφόρων προκαρυωτικών μικροοργανισμών, ανηκόντων κατά κύριο λόγο στα είδη των βακτηρίων *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter agglomerans*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium pasteurianum* και *Clostridium acetobutylicum* (Homman et al., 1990; Heyndrickx et al., 1991; Biebl et al., 1991; 1992; Zeng et al., 1994; Petitdemange et al., 1995; Papanikolaou et al., 2000; Chen et al., 2003; Papanikolaou et al., 2004; Hirschmann et al., 2005; Mu et al., 2006). Προκειμένου να επιτευχθεί βελτιστοποίηση της διεργασίας της παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης, έχει αξιολογηθεί σχεδόν το σύνολο των εν δυνάμει εφαρμοζόμενων συστημάτων καλλιέργειας, ήτοι των καλλιιεργειών σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου, ημι-διαλείποντος έργου, καθώς επίσης και συνεχών καλλιιεργειών σε μονοβάθμια ή διβάθμια συστήματα (Günzel et al., 1991; Pflugmacher and Gottschalk, 1994;

Reimann and Biebl, 1996; Reimann et al., 1998; Papanikolaou et al., 2000; 2004; 2008; González-Pajuelo et al., 2006). Εν γένει, οι καλλιέργειες που λαμβάνουν χώρα σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου, θεωρούνται ως πιο απλές και συνήθως χρησιμοποιούνται σε προκαταρκτικά στάδια της πειραματικής διαδικασίας. Οι μέγιστες συγκεντρώσεις που δύνανται να ληφθούν από την εφαρμογή του εν λόγω συστήματος καλλιέργειας, εξαρτώμενες πάντα από την αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα, κυμαίνονται εντός του εύρους των 35 με 67 g/L (Πίνακας 1.1), ενώ η πλειονότητα των ανωτέρω μελετών σχετίζεται με την αξιοποίηση της καθαρής, αλλά προσφάτως και της βιομηχανικής γλυκερόλης, προς παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης (Saint-Amans et al., 1994; Petitdemange et al., 1995; Himmi et al., 1999; Papanikolaou et al., 2000; 2004).

Επί του παρόντος, με βάση την διεθνή βιβλιογραφία, οι μέγιστες τιμές παραγωγής της 1,3-προπανοδιόλης που έχουν επιτευχθεί αφορούν στην χρήση καλλιεργιών σε βιοαντιδραστήρες ημι-διαλείποντος έργου, καθώς τα εν λόγω συστήματα συνδυάζουν το πλεονέκτημα της υψηλής συγκέντρωσης του τελικού προϊόντος που επιτυγχάνεται στις ασυνεχείς καλλιέργειες με τα οφέλη της μόνιμης διατήρησης της συγκέντρωσης του υποστρώματος ελαφρώς σε περίσσεια (Zeng and Biebl, 2002). Υπό αυτό το καθεστώς, μέγιστες συγκεντρώσεις της τάξεως των 70.4 με 104.4 g/L έχουν επιτευχθεί με την χρήση φυσικών και γενετικώς τροποποιημένων στελεχών βακτηρίων, κατά την ημι-συνεχή καλλιέργεια τους σε καθαρή ή βιομηχανική γλυκερόλη (Hirschmann et al., 2005; González-Pajuelo et al., 2005; Xu et al., 2009; Wilkens et al., 2011) (Πίνακας 1.1). Όσον αφορά στα συνεχή συστήματα καλλιέργειας, η εφαρμογή τους έχει συνεισφέρει σημαντικά στην κατανόηση της φυσιολογίας της παραγωγής των μεταβολικών προϊόντων, κατά την τέλεση της προπανοδιολικής ζύμωσης. Το ζητούμενο κατά την εφαρμογή τέτοιων συστημάτων καλλιέργειας έγκειται στην υψηλή παραγωγικότητα των επιθυμητών μεταβολικών προϊόντων, με απώτερο στόχο την δυνατότητα διεξαγωγής της βιοδιεργασίας σε βιομηχανική κλίμακα.

Πίνακας 1.1 Παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης από φυσικά και γενετικώς τροποποιημένα στελέχη βακτηρίων σε διάφορα συστήματα καλλιέργειας

Σύστημα καλλιέργειας	Στέλεχος	Είδος γλυκερόλης	PDO (g/L)	Y _{PDO/Glyc} (g/g)	Αναφορά
Ασυνεχής	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 15380	Καθαρή	57.7	0.46	Tag (1990)
	<i>K. pneumoniae</i> DSM 2026	Καθαρή	22.3	0.43	Homann et al. (1990)
	<i>C. butyricum</i> DSM 5431	Καθαρή	56.0	0.51	Biebl et al. (1992)
	<i>C. butyricum</i> VPI 3266	Καθαρή	35.0	0.54	Saint-Amans et al. (1994)
	<i>C. butyricum</i> CNCM 1211	Καθαρή	67.0	0.52	Himmi et al. (1999)
	<i>C. butyricum</i> F2b	Βιομηχανική	47.1	0.53	Papanikolaou et al. (2008)
Ημι-συνεχής	<i>C. butyricum</i> DSM 5431	Καθαρή	58.0	0.59	Günzel et al. (1991)
	<i>C. butyricum</i> VPI 3266	Καθαρή	65.0	0.57	Saint-Amans et al. (1994)
	<i>C. butyricum</i> DSM 5431	Καθαρή	57.0	0.53	Reimann and Biebl (1996)
	<i>C. butyricum</i> 2/2 [†]	Καθαρή	70.5	0.59	Reimann and Biebl (1996)
	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 25955	Καθαρή	73.3	0.39	Cameron et al. (1998)
	<i>Clostridium</i> sp. IK 124	Βιομηχανική	80.1	0.56	Hirschmann et al. (2005)
	<i>C. acetobutylicum</i> DG1 [†]	Καθαρή	83.9	0.50	González-Pajuelo et al. (2005)
	<i>K. pneumoniae</i> DSM 2026	Καθαρή	75.0	0.50	Liu et al. (2007)
	<i>K. oxytoca</i> LDH3 [†]	Καθαρή (συν-ζύμωση)	83.5	0.51	Yang et al. (2007)
	<i>K. pneumoniae</i> LDH526 [†]	Καθαρή	102.1	0.43	Xu et al. (2009)
	<i>C. butyricum</i> AKR102a	Καθαρή	93.7	0.52	Wilkens et al. (2011)
	<i>C. butyricum</i> AKR102a	Βιομηχανική	76.2	0.51	Wilkens et al. (2011)
Διβάθμιο	<i>E. coli</i> K-12 ER2925 [†]	Καθαρή (συν-ζύμωση)	104.4	0.90	Tang et al. (2009)
Συνεχής	<i>K. pneumoniae</i> DSM 2026	Καθαρή	48.5	0.52	Menzel et al. (1997)
	<i>C. butyricum</i> VPI 3266	Βιομηχανική	31.5	0.50	González-Pajuelo et al. (2004)
	<i>C. acetobutylicum</i> DG1 [†]	Καθαρή	58.9	0.52	González-Pajuelo et al. (2005)
	<i>C. butyricum</i> F2b	Βιομηχανική	48.1	0.55	Papanikolaou et al. (2008)
Διβάθμιο	<i>C. butyricum</i> F2b	Βιομηχανική	46.0	0.53	Papanikolaou et al. (2002)

†: γενετικώς τροποποιημένα στελέχη

Ωστόσο, το πεδίο αυτό χρήζει ακόμα περαιτέρω διερεύνησης, καθώς οι παραγόμενες συγκεντρώσεις της 1,3-προπανοδιόλης δεν επαρκούν για την αποτελεσματική εφαρμογή της

κατιούσας επεξεργασίας (Biebl et al., 1999). Συγκεκριμένα, οι μέγιστες συγκεντρώσεις της εν λόγω διόλης που έχουν παραχθεί σε συστήματα συνεχούς καλλιέργειας κυμαίνονται μεταξύ των τιμών 31.5 έως 58.9 g/L, από φυσικά και γενετικώς τροποποιημένα στελέχη των βακτηρίων *K. pneumoniae* και *C. butyricum* (Πίνακας 1.1). Επιπλέον, οι μέγιστες τιμές παραγωγικότητας για αυτού του είδους τις καλλιέργειες που έχουν αναφερθεί συγκαταλέγονται εντός του εύρους των 2.5-2.9 g/L/h, με εξαίρεση την περίπτωση του στελέχους *K. pneumoniae* DSM 2026, όπου κατά την συνεχή καλλιέργεια του παρήγαγε υψηλές συγκεντρώσεις 1,3-προπανοδιόλης (48.5 g/L), με ταυτόχρονες υψηλές τιμές παραγωγικότητας (5.1-8.8 g/L/h) (Menzel et al., 1997). Ωστόσο, τα ικανοποιητικά αυτά αποτελέσματα συνοδεύονταν από υψηλές συγκεντρώσεις ακατανάλωτης γλυκερόλης εντός του χημειοστάτη, γεγονός που συνεπάγεται την δυσκολία εφαρμογής της κατιούσας επεξεργασίας για την ανάκτηση του τελικού προϊόντος.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον συγκεντρώνει μεταξύ άλλων, η εφαρμογή διβάθμιων συστημάτων συνεχούς καλλιέργειας κατά την διεργασία της προπανοδιολικής ζύμωσης. Ο εν λόγω τύπος καλλιέργειας συναντάται σε ένα μικρό αριθμό μελετών στην διεθνή βιβλιογραφία, και παρουσιάζει ορισμένα πλεονεκτήματα όπως καλύτερο έλεγχο των συνθηκών καλλιέργειας, των επιμέρους σταδίων αυτής, καθώς επίσης την δυνατότητα συνδυασμού διαφορετικών υποστρωμάτων για την παραγωγή μεταβολιτών και την επίτευξη υψηλής συγκέντρωσης και παραγωγικότητας του τελικού προϊόντος (Papanikolaou et al., 2000; Saxena et al., 2009). Ειδικότερα, κατά την συνεχή καλλιέργεια του βακτηρίου *Citrobacter freundii* σε διβάθμιο σύστημα, η στρατηγική που ακολουθήθηκε αφορούσε, σε πρώτο στάδιο την εφαρμογή περιοριστικών σε γλυκερόλη συνθηκών για την σύνθεση ενεργής βιομάζας και σε δεύτερο στάδιο την διεξαγωγή της συνεχούς καλλιέργειας σε χαμηλούς ρυθμούς αραίωσης, για την μεγιστοποίηση της παραγόμενης 1,3-προπανοδιόλης (Boenigk et al., 1993). Στην περίπτωση αυτή, η μέγιστη συγκέντρωση της διόλης ήταν 41.4 g/L, συνοδευόμενη από μέγιστη παραγωγικότητα ίση με 1.38 g/L/h. Αντίθετα, κατά την συνεχή καλλιέργεια του βακτηρίου *C. butyricum* F2b σε διβάθμιο σύστημα με βιομηχανική

γλυκερόλη ως υπόστρωμα, παρατηρήθηκε ότι οι μέγιστες συγκεντρώσεις 1,3-προπανοδιόλης κυμάνθηκαν σε παρόμοια επίπεδα (έως 46 g/L), ωστόσο η παραγωγικότητα του εν λόγω στελέχους ήταν σαφώς μεγαλύτερη, φτάνοντας τα 3.4 g/L/h, με αντίστοιχο συντελεστή απόδοσης ίσο με 0.53 g ανά g καταναλωθείσας γλυκερόλης (Papanikolaou et al., 2000). Επιπρόσθετα, η εφαρμογή διβάθμιων συστημάτων ημι-συνεχούς καλλιέργειας δύναται να συντελέσει στην αντιμετώπιση της σύνθεσης τοξικών ενδιάμεσων μεταβολιτών, όπως η 3-υδρόξυ-προπιοναλδεΐδη κατά την καλλιέργεια στελεχών του βακτηρίου *K. pneumoniae*, δίδοντας την δυνατότητα της αύξησης των τελικών συγκεντρώσεων της 1,3-προπανοδιόλης από τα εν λόγω στελέχη (Zheng et al., 2007).

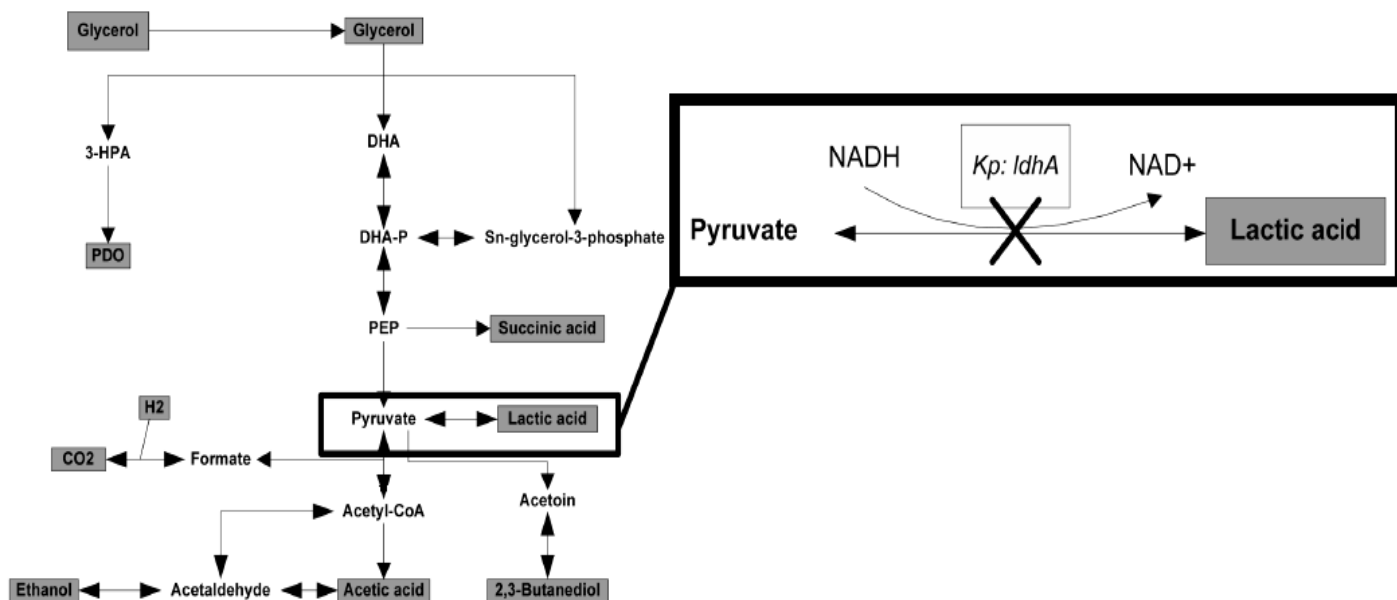
1.2.4.2 Δημιουργία βελτιωμένων στελεχών με την συνδρομή της γενετικής μηχανικής

Η εφαρμογή γενετικών εργαλείων στην προπανοδιολική ζύμωση αποτελεί σημείο αναφοράς για την γενετική μηχανική. Με απώτερο σκοπό την εξέλιξη της φυσιολογικής διαδικασίας της παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης από μικροοργανισμούς που αποικοδομούν την γλυκερόλη σε μια πιο αποτελεσματική διαδικασία, το σκεπτικό που ακολουθείται από την επιστήμη της γενετικής μηχανικής περιλαμβάνει μια σειρά από προσεγγίσεις (Saxena et al., 2009). Η επιλογή μικροοργανισμών-φυσικών παραγωγών της 1,3-προπανοδιόλης ως γενετικό εργαλείο δύναται να αποτελέσει μια καλή βάση για την εφαρμογή της γενετικής μηχανικής, με δεδομένο ότι το υπό βελτίωση μεταβολικό μονοπάτι υπάρχει ήδη στο γονιδίωμα του μικροοργανισμού. Επιπλέον, οι εν λόγω μικροοργανισμοί εμφανίζονται συνήθως ως πιο ανθεκτικοί επί του επιθυμητού μεταβολικού προϊόντος. Αντιθέτως, κάτι τέτοιο δεν μπορεί να εγγυηθεί η γενετική τροποποίηση μικροοργανισμών μη-φυσικών παραγωγών της 1,3-προπανοδιόλης, ενώ παράλληλα είναι πιθανή η εμφάνιση τοξικότητας ή θνησιμότητας αυτών από ενδιάμεσα μεταβολικά προϊόντα ή παραπροϊόντα προερχόμενα από την έκφραση νέων γονιδίων (Maervoet et al., 2011). Εξάλλου, στην περίπτωση της 1,3-προπανοδιόλης, η στρατηγική που ακολουθείται από την γενετική μηχανική για την βελτιστοποίηση της παραγωγής του τελικού προϊόντος έγκειται τόσο στην τροποποίηση

συγκεκριμένων βιοχημικών αντιδράσεων του κυτταρικού μεταβολισμού, όσο και στην εισαγωγή νέων μεταβολικών μονοπατιών μέσω της τεχνολογίας ανασυνδυασμένου DNA. Ως τώρα στον τομέα αυτό, πρόοδο πέραν της «τεχνολογικής στάθμησης» (state-of-the-art) αποτελεί η καινοτόμος ανάπτυξη και εμπορευματοποίηση ενός ανασυνδυασμένου στελέχους *E. coli* από τις εταιρίες “DuPont” και “Genecor International Inc.” (Nakamura and Whited, 2003). Το εν λόγω στέλεχος περιέχει γονίδια από την ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* για την παραγωγή γλυκερόλης από γλυκόζη και από το βακτήριο *Klebsiella pneumoniae* για τον καταβολισμό της γλυκερόλης σε 1,3-προπανοδιόλη, και δύναται να παράγει έως 135 g/L διόλης, με συντελεστή απόδοσης 0.51 g ανά g καταναλωθείσας γλυκόζης σε βιοαντιδραστήρες ημι-διαλείποντος έργου των 10-L (Nakamura and Whited, 2003; Zeng and Sabra, 2011).

Υπό το ίδιο πρίσμα, ένας σημαντικός αριθμός μελετών στην διεθνή βιβλιογραφία σχετίζεται με την γενετική τροποποίηση στελεχών δυνάμενων να τελέσουν την προπανοδιολική ζύμωση σε υπόστρωμα γλυκερόλης (Yang et al., 2007; Otte et al., 2009; Tang et al., 2009; Seo et al., 2009; Xu et al., 2009). Το γεγονός αυτό αντικατοπτρίζει την ανάγκη της αξιοποίησης της ολοένα και αυξανόμενης διαθεσιμότητας της γλυκερόλης, ως φθινό παραπροϊόν των βιομηχανιών παραγωγής βιολογικού πετρελαίου και βιολογικής αιθανόλης (Zeng and Sabra, 2011). Συγκεκριμένα, οι Yang et al. (2007) και Xu et al. (2009) κατάφεραν να διακόψουν την σύνθεση γαλακτικού οξέος από τα βακτήρια *K. oxytoca* και *K. pneumoniae*, απενεργοποιώντας τα αντίστοιχα γονίδια υπεύθυνα για την κωδικοποίηση της γαλακτικής αφυδρογονάσης (Σχήμα 1.3). Με αυτόν τον τρόπο, επετεύχθησαν τελικές συγκεντρώσεις 1,3-προπανοδιόλης της τάξεως των 83.5 και 102 g/L αντίστοιχα, ενώ και στις δύο περιπτώσεις παρατηρήθηκαν υψηλές συγκεντρώσεις 2,3-βουτανοδιόλης, ως παραπροϊόν της ζύμωσης. Σε άλλη μελέτη, οι Tang et al. (2009) τροποποίησαν ένα στέλεχος του βακτηρίου *E. coli* δυνάμενο να παράγει 1,3-προπανοδιόλη από τον καταβολισμό της γλυκερόλης, δίχως να απαιτείται η εξωγενής προσθήκη της βιταμίνης B12 στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας. Έτσι, κατά την εφαρμογή διβάθμιου συστήματος καλλιέργειας, ο εν λόγω

μικροοργανισμός παράγαγε 104.4 g/L 1,3-προπανοδιόλης, με εξαιρετικό συντελεστή βιομετατροπής της τάξεως των 0.90 g ανά g καταναλωθείσας γλυκερόλης.



Σχήμα 1.3. Απενεργοποίηση του μεταβολικού μονοπατιού της σύνθεσης γαλακτικού οξέος με απομάκρυνση του ενζύμου της γαλακτικής αφυδρογονάσης από στελέχη βακτηρίων του είδους *Klebsiella* sp. (Maervoet et al., 2011).

Αναφορικά με την εφαρμογή τεχνικών γενετικής τροποποίησης σε βακτήρια του γένους *Clostridium* sp., η έλλειψη διαθέσιμων γενετικών εργαλείων για μικροοργανισμούς ανήκοντες στο γένος *Clostridium* sp. και δυνάμενος να παράγουν 1,3-προπανοδιόλη, έχει ως αποτέλεσμα την σπάνια χρήση τους ως στόχους της μεταβολικής μηχανικής (Maervoet et al., 2011). Εξαιρεση αποτελεί το βακτήριο *C. acetobutylicum*, ένας μικροοργανισμός μη δυνάμενος να παράγει 1,3-προπανοδιόλη. Ωστόσο, η ανθεκτικότητα του βακτηρίου αυτού σε υψηλές συγκεντρώσεις διαλυτών (διαδικασία παραγωγής ακετόνης-βουτανόλης-αιθανόλης), το καθιστά έναν ενδιαφέροντα υποψήφιο μικροοργανισμό για την τέλεση της προπανοδιολικής ζύμωσης. Επιπλέον, υπάρχουν διαθέσιμα γενετικά εργαλεία για την διαγραφή και υπερέκφραση γονιδίων για το εν λόγω βακτήριο. Έτσι, οι González-Pajuelo et al. (2005) κλωνοποιώντας γονίδια του βακτηρίου *Clostridium butyricum* στο βακτήριο *C. acetobutylicum*, δημιούργησαν έναν γενετικά τροποποιημένο

μικροοργανισμό ικανό να αυξάνεται στην γλυκερόλη, παράγοντας 1,3-προπανοδιόλη ως το κύριο μεταβολικό προϊόν, συνοδευόμενο από παραπροϊόντα όπως το βουτυρικό και το οξικό οξύ. Με την εφαρμογή ημι-συνεχούς καλλιέργειας, το συγκεκριμένο στέλεχος παρήγαγε υψηλότερες συγκεντρώσεις 1,3-προπανοδιόλης εν συγκρίσει με το φυσικό στέλεχος απ' όπου προήλθε (84 g/L έναντι 64.9 g/L εκ του φυσικού στελέχους). Σε άλλη περίπτωση, οι Otte et al. (2009) εκθέτοντας το βακτήριο *C. diolis* DSM 15410 σε μεταλλαξιογόνους παράγοντες (*N*-methyl-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidine, NTG) με σκοπό την παραλαβή νέων στελεχών ανθεκτικών στην γλυκερόλη και εφαρμόζοντας την τεχνική της ανασύνθεσης του γονιδιώματος (genome shuffling), κατάφεραν να πετύχουν έως και 85 g/L παραγόμενης 1,3-προπανοδιόλης σε υπόστρωμα καθαρής γλυκερόλης. Ωστόσο, η καλλιέργεια των μεταλλαγμένων αυτών στελεχών σε βιομηχανική γλυκερόλη κατέληξε σε παραγωγή μικρότερων τελικών συγκεντρώσεων 1,3-προπανοδιόλης και επιμήκυνση της λανθάνουσας φάσης του αυξητικού τους κύκλου.

1.2.4.3 Εφαρμογή μαθηματικών μοντέλων στην διεργασία παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης

Με βάση την διεθνή βιβλιογραφία διαπιστώνεται ένας αριθμός μελετών σχετιζόμενων με την εφαρμογή μαθηματικών και αναλυτικών μοντέλων για την πρόβλεψη της κινητικής συμπεριφοράς κατά την παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης από μικροοργανισμούς-παραγωγούς της εν λόγω διόλης. Στον πίνακα 1.2 συνοψίζονται οι βελτιστοποιημένες κινητικές παράμετροι, όπως έχουν υπολογιστεί με βάση μαθηματικά μοντέλα και πειραματικά αποτελέσματα στην διεθνή βιβλιογραφία.

Συγκεκριμένα, οι Zeng et al. (1994) πρότειναν ένα μαθηματικό μοντέλο για τον προσδιορισμό της πιθανής παρεμπόδισης που ασκεί τόσο η συγκέντρωση του υποστρώματος όσο και των μεταβολικών προϊόντων, αυτό-παραγόμενων και εξωγενώς προστιθέμενων, στα βακτήρια *K. pneumoniae* και *C. butyricum*.

Πίνακας 1.2 Σύνοψη των τιμών των βελτιστοποιημένων κινητικών παραμέτρων της προπανοδιολικής ζύμωσης με βάση μαθηματικά μοντέλα και πειραματικά δεδομένα.

Βελτιστοποιημένη Παράμετρος	Βάσει	Τιμή παραμέτρου	Είδος γλυκερόλης	Στέλεχος	Αναφορά
μ_{max} (h ⁻¹)	Μοντέλου	0.68	Καθαρή	<i>C. butyricum</i> DSM 5431	Zeng et al. (1994)
	Μοντέλου	0.71	Καθαρή	<i>K. pneumoniae</i> DSM 2026	Zeng et al. (1994)
	Μοντέλου	0.67	Καθαρή	<i>K. pneumoniae</i> DSM 2026	Menzel et al. (1997)
	Μοντέλου	0.39-0.43	Ακάθαρτη	<i>C. butyricum</i> F2b	Papanikolaou et al. (2000)
	Μοντέλου	0.527	Ακάθαρτη	<i>C. butyricum</i> F2b	Papanikolaou and Aggelis (2003)
$K_{PDO/X}$ (g/g)	Μοντέλου	6.1-22.8	Καθαρή	<i>K. pneumoniae</i> DSM 2026	Menzel et al. (1997)
	Πειραματικών δεδομένων	1.6-2.2	Καθαρή	<i>C. butyricum</i> DSM 5431	Biebl et al. (1992)
	Μοντέλου	4.9-8.8	Καθαρή	<i>K. pneumoniae</i> DSM 2026	Menzel et al. (1997)
	Μοντέλου	17.14	Ακάθαρτη	<i>C. butyricum</i> F2b	Papanikolaou and Aggelis (2003)
P (g/L/h)	Πειραματικών δεδομένων	1.7-1.9	Καθ./Ακάθ.	<i>C. butyricum</i> CNCM 1211	Himmi et al. (1999)
	Πειραματικών δεδομένων	0.7-1.9	Καθαρή	<i>K. pneumoniae</i> DSM 2026	Barbirato et al. (1998)
	Μοντέλου	3.4	Ακάθαρτη	<i>C. butyricum</i> F2b	Papanikolaou et al. (2000)
	Μοντέλου	6.47	Ακάθαρτη	<i>C. butyricum</i> F2b	Papanikolaou and Aggelis (2003)
K_S (g/L)	Μοντέλου	0.25	Καθαρή	<i>K. pneumoniae</i> DSM 2026	Menzel et al. (1997)
	Μοντέλου	0.005	Καθαρή	<i>C. butyricum</i> DSM 5431	Zeng et al. (1994)
	Μοντέλου	0.026	Καθαρή	<i>K. pneumoniae</i> DSM 2026	Zeng et al. (1994)

Τα αποτελέσματα του μοντέλου αυτού έδειξαν ότι η πιθανή παρεμπόδιση που ασκεί η εξωγενώς προστιθέμενη αλλά και η παραγόμενη 1,3-προπανοδιόλη είναι ουσιαστικά η ίδια. Ωστόσο, στην περίπτωση του βουτυρικού και του οξικού οξέος παρατηρήθηκε ότι τα εν λόγω οργανικά οξέα δύναται να ασκήσουν μεγαλύτερη τοξικότητα στο μικροβιακό κύτταρο όταν αποτελούν φυσικά μεταβολικά προϊόντα της διεργασίας, παρά όταν προστίθενται εξωγενώς. Ακόμη, βρέθηκε ότι το μεταβολικό μονοπάτι της σύνθεσης του βουτυρικού οξέος είναι ενεργειακά

πιο αποδοτικό, σε σχέση με το αντίστοιχο μεταβολικό μονοπάτι του οξικού οξέος (Zeng et al., 1994). Όσον αφορά στις μέγιστες ανεκτές συγκεντρώσεις του υποστρώματος και των μεταβολικών προϊόντων των δύο μικροοργανισμών, διαπιστώθηκε ότι αντιστοιχούσαν σε 0.35 g/L αδιάστατης μορφής του οξικού οξέος, 10.1 g/L συνολικού βουτυρικού οξέος, 16.6 g/L αιθανόλης, 71.4 g/L 1,3-προπανοδιόλης και 187.6 g/L γλυκερόλης.

Σε άλλη μελέτη, οι Papanikolaou and Aggelis (2003) πρότειναν ένα αναλυτικό, αριθμητικό μοντέλο τύπου Contois για την πρόβλεψη της κινητικής συμπεριφοράς του βακτηρίου *C. butyricum*, κατά την αύξησή του σε υπόστρωμα ακάθαρτης γλυκερόλης, συγκρίνοντας τις προβλεφθείσες τιμές για τις παραμέτρους της μικροβιακής αύξησης με αυτές που ελήφθησαν με βάση την βιβλιογραφία. Έτσι, με βάση το μοντέλο βρέθηκε ότι η τιμή του μέγιστου ειδικού ρυθμού αύξησης (μ_{max}) ήταν παρόμοια με αυτή που αναφέρεται κατά την καλλιέργεια των βακτηρίων *K. pneumoniae* και *C. butyricum* σε βιοαντιδραστήρες διαλείποντος έργου και συνεχούς, με υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης, δεικνύοντας την καταλληλότητα της βιομηχανικής γλυκερόλης ως υπόστρωμα για την προπανοδιολική ζύμωση (Πίνακας 1.2).

Επιπροσθέτως, οι Papanikolaou et al. (2004) εφήρμοσαν ένα αναλυτικό μοντέλο βασιζόμενο στην απελευθέρωση διοξειδίου του άνθρακα κατά την τέλεση της φωσφοροκλαστικής αντίδρασης από το βακτήριο *C. butyricum*, με σκοπό την ποσοτικοποίηση της επίδρασης της αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης στην παραγωγή βιομάζας και μεταβολικών προϊόντων, σε συνεχές σύστημα καλλιέργειας. Διαπιστώθηκε ότι η αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκερόλης στον χημειοστάτη επηρεάζει θετικά την βιοσύνθεση κυρίως του βουτυρικού και δευτερευόντως του οξικού οξέος. Εν αντιθέσει, υπό το καθεστώς αυξημένων συγκεντρώσεων γλυκερόλης, παρατηρείται μείωση του συντελεστή απόδοσης 1,3-προπανοδιόλης ανά g καταναλωθείσας γλυκερόλης, σε σύγκριση με τους αντίστοιχους συντελεστές απόδοσης για το οξικό και κυρίως, το βουτυρικό οξύ, καθώς επίσης και μείωση του συντελεστή απόδοσης της παραγόμενης βιομάζας. Τεκμαίρεται συνεπώς, ότι ο μεταβολικό μονοπάτι της βιοσύνθεσης του βουτυρικού οξέος είναι

ανταγωνιστικό ως προς το αντίστοιχο μονοπάτι σύνθεσης 1,3-προπανοδιόλης, ως προς την αναγέννηση των αναγωγικών παραγόντων (NADH) εντός του μικροβιακού κυττάρου (Papanikolaou et al., 2004).

Τέλος, οι Xiu et al. (2004) πρότειναν ένα αναλυτικό μοντέλο για την ανάλυση και βελτιστοποίηση της ζύμωσης της γλυκερόλης, σε διβάθμιο σύστημα καλλιέργειας από το βακτήριο *K. pneumoniae*. Ειδικότερα, η ανάλυση του μοντέλου έδειξε ότι ο εφαρμοζόμενος ρυθμός αραίωσης πρέπει να είναι υψηλότερος στο δεύτερο στάδιο, σε αντίθεση με το πρώτο στάδιο. Όσον αφορά την επίτευξη μέγιστων συγκεντρώσεων, αποδόσεων και παραγωγικοτήτων, αποδείχθηκε ότι η τέλεση διβάθμιου συστήματος καλλιέργειας ήταν πιο ευνοϊκή για τη παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης, σε σύγκριση με την εφαρμογή της βιοδιεργασίας σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου και ίδιου όγκου.

1.2.4.4 Δυνατότητες εφαρμογής της προπανοδιολικής ζύμωσης σε βιομηχανική κλίμακα

Γενικά, για την επιτυχή εδραίωση της βιοτεχνολογικής παραγωγής της 1,3-προπανοδιόλης στο ευρύτερο φάσμα των βιομηχανικών ζυμώσεων, είναι αναγκαία η ικανοποίηση τριών παραμέτρων. Η πρώτη παράμετρος αφορά στην διαθεσιμότητα του χρησιμοποιούμενου υποστρώματος, συνοδευόμενη από το μικρό κόστος αυτού. Η δεύτερη παράμετρος έγκειται στην εύρεση κατάλληλων μικροοργανισμών και διαδικασιών ζύμωσης έτσι ώστε να επιτυγχάνεται η παραλαβή υψηλών συγκεντρώσεων και ικανοποιητικών παραγωγικοτήτων του τελικού προϊόντος. Τρίτη παράμετρος, αλλά εξίσου σημαντική για την βιομηχανική εφαρμογή της διεργασίας, αποτελεί η δυνατότητα της εφαρμογής της παραγωγικής διαδικασίας με χαμηλό κόστος επένδυσης και λειτουργίας (Zeng and Sabra, 2011). Την τελευταία δεκαετία έχουν γίνει σημαντικές προσπάθειες από ορισμένες ερευνητικές ομάδες, αναφορικά με την εύρεση τρόπων για την ικανοποίηση κυρίως των δυο πρώτων παραμέτρων.

Αναφορικά με την εύρεση νέων στελεχών μικροοργανισμών δυνάμενων να χρησιμοποιηθούν σε βιομηχανική κλίμακα, προς αυτή την κατεύθυνση κινείται η γενετική μηχανική, με ελπιδοφόρα αποτελέσματα (βλέπε παράγραφο 1.2.4.2). Εξάλλου, αξίζει να υπογραμμιστεί ότι η μοναδική περίπτωση της εμπορικής εφαρμογής της τεχνολογίας παραγωγής της 1,3-προπανοδιόλης έχει επιτευχθεί μετά από την γενετική τροποποίηση του μικροοργανισμού *E. coli*, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα αύξησης την γλυκόζη (Nakamura and Whited, 2003; Zeng and Sabra, 2011). Ωστόσο, δεδομένου ότι το κόστος για την προμήθεια του εκάστοτε υποστρώματος υπολογίζεται ότι αντιστοιχεί στο 50% περίπου του συνολικού κόστους παραγωγής (Deckwer, 1995; Willke and Vorlop, 2008) και λαμβάνοντας υπ' όψιν την ραγδαία αύξηση των αποθεμάτων γλυκερόλης εξαιτίας της παγκόσμιας ανάπτυξης της βιομηχανίας παραγωγής βιολογικού πετρελαίου, καθίσταται σαφές ότι η βιομηχανική γλυκερόλη δύναται να αποτελέσει ένα ικανοποιητικό υλικό ως υπόστρωμα μικροβιακών ζυμώσεων. Χαρακτηριστική είναι άλλωστε η πτώση της τιμής της βιομηχανικής γλυκερόλης περί τα 4-5 cents/kg, ενώ η παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας όπως η 1,3-προπανοδιόλη, δύναται να αποτελέσει το έναυσμα για την μείωση τόσο του κόστους παραγωγής της 1,3-προπανοδιόλης, όσο και για την βελτίωση της οικονομικής βιωσιμότητας των βιομηχανιών παραγωγής βιολογικού πετρελαίου, μέσω της εφαρμογής της τεχνολογίας των βιοδιωλιστηρίων (Saxena et al., 2009).

Υπό αυτό το πρίσμα, πρόσφατες μελέτες αναφέρονται στην αξιοποίηση της βιομηχανικής γλυκερόλης προερχόμενης από διάφορες βιομηχανικές διεργασίες για την παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης (Barbirato et al., 1998; Papanikolaou et al., 2000; Papanikolaou and Aggelis, 2003; González-Pajuelo et al., 2004; Papanikolaou et al., 2004; Rehman et al., 2008; Wilkens et al., 2011). Οι Barbirato et al. (1998) μελέτησαν την παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης κατά την αύξηση του βακτηρίου *C. butyricum* σε απόβλητο γλυκερόλης προερχόμενη από οινοποίηση (χαμηλή περιεκτικότητα σε γλυκερόλη) αλλά και από την βιομηχανία παραγωγής εστέρων (υψηλή περιεκτικότητα σε γλυκερόλη). Στη περίπτωση της χρήσης της γλυκερόλης από οινοποίηση, ο

μικροοργανισμός εμφάνισε ικανοποιητικό συντελεστή απόδοσης σε 1,3-προπανοδιόλη, ενώ η αύξηση του σε γλυκερόλη από την βιομηχανία εστέρων συνοδεύτηκε από παραγωγή υψηλών τελικών συγκεντρώσεων 1,3-προπανοδιόλης. Σε άλλη μελέτη, διαπιστώθηκε ότι η παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης ήταν παρόμοια έως καλύτερη, κατά την αύξηση του βακτηρίου *C. butyricum* σε βιομηχανική γλυκερόλη, εν συγκρίσει με την απόδοση του μικροοργανισμού στην εμπορική γλυκερόλη (Papanikolaou and Aggelis, 2003). Εξάλλου, η επάρκεια της βιομηχανικής γλυκερόλης ως υπόστρωμα για την αύξηση βακτηρίων ανηκόντων στο είδος *C. butyricum* έχει διαπιστωθεί και σε άλλες μελέτες (González-Pajuelo et al., 2004; Papanikolaou et al., 2004). Αναφορικά με την επίδραση των προσμίξεων που δύναται να περιέχονται στην βιομηχανική γλυκερόλη, οι Rehman et al. (2008) διαπίστωσαν την δυνατότητα του βακτηρίου *C. butyricum* να αυξηθεί σε υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης (προερχόμενης από βιομηχανία παραγωγής βιολογικού πετρελαίου με υλικό εκκινήσεως ηλιέλαιο), μετά την απομάκρυνση της μεθανόλης που περιέχονταν σε αυτή. Τέλος, οι Mu et al. (2006) διερεύνησαν την δυνατότητα της αύξησης του βακτηρίου *K. pneumoniae* σε υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης προερχόμενη από την παραγωγή βιολογικού πετρελαίου μέσω χημικών ή ενζυμικών καταλυτών και διαπίστωσαν ότι το εν λόγω βιομηχανικό απόβλητο μπορεί να χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης, δίχως να απαιτείται προηγούμενο στάδιο επεξεργασίας αυτού.

Εξάλλου, ένας μικρός αριθμός μελετών στην διεθνή βιβλιογραφία σχετίζεται με την διερεύνηση της δυνατότητας κλιμάκωσης της προπανοδιολικής ζύμωσης, με την χρήση βακτηρίων ανηκόντων ως επί το πλείστον στα γένη *Clostridium* sp. και *Klebsiella* sp.. Συγκεκριμένα, οι Günzel et al. (1991) πραγματοποίησαν επιτυχώς την καλλιέργεια του βακτηρίου *C. butyricum* DSM 5431 σε βιοαντιδραστήρες όγκου 1200- και 2000-L, παραλαμβάνοντας έως 58 g/L τελικής συγκέντρωσης της 1,3-προπανοδιόλης, με αντίστοιχες τιμές παραγωγικότητας περί τα 2.9 g/L/h. Επιπρόσθετα, οι Zheng et al. (2009) επιχείρησαν την κλιμάκωση της διεργασίας σε βιοαντιδραστήρες όγκου από 500- έως 50000-L, παράγοντας έως και 63.3 g/L 1,3-προπανοδιόλης,

κατά την αερόβια αύξηση του βακτηρίου *K. pneumoniae* CGMCC 1.6366 σε υπόστρωμα καθαρής γλυκερόλης. Τέλος, σε μία πρόσφατη μελέτη, η κλιμάκωση της προπανοδιολικής ζύμωσης κατά την ημι-συνεχή καλλιέργεια του βακτηρίου *C. butyricum* AKR102a σε βιοαντιδραστήρα ενεργού όγκου 200-L, είχε σαν αποτέλεσμα την παραγωγή 61.5 g/L 1,3-προπανοδιόλης (Wilkens et al., 2011).

Επιπρόσθετα, άξιες λόγου θεωρούνται οι προσπάθειες για την βελτιστοποίηση και ανάπτυξη νέων διαδικασιών ζύμωσης με σκοπό την εφαρμογή της προπανοδιολικής ζύμωσης σε βιομηχανική κλίμακα. Συγκεκριμένα, οι Friedmann and Zeng (2008) πρότειναν την χρήση μικτών μικροβιακών καλλιεργειών για την παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης και μεθανίου από την βιομηχανική γλυκερόλη, προκειμένου να παρεμποδιστεί η συσσώρευση τοξικών παραπροϊόντων της βιοδιεργασίας όπως οργανικά οξέα και η αιθανόλη. Σε αυτή την περίπτωση, εκτός από τον μικροοργανισμό-παραγωγό της 1,3-προπανοδιόλης, λαμβάνουν χώρα καλλιέργειες οξυγενών και μεθανογενών βακτηρίων για την μετατροπή των παραπροϊόντων της ζύμωσης σε μεθάνιο ή για την αναερόβια χώνευσή τους εντός βιοαντιδραστήρα προς παραγωγή βιοαερίου.

Ακόμη, είναι γνωστή η χρήση ακινητοποιημένων κυττάρων στις βιομηχανικές ζυμώσεις, προσφέροντας το πλεονέκτημα της πολλαπλής εφαρμογής για την παραγωγή του επιθυμητού μεταβολικού προϊόντος και της εύκολης απομάκρυνσης τους από το θρεπτικό μέσο (Saxena et al., 2009). Στην διεθνή βιβλιογραφία, αναφέρεται η χρήση τροποποιημένου αφρού πολυουρεθάνης και άλλων πολυμερών για την ακινητοποίηση κυττάρων των βακτηρίων *Citrobacter freundii* και *K. pneumoniae* (Pflugmacher and Gottschalk, 1994; Wong et al., 2011). Επιπλέον, οι Zhao et al. (2006) ακινητοποίησαν κύτταρα του βακτηρίου *K. pneumoniae* σε μικροκάψουλα κυτταρίνης για την παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης σε ασυνεχή, ημι-συνεχή και συνεχή συστήματα καλλιέργειας. Η παραγωγή της εν λόγω διόλης βρέθηκε ικανοποιητική κατά την τέλεση της διεργασίας σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου (63.1 g/L), ωστόσο τα αποτελέσματα δεν ήταν ενθαρρυντικά

κατά την εφαρμογή συνεχούς καλλιέργειας, δοθέντος του γεγονότος ότι η μέγιστη επιτευχθείσα παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης ήταν ίση με 13.6 g/L.

Όπως ειπώθηκε και στην αρχή του παρόντος εδάφιου, η επίτευξη ικανοποιητικής παραγωγικότητας του εκάστοτε τελικού προϊόντος αποτελεί σημαντική παράμετρο για την μείωση των λειτουργικών εξόδων της βιοδιεργασίας. Για τον σκοπό αυτό, είναι συνήθης η εφαρμογή των βιομηχανικών ζυμώσεων σε συστήματα συνεχούς καλλιέργειας. Παρόλα αυτά, η τέλεση των βιοδιεργασιών σε συστήματα ημι-συνεχούς καλλιέργειας μπορεί να αποτελέσει μια εναλλακτική επιλογή. Οι Xue et al. (2010) εφήρμοσαν επαναλαμβανόμενους κύκλους ημι-συνεχούς καλλιέργειας του βακτηρίου *K. pneumoniae* σε γλυκερόλη, επιτυγχάνοντας μέγιστη παραγωγικότητα της 1,3-προπανοδιόλης ίση με 3.30 g/L/h σε κάθε κύκλο και τελική συγκέντρωση αυτής περί τα 66 g/L. Εξάλλου, οι Jun et al. (2010) διενεργήσαν επαναλαμβανόμενες ημι-συνεχείς καλλιέργειες ακινητοποιημένων κυττάρων του βακτηρίου *K. pneumoniae* σε βιοαντιδραστήρα σταθερής κλίνης (fixed-bed bioreactor). Κατά την διάρκεια 46 κύκλων της ημι-συνεχούς καλλιέργειας διαπιστώθηκε σταθερότητα της διεργασίας, με παραγόμενες συγκεντρώσεις 1,3-προπανοδιόλης εντός του εύρους των 30-40 g/L, σε υπόστρωμα καθαρής αλλά και βιομηχανικής γλυκερόλης.

Τέλος, σημαντική παράμετρος της βιομηχανικής εφαρμογής της προπανοδιολικής ζύμωσης αποτελεί και η κατιούσα επεξεργασία για την ανάκτηση του τελικού προϊόντος. Δοθέντος του γεγονότος ότι η παραγόμενη 1,3-προπανοδιόλη αξιοποιείται κυρίως στην τεχνολογία πολυμερών, ο βαθμός καθαρισμού της πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 95 και 99%, ανάλογα με το είδος των προσμίξεων που περιέχει και τις απαιτούμενες ιδιότητες της (Willke and Vorlop, 2008). Λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι μετά το πέρας της βιομετατροπής, εντός της καλλιέργειας περιέχεται ένα μίγμα συστατικών όπως νερό, υπολείμματα γλυκερόλης, οργανικά οξέα, αιθανόλη, 2,3-βουτανοδιόλη, μακρομόρια (πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες και νουκλεϊκά οξέα) και άλατα, εύκολα διαπιστώνεται ότι η κατιούσα επεξεργασία που απαιτείται για την επιτυχή ανάκτηση της 1,3-

προπανοδιόλης αποτελεί πρόκληση (Xiu and Zeng, 2008). Στην διεθνή βιβλιογραφία γίνεται αναφορά σε διαφορές μεθόδους ανάκτησης της 1,3-προπανοδιόλης. Εντούτοις, καμία εξ' αυτών μέχρι στιγμής δεν εξαιρείται μειονεκτημάτων ή περιορισμών εφαρμογής (Xiu and Zeng, 2008). Η διαδικασία που ακολουθείται για την παραλαβή της βιολογικώς παραγόμενης 1,3-προπανοδιόλης, περιλαμβάνει τρία στάδια. Στο πρώτο στάδιο πραγματοποιείται η απομάκρυνση των μικροβιακών κυττάρων, συνήθως με φυγοκέντρηση ή μικρο-διήθηση (Šmidoná et al., 2006), συμπεριλαμβάνοντας ενδιάμεση κατεργασία με ρύθμιση της τιμής του pH ή με προσθήκη παραγόντων συσσωμάτωσης στο υγρό της καλλιέργειας (Hao et al., 2006). Επόμενο στάδιο αποτελεί η απομάκρυνση των προσμίξεων και ο διαχωρισμός της 1,3-προπανοδιόλης από το υγρό της καλλιέργειας. Για τον σκοπό αυτό εφαρμόζονται διάφορες μέθοδοι, όπως εξάτμιση και διεξάτμιση για την απομάκρυνση του νερού, της αιθανόλης και του οξικού οξέος και τον διαχωρισμό της 1,3-προπανοδιόλης αντίστοιχα (Li et al., 2001; Sanz et al., 2001; Ames, 2002; Li et al., 2002), ηλεκτροδιάλυση για την απομάκρυνση των αλάτων (Gong et al., 2004; Hao and Liu, 2005), καθώς επίσης και χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων, διαχωρισμό με οργανικούς διαλύτες και ενεργό άνθρακα για τον καθαρισμό της 1,3-προπανοδιόλης (Schlieker et al., 1992; Cho et al., 2006). Το τελικό στάδιο περιλαμβάνει τον τελικό καθαρισμό της 1,3-προπανοδιόλης με απόσταξη υπό κενό ή/και προπαρασκευαστική υγρή χρωματογραφία (Xiu and Zeng, 2008).

Σε γενικές γραμμές μπορεί να λεχθεί ότι οι δυσκολίες που σχετίζονται με την ανάκτηση της 1,3-προπανοδιόλης σχετίζονται με την υδρόφιλη φύση της εν λόγω διόλης, το υψηλό σημείο ζέσεως αυτής και την περιπλοκότητα του υγρού της καλλιέργειας. Για τον λόγο αυτό κρίνεται επιτακτική η βελτίωση των κλασσικών μεθόδων διαχωρισμού και ο συνδυασμός τους με νέες τεχνολογίες, για την ανάπτυξη μιας αποδοτικής και οικονομικά συμφέρουσας κατιούσας επεξεργασίας (Xiu and Zeng, 2008).

1.3 Το γένος *Clostridium* sp.

Το γένος *Clostridium* περιλαμβάνει βακτήρια χαρακτηριζόμενα ως σποριογόνα και αυστηρώς αναερόβια, με σημαντικό ρόλο τόσο στην ανθρώπινη υγεία, όσο και στη επιστήμη της Βιοτεχνολογίας. Η πρώτη περιγραφή του πραγματοποιήθηκε στα μέσα του 1800 από τον L. Pasteur. Το γένος *Clostridium* ανήκει στην οικογένεια των Clostridia, του φύλου Firmicutes, του βασιλείου των Βακτηριών. Παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια, ενώ αν ληφθεί υπ' όψιν ότι συγκροτείται από περίπου 200 είδη, δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι αντιπροσωπεύει ένα από τα μεγαλύτερα γένη εκ του συνόλου των προκαρυωτικών μικροοργανισμών (Jones, 2001; Johnson, 2009).

Τα κλωστηρίδια παρουσιάζουν συγκεκριμένες ιδιότητες. Ειδικότερα, η δομή του κυτταρικού τους τοιχώματος είναι όμοια με αυτή των θετικών κατά Gram βακτηρίων, σχηματίζουν ανθεκτικά ενδοσπόρια που συχνά διογκώνουν το κύτταρο και εμφανίζουν αναερόβιο και ζυμωτικό μεταβολισμό (Johnson, 2009). Επί του παρόντος, τα κλωστηρίδια κατηγοριοποιούνται με βάση την μορφολογία τους, τον σχηματισμό σπορίων, τις φυσιολογικές τους ιδιότητες, την δυνατότητα σχηματισμού τοξινών και συσχέτισής τους με ασθένειες ανθρώπων και ζώων, καθώς επίσης με βάση την ομοιογένεια της αλληλουχίας του ριβοσωμικού τους RNA. Η συντριπτική πλειονότητα των κυττάρων των κλωστηριδίων εμφανίζουν σχήμα βακίλου και κινητικότητα χάρη στα τριχίδια της κυτταρικής τους μεμβράνης (Johnson, 2009).

Το γένος *Clostridium* είναι μεγάλης σπουδαιότητας για την βιομηχανία και την ασφάλεια των τροφίμων. Είδη όπως τα *C. tyrobutyricum* και *C. butyricum* είναι αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί των τυριών, ενώ η φυσιολογία τους ως αυστηρά αναερόβια και συγχρόνως σποριογόνα, καθιστά ορισμένα βακτήρια του εν λόγω γένους, όπως το *C. botulinum*, υπεύθυνα για δηλητηριάσεις από κονσερβοποιημένα τρόφιμα (Αγγελής, 2007). Τα είδη *C. botulinum* και *C. perfringens* είναι γνωστά για την παραγωγή ισχυρών νευροτοξινών και εντεροτοξινών αντίστοιχα, προσβάλλοντας συνήθως κονσερβοποιημένα τρόφιμα, λαχανικά, κρέας ή γάλα και είναι υπεύθυνα για πλήθος κρουσμάτων

τροφικής δηλητηρίασης ανά τον κόσμο. Μάλιστα, η περίπτωση της εκδήλωσης κρούσματος βουτυλισμού, γνωστού και ως αλλαντίαση, συνοδεύεται και από αυξημένα ποσοστά θνησιμότητας (25-67%) αν δεν αντιμετωπιστεί εγκαίρως και σε συνάρτηση με την εν γένει κατάσταση της υγείας του παθόντος.

Στον τομέα της ιατρικής μικροβιολογίας, χαρακτηριστική είναι η περίπτωση της βουτυλικής τοξίνης που παράγεται από το βακτήριο *C. botulinum*, αποτελώντας ένα εξαιρετικά σημαντικό φαρμακευτικό προϊόν για την θεραπεία κινητικών διαταραχών, συνδρόμων πόνου και πλήθος άλλων νευρολογικών παθήσεων. Σημαντική είναι επίσης η χρήση της εν λόγω τοξίνης και στην επιστήμη της κοσμετολογίας. Οι ιδιότητες της βουτυλικής τοξίνης οφείλονται κυρίως στην εξειδίκευση της δράσης της στα νευρικά κύτταρα και την μακρά διάρκεια της επίδρασης που ασκεί στην περιοχή-στόχο της θεραπείας (Johnson, 2009).

Αναφορικά με την βιομηχανική χρήση μικροοργανισμών που ανήκουν στο γένος *Clostridium*, μεγάλης ιστορικής και οικονομικής σημασίας για την βιομηχανική ανάπτυξη της Γερμανίας και της Μεγάλης Βρετανίας τις πρώτες δεκαετίες του περασμένου αιώνα, θεωρείται η παραγωγή οργανικών διαλυτών κατά την ζύμωση ακετόνης-βουτανόλης από βακτήρια του είδους *C. butyricum*, *C. acetobutylicum*, *C. pasteurianum* και *C. beijerinckii* (Jones, 2001; Αγγελής, 2007). Ως πηγές άνθρακα για την εν λόγω βιοδιεργασία έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα παραπροϊόντα και απόβλητα όπως λιγνοκυτταρινούχα υποστρώματα, ξυλόζη, μελάσα, καθώς επίσης και απόβλητα βιομηχανιών παραγωγής φοινικέλαιου (Lenz and Morerla, 1980; Jones and Woods, 1986; Marlatt and Datta, 2008). Παρόλο που η βιοτεχνολογική παραγωγή οργανικών διαλυτών (ακετόνης, βουτανόλης) θεωρείται σήμερα στην Ευρώπη και τις Η.Π.Α. ως μη-ανταγωνιστική της χημικής σύνθεσης, οργανικοί διαλύτες συνεχίζουν να παράγονται στην Κίνα και σε μερικές άλλες ασιατικές χώρες από στελέχη του γένους *Clostridium* (Αγγελής, 2007). Ακόμη, ορισμένα θερμόφιλα στελέχη κλωστηριδίων χρησιμοποιούνται για την βιομηχανική παραγωγή ένζυμων, δυνάμενων να αποικοδομούν επιλεκτικά φθηνά υποστρώματα όπως κυτταρίνη, ξυλάνη, πηκτίνη, άμυλο ή

κολλαγόνο. Τα εν λόγω ενζυμα τυγχάνουν εφαρμογής, μεταξύ άλλων, στην βιομηχανία παραγωγής και επεξεργασίας τροφίμων. Επίσης, αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι ορισμένα είδη κλωστηριδίων είναι ικανά να βιοαποικοδομούν αναερόβια ρυπογόνες αλλά και ξενοβιοτικές ουσίες, όπως φυτοφάρμακα ή εντομοκτόνα, μέσω ενός ενζυμικού συστήματος των κυττάρων τους (Ahmad et al., 2005).

Όσον αφορά στο είδος *C. butyricum*, στελέχη του εν λόγω μικροοργανισμού χρησιμοποιούνται για την παραγωγή βιολογικού υδρογόνου (Pattrā et al., 2008; Wang and Jin, 2009), αλλά και βουτυρικού οξέος (Zigoná et al., 1999; Kong et al., 2006). Ακόμη, διάφορα στελέχη του είδους είναι ικανά να μεταβολίζουν την βιομηχανική γλυκερόλη, προερχόμενη ως παραπροϊόν της βιομηχανίας παραγωγής βιολογικού πετρελαίου και αιθανόλης, καθώς επίσης και από την βιομηχανία σαπωνοποίησης. Κύριο μεταβολικό προϊόν της διεργασίας αυτής είναι η 1,3-προπανοδιόλη (Biebl et al., 1999; Zeng and Biebl, 2002; Papanikolaou, 2009). Δοθείσης της αυξανόμενης παραγωγής βιολογικών καυσίμων τα τελευταία χρόνια και της παράλληλης αύξησης των αποθεμάτων βιομηχανικής γλυκερόλης, η ζύμωση της 1,3-προπανοδιόλης έχει κερδίσει το ενδιαφέρον των ερευνητών στη προσπάθεια της εύρεσης μεθόδων για την αξιοποίηση του εν λόγω αποβλήτου (Barbirato et al., 1998; Himmi et al., 1999; Papanikolaou et al., 2000; 2004; González-Pajuelo et al., 2004).

1.4 Σκοπός της διδακτορικής διατριβής

Η γλυκερόλη είναι μια ανανεώσιμη πηγή άνθρακα η οποία παράγεται σε διεθνές επίπεδο ως το κύριο παραπροϊόν (απόβλητο) των διαφόρων βιομηχανιών παραγωγής σαπώνων και οينوπνευματωδών ποτών. Ωστόσο, η αλματώδης ανάπτυξη που σημειώνει τα τελευταία χρόνια η βιομηχανία παραγωγής εναλλακτικού τύπου καυσίμων, όπως το βιολογικό πετρέλαιο και η βιολογική αιθανόλη, έχει ως απόρροια την σημαντική αύξηση των αποθεμάτων της γλυκερόλης ως ενός παραπροϊόντος χρήζοντος ανάγκης για περαιτέρω επεξεργασία. Τονίζεται ότι ήδη το βιολογικό πετρέλαιο χρησιμοποιείται ως συμπληρωματικό καύσιμο στους κινητήρες εσωτερικής καύσης διαφόρων τύπων αυτοκινήτων και λεωφορείων σε πολλές χώρες παγκοσμίως.

Ο πιο προφανής τρόπος βιοτεχνολογικής αξιοποίησης της γλυκερόλης αφορά στην αξιοποίηση της ως πηγή άνθρακα για την καλλιέργεια μικροοργανισμών προς παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης. Η 1,3-προπανοδιόλη χρησιμοποιείται σε ευρεία κλίμακα από τη βιομηχανία πλαστικών ως μονομερές του οποίου η συμπύκνωση έχει ως απόρροια σύνθεση βιοαποικοδομήσιμων πλαστικών τύπου πολυεστέρων, πολυαιθέρων και πολυουρεθανών. Περαιτέρω, η 1,3-προπανοδιόλη τυγχάνει ευρείας εφαρμογής και στις διάφορες (πετρο)-χημικές βιομηχανίες (χρήση ως διαλύτης ή λιπαντικό). Παρά το γεγονός ότι η βιομηχανική γλυκερόλη προσφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα σε σχέση με την καθαρή γλυκερόλη λόγω του πολύ χαμηλού (και ενίοτε αρνητικού) κόστους της πρώτης, μέχρι στιγμής στη βιβλιογραφία ευρίσκεται ένας σχετικά μικρός αριθμός εργασιών, σχετιζόμενων με την χρήση του εν λόγω παραπροϊόντος ως υπόστρωμα για τη αύξηση μικροοργανισμών. Αντιθέτως, οι περισσότερες δουλειές οι οποίες εμφανίζονται στη βιβλιογραφία, αναφέρονται στη χρήση της καθαρής γλυκερόλης ως πηγής άνθρακα από διάφορα μικροβιακά στελέχη, καθόσον η βιομηχανική γλυκερόλη δύναται να περιέχει υπολείμματα της σαπωνοποίησης ή της μεθανόλυσης καθώς και καταλύτες, τα οποία θεωρείται ότι στο σύνολο τους παρεμποδίζουν αξιοσημείωτα την αύξηση ενός ευρέως φάσματος μικροοργανισμών.

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη της φυσιολογικής συμπεριφοράς του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 κατά την καλλιέργεια του σε υποστρώματα με βάση την βιομηχανική γλυκερόλη. Αρχικά, προκειμένου να διαπιστωθεί η καταλληλότητα της βιομηχανικής γλυκερόλης ως υπόστρωμα για την αύξηση του εν λόγω μικροοργανισμού, εξετάστηκε η επίδραση που ασκούν οι διάφορες προσμίξεις που δύνανται να βρεθούν στην σύσταση της βιομηχανικής γλυκερόλης. Εν συνεχεία, έλαβε χώρα η διερεύνηση της στρατηγικής αναεροβίωσης και της γεωμετρίας του βιοαντιδραστήρα, στην αύξηση του μικροοργανισμού και την δυνατότητα παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης, σε βιοαντιδραστήρες διαλείποντος και ημι-διαλείποντος έργου. Ιδιαίτερη μνεία δόθηκε στην εύρεση του μέγιστου σημείου ανεκτικότητας του μικροοργανισμού στην παρουσία της 1,3-προπανοδιόλης (παραγόμενης και εξωγενώς προστιθέμενης), αλλά και της επίδρασης που αυτή ασκεί στο προφίλ των κυριότερων λιπαρών οξέων των κυτταρικών λιπιδίων του βακτηρίου. Ακολούθησε η μελέτη της βιοχημικής απόκρισης του βακτηρίου κατά την συνεχή καλλιέργεια του, υπό διαφορετικούς ρυθμούς αραίωσης και συγκεντρώσεως γλυκερόλης, τόσο σε συνάρτηση με την παραγόμενη 1,3-προπανοδιόλη, όσο και με την μεταβολή της σύστασης των κυτταρικών λιπιδίων του μικροοργανισμού. Τέλος, στη παρούσα διατριβή διερευνάται και προτείνεται η δυνατότητα της διεξαγωγής της προπανοδιολικής ζύμωσης υπό μη στείρες συνθήκες καλλιέργειας, ως μια αξιοποιήσιμη μέθοδος στο εγχείρημα της βιομηχανικής εφαρμογής της εν λόγω βιοδιεργασίας.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στο παρόν κεφάλαιο παρουσιάζονται συνοπτικά η σύσταση των θρεπτικών μέσων που χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα για την μικροβιακή αύξηση, το βιολογικό υλικό, καθώς επίσης και οι συνθήκες καλλιέργειας που εφαρμόστηκαν στην παρούσα μελέτη. Ακόμη, πραγματοποιείται εκτενής αναφορά στα πρωτόκολλα που ακολουθήθηκαν για τον προσδιορισμό τόσο της μικροβιακής αύξησης, όσο και των μεταβολικών παραγώγων αυτής. Τέλος, παρατίθενται πληροφορίες σχετικά με τις συνθήκες λειτουργίας των αναλυτικών συσκευών και του λοιπού οργανολογικού εξοπλισμού που χρησιμοποιήθηκαν για τους σκοπούς της εν λόγω μελέτης.

2.1 Η ακάθαρτη γλυκερόλη ως πηγή άνθρακα και ενέργειας για την μικροβιακή αύξηση

Κύριο άξονα της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η αξιοποίηση του αποβλήτου της βιομηχανικής γλυκερόλης, προερχόμενης από την βιομηχανία παραγωγής βιολογικού πετρελαίου. Για τον σκοπό αυτό, στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν ακάθαρτες γλυκερόλες από διάφορες βιομηχανίες παραγωγής βιολογικού πετρελαίου της Ελλάδας και του εξωτερικού, οι οποίες παρουσίαζαν διαφοροποιήσεις όσον αφορά στη σύσταση τους σε προσμίξεις. Συγκεκριμένα, παρελήφθησαν ποσότητες ακάθαρτης γλυκερόλης από τις ελληνικές βιομηχανίες «ΕΛΙΝ Βιοκαύσιμα Α.Ε.» (Αττική) και «GF Energy» (Κόρινθος), καθώς επίσης και από την γερμανική βιομηχανία «ADM Industries» (Αμβούργο). Σημειώνεται ότι όσον αφορά στις ελληνικές βιομηχανίες, το υλικό εκκίνησης για την παραγωγή βιολογικού πετρελαίου αποτέλεσαν φυτικά έλαια («ΕΛΙΝ Βιοκαύσιμα Α.Ε.»), αλλά και απόβλητες λιπαρές ύλες φυτικής ή ζωικής προέλευσης («GF Energy»), ενώ αντίθετα στην περίπτωση της γερμανικής βιομηχανίας («ADM Industries»), το υλικό εκκινήσεως για την παραγωγή του βιολογικού πετρελαίου αποτέλεσαν φυτικά έλαια προερχόμενα από τον καρπό της ελαιοκράμβης. Στον ακόλουθο Πίνακα 2.1 παρουσιάζεται η επί τοις εκατό κατά βάρος σύσταση της εκάστοτε χρησιμοποιούμενης ακάθαρτης γλυκερόλης.

Πίνακας 2.1 Σύσταση των διαφόρων ακάθαρτων γλυκερόλων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη

Σύσταση (% κ.β.)	Προέλευση ακάθαρτης γλυκερόλης		
	ΕΛΙΝ	GF Energy	ADM
Γλυκερόλη	90.0	85.5	81.0
Νερό	5.0	9.7	11.8
Άλατα	4.8	4.1	6.0
Λιπαρά οξέα	-	-	1.0
Μεθανόλη	<0.2	0.7	<0.2

Ακόμη, για τους σκοπούς της πειραματικής διαδικασίας, σε ορισμένες περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα η καθαρή γλυκερόλη (99% καθαρότητας, Sigma Aldrich). Σε κάθε περίπτωση, η γλυκερόλη (ακάθαρτη ή καθαρή) αποτέλεσε την μοναδική πηγή ενέργειας και άνθρακα για τις μικροβιακές ζυμώσεις, ενώ η συγκέντρωση της διαφοροποιούνταν ανάλογα με τους σκοπούς του πειράματος, κυμαινόμενη από 10 έως 100 g/L. Τέλος, υπογραμμίζεται ότι στην περίπτωση της χρήσης οποιασδήποτε ακάθαρτης γλυκερόλης, για τον υπολογισμό της τελικής της συγκέντρωσης στο θρεπτικό μέσο, λαμβάνονταν υπ' όψιν η καθαρότητα αυτής.

2.2 Ο μικροοργανισμός *Clostridium butyricum* VPI 1718

Το υποχρεωτικά αναερόβιο, σποριογόνο βακτήριο *Clostridium butyricum* VPI 1718, αποτέλεσε τον μικροοργανισμό που χρησιμοποιήθηκε αποκλειστικά κατά την διάρκεια της παρούσας μελέτης. Το εν λόγω βακτήριο προήλθε από την συλλογή του εργαστηρίου αναερόβιων μικροοργανισμών της Πολυτεχνικής Σχολής της Βιρτζίνια των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής (Anaerobe Laboratory, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA, USA) και αποτέλεσε ευγενική χορηγία του καθηγητή An-Ping Zeng της Πολυτεχνικής Σχολής του Πανεπιστημίου του Αμβούργου (Institute of Biosystems and Bioprocess Engineering, Technical University of Hamburg-Harburg, Germany). Το βακτήριο *C. butyricum* VPI 1718 διατηρήθηκε υπό μορφή σπορίων, σε αναερόβιες φιάλες των 50 mL, πεπληρωμένες με 25 mL θρεπτικού μέσου RCM

(Reinforced Clostridia Medium, Fluka) και εμπλουτισμένου με 20 g/L καθαρής γλυκερόλης, στους $\Theta=4^{\circ}\text{C}$. Το θρεπτικό μέσο RCM είχε την εξής σύσταση (σε g/L): casein peptone, 5; peptone, 5; meat extract, 10; yeast extract, 3; glucose, 5; NaCl, 5; starch, 1; HCl-cysteine, 0.5; sodium acetate, 3; agar, 0.5. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την παρασκευή του ανωτέρω θρεπτικού μέσου περιελάμβανε την πλήρωση των αναερόβιων φιαλών με RCM, την απομάκρυνση του οξυγόνου με εμφύσηση αερίου αζώτου εντός του θρεπτικού μέσου για 15 min, τον πωματισμό των φιαλών με πώμα βουτυλίου και την σφράγιση τους με δακτύλιο αλουμινίου και τέλος, την αποστείρωση τους σε αυτόκλειστο ($121^{\circ}\text{C}/20\text{ min}$). Η τιμή pH του μέσου ήταν μετά την αποστείρωση ίση με 6.8 ± 0.2 .

2.3 Συνθήκες καλλιέργειας του μικροοργανισμού

Πριν την διεξαγωγή κάθε πειράματος, πραγματοποιούνταν θερμικό σοκ στα σπόρια του μικροοργανισμού (Heat Shock: $\Theta=80^{\circ}\text{C}$, 15 min) προκειμένου να γίνει εκβλάστηση των σπορίων. Εν συνεχεία, το βιολογικό υλικό που παραλαμβάνοταν χρησιμοποιούνταν για την παρασκευή των προκαλλιιεργειών του μικροοργανισμού, οι οποίες και αποτελούσαν το εμβόλιο της κύριας καλλιέργειας. Η παρασκευή της προκαλλιιεργειας πραγματοποιούνταν σε αναερόβιες φιάλες των 200 mL, στις οποίες προστίθετο 50 mL από το θρεπτικό μέσο της προκαλλιιεργειας, η σύσταση του οποίου δίνεται στον ακόλουθο Πίνακα 2.2. Σημειώνεται ότι το θρεπτικό μέσο προκαλλιιεργειας εμπλουτιζόταν με 20 g/L καθαρής γλυκερόλης ως πηγή άνθρακα και ενέργειας. Εν συνεχεία, στις φιάλες πραγματοποιούνταν εμφύσηση αερίου αζώτου για 15 min, προκειμένου να καταστεί το περιεχόμενο τους απαλλαγμένο από οξυγόνο και κλείνονταν αμέσως με πώμα βουτυλίου και αλουμινένιο δακτύλιο (Εικόνα 2.1). Τέλος, οδηγούνταν προς αποστείρωση σε αυτόκλειστο ($T=121^{\circ}\text{C}$, 20 min) και φυλάσσονταν σε δροσερό και σκιερό μέρος μέχρι την χρήση τους.

Ο εμβολιασμός της προκαλλιιεργειας πραγματοποιούνταν υπό στείρες συνθήκες στον θάλαμο νηματικής ροής, όπου με την βοήθεια αποστειρωμένης σύριγγας των 5 mL λαμβάνονταν 2-

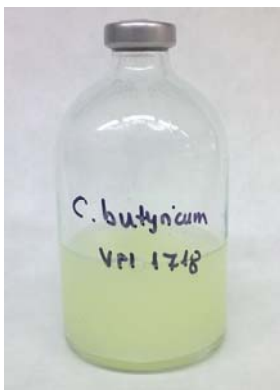
3 mL εναιωρήματος βακτηρίου ευρισκόμενου υπό μορφή κυττάρων και τοποθετούνταν σε μια αναερόβια φιάλη πεπληρωμένη με το θρεπτικό μέσο προκαλλιέργειας.

Πίνακας 2.2 Σύσταση θρεπτικού μέσου προκαλλιέργειας του μικροοργανισμού

Συστατικά	Συγκέντρωση (g/L ή mL/L)
K_2HPO_4	3.4
KH_2PO_4	1.3
$(NH_4)_2SO_4$	2.0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.02
$CaCO_3$	2.0
Εκχύλισμα ζύμης	1.0
Διάλυμα σιδήρου ⁽¹⁾	1.0
Διάλυμα ιχνοστοιχείων ⁽²⁾	2.0

⁽¹⁾ Σύσταση διαλύματος σιδήρου (ανά L): 5 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 4 mL HCl (37%).

⁽²⁾ Σύσταση διαλύματος ιχνοστοιχείων (ανά L): 70 mg $ZnCl_2$, 0.1 g $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 60 mg H_3BO_3 , 0.2 g $CoCl_2 \cdot 2H_2O$, 20 mg $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, 25 mg $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, 35 mg $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 0.9 mL HCl (37%).



Εικόνα 2.1 Προκαλλιέργεια *C. butyricum* VPI 1718 σε αναερόβια φιάλη των 200 mL

Η εν λόγω φιάλη αποτελούσε την πρώτη προκαλλιέργεια και τοποθετούνταν στον θάλαμο επώασης ($\Theta=35^\circ C$), για 12 ώρες, χρονικό σημείο στο οποίο ο μικροοργανισμός ευρίσκονταν στη εκθετική φάση αύξησης. Εν συνεχεία, από την φιάλη της πρώτης προκαλλιέργειας, εμβολιάζονταν με αποστειρωμένη σύριγγα των 5 mL, όσες φιάλες με θρεπτικό μέσο προκαλλιέργειας απαιτούνταν,

έτσι ώστε ο τελικός όγκος του εμβολίου να αποτελεί το 10% (κατ' όγκο) του συνολικού όγκου της κύριας καλλιέργειας. Οι εν λόγω φιάλες αποτελούσαν την δεύτερη προκαλλιέργεια και τοποθετούνταν προς επώαση στον θερμοστατούμενο κλίβανο για 12 ώρες και εν συνεχεία εμβολιάζονταν στο θρεπτικό μέσο της κύριας καλλιέργειας εντός του βιοαντιδραστήρα, υπό ασηπτικές συνθήκες.

Όπως προαναφέρθηκε, σε όλες τις καλλιέργειες του μικροοργανισμού, η γλυκερόλη (καθαρή ή ακάθαρτη) αποτέλεσε την μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας, σε διαφορές αρχικές συγκεντρώσεις. Μαζί με την γλυκερόλη προστίθετο στο θρεπτικό μέσο και ένα μίγμα αλάτων, η σύσταση του οποίου παρατίθεται στον ακόλουθο Πίνακα 2.3. Ακόμη, στο θρεπτικό μέσο της κύριας καλλιέργειας προστίθετο και 0.1 g/L αντιαφριστικού παράγοντα (Desmorphen, Sigma Aldrich). Μετά την παρασκευή του θρεπτικού μέσου της κύριας καλλιέργειας ακολουθούσε η προσθήκη του ανάλογα με το είδος της καλλιέργειας που εφαρμοζόταν σε κάθε περίπτωση, σε αναερόβιες φιάλες των 200 mL, στον βιοαντιδραστήρα ή σε φιάλη Duran, εντός του οποίου και αποστειρωνόταν στο αυτόκλειστο και εν συνεχεία εμβολιάζονταν με την προκαλλιέργεια του μικροοργανισμού.

Πίνακας 2.3 Σύσταση θρεπτικού μέσου κύριας καλλιέργειας

Συστατικά	Συγκέντρωση (g/L ή mL/L)
NH ₄ Cl	2.0
KCl	0.75
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	1.38
Na ₂ SO ₄	0.28
Citric acid·H ₂ O	0.42
Εκχύλισμα ζύμης	1.0
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.26
CaCl ₂ ·H ₂ O	0.003
Διάλυμα σιδήρου ⁽¹⁾	1.0
Διάλυμα ιχνοστοιχείων ⁽²⁾	2.0

⁽¹⁾ Σύσταση διαλύματος σιδήρου (ανά L): 1 g FeCl₃·6H₂O

⁽²⁾ Σύσταση διαλύματος ιχνοστοιχείων: όπως στον πίνακα 2.2

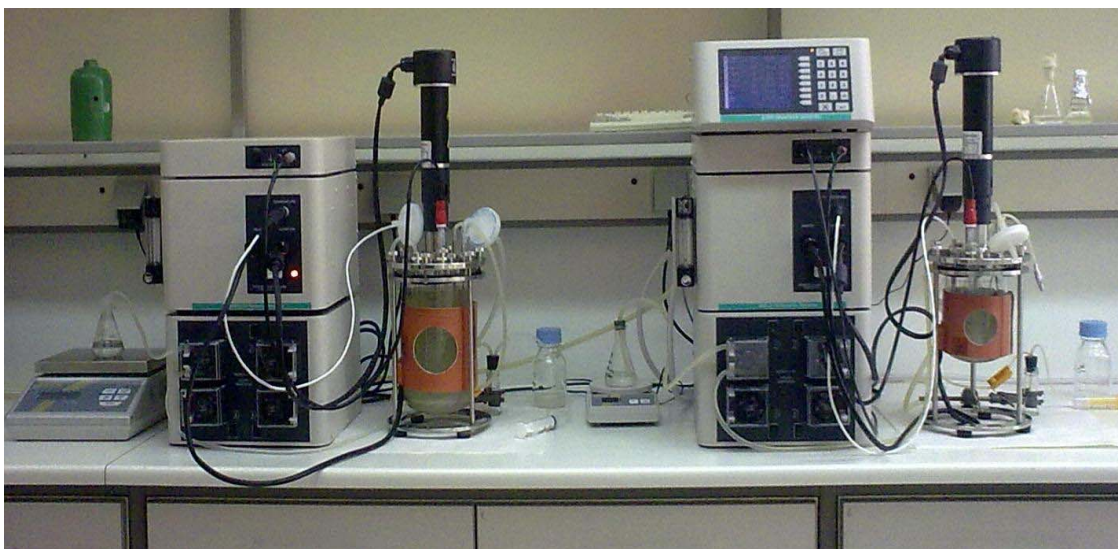
Κατά την διεξαγωγή πειραμάτων σε αναερόβιες φιάλες ή σε φιάλη Duran, μετά την προσθήκη του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας, ακολουθούσε εμφύσηση αερίου αζώτου εντός των φιαλών για την απομάκρυνση του οξυγόνου από το υγρό θρεπτικό μέσο, ευθύς αμέσως κλείσιμο των φιαλών και αποστείρωση στο αυτόκλειστο ($\Theta=121^{\circ}\text{C}$, 20 min). Τέλος, πραγματοποιούνταν ο εμβολιασμός της καλλιέργειας με την προκαλλιέργεια του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 υπό ασηπτικές συνθήκες στον θάλαμο νηματικής ροής και οι καλλιέργειες επωάζονταν στην περίπτωση των αναερόβιων φιαλών σε θερμοστατούμενο κλίβανο Memmert ($\Theta=35^{\circ}\text{C}$) και στην περίπτωση της φιάλης Duran σε ανακινούμενο θερμοστατούμενο επωαστικό κλίβανο (ZHWHY-211C Series Floor Model Incubator, PR China) ($\Theta=35^{\circ}\text{C}$, 80 rpm). Σημειώνεται ότι η διαδικασία που ακολουθήθηκε κατά την καλλιέργεια του μικροοργανισμού στον βιοαντιδραστήρα θα περιγραφεί εκτενώς στην ακόλουθη παράγραφο 2.4 του παρόντος κεφαλαίου.

Κατά την εφαρμογή ημι-συνεχούς καλλιέργειας, πραγματοποιούνταν προσθήκη εντός του βιοαντιδραστήρα πυκνού διαλύματος ακάθαρτης γλυκερόλης (65%, κ.β.) εμπλουτισμένου με εκχύλισμα ζύμης (yeast extract) σε συγκέντρωση 1 g/L. Επιπροσθέτως, στην περίπτωση της εφαρμογής συνεχούς καλλιέργειας, το θρεπτικό μέσο εισόδου αποτελούνταν από την σύσταση που παρουσιάζεται στον προαναφερθέντα Πίνακα 2.3, εμπλουτισμένο με διάφορες αρχικές συγκεντρώσεις ακάθαρτης γλυκερόλης, από 25 έως 100 g/L.

2.4 Συνθήκες λειτουργίας βιοαντιδραστήρα

Η πλειονότητα των μικροβιακών καλλιεργείων που έλαβαν χώρα κατά την πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε βιοαντιδραστήρα. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν βιοαντιδραστήρες διαφορετικού ενεργού όγκου και γεωμετρίας για την μελέτη της αύξησης του μικροοργανισμού *C. butyricum* VPI 1718 σε καλλιέργειες διαλείποντος έργου, ημι-συνεχείς και συνεχείς. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε ένας βιοαντιδραστήρας συνολικού όγκου 1-L με όγκο λειτουργίας 0.8-L και ένας βιοαντιδραστήρας συνολικού όγκου 3-L με όγκο λειτουργίας 2-L (New

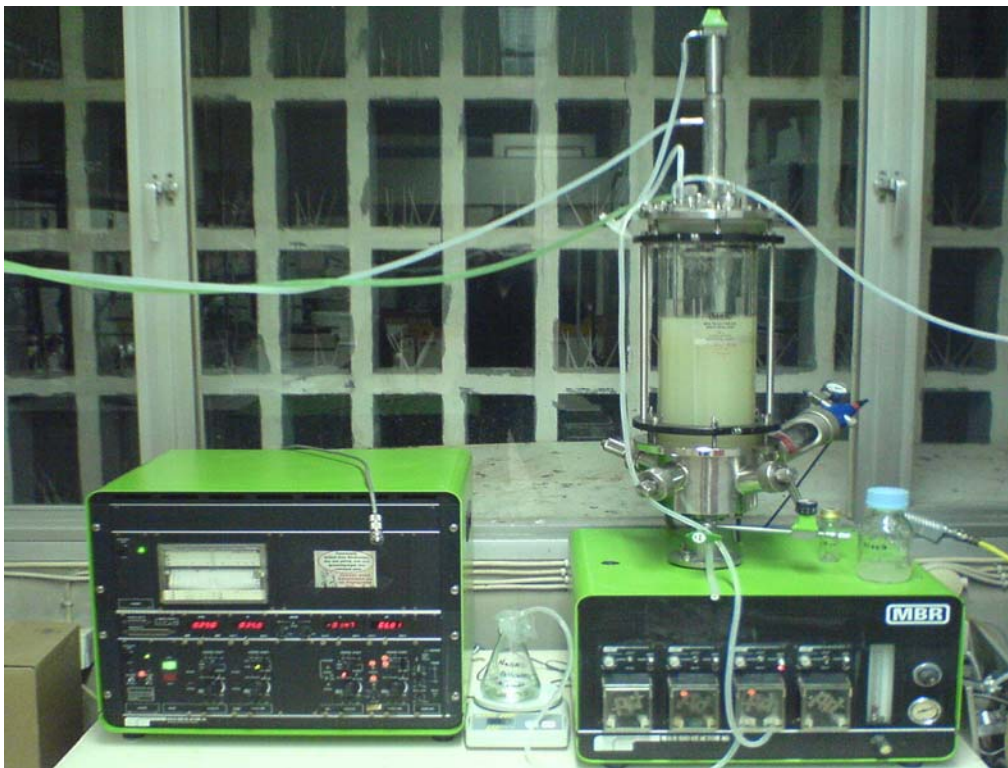
Brunswick Scientific Co, New Jersey, USA) (Εικόνα 2.2). Για τους σκοπούς των πειραμάτων, οι ανωτέρω βιοαντιδραστήρες ήταν εξοπλισμένοι με ηλεκτρόδιο μέτρησης της τιμής του pH (Mettler Toledo, USA), εξωτερικό μανδύα θέρμανσης, αισθητήρα θερμοκρασίας, δειγματολήπτη, φίλτρα εισόδου-εξόδου αερίων και σωλήνες ποικίλων διαμέτρων χρησιμοποιούμενοι κατά περίπτωση για την εισαγωγή θρεπτικών μέσων, αερίου αζώτου, διαλύματος βάσης για την ρύθμιση της τιμής του pH και την έξοδο θρεπτικού μέσου από τον βιοαντιδραστήρα. Αμφότεροι οι βιοαντιδραστήρες αποστειρώνονταν σε αυτόκλειστο, αφού προηγουμένως είχαν εξοπλιστεί με τα απαραίτητα εξαρτήματα όπως παρατέθηκαν προηγουμένως, και μετά το πέρας της αποστείρωσης αφήνονταν σε ηρεμία, προκειμένου να αποκτήσουν θερμοκρασία περιβάλλοντος.



Εικόνα 2.2 Βιοαντιδραστήρες συνολικού όγκου 3-L (αριστερά) και 1-L (δεξιά) (New Brunswick Scientific Co, New Jersey, USA) σε λειτουργία στον χώρο του εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

Εν συνεχεία, πραγματοποιούνταν η σύνδεση των εξαρτημάτων με την κεντρική μονάδα λειτουργίας, στην οποία καταχωρούνταν όλες οι τιμές των παραμέτρων της καλλιέργειας που επιθυμείτο κάθε φορά να παραμένουν σταθερές. Δοθέντος του γεγονότος ότι ο μικροοργανισμός που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη είναι υποχρεωτικά αναερόβιος, πριν κάθε εμβολιασμό πραγματοποιούνταν εμφύσηση αερίου αζώτου υψηλής καθαρότητας εντός του βιοαντιδραστήρα,

για την απομάκρυνση του οξυγόνου από το περιβάλλον της καλλιέργειας, με ροή 0.4 vnm για 20 min. Αναλόγως του στόχου του εκάστοτε πειράματος, η εμφύσηση αζώτου είτε συνεχιζόταν καθ' όλη την διάρκεια της βιοδιεργασίας με ροή 0.1 vnm, είτε διακοπτόταν μετά τον εμβολιασμό της προκαλλιέργειας στον βιοαντιδραστήρα. Ο εμβολιασμός πραγματοποιούνταν μέσω ενός διαφράγματος βουτυλίου τοποθετημένου σε μια θύρα εισόδου στην κεφαλή του βιοαντιδραστήρα, με αποστειρωμένη σύριγγα των 20 mL, υπό ασηπτικές συνθήκες κοντά σε φλόγα. Τέλος, για την κάλυψη των αναγκών της πειραματικής διαδικασίας, ορισμένα πειράματα διεξήχθησαν σε βιοαντιδραστήρα συνολικού όγκου 4.5-L, με ενεργό όγκο 3-L (MBR Bio Reactor AG, Zurich, Switzerland) (Εικόνα 2.3). Η πλειονότητα των πειραμάτων κατά τα οποία έγινε χρήση του ανωτέρω βιοαντιδραστήρα αφορούσαν σε καλλιέργειες υπό μη στείρες συνθήκες, ενώ η διαδικασία προετοιμασίας του οργάνου που τηρούνταν ήταν η ίδια με τους υπόλοιπους βιοαντιδραστήρες που αναφέρονται στο παρόν εδάφιο.



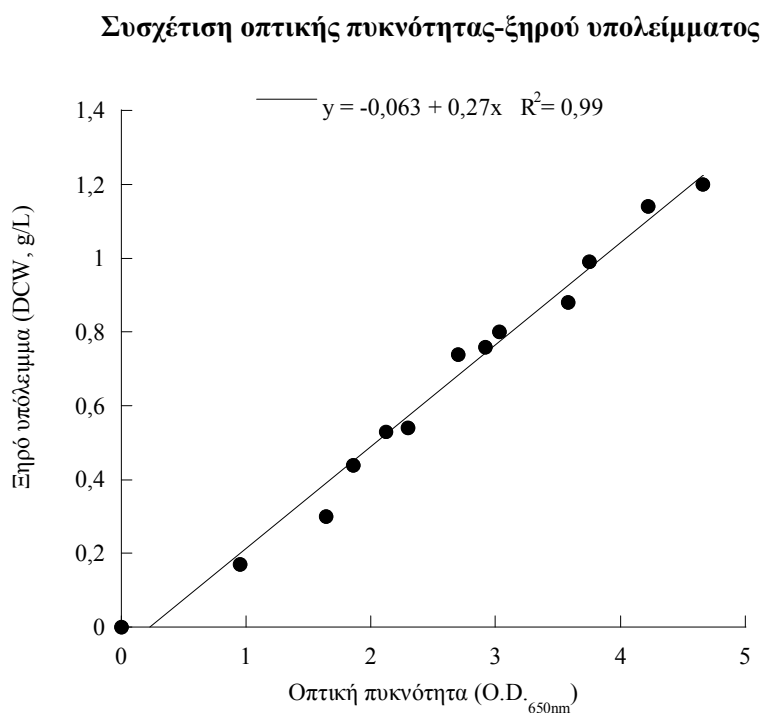
Εικόνα 2.3 Βιοαντιδραστήρας συνολικού όγκου 4.5-L (MBR Bio Reactor AG, Zurich, Switzerland) σε λειτουργία στον χώρο του εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

Κατά την διάρκεια των πειραμάτων σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου, οι συνθήκες λειτουργίας του οργάνου περιλάμβαναν θερμοκρασία καλλιέργειας $\Theta=35^{\circ}\text{C}$, ρυθμό ανάδευσης 150 rpm στην περίπτωση της χρήσης του βιοαντιδραστήρα 1-L και 200 rpm κατά την χρήση των βιοαντιδραστήρων 3- και 4.5-L, καθώς επίσης και διατήρηση της τιμής του pH ίση με 6.8 με αυτόματη προσθήκη διαλύματος καυστικού νατρίου (NaOH) 5 M. Στην περίπτωση που εφαρμόζονταν καλλιέργειες ημι-συνεχούς λειτουργίας, η ζύμωση ελάμβανε χώρα αρχικά υπό τις προαναφερθείσες συνθήκες και η προσθήκη του πυκνού διαλύματος γλυκερόλης γινόταν χειρονακτικά μέσω του διαφράγματος βουτυλίου με αποστειρωμένη σύριγγα υπό ασηπτικές συνθήκες, κοντά σε φλόγα. Τέλος, στην περίπτωση της τέλεσης συνεχούς καλλιέργειας, οι συνθήκες ζυμώσεως παρέμεναν ίδιες, ενώ η είσοδος του θρεπτικού μέσου και η έξοδος του από τον βιοαντιδραστήρα πραγματοποιούνταν μέσω αποστειρωμένων σωλήνων με την βοήθεια αντλιών ενσωματωμένων στην κεντρική μονάδα του οργάνου. Οι ροές εισόδου και εξόδου ρυθμίζονταν κατά περίπτωση από την κεντρική μονάδα λειτουργίας του βιοαντιδραστήρα, προκειμένου ο όγκος της καλλιέργειας να παραμένει σταθερός.

2.5 Προσδιορισμός βιομάζας

Κατά την καλλιέργεια του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 λάμβαναν χώρα συχνές δειγματοληψίες από τον βιοαντιδραστήρα ή τις φιάλες (συνήθως ανά 2-3 ώρες) και ο προσδιορισμός της βιομάζας γίνονταν έμμεσα, με την βοήθεια της μεθόδου της οπτικής πυκνότητας (Optical Density, O.D.). Συνοπτικά, λαμβάνονταν αρχικά δείγμα από την καλλιέργεια αμέσως μετά τον εμβολιασμό και 1 mL αυτού τοποθετούνταν σε κυβέτα όγκου 1.5 mL και η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας πραγματοποιούνταν με την λήψη της τιμής της απορρόφησης του δείγματος στο μήκος κύματος $\lambda=650$ nm, σε φασματοφωτόμετρο διπλής θέσεως τύπου Hitachi U-2000 (Hitachi Ltd, Tokyo, Japan). Η τιμή αυτή αποτελούσε το μηδενικό σημείο για την μέτρηση της βιομάζας και τα δείγματα που ακολουθούσαν συγκρίνονταν με βάση την εν λόγω τιμή. Ακόμη, ανά

τακτά χρονικά διαστήματα λαμβάνονταν δείγματα από την καλλιέργεια και οδηγούνταν προς φυγοκέντρηση (10.000 rpm, 15 min) σε φυγόκεντρο τύπου Hettich Universal 320 (Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Germany). Το υπερκείμενο απορρίπτονταν και ακολουθούσε δεύτερη φυγοκέντρηση με νερό για το ξέπλυμα των κυττάρων. Έπειτα, η βιομάζα τοποθετούνταν σε προζυγισμένα φιαλίδια και οδηγούνταν προς ξήρανση σε κλίβανο ($\Theta=90\pm 5^\circ\text{C}/ 24 \text{ h}$) μέχρι ενδείξεως σταθερού βάρους του ξηρού υπολείμματος σε ζυγό ακριβείας τύπου Kern ABJ (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Germany), εκφρασμένο σε g/L. Με αυτό τον τρόπο κατέστη δυνατή η συσχέτιση της τιμής της οπτικής πυκνότητας και της τιμής του ξηρού βάρους, μέσω της εξίσωσης που απεικονίζεται στο ακόλουθο Γράφημα 2.1.



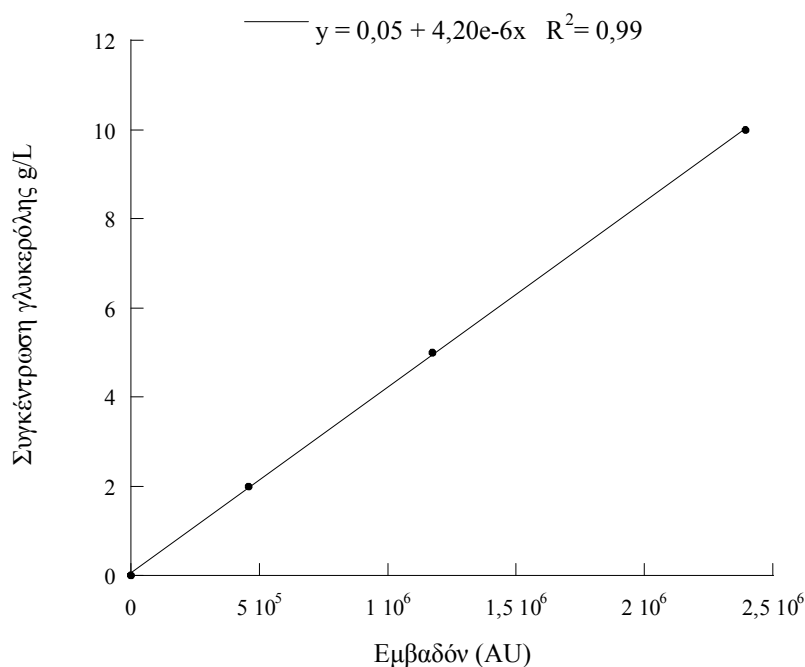
Γράφημα 2.1 Συσχέτιση της οπτικής πυκνότητας και της συγκέντρωσης του ξηρού υπολείμματος για τον προσδιορισμό της βιομάζας

2.6 Προσδιορισμός γλυκερόλης, 1,3-προπανοδιόλης και οργανικών οξέων

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της εναπομείνουσας γλυκερόλης και της παραγόμενης 1,3-προπανοδιόλης και των λοιπών μεταβολικών προϊόντων-οργανικών οξέων πραγματοποιήθηκε

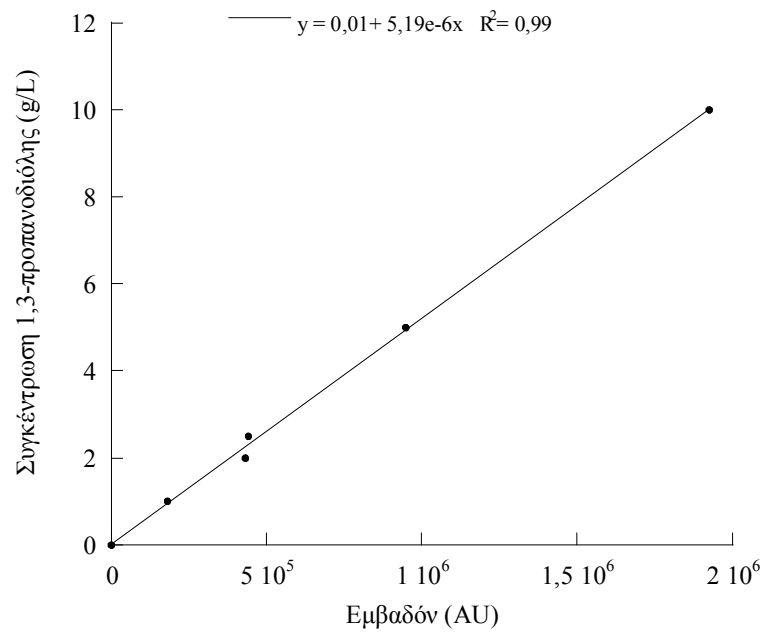
με την βοήθεια της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Αποδόσεως (High Performance Liquid Chromatography, H.P.L.C.) σε σύστημα Waters 600E (Waters, Milford, MA, USA). Η ανίχνευση των οργανικών οξέων έγινε μέσω ανιχνευτή απορρόφησης υπεριώδους ακτινοβολίας σε μήκος κύματος $\lambda=210$ nm (UV Waters 486), ενώ ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της γλυκερόλης και της 1,3-προπανοδιόλης πραγματοποιήθηκε μέσω ανιχνευτή διαφορικού διαθλασίμετρου (RI Waters 410). Η ταυτοποίηση των μεταβολικών προϊόντων βασίστηκε στον χρόνο κατακράτησης, ο οποίος συγκρίθηκε με γνωστά δείγματα αυτών. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε υδατικό 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 μίγματος ήταν τύπου Aminex HPX-87H (300 mm \times 7.8 mm, Bio-Rad, California, USA) και θερμοκρασίας 65°C. Από τη στήλη περνούσαν 20 μ L δείγματος και η διάρκεια της ανάλυσης ήταν 20 min. Οι πρότυπες καμπύλες των ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό των μεταβολικών προϊόντων παρουσιάζονται στα παρακάτω Γραφήματα 2.2-2.6.

Πρότυπη Καμπύλη Γλυκερόλης



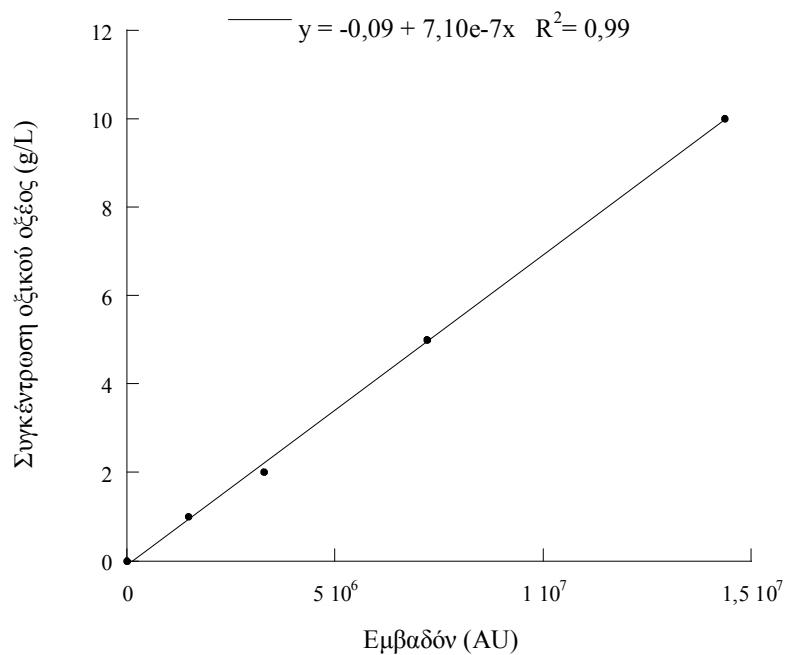
Γράφημα 2.2 Πρότυπη καμπύλη προσδιορισμού γλυκερόλης

Πρότυπη Καμπύλη 1,3-Προπανοδιόλης

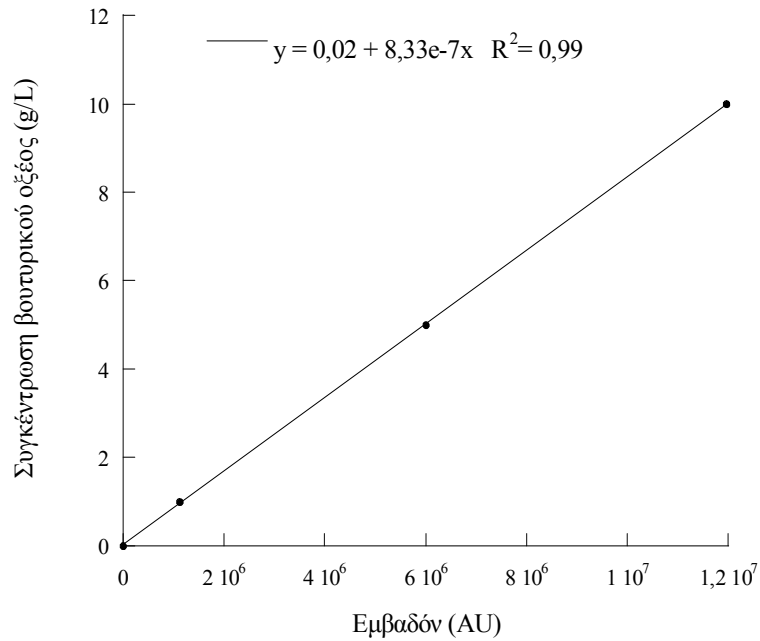
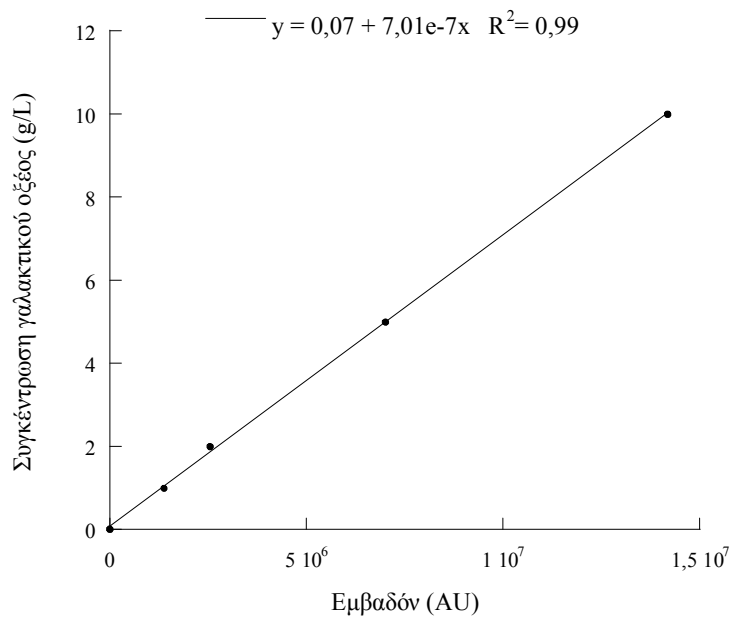


Γράφημα 2.3 Πρότυπη καμπύλη προσδιορισμού 1,3-προπανοδιόλης

Πρότυπη Καμπύλη Οξικού Οξέος



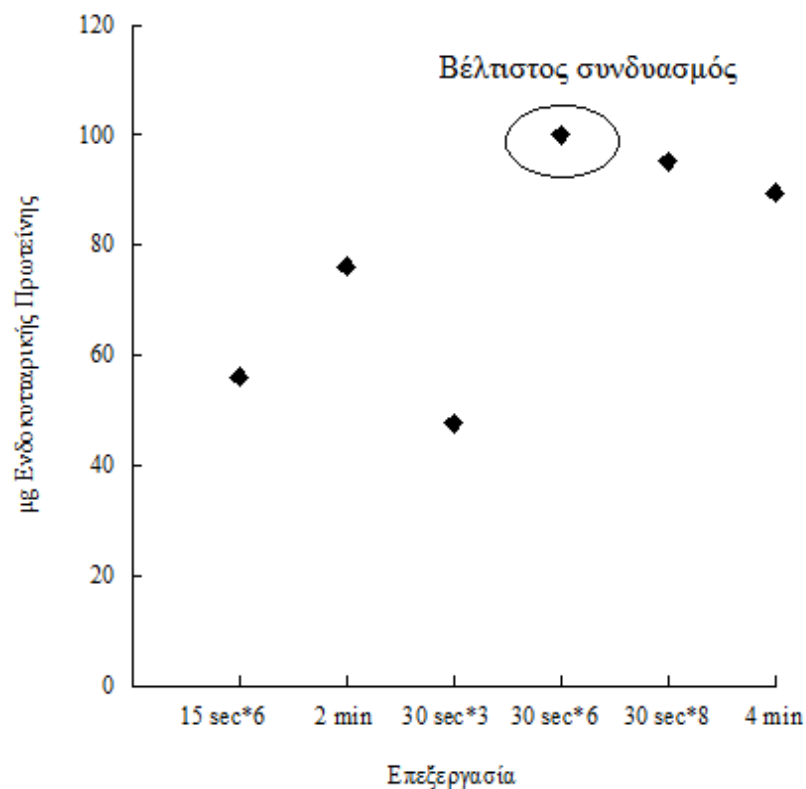
Γράφημα 2.4 Πρότυπη καμπύλη προσδιορισμού οξικού οξέος

Πρότυπη Καμπύλη Βουτυρικού Οξέος**Γράφημα 2.5** Πρότυπη καμπύλη προσδιορισμού βουτυρικού οξέος**Πρότυπη Καμπύλη Γαλακτικού Οξέος****Γράφημα 2.6** Πρότυπη καμπύλη προσδιορισμού γαλακτικού οξέος

2.7 Προσδιορισμός ενεργότητας του ενζύμου της γαλακτικής αφυδρογονάσης (EC 1.1.1.27)

Για τους σκοπούς του πειραματικού σχεδιασμού, σε ορισμένες περιπτώσεις κρίθηκε αναγκαίος ο προσδιορισμός της ενεργότητας του ενδοκυτταρικού ενζύμου της γαλακτικής αφυδρογονάσης. Δείγματα καλλιέργειας ελήφθησαν υπό ασηπτικές συνθήκες εκ του βιοαντιδραστήρα και τα κύτταρα συλλέχθηκαν μετά από φυγοκέντρηση ($9.000\times g$, 15 min, στους $4^{\circ}C$) σε φυγόκεντρο τύπου Hettich Micro (Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Germany). Ακολούθησε διπλή έκπλυση του συσσωματώματος των κυττάρων με αποστειρωμένο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS, $pH=7.4$) και διασπορά τους στο ρυθμιστικό διάλυμα PBS με προσθήκη 0.1 mM μίγματος παρεμποδιστών πρωτεασών (Protease Inhibitor Mix, Serva). Εν συνεχεία, τα κύτταρα διασπάστηκαν με την βοήθεια συσκευής υπερήχων (VCX 400, Sonics & Materials Inc, Vibra Cell, Danbury, USA) εντός υδατόλουτρου ($\Theta=4^{\circ}C$), με έξι επαναλαμβανόμενους κύκλους των 30 sec και ενδιάμεσες παύσεις του 1 min. Η επιλογή του εν λόγω συνδυασμού του χρόνου εφαρμογής των υπερήχων και του χρόνου παύσεως προήλθε μετά από δοκιμαστικές εφαρμογές διαφόρων επιλογών, με σκοπό να ευρεθεί ο καταλληλότερος τρόπος χειρισμού των κυττάρων σε σχέση με την ποσότητα της ενδοκυτταρικής πρωτεΐνης που προέκυπτε κατά την εκάστοτε εφαρμογή. Στο ακόλουθο γράφημα παρουσιάζονται οι συνδυασμοί που δοκιμάστηκαν και η συγκέντρωση της ενδοκυτταρικής πρωτεΐνης που απέδωσαν, όπως αυτή προσδιορίστηκε με την μέθοδο Bradford (βλέπε παρακάτω). Διαπιστώθηκε πως ο βέλτιστος συνδυασμός για την διάρρηξη των κυττάρων και την παραλαβή της μέγιστης ποσότητας ενδοκυτταρικής πρωτεΐνης με υπερήχους ήταν η εφαρμογή έξι επαναλαμβανόμενων κύκλων των 30 sec, με ενδιάμεση παύση ενός λεπτού.

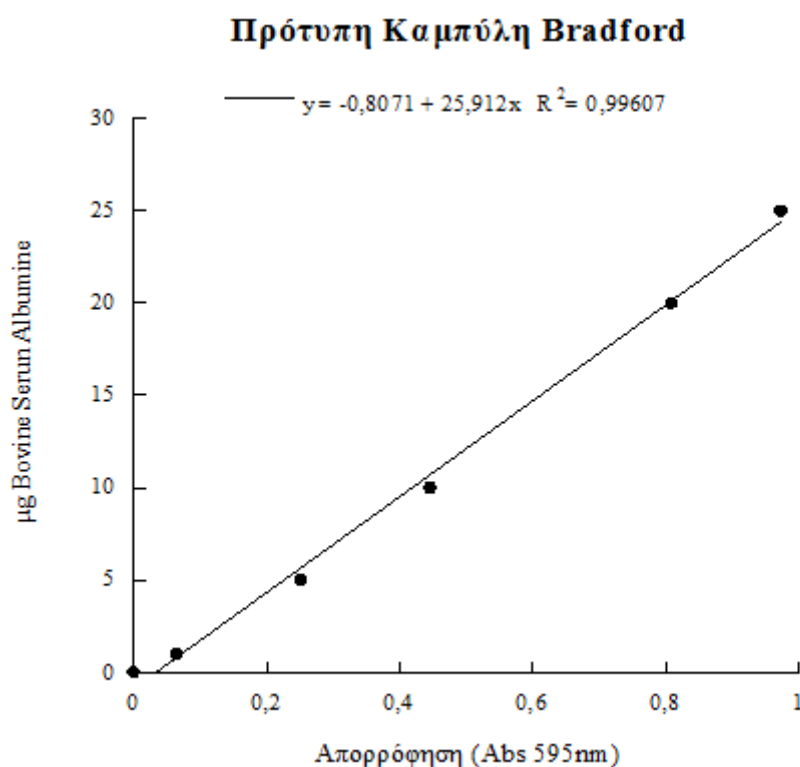
Εν συνεχεία, τα υπολείμματα των διαρρηγμένων κυττάρων απομακρύνθηκαν με φυγοκέντρηση ($9.000\times g$, 1 h, στους $4^{\circ}C$) σε φυγόκεντρο τύπου Hettich Micro (Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Germany) και στο παραληφθέν εκχύλισμα έλαβε χώρα ο προσδιορισμός της ενζυμικής ενεργότητας της γαλακτικής αφυδρογονάσης.



Γράφημα 2.7 Συνδυασμοί επεξεργασίας των κυττάρων του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 με υπερήχους και απόδοση τους σε ενδοκυτταρική πρωτεΐνη

Για τον προσδιορισμό της ενεργότητας της γαλακτικής αφυδρογονάσης, ακολουθήθηκε η μέθοδος των Vassault et al. (1987). Συνοπτικά, η ενεργότητα του ενζύμου συσχετίστηκε με την ποσότητα του πυροσταφυλικού οξέος που καταναλώνεται, κατά την παρακολούθηση της μείωσης της απορρόφησης του στο μήκος κύματος $\lambda=339$ nm, εξαιτίας της οξειδωσης των αναγωγικών παραγόντων NADH_2 . Η εν λόγω αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία $\Theta=30^\circ\text{C}$, σε κλειστές κυβέτες των 3 mL, σε φασματοφωτόμετρο Hitachi U-2000 (Hitachi Ltd, Tokyo, Japan). Το μίγμα της ενζυμικής αντίδρασης αποτελούνταν από 80 mM διαλύματος τρις-χλωριούχου νατρίου (Tris-sodium chloride, $\text{pH}=7.2$), 200 mM χλωριούχου νατρίου, 0.2 mM NADH, 1.6 mM πυροσταφυλικού οξέος ως το υπόστρωμα της ενζυμικής αντίδρασης και 0.5 mL ακατέργαστου εκχυλίσματος κυττάρων. Ως μονάδα ενζυμικής ενεργότητας ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για την οξείδωση 1 μmol NADH ανά min, στους 30°C .

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της ενδοκυτταρικής πρωτεΐνης με βάση το πρωτόκολλο κατά Bradford (1976). Συνοπτικά, μετά την λύση των κυττάρων, το ακατέργαστο εκχύλισμα αραιώνονταν κατάλληλα με απιονισμένο νερό αν κρινόταν απαραίτητο. Εξ αυτού προστίθεντο 0.8 mL σε δοκιμαστικό σωλήνα και ακολούθως 0.2 mL διαλύματος Dye Reagent Concentrate. Το μίγμα αναδεύονταν προσεκτικά για την αποφυγή αφρού, παρέμενε σε ηρεμία για 5 min και οδηγούνταν στο φασματοφωτόμετρο Hitachi U-2000 (Hitachi Ltd, Tokyo, Japan) για την μέτρηση της απορρόφησης του σε μήκος κύματος $\lambda=595$ nm. Με τον ίδιο τρόπο παρασκευάζονταν και τυφλό δείγμα, με προσθήκη απιονισμένου νερού αντί κυτταρικού εκχυλίσματος και ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της ενδοκυτταρικής πρωτεΐνης λάμβανε χώρα με βάση πρότυπη καμπύλη απορρόφησης γνωστών συγκεντρώσεων αλβουμίνης (Bovine Serum Albumin, B.S.A.) (Γράφημα 2.8).



Γράφημα 2.8 Πρότυπη καμπύλη προσδιορισμού ενδοκυτταρικής πρωτεΐνης με την μέθοδο Bradford

2.8 Παραλαβή και ανάλυση των κυτταρικών λιπιδίων του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718

Κατά την διεξαγωγή της παρούσας μελέτης, σε ορισμένες περιπτώσεις κρίθηκε αναγκαία η μελέτη της σύστασης των κυτταρικών λιπιδίων του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718. Για τον σκοπό αυτό, λαμβάνονταν δείγμα όγκου 100 mL από τον βιοαντιδραστήρα και οδηγούνταν προς διπλή φυγοκέντρηση ($9000\times g$, 10 min) σε φυγόκεντρο τύπου Hettich Universal 320 (Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Germany), για τον διαχωρισμό και την έκπλυση των κυττάρων. Στην συνέχεια, τα κύτταρα τοποθετούνταν σε προζυγισμένο φιαλίδιο και οδηγούνταν προς ξήρανση ($\Theta=90\pm 5^\circ C$) μέχρι ενδείξεως σταθερού βάρους του ξηρού υπολείμματος. Έπειτα, εντός του φιαλιδίου με το ξηρό υπόλειμμα προστίθετο ποσότητα ολίγων mL μίγματος διαλυτών $CHCl_3/CH_3OH$ σε αναλογία 2:1 (Folch et al., 1957; Papanikolaou et al., 2002). Η εκχύλιση πραγματοποιούνταν σε σκοτεινό και ξηρό θάλαμο για 72 h. Με το χρησιμοποιούμενο μίγμα διαλυτών εκχυλίζεται το συνολικό (total) μικροβιακό λίπος. Κατόπιν η βιομάζα μαζί με το μίγμα διαλυτών υφίστατο διήθηση μέσω χάρτινου ηθμού Whatman No.1. Το διήθημα συλλεγόταν σε προζυγισμένη φιάλη εξάτμισης και ακολουθούσε εξάτμιση υπό κενό και σε θερμοκρασία $50^\circ C$, σε περιστροφικό εξατμιστήρα (Büchi Rotavapor R-114, Switzerland) για την απομάκρυνση των διαλυτών. Στην φιάλη εξάτμισης παρέμενε το μικροβιακό λίπος το οποίο και ζυγίζονταν σε ζυγό ακριβείας τύπου Kern ABJ (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Germany). Σε κάθε περίπτωση, το βάρος του συνολικού λίπους του βακτηρίου δεν ξεπερνούσε τα 5 mg.

Εν συνεχεία, το κυτταρικό λίπος μετατρέπεται με μεθυλίωση στους αντίστοιχους μεθυλικούς εστέρες, με την γενικευμένη μέθοδο AFNOR (1959), προκειμένου να γίνει ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων που περιέχονται σε αυτό. Η εστεροποίηση πραγματοποιείται σε δύο στάδια, το πρώτο σε αλκαλικό περιβάλλον και το δεύτερο σε όξινο. Κατά το πρώτο στάδιο τελείται η πυρηνόφιλη υποκατάσταση στο μόριο των τριγλυκεριδίων και των φωσφολιπιδίων, με τελικό προϊόν τους αντίστοιχους μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων. Παράλληλα, τα ήδη υπάρχοντα ελεύθερα λιπαρά οξέα αντιδρούν με το διάλυμα του μεθανολικού

νατρίου και παραλαμβάνονται οι αντίστοιχοι σάπωνές τους. Στο δεύτερο στάδιο πραγματοποιείται η μετατροπή των σαπώνων των λιπαρών οξέων προς τους αντίστοιχους μεθυλεστέρες, έτσι ώστε να καταστούν πτητικά για να αναλυθούν στον αέριο χρωματογράφο. Συγκεκριμένα, στην σφαιρική φιάλη με το ζυγισθέν κυτταρικό λίπος προστίθενται ολίγες πέτρες βρασμού και 10 mL διαλύματος μεθανολικού νατρίου (MeO-Na^+) που περιείχαν φαινολοφθαλεΐνη ως δείκτη pH και το δείγμα τοποθετείτο προς ήπιο βρασμό για 20 min. Το διάλυμα του μεθανολικού νατρίου παρασκευάστηκε διαλύοντας 1 g μεταλλικού νατρίου σε 100 mL μίγματος μεθανόλης/ βενζολίου 70/30 (v/v). Μετά το πέρας του χρόνου προστίθεται 5-10 mL υδροχλωρικής μεθανόλης (έως ότου το δείγμα αποχρωματιστεί) και αφήνεται προς βρασμό για άλλα 20 min. Το διάλυμα της υδροχλωρικής μεθανόλης παρασκευάστηκε προσθέτοντας στάγδην 10 mL ακετυλο-χλωριδίου σε 125 mL μεθανόλης (ισχυρά εξώθερμη αντίδραση). Ακολουθεί προσθήκη απιονισμένου νερού προκειμένου να λάβει τέλος η αντίδραση και το δείγμα μεταφέρεται σε εκχυλιστική χοάνη. Προστίθενται 6 mL εξανίου, ακολουθεί έντονη ανάδευση και το δείγμα αφήνεται για λίγα λεπτά σε ηρεμία προκειμένου να διαχωριστούν οι δύο φάσεις (η οργανική και η υδατική φάση). Η φάση του εξανίου συλλέγεται σε μικρό φιαλίδιο και προστίθεται μικρή ποσότητα άνυδρου θεικού νατρίου (Na_2SO_4) για την απορρόφηση της υγρασίας. Τέλος, το δείγμα οδηγείται προς ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο, προκειμένου να γίνει ο προσδιορισμός των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων που περιέχονται σε αυτό.

2.9 Συνθήκες αέριας χρωματογραφίας

Ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων των κυτταρικών λιπιδίων του μικροοργανισμού *C. butyricum* VPI 1718 έλαβε χώρα με την βοήθεια της αέριας χρωματογραφίας (Gas Chromatography-G.C.). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε ένα σύστημα Fisons 8060 (Fisons Instruments, Manchester, UK), εξοπλισμένο με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (FID detector) και στήλη Chrompack (60 m×0.25 mm, πάχος επικάλυψης εσωτερικά της στήλης 0.25 μm , J&W

Scientific). Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε ήλιο υψηλής καθαρότητας, με ροή 2 mL/min, ενώ για την ενεργοποίηση της φλόγας χρησιμοποιήθηκαν υδρογόνο και μίγμα αέρα. Η ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιούνταν μέσω προγράμματος κλιμακωτής αύξησης της θερμοκρασίας ανάλυσης. Αρχικά, η ανάλυση ξεκινούσε με την θερμοκρασία του φούρνου στους 200°C όπου και παρέμενε για 13 min, μετά αυξάνονταν στους 220°C με ρυθμό 2°C ανά min και τέλος με ρυθμό 20°C ανά min έως τους 240°C, όπου και παρέμεινε για 3 min. Η θερμοκρασία του εισαγωγέα και του ανιχνευτή ήταν στους 240°C και 250°C αντίστοιχα, ενώ ο όγκος του δείγματος ήταν 1-2 μ L. Η ταυτοποίηση των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με βάση τους χρόνους κατακράτησης προτύπου δείγματος μεθυλεστέρων (F.A.M.E. Mix C8-C22, Supelco Analytical, USA) και από το εμβαδόν της κάθε κορυφής προέκυψε η συγκέντρωση του εκάστοτε λιπαρού οξέος.

2.10 Συνθήκες αέριας χρωματογραφίας-φασματοσκοπίας μάζας (G.C.-M.S.)

Κατά την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, κρίθηκε αναγκαία η επιβεβαίωση της ύπαρξης ενός λιπαρού οξέος στην σύσταση των κυτταρικών λιπιδίων του μικροοργανισμού *C. butyricum* VPI 1718. Τούτο κατέστη δυνατό με την χρήση της αέριας χρωματογραφίας-φασματοσκοπίας μάζας, σε χρωματογράφο Fisons MD 800 (Fisons Instruments, Manchester, UK), ο οποίος έφερε στήλη DB-5 (J&W Scientific) διαστάσεων 30 m \times 0.25 mm και πάχος επικάλυψης εσωτερικά της στήλης 0.25 μ m. Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε ήλιο υψηλής καθαρότητας με ροή 1.6 mL/min. Οι συνθήκες της ανάλυσης ήταν ως εξής: αρχική θερμοκρασία στήλης 120°C, αύξηση της θερμοκρασίας της στήλης από τους 120°C στους 250°C με ρυθμό 3°C ανά λεπτό και παραμονή στους 250°C για 5 min. Η θερμοκρασία του εισαγωγέα ήταν 230°C, ενώ τα ιόντα παρήχθησαν με την μέθοδο του βομβαρδισμού με ηλεκτρόνια ενέργειας 70 eV, με σκοπό την παραλαβή θραυσμάτων εντός του εύρους 40-450 m/z. Τέλος, η συνολική διάρκεια της ανάλυσης ήταν 50 min. Η ταυτοποίηση των θραυσμάτων των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων έγινε με την

βοήθεια προτύπου μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων (F.A.M.E. Mix C8-C22, Supelco Analytical, USA), αλλά και βάσει βιβλιογραφικών δεδομένων των βιβλιοθηκών του Wiley (<http://eu.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-04-70047852.html>) και του NIST (<http://www.nist.gov/srd/nist1a.html>).

2.11 Έλεγχος της καθαρότητας των μικροβιακών καλλιιεργειών

Κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων τόσο υπό στείρες, όσο και υπό μη-στείρες συνθήκες καλλιέργειας, πραγματοποιούνταν περιοδικά έλεγχος της καθαρότητας της μικροβιακής καλλιέργειας. Τούτο κατέστη δυνατό με την λήψη 1-2 mL από την εκάστοτε καλλιέργεια και την δημιουργία παρασκευάσματος νωπού ή μετά από την κατεργασία της χρώσης κατά Gram και την παρατήρηση του σε οπτικό μικροσκόπιο τύπου Zeiss (Germany). Επιπρόσθετα, στην περίπτωση της τέλεσης συνεχούς καλλιέργειας υπό μη-στείρες συνθήκες ζύμωσης, κρίθηκε αναγκαία η εφαρμογή μιας πιο εξειδικευμένης ανάλυσης, προκειμένου να διαπιστωθεί η παρουσία ή μη άλλων μικροοργανισμών πλην του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 εντός του χημειοστάτη. Για τον λόγο αυτό εφαρμόστηκε η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) σε συνδυασμό με την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε διαβαθμισμένο αποδιατακτικό πήκτωμα (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE). Ειδικότερα, δείγμα καλλιέργειας ελήφθη από τον χημειοστάτη και μετά τη συλλογή των κυττάρων με φυγοκέντρηση (3.000×g/ 5 min) σε φυγόκεντρο τύπου Hettich (Hettich Zentrifugen Mikro 12-24, Germany). Ακολούθησε απομόνωση του συνόλου του γενετικού υλικού (DNA) σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται από τους κατασκευαστές του εμπορικού σκευάσματος για την απομόνωση και καθαρισμό του DNA (Wizard DNA purification kit, Promega, Madison, WI, USA).

Το απομονωμένο DNA από την καλλιέργεια ενισχύθηκε με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) με την χρήση των εκκινητών U968 (AACGCGAAGAACCTTAC) και L1401 (GCGTGTGTACAAGACCC) που στοχεύουν στην περιοχή V6–V8 του γονιδίου 16S

rRNA (Ercolini et al., 2006), με επιθυμητό προϊόν PCR 450bp. Σύμφωνα με μια προηγούμενη μελέτη, μια GC προέκταση (GC clamp) προστέθηκε στον εκκινητή U968 (Muyzer et al., 1993). Για την προετοιμασία των δειγμάτων για την ενίσχυση της περιοχής αυτής, ποσότητα DNA ίση με 20 ng/μL προστέθηκε σε διάλυμα που αποτελείτο από 2.5 U θερμοάντοχης (Taq) DNA πολυμεράσης (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), 5 μL ρυθμιστικού διαλύματος πολυμεράσης, 0.8 mM dNTPs, 0.2 μM από κάθε εκκινητή, 1.0 mM MgCl₂ σε τελικό όγκο 25 μL. Η αντίδραση της PCR έλαβε χώρα σε θερμοκυκλοποιητή με τα εξής στάδια: αρχική θερμική αποδιάταξη για 5 min στους 94°C, ακολουθούμενο από 30 κύκλους [αποδιάταξη του DNA στους 94°C για 1 min, πρόσδεση των εκκινητών στο DNA εκμαγείο (annealing) στους 56 °C για 45 sec, επιμήκυνση των εκκινητών (extension) στους 72°C για 3 min] και ένα τελικό στάδιο επιμήκυνσης στους 72 °C για 10 min. Για τον έλεγχο της ορθότητας των προϊόντων της αντίδρασης PCR, 5 μL από το προϊόν της αντίδρασης ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1.5% (w/v).

Για την ανίχνευση πιθανής παρουσίας επιπλέον ζωνών διαφορετικών της εναρκτήριας καλλιέργειας, τα προϊόντα της PCR αναλύθηκαν με αποδιατακτική βαθμιδωτή ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου (DGGE) σε συσκευή ηλεκτροφόρησης BioRad (Dcode apparatus, Biorad Hercules, CA, USA) (Ercolini et al., 2006). Συγκεκριμένα, τα δείγματα αναλύθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 7% (w/v) σε κατάλληλο διάλυμα ηλεκτροφόρησης (1×Tris-acetate EDTA, TAE) στους 60°C, με εφαρμογή τάσης 50 V για 10 min, ακολουθούμενη από 200 V για χρονικό διάστημα 4 h. Η συγκέντρωση του αποδιατακτικού βαθμιδωτού παράγοντα κυμάνθηκε μεταξύ 20% και 50% ουρίας-φορμαμιδίου [το 100% αφορά σε 7 M ουρία και 40% (w/v) φορμαμίδιο]. Η εμφάνιση των αποτελεσμάτων έγινε με έκθεση της πηκτής σε UV (GelDoc system, Bio-Rad), μετά από χρώση σε GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium, Investment Blvd, Hayward, CA, USA) για 3 min και έκπλυση με απιονισμένο νερό για 15 min.

2.12 Υπολογισμός ποσοστού ανάκτησης άνθρακα

Με σκοπό τον έλεγχο της ορθότητας των αποτελεσμάτων, σε ορισμένες περιπτώσεις πραγματοποιήθηκε ο υπολογισμός του ισοζυγίου άνθρακα και του ποσοστού ανάκτησης αυτού (R_C), στο τέλος των καλλιεργειών σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου, στις ημι-συνεχείς καλλιέργειες και κατά την κατάσταση δυναμικής ισορροπίας, στην περίπτωση των συνεχών καλλιεργειών. Ο υπολογισμός του άνθρακα της ξηρής μάζας πραγματοποιήθηκε με βάση τον μοριακό τύπο $C_5H_7NO_2$ (Paranikolaou et al., 2000). Επιπρόσθετα, για τον υπολογισμό του ισοζυγίου άνθρακα θεωρήθηκε ότι για 1 mol παραγόμενου οξικού οξέος, πραγματοποιείται η σύνθεση 1 mol CO_2 , ενώ αντίστοιχα η παραγωγή 1 mol βουτυρικού οξέος συνοδεύεται από την παραγωγή 2 mol CO_2 .

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΣΜΙΞΕΩΝ ΤΗΣ ΑΚΑΘΑΡΤΗΣ ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ ΣΤΗΝ ΑΥΞΗΣΗ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ *C. BUTYRICUM* VPI 1718 ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ 1,3-ΠΡΟΠΑΝΟΔΙΟΛΗΣ

Ως πρώτο σκέλος του πειραματικού σχεδιασμού ορίστηκε η διερεύνηση της επίδρασης των προσμίξεων-υπολειμμάτων που ευρίσκονται στην ακάθαρτη γλυκερόλη, προερχόμενων από την διαδικασία της trans-μεθυλίωσης των λιπαρών οξέων (υλικό εκκινήσεως) κατά την παραγωγή βιολογικού πετρελαίου, στην αύξηση του βακτηρίου *C. butyricum* και στην παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης. Μέχρι προσφάτως, η πλειονότητα των ερευνών στην διεθνή βιβλιογραφία αφορούσε στην χρήση της καθαρής γλυκερόλης ως μόνη πηγή άνθρακα για την παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης μέσω της βιοτεχνολογικής οδού, ενώ ένας περιορισμένος αριθμός μελετών σχετίζεται με την αξιοποίηση της ακάθαρτης γλυκερόλης προερχομένης από την βιομηχανία παραγωγής βιολογικού πετρελαίου ως υπόστρωμα για την παραγωγή της εν λόγω διόλης (Barbirato et al., 1998; González-Pajuelo et al., 2004, 2005; Papanikolaou et al., 2000, 2004; Papanikolaou and Aggelis, 2003; Petitdemange et al., 1995; Rehman et al., 2008). Ιδιαίτερη μνεία γίνεται από ορισμένους μελετητές σχετικά με την δυνατότητα αύξησης των διαφόρων στελεχών βακτηρίων στην ακάθαρτη γλυκερόλη. Συγκεκριμένα, οι Petitdemange et al. (1995) έδειξαν ότι ορισμένα στελέχη του βακτηρίου *C. butyricum* αδυνατούσαν να αυξηθούν σε υπόστρωμα γλυκερόλης προερχόμενης από την trans-μεθυλίωση του ελαίου της ελαιοκράμβης. Οι González-Pajuelo et al. (2004) αναφέρουν ότι η προσθήκη της ακάθαρτης γλυκερόλης στο θρεπτικό μέσο του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 3266 σε συγκέντρωση 100 g/L επέφερε παρεμπόδιση της μικροβιακής αύξησης ίση με 86%. Ακόμη, η προσθήκη αυξανόμενων αρχικών συγκεντρώσεων ακάθαρτης γλυκερόλης σε

συνεχή συστήματα καλλιέργειας με σταθερό ρυθμό αραίωσης, είχε ως επίπτωση την μείωση του συντελεστή απόδοσης βιομάζας (Paranikolaou et al., 2004).

Ως εκ τούτου, το σύνολο των παρατηρήσεων αυτών αποτέλεσε την βάση και το έναυσμα για την μελέτη των διαφόρων προσμίξεων που δύναται να ευρεθούν εντός της ακάθαρτης γλυκερόλης, ως προς την επίδρασή τους στην παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης από το βακτήριο *C. butyricum* VPI 1718. Οι προσμίξεις που μελετήθηκαν σε αυτό το στάδιο της πειραματικής διαδικασίας αφορούσαν στα φωσφορικά άλατα του καλίου και του νατρίου (K_2HPO_4 και Na_2HPO_4), στο χλωριούχο νάτριο ($NaCl$), στο ελαϊκό οξύ ως το επικρατέστερο λιπαρό οξύ που μπορεί να ευρεθεί στην σύσταση της ακάθαρτης γλυκερόλης, καθώς επίσης και στη μεθανόλη, σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από εκείνες στις οποίες συνήθως ευρίσκονται με βάση την διεθνή βιβλιογραφία.

3.1.1 Επίδραση των αλάτων στην μικροβιακή αύξηση και παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης - Ασυνεχείς καλλιέργειες σε στατικές φιάλες αναεροβίωσης χωρίς έλεγχο της τιμής του pH.

Αρχικά, έλαβε χώρα μια σειρά πειραμάτων κατά την οποία πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες του βακτηρίου *C. butyricum* σε φιάλες αναεροβίωσης, με καθαρή γλυκερόλη ως την μόνη πηγή άνθρακα και προσθήκη των εκάστοτε αλάτων σε διάφορες αρχικές συγκεντρώσεις, εκφραζόμενες σε % κ.β. γλυκερόλης. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών συνοψίζονται στον Πίνακα 3.1. Είναι προφανές ότι δεν παρατηρήθηκαν φαινόμενα παρεμπόδισης τόσο της μικροβιακής αύξησης, όσο και της παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης, ανεξάρτητα από την φύση και την συγκέντρωση του εκάστοτε άλατος. Συγκεκριμένα, η μέγιστη τιμή της παραγόμενης βιομάζας αλλά και αυτή της παραγόμενης 1,3-προπανοδιόλης ήταν σε κάθε περίπτωση συγκρίσιμες με τις τιμές που ελήφθησαν στον μάρτυρα (χωρίς προσθήκη άλατος) (Πίνακας 3.1). Εκ των προαναφερθέντων αποτελεσμάτων, κρίθηκε αναγκαία η διεξαγωγή πειραμάτων με υψηλότερη

αρχική συγκέντρωση καθαρής γλυκερόλης, και επιπροσθέτως υψηλότερη συγκέντρωση αλάτων, έτσι ώστε να διαπιστωθεί η ύπαρξη ενός ορίου ανοχής του μικροοργανισμού στα εν λόγω άλατα.

Πίνακας 3.1 Κινητικά δεδομένα του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 κατά την καλλιέργειά του σε καθαρή γλυκερόλη ($S_0=10$ g/L), με προσθήκη διαφόρων συγκεντρώσεων αλάτων, σε στατικές φιάλες αναεροβίωσης των 200 mL, $\Theta=35^\circ\text{C}$.

Άλας	Συγκέντρωση άλατος (%, κ.β. γλυκερόλης)	S_f (g/L)	X (g/L)	1,3-PDO (g/L)
Μάρτυρας	-	0.0	0.6	6.2
	0.5	0.2	0.6	6.0
Na_2HPO_4	1.2	0.0	0.6	5.8
	2.0	0.2	0.7	6.0
K_2HPO_4	1.0	0.2	0.7	5.9
	2.5	0.3	0.7	5.8
	4.0	0.2	0.6	5.8
NaCl	0.5	0.0	0.6	5.9
	1.0	0.2	0.6	5.7
	1.5	0.9	0.6	5.6

Εμφάνιση της εναπομείνουσας γλυκερόλης (S_f , g/L), της παραγόμενης βιομάζας (X, g/L) και της παραγόμενης 1,3-προπανοδιόλης (1,3-PDO, g/L), μετά το πέρας 12h από τον εμβολιασμό.

Συνεπώς, πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 30 g/L και αυξημένες συγκεντρώσεις αλάτων (από 3.0% έως και 6.0% κ.β. γλυκερόλης). Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 3.2), παρουσιάζεται η επί τοις εκατό (%) παρεμπόδιση των αλάτων τόσο ως προς την κατανάλωση του υποστρώματος, όσο και ως προς την παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης. Συγκριτικά με την επίδοση του μικροοργανισμού στην καλλιέργεια-μάρτυρα (απουσία αλάτων),

φαίνεται ότι η παρουσία των φωσφορικών αλάτων παρεμποδίζει ως έναν βαθμό την αφομοίωση της γλυκερόλης, αλλά και την παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης από το βακτήριο *C. butyricum*, αφού σχεδόν η μισή ποσότητα του υποστρώματος παρέμεινε ακατανάλωτη. Ωστόσο, η παρουσία του χλωριούχου νατρίου (NaCl) φαίνεται να αποτελεί τον πιο παρεμποδιστικό παράγοντα για τον μικροοργανισμό, γεγονός που διαπιστώνεται από την παύση της μικροβιακής αύξησης, με άμεσο επακόλουθο τον περιορισμό της σύνθεσης της 1,3-προπανοδιόλης, ενός μεταβολίτη συνδεδεμένου με την μικροβιακή αύξηση.

Πίνακας 3.2 Κινητικά δεδομένα του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 κατά την καλλιέργειά του σε καθαρή γλυκερόλη ($S_0=30$ g/L), με προσθήκη διαφόρων συγκεντρώσεων αλάτων, σε στατικές φιάλες αναεροβίωσης των 200 mL, $\Theta=35^\circ\text{C}$.

Άλας	Συγκέντρωση άλατος (%, κ.β. γλυκερόλης)	S_f (g/L)	X (g/L)	1,3-PDO (g/L)
Μάρτυρας	-	0.3	0.68	14.9
Na ₂ HPO ₄	4.0	10.8	0.77	10.1
	6.0	12.2	0.76	8.2
K ₂ HPO ₄	4.0	16.1	0.9	7.9
	6.0	16.5	0.92	7.5
NaCl	3.0	18.0	0.53	4.7
	4.5	22.0	0.38	4.5

Εμφάνιση της εναπομείνουσας γλυκερόλης (S_f , g/L), της παραγόμενης βιομάζας (X, g/L) και της παραγόμενης 1,3-προπανοδιόλης (1,3-PDO, g/L), μετά το πέρας 24h από τον εμβολιασμό.

Είναι χαρακτηριστικό ότι κατά την προσθήκη χλωριούχου νατρίου (NaCl) ίση με 4.5% κ.β. επί της συγκεντρώσεως της γλυκερόλης, το 73% της αρχικής συγκέντρωσης υποστρώματος παρέμεινε ακατανάλωτο μετά το πέρας 24h ζύμωσης, ενώ οι μέγιστες τιμές που ελήφθησαν ήταν

για την βιομάζα 0.38 g/L και για την 1,3-προπανοδιόλη 4.5 g/L. Εν αντιθέσει, στην καλλιέργεια-μάρτυρα, ο μικροοργανισμός παρήγαγε σχεδόν 15 g/L 1,3-προπανοδιόλης, καταναλώνοντας όλη την διαθέσιμη γλυκερόλη. Όσον αφορά στην τιμή του pH στο τέλος της καλλιέργειας, αυτή κυμάνθηκε εντός του εύρους 5.5-6.5 στις φιάλες όπου παρατηρήθηκε περιορισμός της μικροβιακής αύξησης, ενώ στην καλλιέργεια-μάρτυρα, η αντίστοιχη τιμή pH ήταν ίση με 4.5 ± 0.1 , εξαιτίας της παραγωγής οργανικών οξέων όπως το οξικό και το βουτυρικό οξύ, αναμενόμενων μεταβολιτών-παραπροϊόντων της προπανοδιολικής ζύμωσης, όταν αυτή τελείται από στελέχη του βακτηρίου *C. butyricum*.

Επομένως, με βάση τα ανωτέρω αποτελέσματα φαίνεται πως η ύπαρξη του χλωριούχου νατρίου στις εν λόγω συγκεντρώσεις αποτελεί παρεμποδιστικό παράγοντα για την αύξηση του μικροοργανισμού. Γενικά, μπορεί να λεχθεί ότι η αύξηση των βακτηρίων παρεμποδίζεται κατά την καλλιέργεια τους σε θρεπτικά υποστρώματα με αξιοσημείωτες συγκεντρώσεις άλατος, γεγονός που αποδίδεται κυρίως στην κυτταρική συστολή και τελικά στην λύση των κυττάρων εξαιτίας του ωσμωτικού στρες (Marquis, 1968). Ωστόσο, οι εν λόγω παρατηρήσεις μπορούν να ληφθούν ως μια ένδειξη για την συμπεριφορά του βακτηρίου, καθώς στις στατικές φιάλες αναεροβίωσης δεν είναι δυνατό να διατηρηθούν οι βέλτιστες συνθήκες καλλιέργειας όπως ο έλεγχος της τιμής του pH, η ανάδευση, καθώς επίσης και η απαγωγή του παραγόμενου εκ της μεταβολικής δραστηριότητας CO₂. Ως εκ τούτου, κρίθηκε αναγκαία η πραγματοποίηση της ανωτέρω ζύμωσης σε βιοαντιδραστήρα, προκειμένου να εξαχθούν περισσότερο ασφαλή συμπεράσματα για την επίδραση των παρεμποδιστών, ήτοι του χλωριούχου νατρίου, όσο και άλλων προσμίξεων που μπορεί να ευρεθούν στην ακάθαρτη γλυκερόλη, όπως το ελαϊκό οξύ και η μεθανόλη.

3.1.2 Επίδραση των προσμίξεων της ακάθαρτης γλυκερόλης στην αύξηση και παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης - Καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου με έλεγχο της τιμής του pH.

3.1.2.1 Επίδραση της προσθήκης χλωριούχου νατρίου (NaCl).

Σε συνέχεια των προηγούμενων μελετών, έλαβαν χώρα καλλιέργειες διαλείποντος έργου σε βιοαντιδραστήρα, στις οποίες η καθαρή γλυκερόλη ($S_0=20$ g/L) αποτέλεσε την μονή πηγή άνθρακα, με προσθήκη χλωριούχου νατρίου σε συγκεντρώσεις των 6%, 10% και 30% κ.β. επί της συγκέντρωσης της γλυκερόλης. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών συνοψίζονται στον Πίνακα 3.3. Είναι άξιο λόγου το γεγονός ότι υπό τις δεδομένες συνθήκες καλλιέργειας, η αύξηση του μικροοργανισμού ουδόλως επηρεάστηκε από την παρουσία του χλωριούχου νατρίου, ακόμα και σε υψηλές συγκεντρώσεις αυτού (30 % κ.β. γλυκερόλης).

Πίνακας 3.3 Κινητικά δεδομένα του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 κατά την καλλιέργεια του σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου 1-L με καθαρή γλυκερόλη ($S_0=20$ g/L) ως πηγή άνθρακα και προσθήκη διαφόρων συγκεντρώσεων χλωριούχου νατρίου.

Συγκέντρωση NaCl (% κ.β. γλυκερόλης)	S_0 (g/L)	S_f (g/L)	X (g/L)	1,3-PDO (g/L)	But (g/L)	Ace (g/L)	Lac (g/L)	$Y_{PDO/S}$ (g/g)
0.0	18.9	0.1	0.90	11.3	2.9	0.8	0.5	0.60
6.0	18.8	0.2	0.81	11.3	3.1	0.7	0.5	0.57
10.0	19.9	0.1	0.79	12.1	2.9	0.6	0.4	0.61
30.0	20.1	0.0	0.82	11.9	3.1	0.7	0.5	0.59

Εμφάνιση της αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης (S_0 , g/L), της εναπομείνουσας γλυκερόλης (S_f , g/L), της παραγόμενης βιομάζας (X, g/L), της παραγόμενης 1,3-προπανοδιόλης (1,3-PDO, g/L), του παραγόμενου βουτυρικού οξέος (But, g/L), του παραγόμενου οξικού οξέος (Ace, g/L), του παραγόμενου γαλακτικού οξέος (Lac, g/L) και του συντελεστή απόδοσης της παραγόμενης 1,3-προπανοδιόλης προς την καταναλωθείσα γλυκερόλη ($Y_{PDO/S}$, g/g). Συνθήκες καλλιέργειας: θερμοκρασία επώασης $\Theta=35^\circ\text{C}$, ρυθμός ανάδευσης 150 rpm, εμφύσηση αερίου αζώτου 0.1 vvm, pH=6.8 (προσθήκη 5M NaOH).

Προφανώς, η διατήρηση βέλτιστων συνθηκών καλλιέργειας κατά την αύξηση του μικροοργανισμού στον βιοαντιδραστήρα (ανάδευση, ρύθμιση της τιμής του pH, συνεχής εμφύσηση αερίου αζώτου για την απαγωγή του παραγόμενου CO₂ ή/ και για την διατήρηση απολύτως αναερόβιων συνθηκών) συνετέλεσαν στην ομοιόμορφη κατανομή των κυττάρων του βακτηρίου, με άμεσο επακόλουθο την επαρκή μικροβιακή αύξηση. Επιπρόσθετα, το γεγονός ότι το συγκεκριμένο στέλεχος επέδειξε ανοχή σε υψηλές συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου (έως και 30% κ.β. επί της συγκέντρωσης της γλυκερόλης), αποτελεί ενθαρρυντικό στοιχείο σχετικά με την ανεκτικότητα του απέναντι στο εν λόγω άλας που μπορεί να βρεθεί στην ακάθαρτη γλυκερόλη.

3.1.2.2 Επίδραση της προσθήκης ελαϊκού οξέος και στεατικού οξέος

Ακολούθως μελετήθηκε η επίδραση της προσθήκης ελαϊκού οξέος στο μέσο της καλλιέργειας στην αύξηση του βακτηρίου *C. butyricum*. Το ελαϊκό οξύ (^{Δ9}C18:1) αποτέλεσε το επιλεγθέν προς μελέτη λιπαρό οξύ, δεδομένου ότι σύμφωνα με την βιβλιογραφία, στην σύσταση της ακάθαρτης γλυκερόλης προερχόμενη από την διαδικασία παραγωγής βιολογικού πετρελαίου, το εν λόγω λιπαρό οξύ αποτελεί το επικρατέστερο εκ του συνόλου του κλάσματος των ελεύθερων λιπαρών οξέων, αφού η πλειονότητα των υλικών εκκινήσεως για την εν λόγω βιοδιεργασία συνίσταται από έλαια φυτικής προελεύσεως. Σημειώνεται ότι στην ακάθαρτη γλυκερόλη που διατέθηκε για τους σκοπούς της παρούσας μελέτης («ADM Industries»), το ελαϊκό οξύ βρέθηκε ως το κυρίαρχο (55%, κ.β.), με δευτερεύοντα λιπαρά οξέα το λινελαϊκό οξύ (^{Δ9,12}C18:2) (26%, κ.β) και το παλμιτικό οξύ (C16:0) (15%, κ.β.) Ως εκ τούτου, πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου του 1-L, στις οποίες η καθαρή γλυκερόλη αποτέλεσε την μόνη πηγή άνθρακα (S₀=20 g/L), ενώ στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας προστέθηκε ελαϊκό οξύ υπό μορφή γαλακτώματος, σε συγκεντρώσεις των 0.5%, 1.0%, 1.5% και 2.0% (κ.β. επί της συγκεντρώσεως της γλυκερόλης). Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε μια καλλιέργεια απουσία ελαϊκού οξέος από το θρεπτικό μέσο που αποτέλεσε τον μάρτυρα. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται

στον ακόλουθο Πίνακα 3.4. Τεκμαίρεται ότι η προσθήκη ελαϊκού οξέος σε συγκεντρώσεις των 0.5% και 1.0%, παρόλο που επέφερε μια επιμήκυνση στην λανθάνουσα φάση του αυξητικού κύκλου του μικροοργανισμού, δεν επηρέασε την διαδικασία βιομετατροπής της γλυκερόλης σε 1,3-προπανοδιόλη, αφού το βακτήριο κατανάλωσε όλη την διαθέσιμη γλυκερόλη και παρήγαγε παρόμοιες τελικές συγκεντρώσεις 1,3-προπανοδιόλης με τον μάρτυρα (11.3-11.9 g/L). Ωστόσο, μικρή αύξηση στην συγκέντρωση του λιπαρού οξέος (1.2 και 1.5% κ.β.), επηρέασε αρνητικά την αύξηση του μικροοργανισμού (0.04-0.05 g/L μέγιστης παραγόμενης βιομάζας), άλλα και τον καταβολισμό της γλυκερόλης, αφού μετά το πέρας 24 h, ένα ποσοστό της τάξεως του 80 με 90% της αρχικής συγκέντρωσης του υποστρώματος παρέμεινε ακατανάλωτο. Τελικώς, η προσθήκη ελαϊκού οξέος σε συγκέντρωση 2.0% επέφερε ολική παρεμπόδιση στην μικροβιακή αύξηση (Πίνακας 3.4).

Πίνακας 3.4 Κινητικά δεδομένα του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 κατά την καλλιέργειά του σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου (1-L) με καθαρή γλυκερόλη ($S_0=20$ g/L) ως πηγή άνθρακα και προσθήκη διαφόρων συγκεντρώσεων ελαϊκού οξέος.

Συγκέντρωση ελαϊκού οξέος (% κ.β. γλυκερόλης)	Χρόνος (h)	S_0 (g/L)	S_f (g/L)	X (g/L)	1,3-PDO (g/L)	But (g/L)	Ace (g/L)	Lac (g/L)	$Y_{PDO/S}$ (g/g)
0.0	12	18.9	0.1	0.90	11.3	2.9	0.8	0.5	0.60
0.5	17	20.1	0.2	0.80	11.9	2.2	1.7	0.3	0.69
1.0	19	20.1	0.2	0.80	11.3	2.9	1.1	0.5	0.56
1.2	24	20.2	16.5	0.05	0.5	0.1	0.1	0.0	- ^a
1.5	24	20.2	18.5	0.04	0.5	0.1	0.1	0.0	- ^a
2.0	24	20.1	19.5	0.02	0.2	0.0	0.1	0.0	- ^a

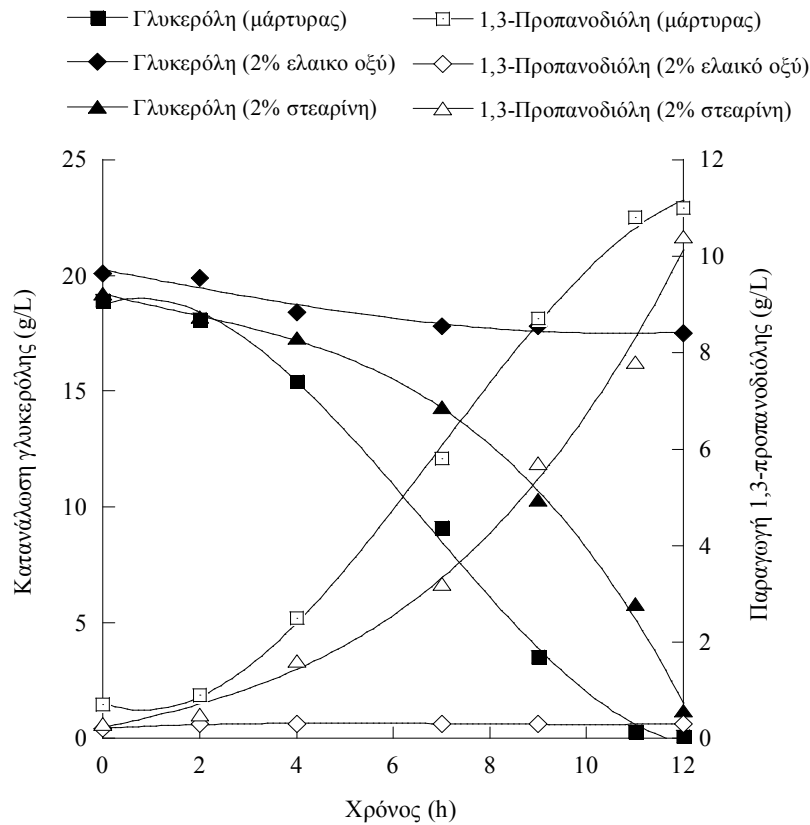
Συνθήκες όπως στον πίνακα 3.3. Συνθήκες καλλιέργειας: θερμοκρασία επώασης $\Theta=35^\circ\text{C}$, ρυθμός ανάδευσης 150 rpm, εμφύσηση αερίου αζώτου 0.1 vvm, pH=6.8 (προσθήκη 5M NaOH).

^a Ο συντελεστής απόδοσης $Y_{PDO/S}$ δεν παρουσιάζεται λόγω μειωμένης παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης στις εν λόγω καλλιέργειες

Από τα ανωτέρω διαπιστώνεται πως η παρουσία ελαϊκού οξέος σε συγκέντρωση ίση με 1% (κ.β. επί της συγκεντρώσεως της γλυκερόλης) αποτελεί και το μέγιστο όριο ανοχής για τον συγκεκριμένο μικροοργανισμό, καθώς πέραν αυτού του ορίου παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη παρεμπόδιση στην αύξηση του κλωστριδίου. Η εν λόγω παρατήρηση ήγειρε ερωτήματα σχετικά με την φύση της παρεμπόδισης που ασκεί η παρουσία του ελαϊκού οξέος στον μικροοργανισμό και ειδικότερα αν ο μηχανισμός παρεμπόδισης οφείλεται στην ύπαρξη του λιπαρού αυτού οξέος στο μέσο της καλλιέργειας, ή στην φύση του λιπαρού οξέος ως μονοακόρεστο λιπαρό οξύ και άρα στον διπλό δεσμό αυτού. Επομένως, για την αποσαφήνιση του ερωτήματος αυτού, έλαβε χώρα ένα συμπληρωματικό πείραμα, στο οποίο το ελαϊκό οξύ αντικαταστάθηκε με την στεαρίνη, ένα μίγμα κορεσμένων λιπαρών οξέων αποτελούμενο κυρίως από στεατικό οξύ (C18:0) σε ποσοστό 85% κ.β., ένα λιπαρό οξύ με ίδιο αριθμό ατόμων άνθρακα με το ελαϊκό, αλλά που στερείται του διπλού δεσμού. Όπως διαπιστώνεται από τις κινητικές που απεικονίζονται στο Γράφημα 3.1, ο μικροοργανισμός παρέμεινε ανεπηρέαστος από την παρουσία του στεατικού οξέος στο μέσο της καλλιέργειας, γεγονός που υποδηλώνει ότι η ύπαρξη του διπλού δεσμού αποτελεί τον παρεμποδιστικό παράγοντα στην αύξηση του βακτηρίου *C. butyricum*.

Στην βιβλιογραφία αναφέρεται ότι οι μικροοργανισμοί έχουν την δυνατότητα να κορέσουν τις μεταβολικές τους ανάγκες σε λιπαρά οξέα μέσω διάφορων μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένης και της πρόσληψής τους από το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται. Ωστόσο, όταν βρεθούν σε περιβάλλον με αυξημένη παρουσία λιπαρών οξέων μακράς αλύσου, μπορεί να παρατηρηθούν μεταβολές και βλάβες στην κυτταρική τους μεμβράνη, παρεμβάσεις επί των διαφόρων μεταβολικών μονοπατιών, με τελική επίπτωση την καταστροφή των κυτταρικών τους δομών (Khulusi et al., 1995). Η παρεμπόδιση επί της μικροβιακής αύξησης οφειλόμενη στην παρουσία ακόρεστων λιπαρών οξέων αποδίδεται κυρίως στις φυσικοχημικές ιδιότητες των τελευταίων, όπως ο ισομερισμός τους και ο βαθμός ακορεστότητας τους. Η αντιβακτηριακή δράση των ακόρεστων λιπαρών αυξάνεται παράλληλα με την αύξηση του αριθμού των διπλών δεσμών στο μόριο τους,

ενώ οι φυσικώς απαντώμενες *cis*-μορφές των λιπαρών οξέων θεωρούνται ως πιο τοξικές από τα αντίστοιχα *trans*-ισομερή αυτών.



Γράφημα 3.1 Κινητική της κατανάλωσης γλυκερόλης και παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης από το βακτήριο *C. butyricum* VPI 1718 κατά την αύξηση του σε θρεπτικό μέσο με προσθήκη ελαιικού οξέος ή στεαρίνης.

Επιπροσθέτως, η ύπαρξη μιας ελεύθερης καρβοξυλικής ομάδας αποτελεί έναν σημαντικό παράγοντα που ενισχύει την επιζήμια επίδραση των λιπαρών οξέων (Kodicek and Worden, 1945). Επιπρόσθετα, βακτήρια ανήκοντα στην κατηγορία των θετικών κατά Gram (Gram positive bacteria) φέρονται να είναι γενικά πιο επιρρεπή όταν εκτίθενται σε λιπαρά οξέα, σε αντίθεση με τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια (Gram negative bacteria) (Nieman, 1954). Ωστόσο, ως γενικό συμπέρασμα, μπορεί να ειπωθεί ότι η ικανοποιητική μικροβιακή αύξηση και παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης κατά την καλλιέργεια του βακτηρίου *C. butyricum* παρουσία στεατικού οξέος (C18:0) υποδηλώνει μια σαφή ένδειξη της ισχυρής παρεμποδιστικής δράσης που ασκεί το ελαιικό

οξύ, αποδιδόμενη πιθανότητα στην παρουσία του διπλού δεσμού στο μόριο του λιπαρού αυτού οξέος.

3.1.2.3 Επίδραση της προσθήκης μεθανόλης

Επόμενο είδος προσμίξεως-υπολείμματος που εξετάστηκε για την πιθανή δράση του ως παρεμποδιστικός παράγοντας στην αύξηση του μικροοργανισμού *C. butyricum* ήταν η μεθανόλη. Η μεθανόλη θεωρείται ως μια ουσία μη αφομοιώσιμη από στελέχη βακτηρίων ικανά να αποικοδομήσουν την γλυκερόλη, επομένως η παρουσία της στην ακάθαρτη γλυκερόλη δύναται να αποτελέσει έναν αρνητικό παράγοντα για την μικροβιακή αύξηση (Rigomier et al., 1980; Rehman et al., 2008). Ακόμη, η παρουσία της μεθανόλης στο περιβάλλον ανάπτυξης ενός μικροοργανισμού, δύναται να προκαλέσει φαινόμενα ώσμωσης στις κυτταρικές δομές του, επηρεάζοντας τόσο την ρευστότητα και τους μηχανισμούς μεταφοράς της κυτταρικής μεμβράνης, όσο και την ενεργότητα των ενζύμων που εμπλέκονται στην ομαλή λειτουργία της (Ingram and Buttke, 1984). Υπό αυτό το πρίσμα διεξήχθησαν καλλιέργειες του βακτηρίου *C. butyricum* σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου και όγκου 1-L, κατά τις οποίες προστέθηκαν γνωστές συγκεντρώσεις μεθανόλης, ενώ και σε αυτή την περίπτωση συμπεριλήφθηκε και μια καλλιέργεια χωρίς προσθήκη μεθανόλης που αποτέλεσε τον μαρτύρα. Σημειώνεται ότι η προσθήκη της μεθανόλης έλαβε χώρα μετά τη αποστείρωση του βιοαντιδραστήρα με το θρεπτικό μέσο και προτού διεξαχθεί ο εμβολιασμός, προς αποφυγή της εξάτμισής της κατά την θερμική επεξεργασία. Στον Πίνακα 3.5 συνοψίζονται τα αποτελέσματα που αφορούν στις προαναφερθείσες καλλιέργειες.

Διαπιστώθηκε ότι η ύπαρξη της μεθανόλης σε συγκέντρωση 5% κ.β. επί της συγκεντρώσεως της γλυκερόλης δεν επηρέασε την απόδοση του μικροοργανισμού, τόσο ως προς την εξάντληση της πηγής άνθρακα από το μέσο της καλλιέργειας, όσο και ως προς την παραγωγή 1,3-προπανοδιολής, με την μέγιστη παραγόμενη ποσότητα αυτής να είναι άμεσα συγκρίσιμη με την αντίστοιχη που επετεύχθη στην καλλιέργεια-μάρτυρα (11.3-11.5 g/L). Όταν η συγκέντρωση της

μεθανόλης στο θρεπτικό μέσο διπλασιάστηκε, παρατηρήθηκε μια μείωση στην μέγιστη παραγόμενη ποσότητα του βουτυρικού οξέος (1.7 g/L από 2.9 g/L στον μάρτυρα).

Πίνακας 3.5 Κινητικά δεδομένα του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 κατά την ασυνεχή καλλιέργειά του σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου, όγκου 1-L με καθαρή γλυκερόλη ($S_0=20$ g/L) ως πηγή άνθρακα και προσθήκη διαφόρων συγκεντρώσεων μεθανόλης.

Συγκέντρωση μεθανόλης (% κ.β. γλυκερόλης)	S_0 (g/L)	S_f (g/L)	X (g/L)	1,3-PDO (g/L)	But (g/L)	Ace (g/L)	Lac (g/L)	$Y_{PDO/S}$ (g/g)
0.0	18.9	0.1	0.9	11.3	2.9	0.8	0.5	0.60
5.0	20.3	0.1	1.1	11.5	2.5	0.4	0.5	0.56
10.0	20.1	0.5	1.1	10.9	1.7	0.4	0.6	0.55

Συντημήσεις όπως στον πίνακα 3.2. Συνθήκες καλλιέργειας: θερμοκρασία επώασης $\Theta=35^\circ\text{C}$, ρυθμός ανάδευσης 150 rpm, εμφύσηση αερίου αζώτου 0.1 vvm, pH=6.8 (προσθήκη 5M NaOH).

Ωστόσο, τόσο η παραχθείσα βιομάζα, όσο και η παραχθείσα 1,3-προπανοδιόλη κυμάνθηκαν σε ικανοποιητικά επίπεδα, ενισχύοντας την εκτίμηση της απουσίας φαινομένων παρεμπόδισης κατά την προσθήκη μεθανόλης στο μέσο της καλλιέργειας.

3.1.3 Επίδραση των προσμίξεων της ακάθαρτης γλυκερόλης στην αύξηση και παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης σε μονοβάθμιο συνεχές σύστημα καλλιέργειας

Εν συνεχεία, δεδομένου ότι από τα ανωτέρω πειράματα κατέστη δυνατή η αξιολόγηση της επίδρασης των πιθανών προσμίξεων της ακάθαρτης γλυκερόλης επί του μικροοργανισμού, αποφασίστηκε η καλλιέργεια του βακτηρίου *C. butyricum* χρησιμοποιώντας ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας την ακάθαρτη γλυκερόλη (απόβλητο βιομηχανίας παραγωγής βιολογικού πετρελαίου). Για τον σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν πρωτίστως ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα, οι οποίες ελήφθησαν ως μάρτυρες, με αρχική συγκέντρωση καθαρής και

ακάθαρτης γλυκερόλης ίση με 25 g/L, και σε δεύτερο στάδιο πειράματα σε μονοβάθμιο συνεχές σύστημα καλλιέργειας με πηγή άνθρακα την ακάθαρτη γλυκερόλη ($S_0=25$ g/L). Στον παρακάτω Πίνακα 3.6 απεικονίζονται τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα που προέκυψαν από τις ασυνεχείς καλλιέργειες άλλα και από την συνεχή καλλιέργεια όταν σε αυτή επετεύχθη κατάσταση δυναμικής ισορροπίας (Κ.Δ.Ι., steady-state). Συγκρίνοντας την απόδοση του μικροοργανισμού κατά την καλλιέργεια του σε καθαρή και ακάθαρτη γλυκερόλη, διαπιστώνεται πως δεν παρουσιάζονται φαινόμενα παρεμπόδισης του μικροοργανισμού από το εν λόγω απόβλητο, τόσο σε επίπεδο μικροβιακής αύξησης όσο και σε επίπεδο παραγόμενης 1,3-προπανοδιόλης. Επιπροσθέτως, κατά την αύξηση του κλωστριδίου σε συνεχή συστήματα καλλιέργειας παρατηρήθηκε πως κατά την κατάσταση δυναμικής ισορροπίας, το κυρίαρχο παραγόμενο μεταβολικό προϊόν ήταν η 1,3-προπανοδιόλη, κυμαινόμενη σε ικανοποιητικά επίπεδα της τάξεως των 14.2 g/L, με μέγιστη παραγωγικότητα 1.41 g/L/h, ενώ ο ειδικός ρυθμός παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης (q_{PDO}) ήταν ίσος με 0.78 g/L/h.

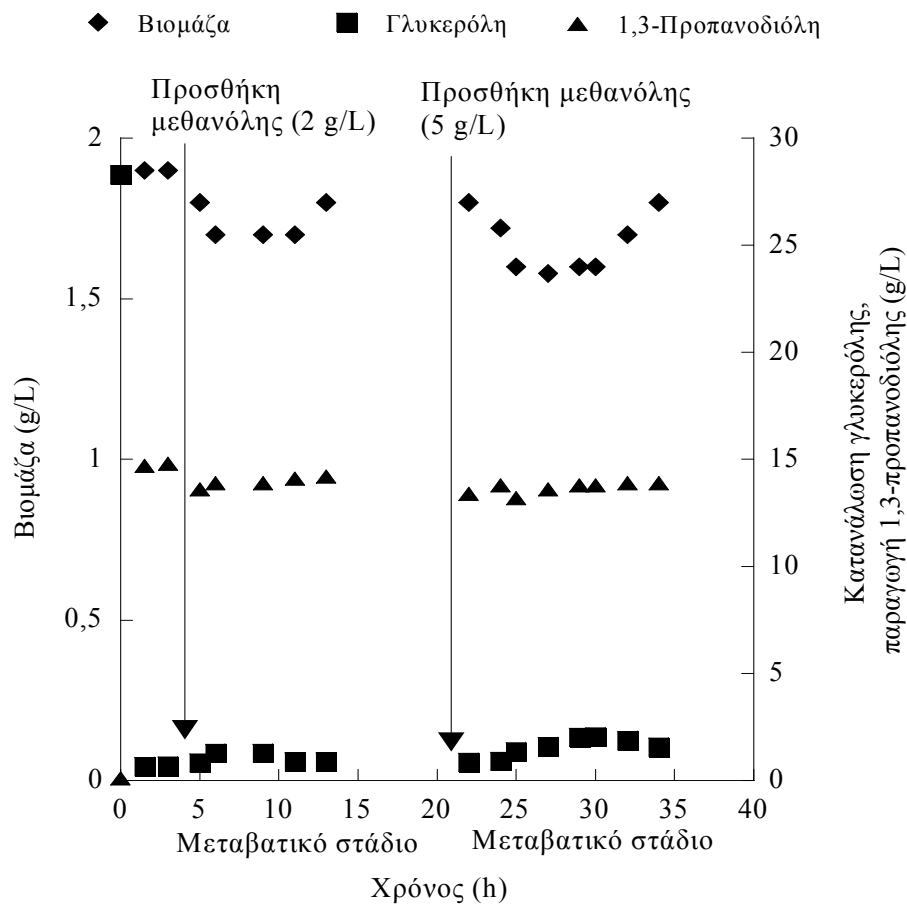
Πίνακας 3.6 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της καλλιέργειας του βακτηρίου *C.butyricum* VPI 1718 σε ασυνεχή και συνεχή συστήματα, με την χρήση καθαρής ή ακάθαρτης γλυκερόλης ως μοναδική πηγή ενέργειας ($S_0=25$ g/L).

Είδος καλλιέργειας	D (h ⁻¹)	S _f (g/L)	X (g/L)	1,3-PDO (g/L)	But (g/L)	Ace (g/L)	Lac (g/L)	Y _{PDO/S} (g/g)
Ασυνεχής (Καθαρή γλυκερόλη)	-	0.0	1.4	13.8	3.4	0.6	0.4	0.56
Ασυνεχής (Ακάθαρτη γλυκερόλη)	-	0.0	1.5	13.7	3.3	0.5	0.4	0.56
Συνεχής (Ακάθαρτη γλυκερόλη)	0.1	0.4±0.2	1.8±0.1	14.2±0.2	3.8±0.1	0.5±0.2	0.3±0.1	0.57

Εμφάνιση του ρυθμού αραίωσης (D, h⁻¹), της εναπομείνουσας-υπολειπόμενης γλυκερόλης (S_f, g/L), της παραγόμενης βιομάζας (X, g/L), της παραγόμενης 1,3-προπανοδιόλης (1,3-PDO, g/L), του παραγόμενου βουτυρικού οξέος (But, g/L), του παραγόμενου οξικού οξέος (Ace, g/L), του παραγόμενου γαλακτικού οξέος (Lac, g/L) και του συντελεστή απόδοσης της παραγόμενης 1,3-προπανοδιόλης προς την καταναλωθείσα γλυκερόλη (Y_{PDO/S}, g/g). Συνθήκες καλλιέργειας για της ασυνεχείς καλλιέργειες όπως στον πίνακα 3.3. Συνθήκες καλλιέργειας για την συνεχή καλλιέργεια: ενεργός όγκος 500 mL, θερμοκρασία επώασης 35°C, ρυθμός ανάδευσης 150 rpm, εμφύσηση αερίου αζώτου 0.1 vvm, pH=6.8 (προσθήκη 5M NaOH).

Αντίστοιχα, το βουτυρικό και το οξικό οξύ αποτέλεσαν τα κύρια παραγόμενα οργανικά οξέα, αναμενόμενα ως δευτερογενή μεταβολικά παραπροϊόντα της προπανοδιολικής ζύμωσης σε συγκεντρώσεις ανάλογες με εκείνες που επετεύχθησαν στις ασυνεχείς καλλιέργειες. Οι ειδικοί ρυθμοί παραγωγής των οργανικών οξέων (q_{But} και q_{Ace}) βρέθηκαν ίσοι με 0.21 και 0.02 g/g/h αντίστοιχα.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν το γεγονός ότι στην ακάθαρτη γλυκερόλη που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, η περιεκτικότητα της μεθανόλης βρέθηκε να υπάρχει σε ίχνη (<0.1%), αποφασίστηκε η προσθήκη μεθανόλης κατά την κατάσταση δυναμικής ισορροπίας της συνεχούς καλλιέργειας, έτσι ώστε παρακολουθηθεί η συμπεριφορά του μικροοργανισμού κατά το μεταβατικό στάδιο (transitory phase), καθώς επίσης και η δυνατότητα του μικροοργανισμού να επέλθει πάλι σε κατάσταση δυναμικής ισορροπίας (Κ.Δ.Ι., steady-state) υπό τον δεδομένο ρυθμό αραίωσης ($D=0.1 \text{ h}^{-1}$). Υπό αυτό το πρίσμα, προστέθηκαν σε πρώτη φάση 2 g/L μεθανόλης στον χημειοστάτη και ελήφθησαν δείγματα ανά τακτά χρονικά διαστήματα κατά την διάρκεια του μεταβατικού σταδίου της καλλιέργειας. Η κινητική της επίδρασης της μεθανόλης στον χημειοστάτη απεικονίζεται στο Γράφημα 3.2. Μετά την προσθήκη 2 g/L μεθανόλης, παρατηρήθηκε μια μικρή μείωση της παραγόμενης βιομάζας, με παράλληλη αύξηση της υπολειπόμενης γλυκερόλης. Ωστόσο μετά την έκπλυση (washout) της μεθανόλης από τον χημειοστάτη, οι συγκεντρώσεις της βιομάζας και της υπολειπόμενης γλυκερόλης επανήλθαν στα αρχικά επίπεδα. Η καλλιέργεια αφέθηκε έτσι ώστε να επιτευχθεί ξανά κατάσταση δυναμικής ισορροπίας και τότε προστέθηκαν 5 g/L μεθανόλης στον χημειοστάτη. Η συμπεριφορά του μικροοργανισμού ήταν και πάλι η ίδια όσον αφορά στην παραγόμενη βιομάζα και την υπολειπόμενη γλυκερόλη, κα μετά την απομάκρυνση της μεθανόλης το σύστημα επανήλθε σε κατάσταση δυναμικής ισορροπίας. Επομένως, μπορεί να ειπωθεί ότι η μεθανόλη δεν επηρεάζει την βιομετατροπή της ακάθαρτης γλυκερόλης σε 1,3-προπανοδιόλη από το βακτήριο *C. butyricum* ακόμα και σε συνεχή συστήματα καλλιέργειας υπό τις δεδομένες συνθήκες αύξησης.



Γράφημα 3.2 Παρουσίαση των μεταβατικών σταδίων μεταξύ των χρονικών σημείων προσθήκης μεθανόλης κατά την συνεχή καλλιέργεια του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718. Συνθήκες καλλιέργειας όπως στον πίνακα 3.6.

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, η μεθανόλη έχει χαρακτηριστεί ως παρεμποδιστικός παράγοντας στην αύξηση διαφόρων μικροοργανισμών. Οι Athalye et al. (2009) μελέτησαν την επίδραση της μεθανόλης κατά την καλλιέργεια του μύκητα *Pythium irregulare* και παρατήρησαν πλήρη επίσχεση της μικροβιακής αύξησης παρουσία της αλκοόλης στο θρεπτικό μέσο. Εν αντιθέσει, η μεθανόλη δεν φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά την αύξηση του μικροφύκου *Schizochytrium limacinum*, όταν προστέθηκε στο μέσο της καλλιέργειας σε συγκεντρώσεις μέχρι 20 g/L. Ωστόσο, η προσθήκη της στην συγκέντρωση των 50 g/L βρέθηκε να είναι ισχυρώς παρεμποδιστική για την αύξηση του μικροοργανισμού (Pyle et al., 2008). Στο γενικότερο πλαίσιο της επίδρασης διαφόρων αλκοολών επί της μικροβιακής αύξησης, πρέπει να τονιστεί πως τόσο το κύριο μεταβολικό προϊόν- στόχος της

μελέτης αυτής, η 1,3-προπανοδιόλη, αλλά και άλλες αλκοόλες όπως η 1,2-προπανοδιόλη και η 2,3-βουτανοδιόλη, έχουν αναφερθεί πως επηρεάζουν αρνητικά την αύξηση του στελέχους *C. butyricum* CNCM 1211 όταν προστίθενται εξωγενώς στο μέσο της καλλιέργειας, κατά την ζύμωση της γλυκερόλης (Colin et al., 2000). Ακόμη, η επίδραση της εξωγενώς προστιθέμενης 1,3-προπανοδιόλης έχει μελετηθεί και κατά την προσθήκη της σε ασυνεχή και συνεχή συστήματα καλλιέργειας του βακτηρίου *C. butyricum* F2b (Papanikolaou et al., 2008). Το εν λόγω στέλεχος αναφέρεται ως ανθεκτικό σε αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις 1,3-προπανοδιόλης εντός του χημειοστάτη (84.2 g/L), διατηρώντας ικανοποιητικό μικροβιακό πληθυσμό και χωρίς να παρατηρηθούν φαινόμενα έκπλυσης (washout) της καλλιέργειας.

Αξία λόγου κρίνεται μεταξύ άλλων η ικανοποιητική παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης κατά την συνεχή καλλιέργεια του μικροοργανισμού *C. butyricum* VPI 1718 στην παρούσα μελέτη. Σε κατάσταση δυναμικής ισορροπίας, η συγκέντρωση του εν λόγω κύριου μεταβολικού προϊόντος ήταν ίση με 14.2 g/L, με αντίστοιχο συντελεστή βιομετατροπής της γλυκερόλης προς 1,3-προπανοδιόλη ίσο με 0.57 g/g, μια τιμή κοντά στην μέγιστη θεωρητική (0.60 g/g) (Zeng, 1996). Ακόμη, είναι χαρακτηριστικό το γεγονός ότι οι συγκεντρώσεις όλων των μεταβολικών προϊόντων (δηλαδή της 1,3-προπανοδιόλης αλλά και των οργανικών οξέων) παρήχθησαν σε παρόμοιες τελικές συγκεντρώσεις τόσο στις ασυνεχείς καλλιέργειες-μάρτυρες, όσο και στη αντίστοιχη συνεχή καλλιέργεια με την ίδια συγκέντρωση εισόδου της γλυκερόλης (25 g/L). Εξάλλου, η σταθερότητα οι οποία διέπει την βιομετατροπή της γλυκερόλης σε 1,3-προπανοδιόλη έχει αναφερθεί στην βιβλιογραφία, κατά την μελέτη ασυνεχών και συνέχων καλλιέργειών του βακτηρίου *C. butyricum* σε υποστρώματα με βάση την γλυκερόλη. Η παρατήρηση αυτή έγκειται στην ύπαρξη ρυθμιστικών μηχανισμών, οι οποίοι κατανέμουν με ακρίβεια την ροή του άνθρακα μεταξύ των μεταβολικών μονοπατιών της βιοσύνθεσης των οργανικών οξέων και της σύνθεσης της 1,3-προπανοδιόλης (Abbad-Andaloussi et al., 1996, 1998; González-Pajuelo et al., 2004; Papanikolaou et al., 2004, 2008).

Συμπερασματικά, στο παρόν κεφάλαιο εξετάστηκε η δυνατότητα του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 να αυξηθεί σε θρεπτικά υποστρώματα τα οποία περιείχαν διαφορές προσμίξεις-υπολείμματα που συνήθως απαντώνται στην ακάθαρτη γλυκερόλη, προερχόμενη από την βιομηχανία παραγωγής βιολογικού πετρελαίου. Το στέλεχος επέδειξε αξιοσημείωτη αντοχή όταν βρέθηκε σε περιβάλλον με υψηλή συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου, κατά την καλλιέργεια του σε βέλτιστες συνθήκες αύξησης στον βιοαντιδραστήρα. Εν αντιθέσει, η έκθεση του μικροοργανισμού στο ελαϊκό οξύ προκάλεσε την επίσχεση της αύξησης του πέραν μιας δεδομένης συγκέντρωσης του λιπαρού οξέος, ενώ η ικανοποιητική αύξηση του σε περιβάλλον καλλιέργειας με προσθήκη στεαρίνης υποδηλώνει ότι ο μηχανισμός παρεμπόδισης που ασκείται στο βακτήριο έγκειται στην παρουσία του διπλού δεσμού. Ακόμη, η προσθήκη της μεθανόλης στο μέσο της καλλιέργειας δεν επηρέασε ούτε θετικά άλλα ούτε και αρνητικά την αύξηση του μικροοργανισμού, επιτρέποντας την ομαλή τέλεση της βιοδιεργασίας. Συνεπώς, τεκμαίρεται ότι το εν λόγω στέλεχος αποτελεί έναν ελπιδοφόρο μικροοργανισμό προς μελέτη, τόσο για την ανθεκτικότητα του στις διάφορες προσμίξεις της ακάθαρτης γλυκερόλης που μελετήθηκαν σε αυτό το πρώτο στάδιο του πειραματικού σχεδιασμού, αλλά και γενικότερα ως ένας μικροοργανισμός-παραγωγός της 1,3-προπανοδιόλης.

Τα αποτελέσματα του παρόντος κεφαλαίου έχουν δημοσιευθεί:

Chatzifragkou A, Dietz D, Komaitis M, Zeng AP, Papanikolaou S (2010) “Effect of biodiesel-derived waste glycerol impurities on biomass and 1,3-propanediol production of *Clostridium butyricum* VPI 1718”, *Biotechnology and Bioengineering*, 107 (1): 76-84.

3.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗΣ ΑΝΑΕΡΟΒΙΩΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΓΕΩΜΕΤΡΙΑΣ ΤΟΥ ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑ ΣΤΗΝ ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ *C. BUTYRICUM* VPI 1718 ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΖΥΜΩΣΗ ΤΗΣ 1,3-ΠΡΟΠΑΝΟΔΙΟΛΗΣ

Επόμενο σκέλος της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η διερεύνηση της βιοχημικής απόκρισης του μικροοργανισμού *C. butyricum* κατά την τέλεση της ζύμωσης της 1,3-προπανοδιόλης υπό διαφορετικές στρατηγικές επίτευξης αναερόβιου περιβάλλοντος, σε βιοαντιδραστήρες διαφορετικής γεωμετρίας. Η επίτευξη αναερόβιου περιβάλλοντος για τον μικροοργανισμό πραγματοποιήθηκε με δύο τρόπους. Στην πρώτη περίπτωση, εφαρμόστηκε εμφύσηση αερίου αζώτου υψηλής καθαρότητας στον βιοαντιδραστήρα, καθ' όλη την διάρκεια της βιοδιεργασίας, ενώ εναλλακτικά, το αναερόβιο περιβάλλον της ζύμωσης επετεύχθη με την διακοπή της εμφύσησης του αερίου αζώτου μετά από τον εμβολιασμό και την διατήρηση αναερόβιων συνθηκών μέσω του μικροβιακού μεταβολισμού (αυτό-παραγόμενη, self-generated), και ειδικότερα μέσω της αποκαρβοξυλίωσης του πυροσταφυλικού οξέος. Η δεύτερη περίπτωση αποτελεί τακτική που εφαρμόζεται ευρέως σε μικροβιακές ζυμώσεις οι οποίες λαμβάνουν χώρα σε βιομηχανική κλίμακα. Επιπροσθέτως, στον πειραματικό σχεδιασμό συμπεριλήφθηκαν βιοαντιδραστήρες με διαφορετική γεωμετρία, προκειμένου να μελετηθεί η πιθανή επίδραση του εν λόγω παράγοντα στην μικροβιακή αύξηση και την παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης υπό το πρίσμα της δημιουργίας αναερόβιου περιβάλλοντος με διαφορετικό τρόπο εφαρμογής.

3.2.1 Καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου με εφαρμογή διαφορετικών στρατηγικών αναερόβιωσης

Αρχικά, η ζύμωση της 1,3-προπανοδιόλης τελέστηκε σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου και όγκου 1-L [λόγος ύψους δοχείου προς διάμετρο (height-to-diameter ratio, H_R/D_R) ίσος με 1.45], χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα και ενέργειας την ακάθαρτη γλυκερόλη, σε αρχικές

συγκεντρώσεις (S_0) από 20 έως 60 g/L. Η επίτευξη αναερόβιων συνθηκών καλλιέργειας πραγματοποιήθηκε με συνεχή εμφύσηση αερίου αζώτου υψηλής καθαρότητας κατά την διάρκεια της ζύμωσης. Τα κινητικά δεδομένα των ανωτέρω πειραμάτων συνοψίζονται στον ακόλουθο Πίνακα 3.7. Σε κάθε περίπτωση, ο μικροοργανισμός εξάντλησε την πηγή άνθρακα από το μέσο της καλλιέργειας, ενώ σε ικανοποιητικά επίπεδα κυμάνθηκε η παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης, με την μέγιστη παραγωγή αυτής τα 35.1 g/L στις καλλιέργειες με αρχική συγκέντρωση ακάθαρτης γλυκερόλης ίση με 60 g/L.

Πίνακας 3.7 Κινητικά δεδομένα της καλλιέργειας του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 σε ασυνεχείς καλλιέργειες με διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις γλυκερόλης και με επίτευξη της αναεροβίωσης μέσω δυο διαφορετικών στρατηγικών, σε βιοαντιδραστήρα 1-L.

Αναεροβίωση	Χρόνος (h)	S_{cons} (g/L)	X (g/L)	1,3-PDO (g/L)	But (g/L)	Ace (g/L)	Lac (g/L)	$Y_{PDO/S}$ (g/g)	R_C (% w/w)
Με συνεχή εμφύσηση N_2	12	20.2	0.6	11.3	3.2	0.4	0.3	0.55	89.4
	19	30.5	0.6	17.6	4.7	0.5	0.8	0.57	92.9
	29	38.5	0.8	21.4	6.0	0.6	1.0	0.55	91.7
	53	60.8	1.0	35.1	8.8	1.5	1.4	0.57	94.3
Αυτό- παραγόμενη	12	20.3	0.6	11.4	2.6	0.4	0.3	0.55	97.1
	18	30.4	0.7	16.7	4.4	0.6	1.1	0.55	90.1
	30	38.9	0.7	20.5	5.1	0.8	3.9	0.52	92.5
	61	46.4	0.5	25.1	4.7	0.2	10.2	0.42	100.1

Αύξηση σε ακάθαρτη γλυκερόλη. Εμφάνιση του χρόνου ολοκλήρωσης της ζύμωσης (h), της καταναλωθείσας γλυκερόλης (S_{cons} , g/L), της παραγόμενης βιομάζας (X, g/L), της παραγόμενης 1,3-προπανοδιόλης (1,3-PDO, g/L), του παραγόμενου βουτυρικού οξέος (But, g/L), του παραγόμενου οξικού οξέος (Ace, g/L), του παραγόμενου γαλακτικού οξέος (Lac, g/L), του συντελεστή απόδοσης της παραγόμενης 1,3-προπανοδιόλης προς την καταναλωθείσα γλυκερόλη ($Y_{PDO/S}$, g/g) και του ποσοστού ανάκτησης του άνθρακα (R_C , % w/w). Συνθήκες καλλιέργειας: θερμοκρασία επώασης $\Theta=35^\circ\text{C}$, ρυθμός ανάδευσης 150 rpm, εμφύσηση αερίου αζώτου 0.1 vvm, pH=6.8 (προσθήκη 5M NaOH).

Ομοίως, ο συντελεστής απόδοσης της παραγόμενης 1,3-προπανοδιόλης ήταν ικανοποιητικός, λαμβάνοντας τιμές μεταξύ 0.54-0.57 g ανά g καταναλωθέντος υποστρώματος. Όσον αφορά στην παραγωγή των οργανικών οξέων, το βουτυρικό οξύ ήταν σε κάθε περίπτωση το κυρίαρχο, με μέγιστη παραγωγή τα 8.8 g/L στα πειράματα με αυξημένη αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης ($S_0=60$ g/L), ακολουθούμενο από χαμηλές τελικές συγκεντρώσεις του οξικού και του γαλακτικού οξέος σε όλες τις ασυνεχείς καλλιέργειες (Πίνακας 3.7).

Εν συνεχεία, εφαρμόστηκε η δεύτερη στρατηγική αναεροβίωσης (η αναφερθείσα ως αυτό-παραγόμενη αναεροβίωση), κατά την οποία μετά τον εμβολιασμό της καλλιέργειας, η παροχή αερίου αζώτου διακοπτόταν και το σύστημα αφηνόταν έτσι ώστε η επίτευξη αναερόβιου περιβάλλοντος να επιτευχθεί μέσω της μικροβιακής δραστηριότητας του μικροοργανισμού (van Andel et al., 1985; Papanikolaou et al., 2000; 2004). Πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου με αυξανόμενη αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης, όμοιες με πριν (από 20 έως 60 g/L), προκειμένου να συγκριθεί η συμπεριφορά του βακτηρίου *C. butyricum* με τις αποδόσεις που επέτυχε στις καλλιέργειες με συνεχή εμφύσηση αζώτου. Διαπιστώθηκε ότι στα πειράματα με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης μέχρι τα 30 g/L, δεν παρατηρήθηκαν αξιόλογες διαφοροποιήσεις τόσο στην αύξηση του μικροοργανισμού αλλά και την παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης και των οργανικών οξέων-παραπροϊόντων της ζύμωσης (Πίνακας 3.7). Ωστόσο, κατά την αύξηση του μικροοργανισμού σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης ίση με 60 g/L, παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες βιοχημικές μεταβολές. Συγκεκριμένα, παρόλο που ο χρόνος της ζύμωσης παρατάθηκε πλέον των 60 ωρών, το βακτήριο δεν κατάφερε να εξαντλήσει την διαθέσιμη πηγή άνθρακα, αφήνοντας 13.0 g/L γλυκερόλης ακατανάλωτα μετά το πέρας της ζύμωσης. Επιπλέον, υπήρξαν εμφανή σημάδια περιορισμού της μικροβιακής αύξησης, δεδομένου ότι η μέγιστη παραγόμενη βιομάζα έφτασε τα 0.5 g/L υπό τις εφαρμοζόμενες συνθήκες καλλιέργειας, ενώ στο αντίστοιχο πείραμα με συνεχή εμφύσηση αζώτου, η μέγιστη παραγόμενη βιομάζα βρέθηκε ίση με 1.0 g/L. Ως επακόλουθο, η παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης βρέθηκε να

είναι μειωμένη στα 25.1 g/L, ταυτοχρόνως με τον αντίστοιχο συντελεστή απόδοσης ($Y_{PDO/S}$) του εν λόγω μεταβολικού προϊόντος (0.42 g/g καταναλωθέντος υποστρώματος). Εξάλλου, έκπληξη προκάλεσε η αύξηση της μέγιστης παραγωγής του γαλακτικού οξέος υπό τις δεδομένες συνθήκες καλλιέργειας. Είναι χαρακτηριστικό ότι στα πειράματα με $S_0=60$ g/L, το γαλακτικό οξύ ήταν το κύριο οργανικό οξύ που παρήχθη από τον μικροοργανισμό, φτάνοντας τα 10.2 g/L, ενώ η παραγωγή του βουτυρικού οξέος ήταν αυτή που φάνηκε να επηρεάζεται σημαντικά μεταξύ των παραγόμενων οργανικών οξέων, φτάνοντας τα 4.7 g/L στο μέσο της καλλιέργειας. Αξίζει να αναφερθεί σε αυτό το σημείο ότι το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη παράγει γαλακτικό οξύ, ως παραπροϊόν της ζύμωσης της 1,3-προπανοδιόλης, ενώ η παραγωγή του όσον αφορά στο υδρογόνο είναι σχεδόν αμελητέα (προϊόν σχετιζόμενο με την δράση της φωσφοροκλαστικής αντίδρασης στην οποία οφείλεται εν μέρει η παραγωγή γαλακτικού οξέος από τα βακτήρια ανήκοντα στο γένος *Clostridium*) (Biebl and Spröer, 2002). Επιπλέον, ο Simon (1947) έχει αναφέρει ότι στην περίπτωση του βακτηρίου *Clostridium acetobutylicum*, το μεταβολικό μονοπάτι παραγωγής γαλακτικού οξέος δεν είναι συνήθως λειτουργικό και δύναται να ενεργοποιηθεί ως ένας λιγότερο επαρκής μηχανισμός για να αντισταθμίσει την οξειδωση των αναγωγικών παραγόντων ($NADH_2$) όταν η σύνθεση του μοριακού υδρογόνου μέσω του μονοπατιού της φωσφοροκλαστικής αντίδρασης παρεμποδίζεται. Με βάση τα ανωτέρω δύναται να ερμηνευθεί η ικανότητα του συγκεκριμένου στελέχους να συνθέτει γαλακτικό οξύ. Ωστόσο, κατά την καλλιέργειά του με συνεχή εμφύσηση αζώτου, η παραγωγή γαλακτικού οξέος δεν ξεπέρασε σε καμία περίπτωση τα 1.4 g/L (Πίνακας 3.7).

Επόμενο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας αποτέλεσε η καλλιέργεια του βακτηρίου *C. butyricum* υπό τις δύο διαφορετικές στρατηγικές επίτευξης της αναεροβίωσης, αλλά σε βιοαντιδραστήρα διαφορετικής γεωμετρίας [λόγος ύψους δοχείου προς διάμετρο (height-to-diameter ratio, H_R/D_R) ίσος με 2.01] και όγκου 3-L. Τα κινητικά δεδομένα των πειραμάτων αυτών συνοψίζονται στον Πίνακα 3.8. Ο μικροοργανισμός κατάφερε σε κάθε περίπτωση να ολοκληρώσει

επιτυχώς την ζύμωση της 1,3-προπανοδιόλης, παραμένοντας ανεπηρέαστος από την ύπαρξη ή απουσία του αερίου αζώτου στο περιβάλλον της καλλιέργειας. Οι τελικές συγκεντρώσεις της 1,3-προπανοδιόλης κυμάνθηκαν σε όμοια επίπεδα και απολύτως συγκρίσιμα σε κάθε στρατηγική αναεροβίωσης που ακολουθήθηκε. Μόνο στην περίπτωση αυξημένης αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης ($S_0=60$ g/L) υπό συνθήκες αυτό-παραγόμενης αναεροβίωσης παρατηρήθηκε μια μικρή αύξηση της τελικής συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέος, φτάνοντας τα 2.5 g/L. Ωστόσο είναι χαρακτηριστικό το γεγονός ότι ο συντελεστής απόδοσης της 1,3-προπανοδιόλης ($Y_{PDO/S}$) ήταν σταθερός, λαμβάνοντας τιμές στο εύρος 0.55-0.56 g ανά g καταναλωθέντος υποστρώματος.

Πίνακας 3.8 Κινητικά δεδομένα της καλλιέργειας του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 σε ασυνεχείς καλλιέργειες με διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις γλυκερόλης, με επίτευξη της αναεροβίωσης μέσω δυο διαφορετικών στρατηγικών, σε βιοαντιδραστήρα 3-L.

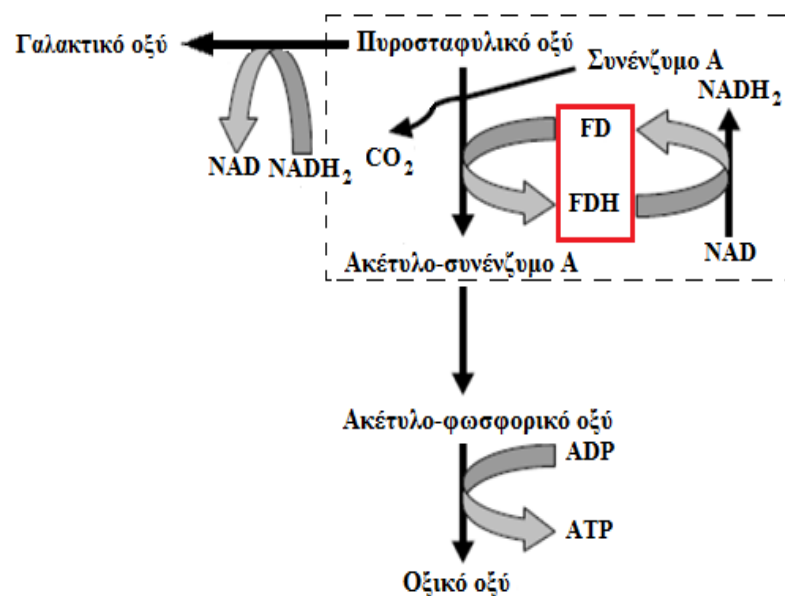
Αναεροβίωση	Χρόνος (h)	S_{cons} (g/L)	X (g/L)	1,3-PDO (g/L)	But (g/L)	Ace (g/L)	Lac (g/L)	$Y_{PDO/S}$ (g/g)	R_C (% w/w)
	12	20.3	0.9	11.4	2.6	0.4	0.3	0.56	87.4
Με συνεχή εμφύσηση N_2	18	30.1	1.1	16.7	4.1	0.6	1.1	0.55	91.2
	28	40.7	1.2	22.5	4.6	0.9	1.2	0.55	87.8
	54	61.0	1.1	33.6	5.9	1.1	1.4	0.55	84.1
	12	19.6	0.9	10.9	2.5	0.5	0.4	0.56	87.7
Αυτό- παραγόμενη	18	29.4	1.1	16.1	3.6	0.6	0.4	0.55	86.1
	29	39.1	0.9	21.6	5.7	0.8	1.2	0.55	91.2
	52	58.5	1.1	32.1	5.8	0.8	2.5	0.55	85.8

Αύξηση σε ακάθαρτη γλυκερόλη. Συντημήσεις όπως στον πίνακα 3.7. Συνθήκες καλλιέργειας: θερμοκρασία επώασης $\Theta=35^\circ\text{C}$, ρυθμός ανάδευσης 200 rpm, εμφύσηση αερίου αζώτου 0.1 vvm, pH=6.8 (προσθήκη 5M NaOH).

Βάσει των αποτελεσμάτων, μπορεί να εικαστεί πως ο συνδυασμός της απουσίας αερίου αζώτου από το μέσο της καλλιέργειας, του χαμηλού λόγου H_R/D_R , καθώς επίσης και οι συνθήκες

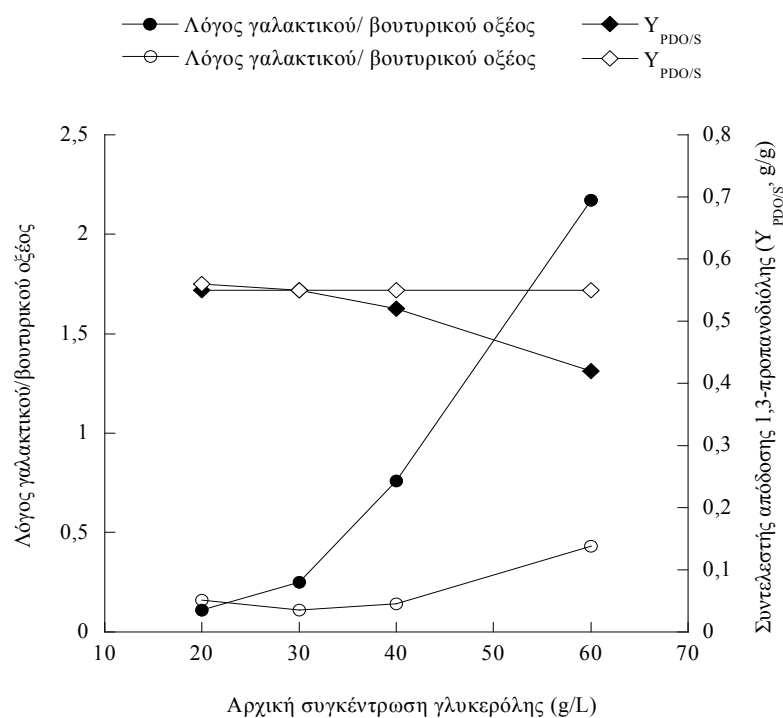
περίσσειας πηγής άνθρακα στο μέσο της καλλιέργειας, ευνοεί την σύνθεση του γαλακτικού οξέος για τον συγκεκριμένο μικροοργανισμό. Ειδικότερα, όσον αφορά στην διαφορετική γεωμετρία των βιοαντιδραστήρων, τονίζεται ότι ο χαμηλός λόγος ύψους-διαμέτρου του δοχείου (H_R/D_R) όπως στην περίπτωση του βιοαντιδραστήρα του 1-L, προσφέρει μεγαλύτερη επιφάνεια για την ομαλότερη διάχυση των αερίων στο υδατικό περιβάλλον της καλλιέργειας. Αντίθετα, ο υψηλός λόγος ύψους-διαμέτρου του δοχείου (H_R/D_R) όπως στη περίπτωση του βιοαντιδραστήρα των 3-L, επιτρέπει την παραμονή των αερίων στο υδατικό περιβάλλον της καλλιέργειας για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, μειώνοντας κατά κάποιον τρόπο την ανταλλαγή των αερίων (Matthews, 2008).

Φαίνεται, λοιπόν, ότι στις καλλιέργειες που έλαβαν χώρα σε βιοαντιδραστήρα συνολικού όγκου 1-L, εξαιτίας της απουσίας αερίου αζώτου, η αυτό-παραγόμενη αναεροβίωση ήταν ανεπαρκής. Για τον λόγο αυτό, σε συνθήκες περίσσειας πηγής άνθρακα και κατ' επέκταση επιμήκυνσης της λανθάνουσας φάσης του αυξητικού κύκλου, η ύπαρξη ανεπαρκούς αναερόβιου περιβάλλοντος φαίνεται να προκάλεσε μερική παρεμπόδιση στο επίπεδο της φωσφοροκλαστικής αντίδρασης (Σχήμα 3.1).



Σχήμα 3.1 Φωσφοροκλαστική αντίδραση τελούμενη από βακτήρια του γένους *Clostridium* sp. (Petitdemange et al., 1976; Papanikolaou, 2009). FD (ή FDH): φερρεδοξίνη-οξειδοαναγωγή

Συγκεκριμένα, μπορεί να λεχθεί ότι η δράση του ενζύμου της NADH-φερρεδοξίνης οξειδοαναγωγάσης, ενός ενζύμου ευαίσθητου στη παρουσία οξυγόνου (Papanikolaou, 2009), παρεμποδίζεται οδηγώντας στην συσσώρευση των αναγωγικών παραγόντων (NADH₂ co-factors) και του πυροσταφυλικού οξέος. Υπό αυτό το καθεστώς, ευνοείται το μεταβολικό μονοπάτι της σύνθεσης του γαλακτικού οξέος μέσω της αναγωγής του πυροσταφυλικού, με άμεσο επακόλουθο την αύξηση της συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέος στο μέσο της καλλιέργειας. Η διαπίστωση αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι η αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης της γλυκερόλης προκάλεσε την αύξηση του λόγου γαλακτικού/βουτυρικού οξέος, ενώ παράλληλα ο συντελεστής απόδοσης της 1,3-προπανοδιόλης ($Y_{\text{PDO/S}}$) παρουσίασε τάση μείωσης (Γράφημα 3.3).



Γράφημα 3.3 Παρουσίαση του λόγου γαλακτικού/βουτυρικού οξέος (κύκλοι) και του συντελεστή απόδοσης της 1,3-προπανοδιόλης (ρόμβοι) συναρτήσει της αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης, κατά την καλλιέργεια του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 υπό συνθήκες αυτό-παραγόμενης αναεροβίωσης σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου, συνολικού όγκου 1-L (μαύρα σύμβολα) και 3-L (λευκά σύμβολα).

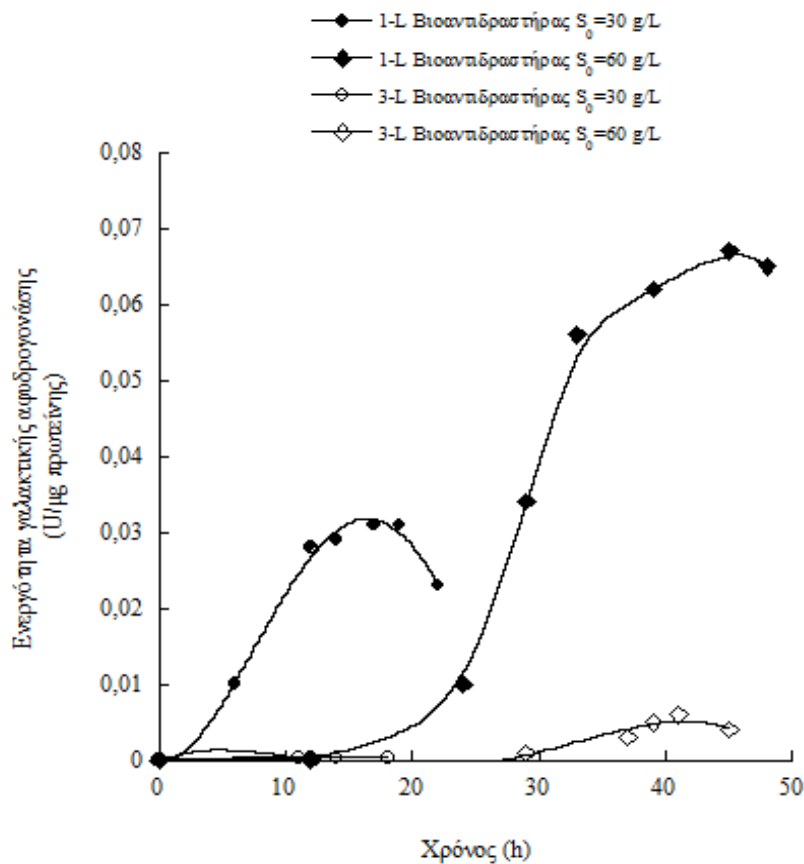
Εξάλλου, η αυξημένη συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος στο μέσο της καλλιέργειας (περισσότερο από 10 g/L στο αντίστοιχο πείραμα αυτό-παραγόμενης αναερόβιας στον βιοαντιδραστήρα 1-L) επέφερε αξιοσημείωτη παρεμπόδιση στην μικροβιακή αύξηση.

3.2.2 Μέτρηση της ενεργότητας του ενζύμου της γαλακτικής αφυδρογονάσης (Lactate dehydrogenase)

Κρίνοντας από τα αποτελέσματα που επετεύχθησαν κατά την καλλιέργεια του βακτηρίου *C. butyricum* υπό δυο διαφορετικά καθεστώτα εφαρμογής αναερόβιας συνθήκης, αποφασίστηκε η διερεύνηση της ενεργότητας του ενζύμου που σχετίζεται με την παραγωγή γαλακτικού οξέος, ήτοι της γαλακτικής αφυδρογονάσης. Αυτό κατέστη δυνατό κατά την καλλιέργεια του μικροοργανισμού σε βιοαντιδραστήρες διαλείποντος έργου, συνολικού όγκου 1- και 3-L, υπό συνθήκες αυτό-παραγόμενης αναερόβιας. Ακόμη, για τους σκοπούς του πειραματικού σχεδιασμού επιλέχθηκαν δυο διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις ακάθαρτης γλυκερόλης που αντιστοιχούσαν στα 30 και 60 g/L. Όπως φαίνεται στο ακόλουθο Γράφημα 3.4, κατά την καλλιέργεια του μικροοργανισμού στον βιοαντιδραστήρα 3-L, η ενζυμική ενεργότητα της γαλακτικής αφυδρογονάσης ήταν ουσιαστικά αμελητέα, ανεξαρτήτως της αρχικής συγκέντρωσης της ακάθαρτης γλυκερόλης. Αντίθετα, η ενεργότητα του εν λόγω ενζύμου ήταν εμφανής κατά την καλλιέργεια του κλωστριδίου στον βιοαντιδραστήρα 1-L, όπου και σημειώθηκε σημαντική παραγωγή γαλακτικού οξέος (< 10 g/L). Η μέγιστη τιμή της ενεργότητας του ενζύμου της γαλακτικής αφυδρογονάσης ήταν ίση με 0.067 U/ μg ενδοκυτταρικής πρωτεΐνης, κατά την αύξηση του μικροοργανισμού στη ακάθαρτη γλυκερόλη, αρχικής συγκέντρωσης 60 g/L.

Γενικά, στελέχη ανήκοντα στο γένος *Clostridium* sp. αναφέρονται στην βιβλιογραφία να περιέχουν το ένζυμο της γαλακτικής αφυδρογονάσης (Adreesen et al., 1989; Gheshlaghi et al., 2009). Ωστόσο, το γαλακτικό οξύ δεν θεωρείται ως κύριο προϊόν της προπανοδιολικής ζύμωσης, όταν αυτή τελείται από στελέχη του βακτηρίου *Clostridium* sp., καθώς τα συνηθέστερα παραγόμενα οργανικά οξέα της βιοδιεργασίας αυτής είναι το οξικό και το βουτυρικό (Petitdemange

et al., 1995; Biebl et al., 1999; Papanikolaou et al., 2000; Zeng and Biebl, 2002; Papanikolaou et al., 2004; Papanikolaou, 2009).



Γράφημα 3.4 Κινητική της ενεργότητας του ενζύμου γαλακτική αφυδρογονάση συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης, υπό συνθήκες αυτό-παραγόμενης αναεροβίωσης, κατά την καλλιέργεια του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 σε υπόστρωμα ακάθαρτης γλυκερόλης αρχικής συγκέντρωσης 30 g/L (κύκλοι) και 60 g/L (ρόμβοι), σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου, συνολικού όγκου 1-L (μαύρα σύμβολα) και 3-L (λευκά σύμβολα).

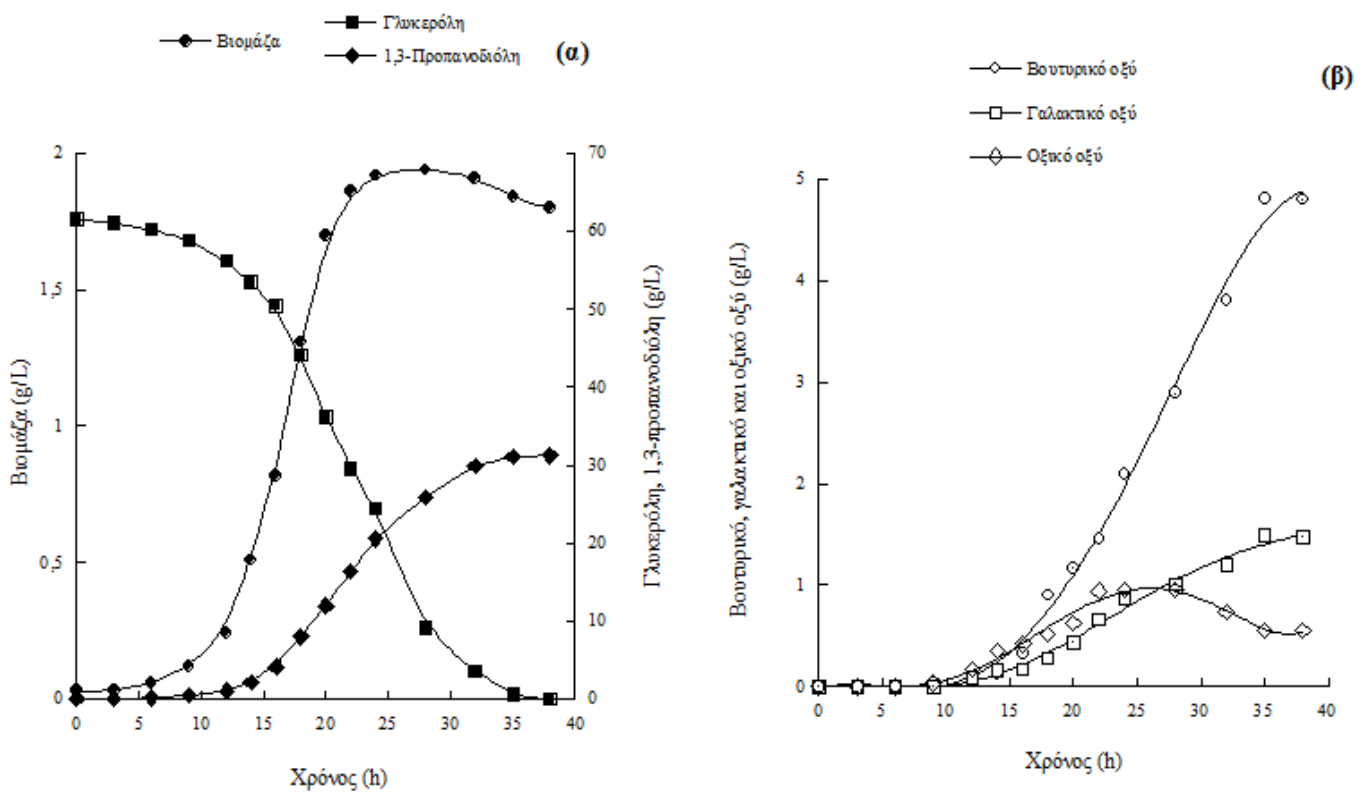
Οι González-Pajuelo et al. (2006) μελέτησαν την ενεργότητα των ενζύμων που εμπλέκονται στο μεταβολικό μονοπάτι του καταβολισμού της γλυκερόλης και της παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης και παρατήρησαν ότι στο βακτήριο *C. butyricum* VPI 3266 η ενεργότητα της γαλακτικής αφυδρογονάσης ήταν μικρότερη από 0.002 U/μg πρωτεΐνης, δεδομένου ότι ο εν λόγω μικροοργανισμός δεν δύναται να παράξει γαλακτικό οξύ. Αντίθετα, σημαντικές τιμές ενεργότητας του ενζύμου βρέθηκαν στο βακτήριο *C. acetobutylicum* DG1 (0.19 U/ μg πρωτεΐνης) ενισχύοντας

την διαπίστωση της ικανότητας του μικροοργανισμού αυτού να συνθέτει γαλακτικό οξύ. Σε άλλη μελέτη, έχει αναφερθεί ότι το στέλεχος *C. butyricum* B593 κατά την καλλιέργεια του σε υπόστρωμα γλυκερόλης, παρήγαγε γαλακτικό οξύ ως παραπροϊόν της ζύμωσης της 1,3-προπανοδιόλης σε μη αμελητέες ποσότητες (Forsberg, 1987).

Το γαλακτικό οξύ είθισται να παράγεται ως αξιοσημείωτο παραπροϊόν του δευτερογενούς μεταβολισμού της προπανοδιολικής ζύμωσης, τελούμενης από στελέχη βακτηρίων ανήκοντα στην ομάδα των εντεροβακτηρίων, όπως *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii* και *Enterobacter agglomerans*, καλλιεργούμενα υπό αερόβιες ή μικρο-αερόφιλες συνθήκες ζυμώσεως (Menzel et al., 1997; Biebl et al., 1999; Zeng and Biebl, 2002; Liu et al., 2007; Chen et al., 2009). Στην περίπτωση των βακτηρίων του γένους *Clostridium* sp., το γαλακτικό οξύ παράγεται υπό συνθήκες παρεμπόδισης του καταβολισμού του πυροσταφιλικού οξέος, οφειλόμενες στην έλλειψη σιδήρου από το θρεπτικό μέσο, στην ύπαρξη μονοξειδίου του άνθρακα στο περιβάλλον της καλλιέργειας ή σε συνθήκες περίσσειας του υποστρώματος (Adreesen et al., 1989; Gheshlaghi et al., 2009). Στην παρούσα μελέτη, την θέση του παράγοντα-κλειδί για την ενεργοποίηση του ενζύμου της γαλακτικής αφυδρογονάσης και κατ' επέκταση της σύνθεσης γαλακτικού οξέος, φαίνεται να κατέχει ο συνδυασμός της περίσσειας συγκέντρωσης του υποστρώματος και της γεωμετρίας του βιοαντιδραστήρα.

Σε συνέχεια των προηγούμενων πειραμάτων και με απώτερο σκοπό την επικύρωση των πειραματικών αποτελεσμάτων του παρόντος κεφαλαίου, τελέστηκε καλλιέργεια του μικροοργανισμού σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου και διαφορετικής γεωμετρίας, ήτοι ενεργού όγκου 4.5-L και λόγου ύψους προς διαμέτρου $H_R/D_R=3.6$. Για τους σκοπούς του πειράματος επιλέχθηκε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης ίση με 60 g/L, ενώ η εμφύσηση αερίου αζώτου στον βιοαντιδραστήρα διακόπηκε μετά την τέλεση του εμβολιασμού, προς επίτευξη συνθηκών αυτό-παραγόμενης αναεροβίωσης. Όπως διαπιστώνεται από το Γράφημα 3.5, η μικροβιακή αύξηση ήταν ικανοποιητική, συνοδευόμενη από εξάντληση της πηγής άνθρακα. Η

μέγιστη συγκέντρωση 1,3-προπανοδιόλης ανήλθε στα 32.1 g/L, με τον αντίστοιχο συντελεστή απόδοσης $Y_{PDO/S}$ να υπολογίζεται ίσος με 0.53 g ανά g υποστρώματος (Γράφημα 3.5 α). Όσον αφορά στην παραγωγή οργανικών οξέων, το βουτυρικό οξύ αποτέλεσε σε κάθε περίπτωση το κύριο παραπροϊόν της ζύμωσης, φτάνοντας τελικώς τα 4.8 g/L, ενώ το γαλακτικό και το οξικό οξύ βρέθηκαν, ως αναμένονταν, σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις εντός του βιοαντιδραστήρα (Γράφημα 3.5 β). Από τα ανωτέρω αποτελέσματα δεικνύεται ότι οι συνθήκες καλλιέργειας που ευνοούν την παραγωγή μη αμελητέων ποσοτήτων γαλακτικού οξέος εξαιτίας της ανεπαρκούς επιτεύξεως αναερόβιου περιβάλλοντος για τον εν λόγω μικροοργανισμό, συναντώνται κυρίως σε εργαστηριακούς βιοαντιδραστήρες μικρού όγκου, όταν σε αυτούς απουσιάζει η συνεχή εμφύσηση αερίου αζώτου κατά την διάρκεια της βιοδιεργασίας.

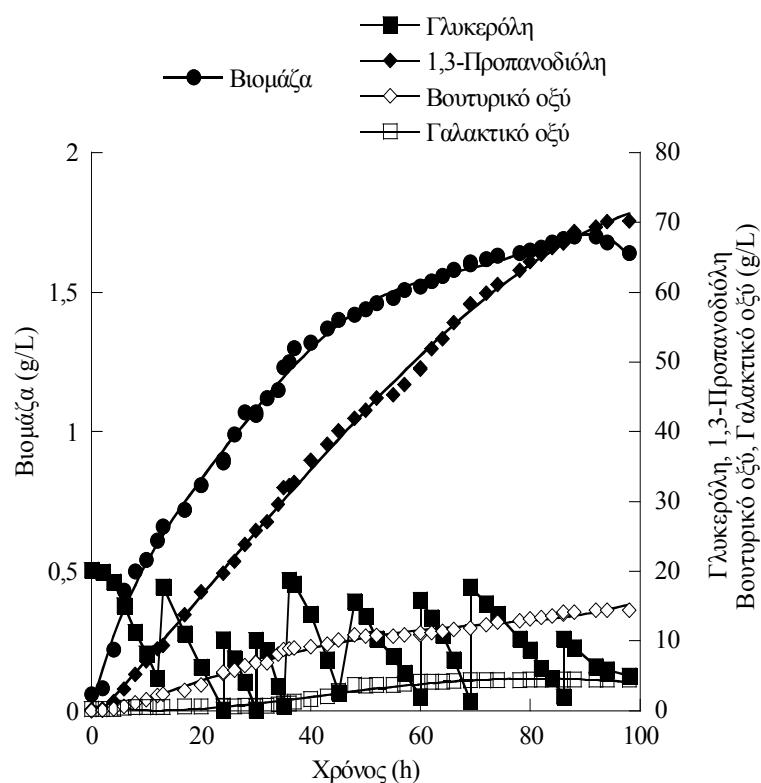


Γράφημα 3.5 Κινητικές (α) της αύξησης της βιομάζας, κατανάλωσης της γλυκερόλης και παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης και (β) παραγωγής οργανικών οξέων, κατά την καλλιέργεια του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου ενεργού όγκου 4.5-L, υπό συνθήκες αυτό-παραγόμενης αναερόβιωσης

3.2.3 Ημι-συνεχείς καλλιέργειες με εφαρμογή διαφορετικών στρατηγικών αναερόβιωσης

Επόμενο στάδιο του πειραματικού σχεδιασμού αποτέλεσε η καλλιέργεια του μικροοργανισμού *C. butyricum* σε ημι-συνεχές σύστημα στον βιοαντιδραστήρα 1-L, προκειμένου να επιτευχθεί μεγαλύτερη παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης. Σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία, η τέλεση της ζύμωσης της 1,3-προπανοδιόλης σε ημι-συνεχή συστήματα αποτελεί τον ιδανικότερο τύπο καλλιέργειας για την μεγιστοποίηση της παραγωγής της 1,3-προπανοδιόλης (Biebl, 1991; Günzel et al., 1991; Saint-Amans et al., 1994; Reimann and Biebl, 1996; Hirschmann et al., 2005; Mu et al., 2006;). Επιπλέον, εφαρμόστηκαν και οι δυο στρατηγικές επίτευξης αναερόβιου περιβάλλοντος στο μέσο της καλλιέργειας, προκειμένου να διερευνηθεί η βιοχημική απόκριση του μικροοργανισμού σε αυτόν τον τύπο καλλιέργειας, ενώ ως πηγή άνθρακα και ενέργειας χρησιμοποιήθηκε το απόβλητο της ακάθαρτης γλυκερόλης. Στην περίπτωση της συνεχούς εμφύσησης αερίου αζώτου στο μέσο της καλλιέργειας καθ' όλη την διάρκεια της βιοδιεργασίας, ο μικροοργανισμός *C. butyricum* κατάφερε να παράξει 70.8 g/L 1,3-προπανοδιόλης (Γράφημα 3.6), με τον αντίστοιχο συντελεστή απόδοσης $Y_{PDO/S}$ ίσο με 0.55 g ανά g καταναλωθείσας γλυκερόλης. Η συνολική ποσότητα της ακάθαρτης γλυκερόλης που καταναλώθηκε κατά την διάρκεια της ημι-συνεχούς καλλιέργειας ξεπέρασε τα 120 g/L (128 g/L), ενώ σημαντική ήταν και η μέγιστη παραγόμενη ποσότητα βουτυρικού οξέος που αποτέλεσε το κύριο οργανικό οξύ στο μέσο της καλλιέργειας, φτάνοντας τα 14.4 g/L. Τέλος, σε μικρότερες ποσότητες ανιχνευτήκαν τόσο το γαλακτικό όσο και το οξικό οξύ, με μέγιστες συγκεντρώσεις τα 4.4 και 1.7 g/L αντίστοιχα. Αξίζει να σημειωθεί ότι η συγκεκριμένη παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης (70.8 g/L) αποτελεί μια εκ των υψηλότερων που έχουν αναφερθεί στην διεθνή βιβλιογραφία όσον αφορά σε φυσικά στελέχη βακτηρίων του γένους *Clostridium* sp και δη σε υπόστρωμα ακάθαρτης γλυκερόλης. Οι Hirschmann et al. (2005) παρήγαγαν 87.7 g/L 1,3-προπανοδιόλης κατά την καλλιέργεια του φυσικού στελέχους *Clostridium* sp. IK124 σε βελτιστοποιημένο ημι-συνεχές σύστημα καλλιέργειας. Εξάλλου, υψηλές συγκεντρώσεις 1,3-προπανοδιόλης μεταξύ 70 και 85 g/L σε ημι-

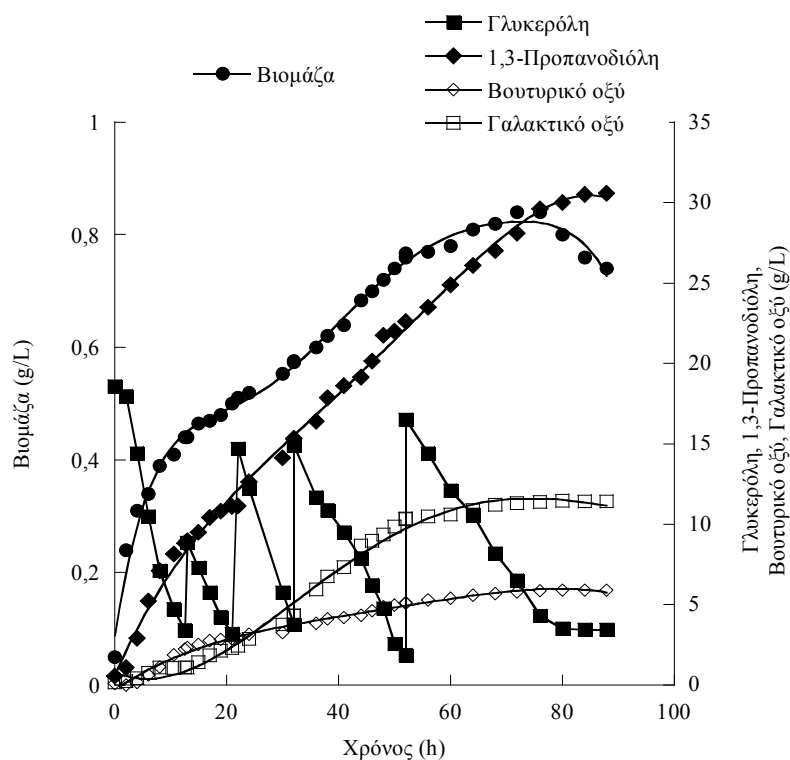
συνεχείς καλλιέργειες έχουν επιτευχθεί και από άλλα στελέχη βακτηρίων όπως *Klebsiella pneumoniae* και *Klebsiella oxytoca*. Ωστόσο, η πλειονότητα των μικροοργανισμών αυτών αποτελεί γενετικά τροποποιημένα στελέχη, απώτερο στόχο την αύξηση της ανθεκτικότητας τους στην 1,3-προπανοδιόλη ή την μείωση της σύνθεσης ανεπιθύμητων παραπροϊόντων της ζύμωσης, όπως το γαλακτικό οξύ, τα οποία δρουν ανταγωνιστικά ως προς την κατανάλωση-αναγέννηση των αναγωγικών παραγόντων (NADH_2 co-factors) κατά την μετατροπή της γλυκερόλης σε 1,3-προπανοδιόλη (Abbad-Andaloussi et al., 1995; Liu et al., 2007; Yang et al., 2007; Jin et al., 2011).



Γράφημα 3.6 Κινητική της αύξησης της βιομάζας, κατανάλωσης της ακάθαρτης γλυκερόλης και παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης, βουτυρικού οξέος και γαλακτικού οξέος κατά την ημι-συνεχή καλλιέργεια του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 σε βιοαντιδραστήρα 1-L, με συνεχή εμφύσηση αερίου αζώτου.

Ακολούθησε η καλλιέργεια του βακτηρίου *C. butyricum* σε ημι-συνεχές σύστημα στον ίδιο βιοαντιδραστήρα (1-L) αλλά με εφαρμογή της αυτό-παραγόμενης αναεροβίωσης στο περιβάλλον της ζύμωσης. Όπως διαπιστώνεται στο παρακάτω Γράφημα 3.7, έως τις πρώτες 20 ώρες της

βιοδιεργασίας, το κύριο οργανικό οξύ στο μέσο της καλλιέργειας ήταν το βουτυρικό. Ωστόσο, κατά την εξέλιξη της ζύμωσης, η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος αυξάνεται εις βάρος της παραγωγής του βουτυρικού οξέος, και τελικά γίνεται το κυρίαρχο παραγόμενο οργανικό οξύ της ζύμωσης. Είναι χαρακτηριστικό ότι μετά το περάς της ζύμωσης, περισσότερα από 11 g/L γαλακτικού οξέος ανιχνεύθηκαν στο μέσο της καλλιέργειας, ενώ η παραγωγή του βουτυρικού οξέος περιορίστηκε στα 5.9 g/L και το οξικό οξύ βρέθηκε σε ίχνη (<0.1 g/L).



Γράφημα 3.7 Κινητική της αύξησης της βιομάζας, κατανάλωσης της ακάθαρτης γλυκερόλης και παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης, βουτυρικού οξέος και γαλακτικού οξέος κατά την ημι-συνεχή καλλιέργεια του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 σε βιοαντιδραστήρα 1-L, με εφαρμογή αυτό-παραγόμενης αναεροβίωσης.

Η στροφή αυτή του μεταβολισμού του βακτηρίου είχε άμεση επίπτωση και στην παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης η οποία περιορίστηκε στα 30.5 g/L, ενώ μετά από σχεδόν 80 ώρες ζύμωσης η κατανάλωση της ακάθαρτης γλυκερόλης σταμάτησε, με τον μικροοργανισμό να έχει καταναλώσει μέχρι εκείνο το χρονικό σημείο περί τα 70 g/L υποστρώματος. Ομοίως, παρατηρήθηκε περιορισμός της μικροβιακής αύξησης, με μέγιστη παραχθείσα βιομάζα ίση με 0.8 g/L, γεγονός που πιθανώς

οφείλεται τόσο στην ύπαρξη ανεπαρκούς αναεροβίωσης, όσο και στην υψηλή συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας.

Τεκμαίρεται, συνεπώς, ότι στην περίπτωση της αυτό-παραγόμενης αναεροβίωσης, το μεταβολικό μονοπάτι της μετατροπής του πυροσταφυλικού οξέος προς γαλακτικό ανταγωνίζεται την κατανάλωση των αναγωγικών παραγόντων με το αντίστοιχο μεταβολικό μονοπάτι της σύνθεσης του βουτυρικού οξέος, εξαιτίας της μειωμένης ενεργότητας της NADH-φερρεδοξίνης οξειδοαναγωγάσης (φωσφοροκλαστική αντίδραση) και της μερικής παρεμπόδισης της μετατροπής του πυροσταφυλικού οξέος σε ακετυλο-συνένζυμο Α (acetyl-CoA), με συνέπεια την παραγωγή υψηλών ποσοτήτων γαλακτικού οξέος.

Συμπερασματικά, στο παρόν κεφάλαιο μελετήθηκε η επίδραση της στρατηγικής αναεροβίωσης και της γεωμετρίας του βιοαντιδραστήρα στην αύξηση του βακτηρίου *C. butyricum* και στην παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης. Η απουσία αερίου αζώτου κατά την διάρκεια της βιοδιεργασίας, η γεωμετρία του βιοαντιδραστήρα, καθώς επίσης και η συγκέντρωση της ακάθαρτης γλυκερόλης, βρέθηκαν να συνεισφέρουν στην μεταβολή της βιοχημικής συμπεριφοράς του μικροοργανισμού, εξαιτίας της επίτευξης ανεπαρκούς αναεροβίωσης στο περιβάλλον αύξησης του μικροοργανισμού. Υπό τις δεδομένες συνθήκες καλλιέργειας ευνοείται σημαντικά η σύνθεση του γαλακτικού οξέος, ένα οργανικό οξύ παραπροϊόν της ζύμωσης της 1,3-προπανοδιόλης, το οποίο καθίσταται ως το κυρίαρχο οργανικό οξύ στο μέσο της καλλιέργειας, δρώντας ανταγωνιστικά τόσο στην μικροβιακή αύξηση, όσο και στην παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης. Ωστόσο, τα ανωτέρω φαινόμενα ουσιαστικά αίρονται κατά την εφαρμογή της βιοδιεργασίας σε βιοαντιδραστήρες μεγαλύτερου όγκου και κατ' επέκταση διαφορετικής γεωμετρίας.

Τα αποτελέσματα του παρόντος κεφαλαίου έχουν δημοσιευθεί:

Chatzifragkou A, Aggelis G, Komaitis M, Zeng AP, Papanikolaou S (2011) “Impact of anaerobiosis strategy and bioreactor geometry on the biochemical response of *Clostridium butyricum* VPI 1718 during 1,3-propanediol fermentation”, *Bioresource Technology* 102:10625-10632.

3.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ 1,3-ΠΡΟΠΑΝΟΔΙΟΛΗΣ ΣΤΗΝ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΑΥΞΗΣΗ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ *C. BUTYRICUM* VPI 1718 ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΟΥ ΣΕ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΑΚΑΘΑΡΤΗΣ ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ

Επόμενο στάδιο του πειραματικού σχεδιασμού αποτέλεσε η μελέτη της επίδρασης της 1,3-προπανοδιόλης στην φυσιολογία του μικροοργανισμού *C. butyricum* VPI 1718 κατά την καλλιέργεια του σε υπόστρωμα με την ακάθαρτη γλυκερόλη ως την μόνη πηγή άνθρακα και ενέργειας. Με βάση την διεθνή βιβλιογραφία, η 1,3-προπανοδιόλη χαρακτηρίζεται ως ένας πρωτογενής μεταβολίτης, ο οποίος παραγόμενος σε υψηλές συγκεντρώσεις δύναται να καταστεί παρεμποδιστικός για την μικροβιακή αύξηση (παρεμπόδιση εκ του προϊόντος, product inhibition). Η δυνατότητα ενός μικροοργανισμού-παραγωγού της 1,3-προπανοδιόλης να ανθίσταται σε υψηλές συγκεντρώσεις αυτής, αποτελεί ένδειξη για την μέγιστη ικανότητα του να παράξει την εν λόγω διόλη. Επομένως, κρίθηκε αναγκαία η μελέτη της επίδρασης της εξωγενώς προστιθέμενης 1,3-προπανοδιόλης στην ικανότητα της αύξησης του μικροοργανισμού, με απώτερο σκοπό την θέσπιση ενός ορίου ανοχής για το βακτήριο *C. butyricum* VPI 1718. Επιπλέον, επιχειρήθηκε για πρώτη φορά στην διεθνή βιβλιογραφία η διερεύνηση της επίδρασης της εξωγενώς προστιθέμενης 1,3-προπανοδιόλης στην σύσταση των κυτταρικών λιπιδίων του μικροοργανισμού.

3.3.1 Επίδραση της εξωγενώς προστιθέμενης 1,3-προπανοδιόλης στην μικροβιακή αύξηση, την κατανάλωση της ακάθαρτης γλυκερόλης και την παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης

3.3.1.1 Ασυνεχείς καλλιέργειες σε αναερόβιες φιάλες Duran

Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν ασυνεχείς καλλιέργειες του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 σε αναερόβιες φιάλες Duran, χρησιμοποιώντας ως μοναδική πηγή άνθρακα την ακάθαρτη γλυκερόλη, με αρχική προσθήκη εξωγενώς διαφόρων ποσοτήτων 1,3-προπανοδιόλης (από 1 έως 20 g/L) πριν τον εμβολιασμό. Σημειώνεται ότι η αρχική συγκέντρωση της γλυκερόλης ήταν μικρή

($S_0=20$ g/L), έτσι ώστε οποιοδήποτε αποτέλεσμα να μπορεί να συσχετιστεί με την επίδραση της προστιθέμενης 1,3-προπανοδιόλης και να αποφευχθεί τυχόν παρεμποδιστική δράση εκ του υποστρώματος. Τα αποτελέσματα των προαναφερθέντων πειραμάτων συνοψίζονται στον ακόλουθο Πίνακα 3.9. Διαπιστώνεται ότι η αρχική προσθήκη 1,3-προπανοδιόλης έως και 10 g/L, δεν επηρέασε σημαντικά την βιοδιεργασία, αφού ο μικροοργανισμός κατανάλωσε όλη την διαθέσιμη γλυκερόλη, παράγοντας ικανοποιητικά ποσά 1,3-προπανοδιόλης, με αντιστοίχως επαρκή συντελεστή απόδοσης ($Y_{PDO/S}$) ο οποίος κυμαίνονταν μεταξύ των τιμών 0.52-0.56 g/g. Ωστόσο, η αύξηση της εξωγενώς προστιθέμενης διόλης στο μέσο της καλλιέργειας στα 15 g/L επέφερε μια εμφανή παύση στην αύξηση του μικροοργανισμού (Πίνακας 3.9).

Πίνακας 3.9 Κινητικά δεδομένα του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 κατά την καλλιέργεια του σε γλυκερόλη ($S_0=20$ g/L), με προσθήκη 1,3-προπανοδιόλης εξωγενώς πριν τον εμβολιασμό

Συγκέντρωση 1,3-προπανοδιόλης (g/L)	Χρόνος (h)	S_f (g/L)	X (g/L)	1,3-PDO (g/L)	But (g/L)	Ace (g/L)	$Y_{PDO/S}$ (g/g)
0.0	14	0.0	1.2	11.3	3.2	2.1	0.56
1.0	14	0.1	1.1	11.4	4.6	1.9	0.56
4.0	14	0.0	1.1	11.8	3.6	2.2	0.56
10.0	15	0.0	1.1	9.9	3.1	2.2	0.52
15.0	25	18.6	0.2	0.1	0.0	0.0	-
20.0	25	19.5	0.1	0.0	0.0	0.0	-

Αύξηση σε ακάθαρτη γλυκερόλη Εμφάνιση του χρόνου ολοκλήρωσης της ζύμωσης (h), της εναπομείνουσας γλυκερόλης (S_f , g/L), της παραγόμενης βιομάζας (X, g/L), της παραγόμενης 1,3-προπανοδιόλης (1,3-PDO, g/L), του παραγόμενου βουτυρικού οξέος (But, g/L), του παραγόμενου οξικού οξέος (Ace, g/L) και του συντελεστή απόδοσης της παραγόμενης 1,3-προπανοδιόλης προς την καταναλωθείσα γλυκερόλη ($Y_{PDO/S}$, g/g). Συνθήκες καλλιέργειας: θερμοκρασία επώασης $\Theta=35^\circ\text{C}$, ρυθμός ανάδευσης 180 rpm, σε φιάλες Duran (800 mL).

Είναι χαρακτηριστικό ότι ακόμη και μετά από την επιμήκυνση του χρόνου της ζύμωσης (από 14 h στις 25 h), δεν παρατηρήθηκαν σημάδια ανάκαμψης της αύξησης του βακτηρίου *C. butyricum*, αφού σχεδόν το 95% της αρχικής συγκέντρωσης της γλυκερόλης παρέμεινε ακατανάλωτο, κατά την εξωγενή προσθήκη τόσο 15 g/L, όσο και 20 g/L της 1,3-προπανοδιόλης (Πίνακας 3.9).

Η επίδραση της αρχικώς εξωγενούς προστιθέμενης 1,3-προπανοδιόλης στην φυσιολογική απόκριση βακτηρίων δυνάμενων να αποικοδομούν την γλυκερόλη αναφέρεται σε έναν αριθμό μελετών στην διεθνή βιβλιογραφία. Ειδικότερα, οι Papanikolaou et al. (2000) μελέτησαν την επίδραση της αρχικώς προστιθέμενης 1,3-προπανοδιόλης κατά την ασυνεχή καλλιέργεια του βακτηρίου *C. butyricum* F2b σε υπόστρωμα ακάθαρτης γλυκερόλης ($S_0=40$ g/L) και αναφέρουν ότι η προσθήκη της εν λόγω διόλης σε συγκέντρωση 23 g/L επέφερε ολική παρεμπόδιση στην μικροβιακή αύξηση. Επιπλέον, οι Abbad-Andaloussi et al. (1995) διερεύνησαν την ανθεκτικότητα ενός φυσικού βακτηρίου *C. butyricum* (στελέχος DSM 5431) και δυο προερχόμενων από αυτό μεταλλαγμένων (mutants) βακτηρίων [η μεταλλαγή πρόεκυψε μετά από έκθεση του φυσικού στελέχους σε *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (NTG) και επίδραση οσμωτικού στρες ή περιβάλλοντος H_2-CO_2] στην εξωγενώς προστιθέμενη 1,3-προπανοδιόλη αρχικής συγκέντρωσης 20, 30 και 40 g/L. Το φυσικό στέλεχος *C. butyricum* DSM 5431 παρεμποδίστηκε κατά 33% κατά την καλλιέργεια του σε υπόστρωμα με αρχική προσθήκη 1,3-προπανοδιόλης 20 g/L, ενώ στα 40 g/L η παρεμπόδιση της μικροβιακής αύξησης ήταν ολοκληρωτική. Εν αντιθέσει, τα μεταλλαγμένα στελέχη του *C. butyricum* DSM 5431 επέδειξαν μεγαλύτερη ανεκτικότητα στην εξωγενώς προστιθέμενη 1,3-προπανοδιόλη, υποδηλώνοντας την ενδεχόμενη δυνατότητα των στελεχών αυτών να παράγουν μεγαλύτερες ποσότητες του τελικού προϊόντος της 1,3-προπανοδιόλης, όντας πιο ανθεκτικά στην παρουσία της, γεγονός που επιβεβαιώθηκε στην εν λόγω μελέτη κατά την καλλιέργεια των στελεχών αυτών σε ημι-συνεχή συστήματα (μέγιστη παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης από το μεταλλαγμένο στέλεχος 2/2 ίση με 70.2 g/L, ενώ για το αντίστοιχο φυσικό στέλεχος 44.5 g/L). Τέλος, οι Colin et al. (2000) αναφέρουν ότι κατά την αύξηση του βακτηρίου *C.*

butyricum CNCM 1211 σε υπόστρωμα καθαρής γλυκερόλης ($S_0=70$ g/L) με αρχική προσθήκη 50 g/L 1,3-προπανοδιόλης, παρατηρήθηκε μια επιμήκυνση της λανθάνουσας φάσης της αύξησης, ωστόσο ο μικροοργανισμός κατάφερε να καταναλώσει όλη την διαθέσιμη γλυκερόλη εντός 30 h. Αντίθετα, κατά την αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκερόλης ($S_0=85$ g/L) και την ίδια αρχική συγκέντρωση της 1,3-προπανοδιόλης (50 g/L) σημειώθηκε ολική παρεμπόδιση της μικροβιακής αύξησης.

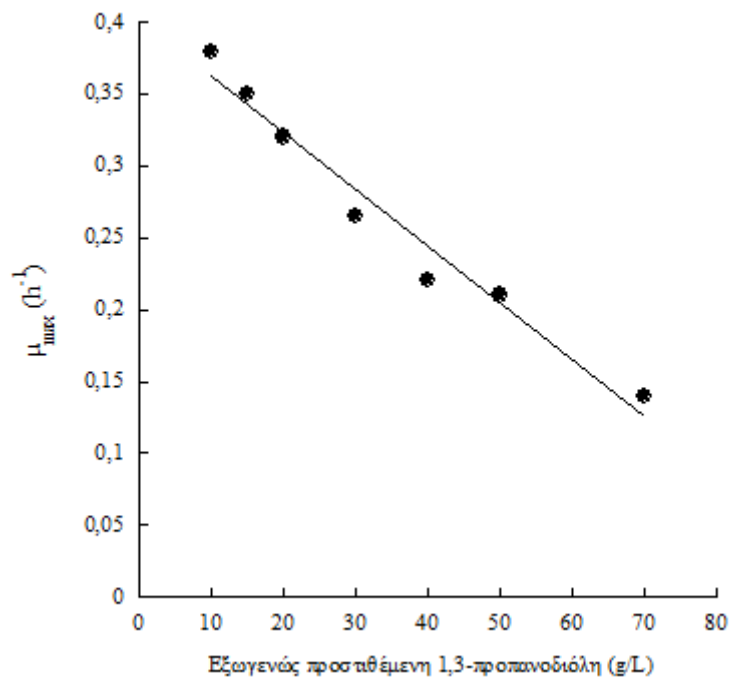
Εν συνεχεία, στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε η καλλιέργεια του μικροοργανισμού, υπό τις ίδιες συνθήκες ζύμωσης, αλλά αυτή τη φορά η προσθήκη της 1,3-προπανοδιόλης έγινε κατά την εκθετική φάση της μικροβιακής αύξησης. Όπως διαπιστώνεται από τον Πίνακα 3.10, ο μικροοργανισμός φαίνεται να ανθίσταται στην παρουσία ιδιαίτερας υψηλών συγκεντρώσεων της 1,3-προπανοδιόλης, ενώ σε καμία περίπτωση δεν παρατηρήθηκε παύση της μικροβιακής αύξησης.

Πίνακας 3.10 Κινητικά δεδομένα του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 κατά την καλλιέργεια του σε γλυκερόλη ($S_0=20$ g/L), με προσθήκη 1,3-προπανοδιόλης κατά την εκθετική φάση της αύξησης του μικροοργανισμού

Συγκέντρωση 1,3-προπανοδιόλης (g/L)	Χρόνος (h)	S_f (g/L)	X (g/L)	1,3-PDO (g/L)	But (g/L)	Ace (g/L)	$Y_{PDO/S}$ (g/g)
10.0	15	0.1	1.8	11.4	4.4	0.6	0.56
15.0	15	0.1	1.3	10.6	2.9	0.3	0.55
20.0	15	0.1	1.1	9.9	3.1	0.3	0.52
30.0	15	0.1	1.2	9.9	2.9	0.3	0.53
40.0	15	0.1	1.3	7.1	3.0	0.4	0.40
50.0	25	2.5	0.7	6.9	2.6	0.3	0.34
70.0	25	5.6	0.6	3.2	2.1	0.2	0.18

Αύξηση σε ακάθαρτη γλυκερόλη. Εμφάνιση του χρόνου ολοκλήρωσης της ζύμωσης (h), της εναπομείνουσας γλυκερόλης (S_f , g/L), της παραγόμενης βιομάζας (X, g/L), της παραγόμενης 1,3-προπανοδιόλης (1,3-PDO, g/L), του παραγόμενου βουτυρικού οξέος (But, g/L), του παραγόμενου οξικού οξέος (Ace, g/L) και του συντελεστή απόδοσης της παραγόμενης 1,3-προπανοδιόλης προς την καταναλωθείσα γλυκερόλη ($Y_{PDO/S}$, g/g). Συνθήκες καλλιέργειας: θερμοκρασία επώασης $\Theta=35^\circ\text{C}$, ρυθμός ανάδευσης 180 rpm, σε φιάλες Duran (800 mL).

Ειδικότερα, φαίνεται ότι μέχρι την προσθήκη έως και 40 g/L, η μικροβιακή αύξηση δεν παρεμποδίζεται, δεδομένου ότι το βακτήριο κατάφερε να καταναλώσει όλη την διαθέσιμη πηγή άνθρακα, παράγοντας ικανοποιητικές ποσότητες 1,3-προπανοδιόλης και ολοκληρώνοντας την διαδικασία βιομετατροπής της ακάθαρτης γλυκερόλης σε περίπου 15 h. Ωστόσο, η προσθήκη 50 g/L 1,3-προπανοδιόλης στο θρεπτικό μέσο προκάλεσε μια επιμήκυνση της φάσης υστέρησης του μικροοργανισμού και κατ' επέκταση της συνολικής διάρκειας της βιομετατροπής. Επιπλέον, παρατηρήθηκε μία σημαντική μείωση στην παραγόμενη βιομάζα αλλά και στην τελική συγκέντρωση της 1,3-προπανοδιόλης, με ταυτόχρονη μείωση του αντίστοιχου συντελεστή απόδοσης ($Y_{PDO/S}=0.34$ g/g). Χαρακτηριστική είναι άλλωστε και η πτωτική τάση του μέγιστου ειδικού ρυθμού αύξησης του μικροοργανισμού (μ_{max}) κατά την αύξηση της συγκέντρωσης της εξωγενούς προστιθέμενης 1,3-προπανοδιόλης στο μέσο της καλλιέργειας (Γράφημα 3.8).



Γράφημα 3.8 Επίδραση της συγκέντρωσης της προστιθέμενης 1,3-προπανοδιόλης στον μέγιστο ειδικό ρυθμό αύξησης (μ_{max} , h⁻¹) του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 κατά την καλλιέργεια του σε φιάλες Duran, σε υπόστρωμα γλυκερόλης ($S_0=20$ g/L).

Σημειώνεται ότι ο υπολογισμός του μέγιστου ειδικού ρυθμού αύξησης (μ_{\max}) πραγματοποιήθηκε με βάση το φυσικό λογάριθμο του πηλίκου της παραγόμενης προς την αρχική βιομάζα [$\ln(X/X_0)$], προς το χρόνο (h), κατά την εκθετική φάση της αύξησης του μικροοργανισμού. Τέλος, με την εξωγενή προσθήκη 70 g/L 1,3-προπανοδιόλης στο θρεπτικό μέσο κατά την εκθετική φάση της αύξησης, ο μικροοργανισμός έπαυσε να παράγει 1,3-προπανοδιόλη, καταναλώνοντας ένα μέρος της διαθέσιμης γλυκερόλης προκειμένου, προφανώς, να κορέσει τις ανάγκες του σε ενέργεια και να καταφέρει να συντηρηθεί (energy of maintenance needs), προς αντικατάσταση της αναβολικής του δραστηριότητας.

Σε αντίστοιχα πειράματα, οι Papanikolaou et al. (2000) αναφέρουν ότι η προσθήκη 23 g/L 1,3-προπανοδιόλης κατά τη εκθετική φάση της αύξησης του βακτηρίου *C. butyricum* F2b σε υπόστρωμα με βάση την βιομηχανική γλυκερόλη στον βιοαντιδραστήρα, προκάλεσε μείωση στον ειδικό ρυθμό αύξησης του μικροοργανισμού, αλλά και στον ειδικό ρυθμό κατανάλωσης της γλυκερόλης, με ταυτόχρονη μείωση στον ρυθμό παραγωγής όλων των μεταβολικών προϊόντων (1,3-προπανοδιόλη, οξικό οξύ και βουτυρικό οξύ). Ωστόσο, ο μικροοργανισμός εξάντλησε την διαθέσιμη γλυκερόλη ($S_0=40$ g/L), ενώ η παρουσία της εξωγενούς προστιθέμενης 1,3-προπανοδιόλης δεν επηρέασε τις τελικές συγκεντρώσεις των μεταβολικών προϊόντων. Σε άλλη μελέτη, οι Colin et al. (2000) σημειώνουν ότι η αύξηση της προστιθέμενης 1,3-προπανοδιόλης έως 60 g/L στο θρεπτικό μέσο κατά την εκθετική φάση αύξησης του βακτηρίου *C. butyricum* CNCM 1211 προκάλεσε γραμμική μείωση του μέγιστου ειδικού ρυθμού αύξησης κατά 80%. Παρόλα αυτά, ο εν λόγω μικροοργανισμός κατάφερε σε κάθε περίπτωση να εξαντλήσει την διαθέσιμη γλυκερόλη ($S_0=20$ g/L), παράγοντας σταθερά 11 g/L 1,3-προπανοδιόλης. Μόνο κατά την περίπτωση της προσθήκης 65 g/L 1,3-προπανοδιόλης παρατηρήθηκε ολική παύση της μικροβιακής δραστηριότητας.

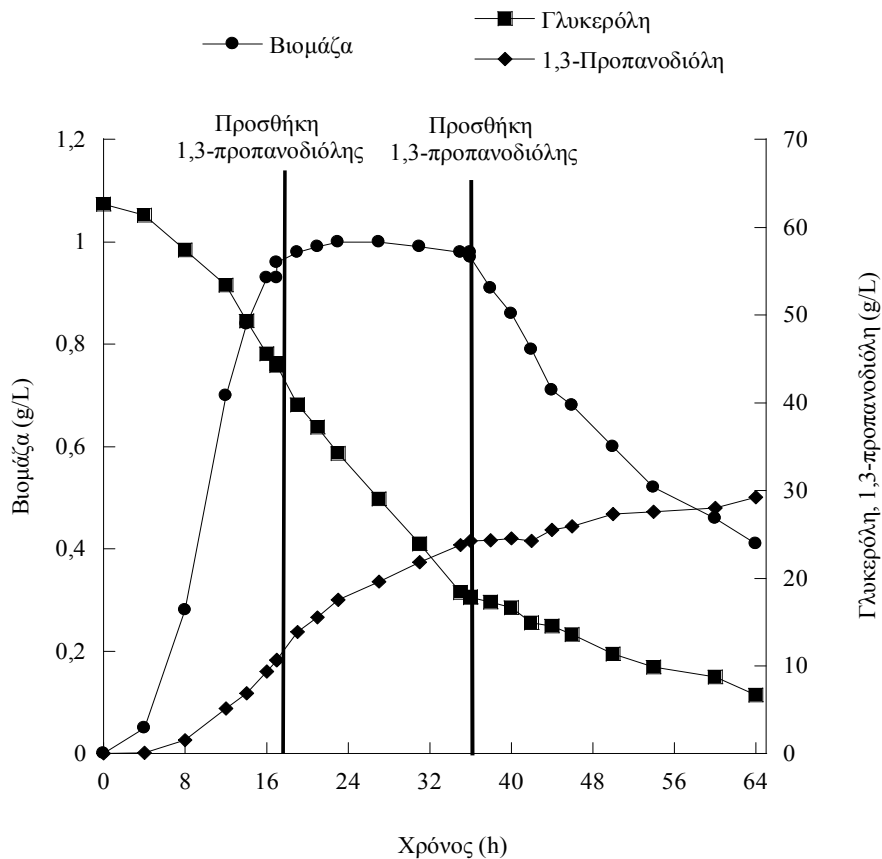
Με βάση τα ανωτέρω αποτελέσματα διαπιστώνεται ότι η επίδραση της 1,3-προπανοδιόλης όταν προστίθεται αρχικά στο μέσο της καλλιέργειας στην μικροβιακή αύξηση είναι

παρεμποδιστική, ακόμα και σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις, ήτοι 15 g/L. Αντίθετα, η προσθήκη της 1,3-προπανοδιόλης κατά την εκθετική φάση του αυξητικού κύκλου φαίνεται να είναι ανεκτή από τον μικροοργανισμό, ακόμα και σε υψηλές συγκεντρώσεις (έως και 70 g/L). Οι απόψεις στην διεθνή βιβλιογραφία σχετικά με την ερμηνεία του φαινομένου αυτού δίστανται. Οι Colin et al. (2000) αναφέρουν ότι η παρεμπόδιση που ασκεί η προστιθέμενη 1,3-προπανοδιόλη είναι πιο σημαντική για την μικροβιακή αύξηση, παρά για την τέλεση της μετατροπής της γλυκερόλης σε 1,3-προπανοδιόλη από τον μικροοργανισμό. Αντίθετα, οι Zeng et al. (1994) αναφέρουν ότι τόσο η προστιθέμενη όσο και η παραγόμενη 1,3-προπανοδιόλη ασκούν την ίδια επίδραση στην μικροβιακή αύξηση. Γενικά, μπορεί να λεχθεί ότι στην περίπτωση της αρχικής προσθήκης της διόλης στο θρεπτικό μέσο, η παρεμπόδιση της μικροβιακής αύξησης είναι πιο ισχυρή, εξαιτίας του γεγονότος ότι τα κύτταρα ευρισκόμενα στην λανθάνουσα φάση του αυξητικού κύκλου δεν δύνανται να αντέξουν στην παρουσία της 1,3-προπανοδιόλης. Αντίθετα, όταν ο μικροοργανισμός βρίσκεται στην εκθετική φάση του αυξητικού κύκλου, δύναται να ξεπεράσει την αρνητική επίδραση της προστιθέμενης 1,3-προπανοδιόλης, ειδικά αν ληφθεί υπ' όψιν ότι στο δεδομένο χρονικό σημείο, ένα ικανοποιητικό ποσό της 1,3-προπανοδιόλης έχει ήδη παραχθεί από τον μικροοργανισμό, προσφέροντας έτσι την δυνατότητα της προσαρμογής των κύτταρων στην παρουσία της διόλης στο περιβάλλον της καλλιέργειας.

3.3.1.2 Καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου

Με βάση τα ανωτέρω αποτελέσματα, κρίθηκε σκόπιμη η μελέτη της εξωγενώς προστιθέμενης 1,3-προπανοδιόλης κατά την εκθετική φάση του μικροοργανισμού κατά την καλλιέργεια του σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου. Με αυτόν τον τρόπο, καθίσταται δυνατή η διερεύνηση της επίδραση της διόλης κατά την καλλιέργεια του μικροοργανισμού υπό βέλτιστες συνθήκες αύξησης. Τα πειράματα έλαβαν χώρα εκ νέου με χρήση ακάθαρτης γλυκερόλης, η αρχική συγκέντρωση της οποίας αντιστοιχούσε σε 60 g/L, προκειμένου να παραταθεί ο συνολικός χρόνος

της ζύμωσης και να επιτευχθεί ικανοποιητική παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης, η οποία πιθανόν να επιδράσει προσθετικά στην φυσιολογική απόκριση του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718. Όπως φαίνεται στο Γράφημα 3.9, περί τις 17 h ζύμωσης, χρονικό σημείο κατά το οποίο στο μέσο της καλλιέργειας ευρίσκονταν 10.7 g/L παραχθείσας 1,3-προπανοδιόλης, προστέθηκαν εξωγενώς 22 g/L της εν λόγω διόλης.



Γράφημα 3.9 Κινητική της αύξησης, της κατανάλωσης γλυκερόλης και της παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης κατά την καλλιέργεια του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου, με εξωγενή προσθήκη 1,3-προπανοδιόλης

Το γεγονός αυτό είχε ως αποτέλεσμα την είσοδο του μικροοργανισμού στην στάσιμη φάση του αυξητικού κύκλου. Παρόλα αυτά, η δεδομένη συγκέντρωση της προστιθέμενης 1,3-προπανοδιόλης δεν επηρέασε σημαντικά την ταχύτητα κατανάλωσης της ακάθαρτης γλυκερόλης (r_s'''), η οποία από 1.81 g/L/h πριν την προσθήκη της διόλης, μεταβλήθηκε σε 1.5 g/L/h κατά την διάρκεια των

επόμενων 15 h μετά το χρονικό σημείο προσθήκης της 1,3-προπανοδιόλης. Ομοίως, παρατηρήθηκε μια μικρή μείωση στην ταχύτητα παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης (r_{PDO}) από 1.24 g/L/h σε 0.8 g/L/h.

Εν συνεχεία, μετά το πέρας 17 h και ενώ εντός του βιοαντιδραστήρα η συνολική ποσότητα της 1,3-προπανοδιόλης (προστιθέμενη και παραγόμενη) ευρισκόταν σε συγκέντρωση ίση με 46.2 g/L, πραγματοποιήθηκε δεύτερη προσθήκη 1,3-προπανοδιόλης ίση με 25.3 g/L. Ως εκ τούτου, την δεδομένη χρονική στιγμή η συνολική ποσότητα της 1,3-προπανοδιόλης στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας ξεπερνούσε τα 70 g/L (71.5 g/L). Όπως δεικνύεται και από το γράφημα 3.9, η εν λόγω ποσότητα της 1,3-προπανοδιόλης είχε εμφανή αρνητική επίδραση στην παραγωγή της βιομάζας, η οποία έκτοτε εμφάνισε πτωτική τάση μέχρι το πέρας της ζύμωσης. Ωστόσο, με έκπληξη διαπιστώθηκε πως ο μικροοργανισμός ανθίσταται στο στρες της υψηλής συγκέντρωσης της 1,3-προπανοδιόλης, δεδομένου ότι συνεχίζεται τόσο η κατανάλωση της γλυκερόλης, έστω και με μειωμένο ρυθμό, όσο και η παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης. Στο σημείο αυτό, υπογραμμίζεται ότι στα αντίστοιχα πειράματα στις φιάλες Duran (βλέπε Παράγραφος 3.31.1.), η σύνθεση της 1,3-προπανοδιόλης πρακτικά έπαυσε και ο μικροοργανισμός κατανάλωσε ένα ποσοστό της διαθέσιμης γλυκερόλης προκειμένου να κορέσει τις ανάγκες του σε ενέργεια και να καταφέρει να συντηρηθεί. Τελικά, μετά το πέρας 64 h ζυμώσεως, η συγκέντρωση της 1,3-προπανοδιόλης στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας ήταν 76.5 g/L, εκ των οποίων τα 30.1 g/L ήταν τα παραχθέντα εκ του μικροοργανισμού. Ο συντελεστής απόδοσης της 1,3-προπανοδιόλης ήταν ίσος με 0.54 g ανά g καταναλωθέντος υποστρώματος, γεγονός που δεικνύει την ανθεκτικότητα του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 στην 1,3-προπανοδιόλη αλλά και την δυνατότητα τέλεσης της βιοδιεργασίας αυτής ακόμα και σε συνθήκες στρες, οφειλόμενες στο κύριο παραχθέν μεταβολικό προϊόν, ήτοι την 1,3-προπανοδιόλη.

Στην διεθνή βιβλιογραφία αναφέρεται ότι η παρεμποδιστική επίδραση της 1,3-προπανοδιόλης επί των βακτηρίων που τελούν την προπανοδιολική ζύμωση, ασκείται κατά την

παρουσία του εν λόγω μεταβολικού προϊόντος σε συγκεντρώσεις εντός του εύρους των 60 με 65 g/L (Biebl, 1991; Biebl et al., 1992; Zeng et al., 1994; Deckwer et al., 1995). Ωστόσο, στην παρούσα μελέτη, το βακτήριο *C. butyricum* VPI 1718 φαίνεται να ανθίσταται σε συγκεντρώσεις της 1,3-προπανοδιόλης που ξεπερνούν τα 70 g/L.

3.3.1.3 Συνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα

Προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω η πιθανή παρεμποδιστική επίδραση της 1,3-προπανοδιόλης στην βιοχημική απόκριση του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718, πραγματοποιήθηκαν συνεχείς καλλιέργειες του μικροοργανισμού, με υψηλή συγκέντρωση γλυκερόλης ($S_0=80$ g/L) στο θρεπτικό μέσο εισόδου του χημειοστάτη και επαγόμενο ρυθμό αραίωσης (D) ίσο με 0.05 h⁻¹. Στον Πίνακα 3.11 που ακολουθεί, συνοψίζονται οι τιμές των κινητικών παραμέτρων που ελήφθησαν κατά την πρώτη επίτευξη στάσιμου σταδίου πριν οποιαδήποτε προσθήκη διόλης (A), κατά την επίτευξη καταστάσεως δυναμικής ισορροπίας μετά την απομάκρυνση της πρώτης προσθήκης 1,3-προπανοδιόλης από τον χημειοστάτη (B) και τέλος, κατά την επίτευξη στάσιμου σταδίου μετά την απομάκρυνση της δεύτερης προσθήκης 1,3-προπανοδιόλης από τον χημειοστάτη (Γ). Αναλυτικότερα, όταν το σύστημα εισήλθε σε κατάσταση δυναμικής ισορροπίας (Πίνακας 3.11), προστέθηκαν 31 g/L 1,3-προπανοδιόλης εντός του χημειοστάτη, με σκοπό να παρακολουθηθεί η επίδραση της εξωγενώς προστιθέμενης διόλης στην βιοχημική απόκριση του μικροοργανισμού κατά το μεταβατικό στάδιο της συνεχούς καλλιέργειας. Όπως δεικνύεται από το γράφημα 3.10 (A), η πρώτη προσθήκη 31 g/L 1,3-προπανοδιόλης στον χημειοστάτη κατά την κατάσταση δυναμικής ισορροπίας, είχε ως αποτέλεσμα την μείωση της παραγόμενης βιομάζας, με ταυτόχρονη αύξηση της υπολειπόμενης γλυκερόλης, κατά την διάρκεια των δέκα πρώτων ωρών του μεταβατικού σταδίου.

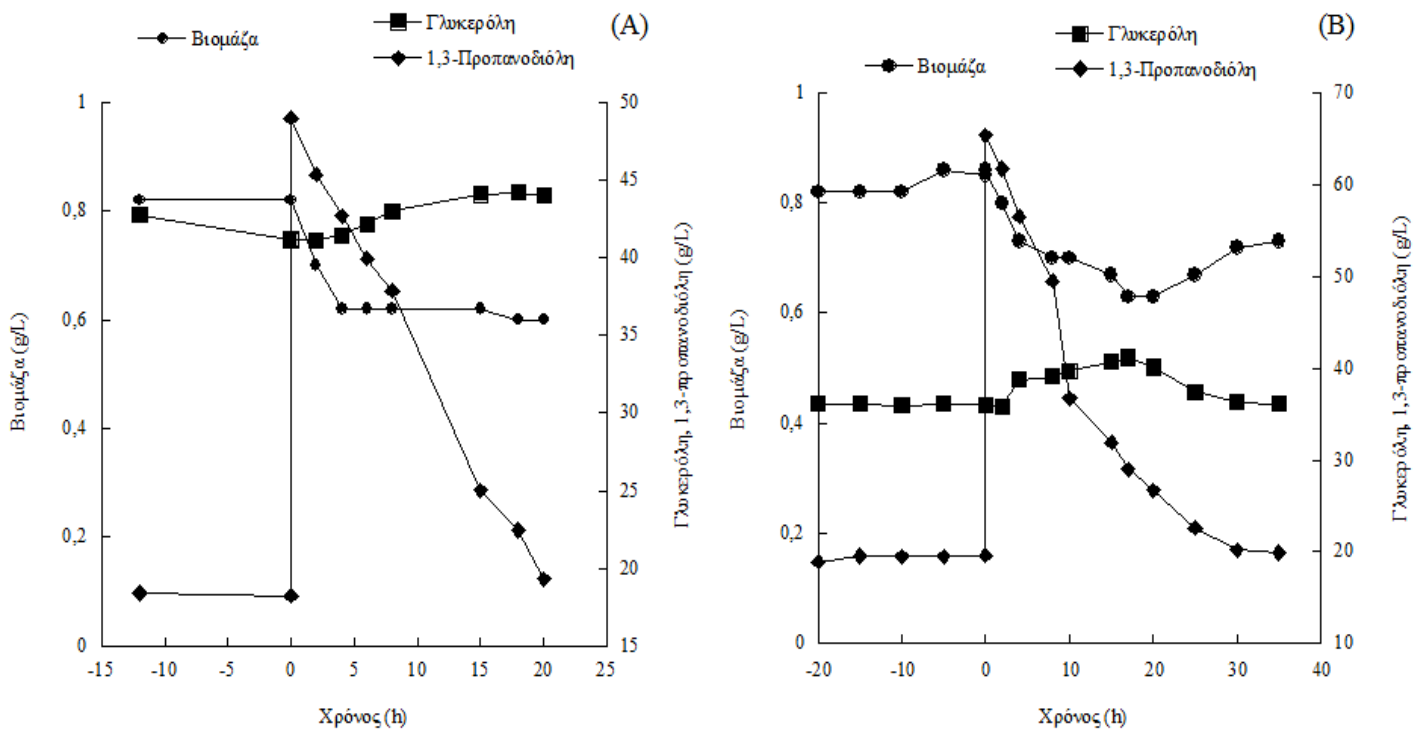
Πίνακας 3.11 Πειραματικά αποτελέσματα του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 σε κατάσταση δυναμικής ισορροπίας κατά την συνεχή καλλιέργεια του υπό συνεχή εμφύσηση αερίου αζώτου, με την γλυκερόλη ως μοναδική πηγή άνθρακα ($S_0=80$ g/L) κατά την εφαρμογή σταθερού ρυθμού αραίωσης ($D=005$ h⁻¹).

Επίτευξη στάσιμου σταδίου	S_f (g/L)	X (g/L)	1,3-PDO (g/L)	But (g/L)	Ace (g/L)	Lac (g/L)	$Y_{PDO/S}$ (g/g)	R_C (% w/w)
A (Πριν την προσθήκη προπανοδιόλης)	42.7	0.91	18.4	2.52	0.61	4.2	0.49	91.1
B (Μετά την απομάκρυνση της πρώτης προσθήκης προπανοδιόλης)	36.1	0.92	19.6	2.97	0.82	3.8	0.45	85.4
Γ (Μετά την απομάκρυνση της δεύτερης προσθήκης προπανοδιόλης)	37.1	0.80	19.3	2.81	0.80	3.2	0.45	84.9

Αύξηση σε ακάθαρτη γλυκερόλη. Εμφάνιση της υπολειπόμενης γλυκερόλης (S_f , g/L), της παραγόμενης βιομάζας (X, g/L), της παραγόμενης 1,3-προπανοδιόλης (1,3-PDO, g/L), του παραγόμενου βουτυρικού οξέος (But, g/L), του παραγόμενου οξικού οξέος (Ace, g/L), του παραγόμενου γαλακτικού οξέος (Lac, g/L), του συντελεστή απόδοσης της παραγόμενης 1,3-προπανοδιόλης προς την καταναλωθείσα γλυκερόλη ($Y_{PDO/S}$, g/g) και του ποσοστού ανάκτησης του άνθρακα (R_C , % w/w).

Ωστόσο, σε καμία περίπτωση δεν παρατηρήθηκε έκπλυση της καλλιέργειας. Μετά την απομάκρυνση της προστιθέμενης 1,3-προπανοδιόλης από τον χημειοστάτη, το σύστημα εισήλθε ξανά σε κατάσταση δυναμικής ισορροπίας, με τις συγκεντρώσεις της βιομάζας, της παραγόμενης 1,3-προπανοδιόλης και της υπολειπόμενης ακάθαρτης γλυκερόλης να λαμβάνουν τιμές παρόμοιες με τις αντίστοιχες που σημειώθηκαν πριν την εξωγενή προσθήκη της 1,3-προπανοδιόλης.

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε δεύτερη προσθήκη 1,3-προπανοδιόλης στον χημειοστάτη, συγκέντρωσης ίση με 46 g/L (Γράφημα 3.10 B). Η εν λόγω ποσότητα της διόλης φάνηκε να ασκεί την ίδια επίδραση στην συνεχή καλλιέργεια του μικροοργανισμού, καθώς η παραγόμενη βιομάζα εμφάνισε πτωτική τάση κατά τις 20 πρώτες ώρες του μεταβατικού σταδίου της καλλιέργειας από την προσθήκη της 1,3-προπανοδιόλης. Όσον αφορά στην υπολειπόμενη γλυκερόλη, εμφανίζεται να αυξάνει στις αντίστοιχες ώρες. Τελικά, μετά την έκπλυση της προστιθέμενης 1,3-προπανοδιόλης από την καλλιέργεια μετά το πέρας 30 ωρών, το σύστημα εισήλθε ξανά σε κατάσταση δυναμικής ισορροπίας.



Γράφημα 3.10 Επίδραση της προστιθέμενης 1,3-προπανοδιόλης στην αύξηση, την κατανάλωση ακάθαρτης γλυκερόλης και την παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης κατά την συνεχή καλλιέργεια του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718, μετά από επίτευξη δυο στάσιμων σταδίων. Προσθήκη 31 g/L (A) και 46 g/L (B) 1,3-προπανοδιόλης στο χρονικό σημείο $t=0$.

Υπό το ίδιο πρίσμα, οι Papanikolaou et al. (2000) μελέτησαν την επίδραση της εξωγενώς προστιθέμενης 1,3-προπανοδιόλης στην αύξηση του *C. butyricum* F2b κατά την συνεχή καλλιέργεια του σε υπόστρωμα ακάθαρτης γλυκερόλης. Χρησιμοποιώντας στο θρεπτικό μέσο εισόδου αρχική συγκέντρωση ακάθαρτης γλυκερόλης ίση με 60 g/L και ρυθμό αραίωσης (D) 0.03 h^{-1} , οι ερευνητές παρατήρησαν ότι κατά την προσθήκη 10 και 20 g/L 1,3-προπανοδιόλης, η συγκέντρωση της βιομάζας δεν σημείωσε αξιόλογη μεταβολή (παραμένοντας σταθερή στα 1.3 g/L). Με την αύξηση της συγκέντρωσης της ακάθαρτης γλυκερόλης ($S_0=80$ g/L) και του ρυθμού αραίωσης ($D=0.04$ h^{-1}), η προσθήκη 39 g/L 1,3-προπανοδιόλης στον χημειοστάτη κατά την κατάσταση δυναμικής ισορροπίας (χρονικό σημείο κατά το οποίο η συγκέντρωση της παραγόμενης

1,3-προπανοδιόλης ήταν 40 g/L), επέφερε μικρή αύξηση στην συγκέντρωση της βιομάζας, ενώ σε καμία περίπτωση δεν παρατηρήθηκε έκπλυση των κυττάρων της καλλιέργειας.

Με βάση την διεθνή βιβλιογραφία, διαπιστώνεται ότι το αίτιο της παρεμποδιστικής δράσης της 1,3-προπανοδιόλης στην αύξηση διαφόρων μικροοργανισμών έγκειται κυρίως στην ένταξη της στην κατηγορία των διολών, παρά σε ένα ιδιαίτερο μηχανισμό που προάγει η ίδια η 1,3-προπανοδιόλη. Ειδικότερα, οι Colin et al. (2000) μελέτησαν εκτός των άλλων και την επίδραση που ασκούν άλλες διόλες, όπως η 1,2-προπανοδιόλη και η 2,3-βουτανοδιόλη, στη αύξηση του βακτηρίου *C. butyricum* CNCM 1211, συμπεραίνοντας ότι ο μικροοργανισμός επηρεάζεται με παρόμοιο τρόπο, ανεξάρτητα από το είδος της διόλης που ευρίσκεται στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας κάθε φορά. Μάλιστα, στην περίπτωση της προσθήκης της 1,2-προπανοδιόλης, ο μικροοργανισμός κατανάλωσε την εν λόγω διόλη ως συν-υπόστρωμα, παράγοντας n-προπανοδιόλη και 1,3-προπανοδιόλη, ενώ αντίθετα δεν μπόρεσε να μεταβολίσει την 2,3-βουτανοδιόλη (Colin et al., 2000). Ενδιαφέρον, άλλωστε, συγκεντρώνει και ο μηχανισμός της παρεμποδιστικής δράσης των διολών επί των διαφόρων μικροοργανισμών. Οι Jain et al. (1978) και οι Linden και Moreira (1982) αναφέρουν ότι η παρεμποδιστική δράση της 1,3-προπανοδιόλης πιθανόν να οφείλεται στην τροποποίηση της δομής της κυτταρικής μεμβράνης των μικροοργανισμών, με άμεσο επακόλουθο την αύξηση της ρευστότητας της μεμβράνης. Επιπλέον, οι Shimizu και Katsura (1988) πιθανολογούν ότι η εν λόγω διόλη ασκεί παρεμποδιστική δράση επί των ενζύμων της κυτταρικής μεμβράνης που καταλύουν την αποικοδόμηση της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), καθώς επίσης και επί των μηχανισμών μεταφοράς της κυτταρικής μεμβράνης του βακτηρίου *C. acetobutylicum*. Με βάση τις ανωτέρω παρατηρήσεις, μπορεί να ειπωθεί ότι η παρεμπόδιση της 1,3-προπανοδιόλης στην ζύμωση της γλυκερόλης από το βακτήριο *C. butyricum* αφορά στο γενικότερο πρίσμα επίδρασης των αλκοολών στις μικροβιακές ζυμώσεις. Για την αποφυγή αυτών των φαινομένων, θεωρείται σημαντική η χρησιμοποίηση άλλων τεχνολογιών στην διαδικασία της ζύμωσης, όπως

συστήματα καλλιέργειας πολλαπλών βαθμίδων, αλλά και ανακύκλωσης ή ακινητοποίησης κυττάρων (Colin et al., 2000).

3.3.2 Επίδραση της εξωγενώς προστιθέμενης 1,3-προπανοδιόλης στην σύσταση των κυτταρικών λιπιδίων του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718

3.3.2.1 Μελέτη της σύστασης των κυτταρικών λιπιδίων του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τις ανωτέρω παρατηρήσεις σχετιζόμενες με την επίδραση της εξωγενώς προστιθέμενης 1,3-προπανοδιόλης στην βιοχημική απόκριση του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718, ακολούθησε η ενδελεχής μελέτη της επίδρασης της εν λόγω διόλης επί των λιπαρών οξέων των κυτταρικών λιπιδίων του βακτηρίου. Προς τούτο, κρίθηκε αναγκαία σε πρώτο στάδιο η διερεύνηση του ποιοτικού προφίλ των κυτταρικών λιπιδίων του μικροοργανισμού, έτσι ώστε να διαπιστωθεί σε δεύτερο στάδιο ενδεχόμενη αλλαγή στην σύσταση των κυριότερων λιπιδίων του βακτηρίου από την εξωγενή προσθήκη της 1,3-προπανοδιόλης στο μέσο της καλλιέργειας. Εξάλλου, είναι γνωστό από την βιβλιογραφία ότι η επιβίωση των βακτηρίων βασίζεται στην διατήρηση της ομοιόστασης της κυτταρικής μεμβράνης και συγκεκριμένα στην ικανότητα των βακτηρίων να τροποποιούν την σύσταση των λιπιδίων της κυτταρικής τους μεμβράνης με τέτοιο τρόπο ώστε να μπορούν να προσαρμοστούν σε διαφορετικές συνθήκες περιβάλλοντος (Zhang and Rock, 2008). Κατ' αυτόν τον τρόπο, ενδέχεται η προσθήκη της 1,3-προπανοδιόλης να ωθεί τον κυτταρικό μεταβολισμό στην τροποποίηση της σύστασης των λιπαρών οξέων της κυτταρικής μεμβράνης, προκειμένου να καταστούν τα κύτταρα ανθεκτικά στο επαγόμενο στρες από την παρουσία της διόλης.

Αρχικά, κρίθηκε απαραίτητη η μελέτη των λιπιδίων του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 κατά την καλλιέργεια του σε υπόστρωμα συντήρησης (Reinforced Clostridia Medium, RCM), με σκοπό να ευρεθεί η σύσταση των κυτταρικών λιπιδίων του μικροοργανισμού σε λιπαρά οξέα, απουσία κάποιου παράγοντα καταπόνησης της αύξησης του από το περιβάλλον της καλλιέργειας.

Στον πίνακα 3.12 που ακολουθεί συνοψίζονται τα ποσοστά των κυριότερων λιπαρών οξέων που ευρίσκονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη του μικροοργανισμού, καθώς επίσης και η σύγκριση αυτών με αποτελέσματα της διεθνούς βιβλιογραφίας αναφερόμενα σε λιπίδια διαφορετικών στελεχών του μικροοργανισμού *C. butyricum*, τα οποία δύναται να αποικοδομήσουν την γλυκερόλη ως μοναδική πηγή άνθρακα.

Πίνακας 3.12 Σύσταση των μεθυλεστέρων των κυριότερων λιπαρών οξέων των κυτταρικών λιπιδίων (Fatty Acid Methyl Esters, FAMES) διαφόρων στελεχών του βακτηρίου *C. butyricum* δυνάμενων να αποικοδομήσουν την γλυκερόλη (εκφραζόμενα σε % κ.β.)

Στέλεχος	C12:0	C14:0	C16:0	^{cis9} C16:1	C18:0	^{cis9} C18:1	^{cis11} C18:1	C18:2	Λοιπά	Αναφορά
<i>C. butyricum</i> DSM 10702	-	4.9	45.7	1.8	15.3	3.4	7.2	-	14.5	Biebl & Spröder (2002)
<i>C. butyricum</i> VPI 3266	-	4.2	41.6	2.0	10.5	5.4	11.2	-	21.6	Biebl & Spröder (2002)
<i>C. butyricum</i> DSM 2478	-	5.4	44.3	1.4	10.8	2.7	5.5	-	26.8	Biebl & Spröder (2002)
<i>C. butyricum</i> VPI 1718 [†]	4.6	5.5	42.2	3.0	15.6	14.8	2.6	2.9	6.8	Παρούσα μελέτη
<i>C. butyricum</i> VPI 1718 [‡]	10.1	1.7	26.6	5.2	17.6	19.4	3.5	3.2	8.6	Παρούσα μελέτη

Συνθήκες καλλιέργειας: επώαση στους 35°C, σε στατικές φιάλες αναερόβιωσης των 250 mL για χρονικό διάστημα 12h.

[†] Καλλιέργεια του βακτηρίου σε υπόστρωμα RCM (Reinforced Clostridia Medium) χωρίς προσθήκη γλυκερόλης

[‡] Καλλιέργεια του βακτηρίου σε υπόστρωμα RCM (Reinforced Clostridia Medium) με προσθήκη καθαρής γλυκερόλης

Παρατηρείται ότι η σύσταση των κυτταρικών λιπιδίων στελεχών του βακτηρίου *C. butyricum* αποτελείται κατά κύριο λόγο από κορεσμένα λιπαρά οξέα, όπως το παλμιτικό οξύ (C16:0), αλλά και το στεατικό οξύ (C18:0). Επιπλέον, αναφορικά με την ύπαρξη ακόρεστων λιπαρών οξέων, τα συνηθέστερα λιπαρά οξέα που απαντώνται είναι το παλμιτελαϊκό οξύ (C16:1), με την θέση του διπλού δεσμού στην ανθρακική αλυσίδα στον ένατο άνθρακα (*cis* 9) (με σημείο έναρξης τον άνθρακα στην ομάδα του καρβοξυλίου), καθώς επίσης το ελαϊκό οξύ (^{Δ9}C18:1) και το

βαξενικό οξύ ($^{11}\text{C}18:1$). Στην περίπτωση του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 παρατηρείται ότι κυρίαρχο λιπαρό οξύ των κυτταρικών του λιπιδίων αποτελεί το παλμιτικό οξύ ($\text{C}16:0$), ένα εύρημα που συμφωνεί με την διεθνή βιβλιογραφία (Πίνακας 3.12). Παραμένοντας στην κατηγορία των κορεσμένων λιπαρών οξέων, σε αξιόλογη ποσότητα βρέθηκε το στεατικό οξύ ($\text{C}18:0$), ενώ σε μικρότερα ποσοστά ανιχνεύτηκαν το μυριστικό ($\text{C}14:0$) και το λαυρικό οξύ ($\text{C}12:0$). Όσον αφορά στην σύσταση των κυτταρικών λιπιδίων του μικροοργανισμού σε ακόρεστα λιπαρά οξέα, σε μεγαλύτερο ποσοστό βρέθηκε το ελαϊκό οξύ ($^{\Delta 9}\text{C}18:1$) και σε μικρότερο ποσοστό το βαξενικό οξύ ($^{11}\text{C}18:1$) και το παλμιτελαϊκό οξύ με τον διπλό δεσμό στην θέση 9 ($^{\Delta 9}\text{C}16:1$). Στα λοιπά λιπαρά οξέα εντάσσονται οι κορυφές των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων που δεν κατέστησαν δυνατά προς ταυτοποίηση και τα οποία με βάση την διεθνή βιβλιογραφία, φαίνεται να αποτελούν μεταξύ άλλων, λιπαρά οξέα με δακτύλιο κυκλοπροπανίου στην δομή της ανθρακικής τους αλυσίδας ($\text{C}17:0$ cyc και $\text{C}19:0$ cyc). Τα εν λόγω λιπαρά οξέα απαντώνται συνήθως σε αρνητικά κατά Gram βακτήρια, άλλα και σε ορισμένα θετικά κατά Gram, ανήκοντα στα γένη των *Lactobacillus* sp. και *Clostridium* sp. βακτηρίων (Fulco, 1983; Biebl and Spröer, 2002). Προς έκπληξη, ωστόσο, διαπιστώθηκε η ύπαρξη του λινελαϊκού οξέος ($^{\Delta 9,12}\text{C}18:2$) στην σύσταση των κυτταρικών λιπιδίων του μικροοργανισμού *C. butyricum* VPI 1718, ενός λιπαρού οξέος που ανιχνεύεται για πρώτη φορά στον εν λόγω μικροοργανισμό. Επίσης, διαπιστώθηκε σημαντική διαφοροποίηση στην σύσταση των κυτταρικών λιπιδίων του βακτηρίου, κατά την καλλιέργεια του σε θρεπτικό μέσο, εμπλουτισμένο με καθαρή γλυκερόλη ως πηγή άνθρακα. Συγκεκριμένα, η ύπαρξη της γλυκερόλης στο θρεπτικό μέσο φαίνεται να ευνοεί την σύνθεση ακόρεστων λιπαρών οξέων από τον μικροοργανισμό (κυρίως του παλμιτελαϊκού και του ελαϊκού οξέος), ενώ όσον αφορά στα κορεσμένα λιπαρά οξέα, παρατηρείται αξιόλογη μείωση του παλμιτικού οξέος, με ταυτόχρονη αύξηση του λαυρικού οξέος.

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η ανίχνευση της ύπαρξης του λινελαϊκού οξέος στην σύσταση των κυτταρικών λιπιδίων του βακτηρίου *C. butyricum* αποτέλεσε ένα ενδιαφέρον εύρημα.

Για τον λόγο αυτό κρίθηκε σκόπιμη η ανάλυση των κυτταρικών λιπιδίων του βακτηρίου στον αέριο χρωματογράφο-φασματογράφο μάζας (G.C.-M.S.), προκειμένου να επικυρωθεί το προαναφερθέν εύρημα. Τα θραύσματα των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων ταυτοποιήθηκαν με βάση τον χρόνο κατακράτησης τους, την λήψη των φασμάτων μάζας τους και την σύγκριση αυτών με τα αντίστοιχα δεδομένα πρότυπων μορίων, καθώς επίσης και με βιβλιογραφικά δεδομένα. Τα αποτελέσματα της εν λόγω ανάλυσης συνοψίζονται στον ακόλουθο Πίνακα 3.13. Η πλειονότητα των λιπαρών οξέων κατέστη δυνατό να ταυτοποιηθεί βάσει προτύπων μορίων. Εξαιρέση αποτέλεσαν δύο άγνωστες κορυφές, εκ των οποίων η πρώτη (στον Πίνακα 3.12, κορυφή 5) εμφανίστηκε σε χρόνο κατακράτησης 19.40 min, με τιμή της βασικής κορυφής του μοριακού ιόντος m/z ίση με 55, γεγονός που δηλώνει ότι επρόκειτο για ακόρεστο λιπαρό οξύ με έναν διπλό δεσμό (Dobson and Christie, 2002; Hui-Qin et al., 2007; Vetter and Thurnhofer, 2007).

Πίνακας 3.13 Φάσματα μάζας μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων των κυτταρικών λιπιδίων του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718.

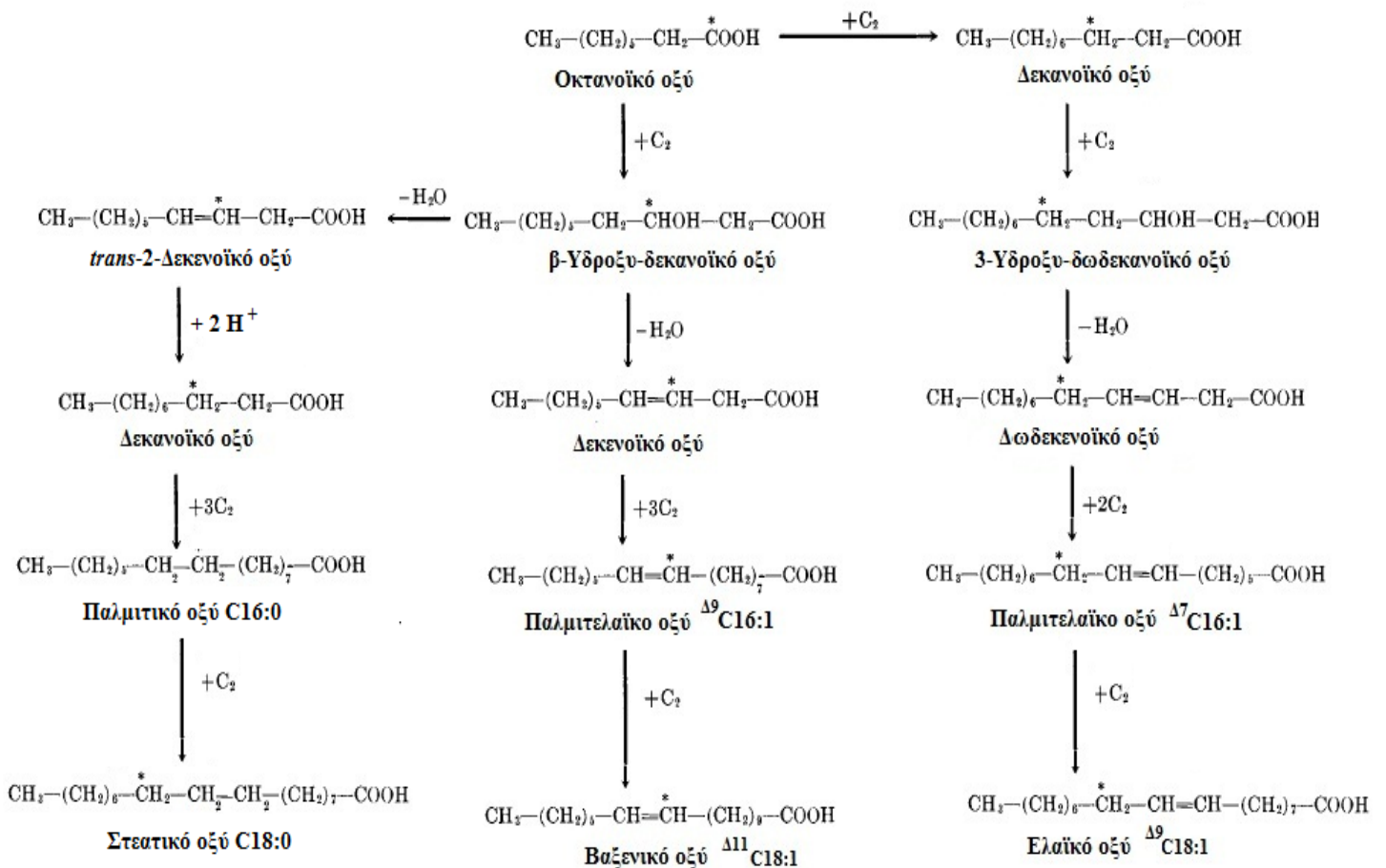
Κορυφή	Λιπαρό οξύ	Χρόνος κατακράτησης (min)	Μοριακό ιόν (m/z)	Βασική κορυφή (m/z)	Χαρακτηριστικά θραύσματα (m/z)	Ταυτοποίηση*
1	C12:0	11.09	214	74	87, 171, 183	α, β
2	C14:0	15.58	242	74	87, 199, 211	α, β
3	C16:0	19.86	270	74	87, 227, 239	α, β
4	Δ^9 C16:1	19.45	268	55	152, 194, 236	α, β
5	Άγνωστο	19.40	268	55	152, 196, 236	-
6	C18:0	23.38	298	74	87, 255, 267	α, β
7	Δ^9 C18:1	23.27	296	55	110, 123, 180, 222, 264	α, β
8	Δ^{11} C18:1	22.90	296	55	111, 124, 180, 222, 264	β
9	$\Delta^{9,12}$ C18:2	22.64	294	81	67, 95, 150, 220, 263	α, β

*Ταυτοποίηση: α, βάσει πρότυπου δείγματος μεθυλεστέρων, β, βάσει βιβλιογραφίας (Wiley, NIST)

Επιπλέον, το μοριακό ιόν του θραύσματος ήταν ίσο με την τιμή m/z 268 και χαρακτηριστικά θραύσματα στις τιμές m/z 152, 196, 236, τα οποία με βάση την βιβλιογραφία υποδεικνύουν ότι πιθανόν να είναι κάποιο ισομερές του παλμιτελαϊκού οξέος (όπως το *cis*-7-εξαδεκενοϊκό οξύ). Η δεύτερη άγνωστη κορυφή (νούμερο 8 στον πίνακα 3.13) εμφανίστηκε σε χρόνο κατακράτησης 23.27 min, με βασική κορυφή μοριακού ιόντος m/z ίση με 55, γεγονός που υποδηλώνει ότι η εν λόγω ουσία αποτελεί ένα μονοακόρεστο λιπαρό οξύ, με μοριακό ιόν m/z ίσο με 296 (ίδιο με το αντίστοιχο του ελαϊκού οξέος) και χαρακτηριστικά θραύσματα στις τιμές m/z 111, 124, 180, 222, 264. Με βάση βιβλιογραφικά δεδομένα, φαίνεται ότι το εν λόγω λιπαρό οξύ είναι το βαξενικό (*cis* Δ^{11} C18:1). Όσον αφορά στην επικύρωση της ύπαρξης του λινελαϊκού οξέος στη σύσταση των κυτταρικών λιπιδίων του βακτηρίου *C. butyricum*, κατέστη δυνατή μέσω της ταυτοποίησης του θραύσματος της κορυφής 9, τόσο βάσει προτύπου δείγματος, όσο και με βιβλιογραφικά δεδομένα. Συγκεκριμένα, ο χρόνος κατακράτησης του εν λόγω λιπαρού οξέος ήταν στα 22.64 min, με βασική κορυφή μοριακού ιόντος τιμής m/z ίση με 81 και χαρακτηριστικά θραύσματα στις τιμές m/z 67, 95, 150, 220 και 263.

Εν γένει, τα βακτήρια παρουσιάζουν μια μοναδική ιδιότητα αναφορικά με την σύνθεση των ακόρεστων λιπαρών οξέων. Οι εν λόγω μικροοργανισμοί δύναται να διαθέτουν από βιοχημικής άποψης, δύο διαφορετικούς μηχανισμούς για την βιοσύνθεση των ακόρεστων λιπαρών οξέων. Ο πρώτος εξ' αυτών είναι ανεξάρτητος από την παρουσία του οξυγόνου (αναερόβιος μηχανισμός) και τελείται αποκλειστικά από μια σειρά ενζυμικών αντιδράσεων, οι οποίες καταλύουν τα διάφορα στάδια του βιοσυνθετικού μονοπατιού. Ως εκ τούτου, η παραγωγή των μονοακόρεστων λιπαρών οξέων πραγματοποιείται μέσω της επιμήκυνσης της ανθρακικής αλυσίδας των ενδιάμεσων *cis*-3 ακόρεστων λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου (Fulco, 1983). Ο δεύτερος μηχανισμός (αερόβιος), ο οποίος συναντάται ως επί το πλείστον στους ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς αλλά και σε ορισμένους προκαρυωτικούς, βασίζεται στην παρουσία του οξυγόνου ως τον τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων για την δράση των ενζύμων υπεύθυνων για την εισαγωγή διπλών δεσμών στην

ανθρακική αλυσίδα (desaturases) (Fulco, 1983; Nichols et al., 1992; Rock, 2008). Η βιοσύνθεση των ακόρεστων λιπαρών οξέων μέσω του αναερόβιου μηχανισμού από το βακτήριο *C. butyricum* έχει μελετηθεί εκτενώς στην βιβλιογραφία από την επιστημονική ομάδα του Bloch και των συνεργατών του (Bloomfield and Bloch, 1960; Goldfine and Bloch, 1961; Scheuerbrandt and Bloch, 1962; Baumann et al., 1964; Bloch, 1969). Οι βιοχημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα κατά τον αναερόβιο μηχανισμό σύνθεσης ακόρεστων λιπαρών οξέων συνοψίζονται στο ακόλουθο Σχήμα 3.2. Το σύνολο της σύνθεσης των λιπαρών οξέων στα βακτήρια ευρίσκεται σε ένα πολυενζυμικό σύμπλεγμα, γνωστό ως Type II Fatty Acid Synthase (Type II FAS), ενωμένο σε ένα κεντρικό μόριο-φορέα πρωτεϊνών (ACP, acyl-carrier protein).



Σχήμα 3.2 Βιοχημικά μονοπάτια σύνθεσης των λιπαρών οξέων μέσω του αναερόβιου μηχανισμού από το αναερόβιο βακτήριο *C. butyricum* [Προσαρμογή σχήματος από Scheuerbrandt et al. (1961) και Fulco et al. (1983)].

Όλα τα ενδιάμεσα παράγωγα του μεταβολικού μονοπατιού είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένα στην προαναφερθείσα πρωτεΐνη-φορέα, καθώς υποβάλλονται σε διαδοχικούς κύκλους συμπύκνωσης, αναγωγής και αφυδάτωσης για κάθε μονάδα άνθρακα που προστίθεται στην ανθρακική αλυσίδα του μηλονιλ-συνενζύμου A (malonyl-CoA), πρόδρομη ένωση για την σύνθεση των λιπαρών οξέων. Στην περίπτωση του αναερόβιου μηχανισμού σύνθεσης των λιπιδίων, το τελικό προϊόν αποτελείται από ένα μείγμα ακόρεστων και κορεσμένων λιπαρών οξέων (Σχήμα 3.2). Στάδιο-κλειδί του βιοσυνθετικού μονοπατιού αποτελεί το επίπεδο σύνθεσης του υδροξυ-δεκανοϊκού οξέος, καθώς ανάλογα με την στερεοχημεία αφυδάτωσης αυτού, δύναται να παραχθούν «συνήθη απαντώμενα» κορεσμένα λιπαρά οξέα (προερχόμενα από την σύνθεση *trans*-2,3 ακόρεστων ενδιάμεσων) ή μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, προερχόμενα από την σύνθεση *cis*-3,4 ακόρεστων ενδιάμεσων) (Russell and Nichols, 1999).

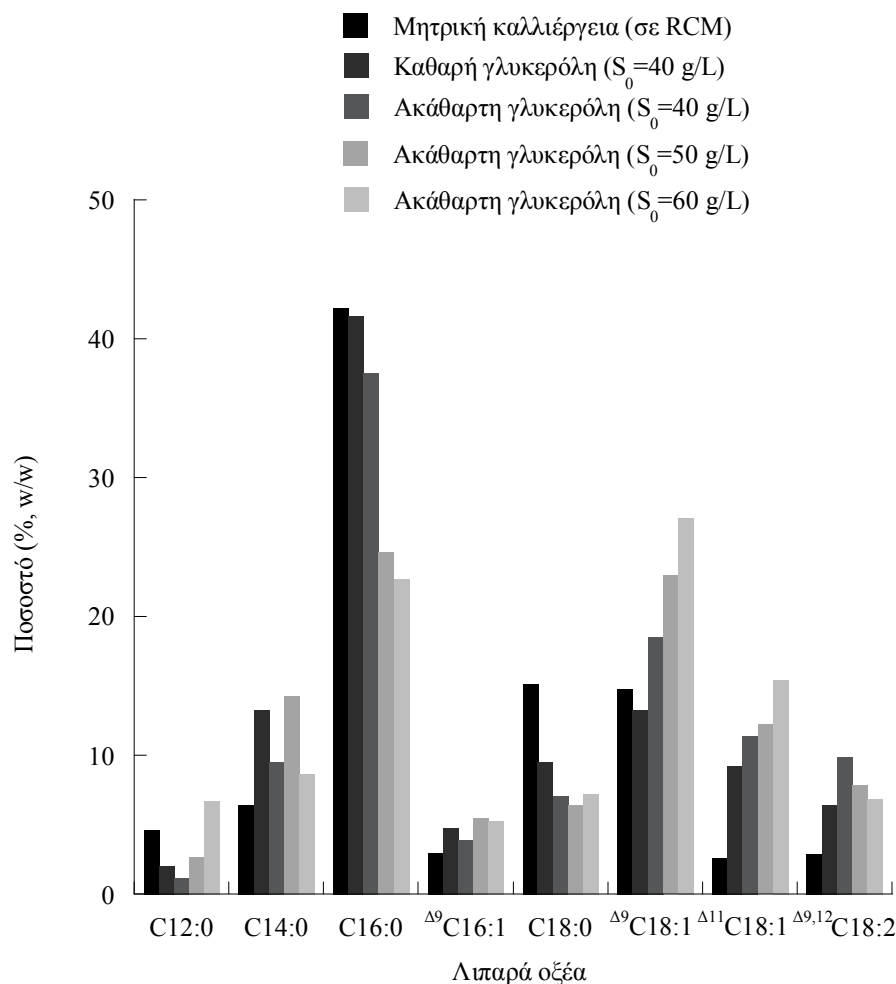
Ως εκ τούτου, φαίνεται ότι το βιοσυνθετικό μονοπάτι των λιπαρών οξέων από βακτήρια που χρησιμοποιούν τον αναερόβιο μηχανισμό, περιορίζεται στο επίπεδο της σύνθεσης μονοακόρεστων λιπαρών οξέων. Το γεγονός ότι στην σύσταση των κυτταρικών λιπιδίων του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 βρέθηκε σε μικρά μεν ποσοστά (έως 3.2% κ.β.) το λινελαϊκό οξύ, αποτελεί πιθανή ένδειξη της ύπαρξης ενός επιπλέον μηχανισμού ενζυμικής φύσεως, μέσω του οποίου προστίθεται ένας ακόμη διπλός δεσμός στο μόριο του ελαϊκού οξέος.

3.3.2.2 Επίδραση της εξωγενώς προστιθέμενης 1,3-προπανοδιόλης στην σύσταση των κυτταρικών λιπιδίων του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 κατά την καλλιέργεια του σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου και σε συνεχείς καλλιέργειες.

Εκτός από την επίδραση της εξωγενώς προστιθέμενης 1,3-προπανοδιόλης στην αύξηση του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 και την παραγωγή των μεταβολικών προϊόντων του, στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε και η επίδραση της διόλης στην σύσταση των κυτταρικών λιπιδίων του μικροοργανισμού. Στην βιβλιογραφία αναφέρεται ότι η καλλιέργεια του εν λόγω βακτηρίου

παρουσία διαλυτών ή αλκοολών μεσαίας αλύσου στο θρεπτικό μέσο (δωδεκάνιο, κυκλοεξάνιο, αιθανόλη, βουτανόλη, οκτανόλη), δύναται να προκαλέσει αλλαγές στην σύνθεση των πολικών λιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης του μικροοργανισμού (MacDonald and Goldfine, 1991).

Αρχικά μελετήθηκε η σύσταση των λιπιδίων του μικροοργανισμού κατά την καλλιέργεια του σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου, με αυξανόμενη αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης από 40 έως 60 g/L, κατά την στάσιμη φάση του αυξητικού κύκλου του βακτηρίου. Για λόγους σύγκρισης, χρησιμοποιήθηκε και καθαρή γλυκερόλη στα εν λόγω πειράματα, προκειμένου να διαπιστωθούν τυχόν διαφοροποιήσεις στην σύσταση των λιπιδίων του βακτηρίου, οφειλόμενες στην καθαρότητα της πηγής άνθρακα.

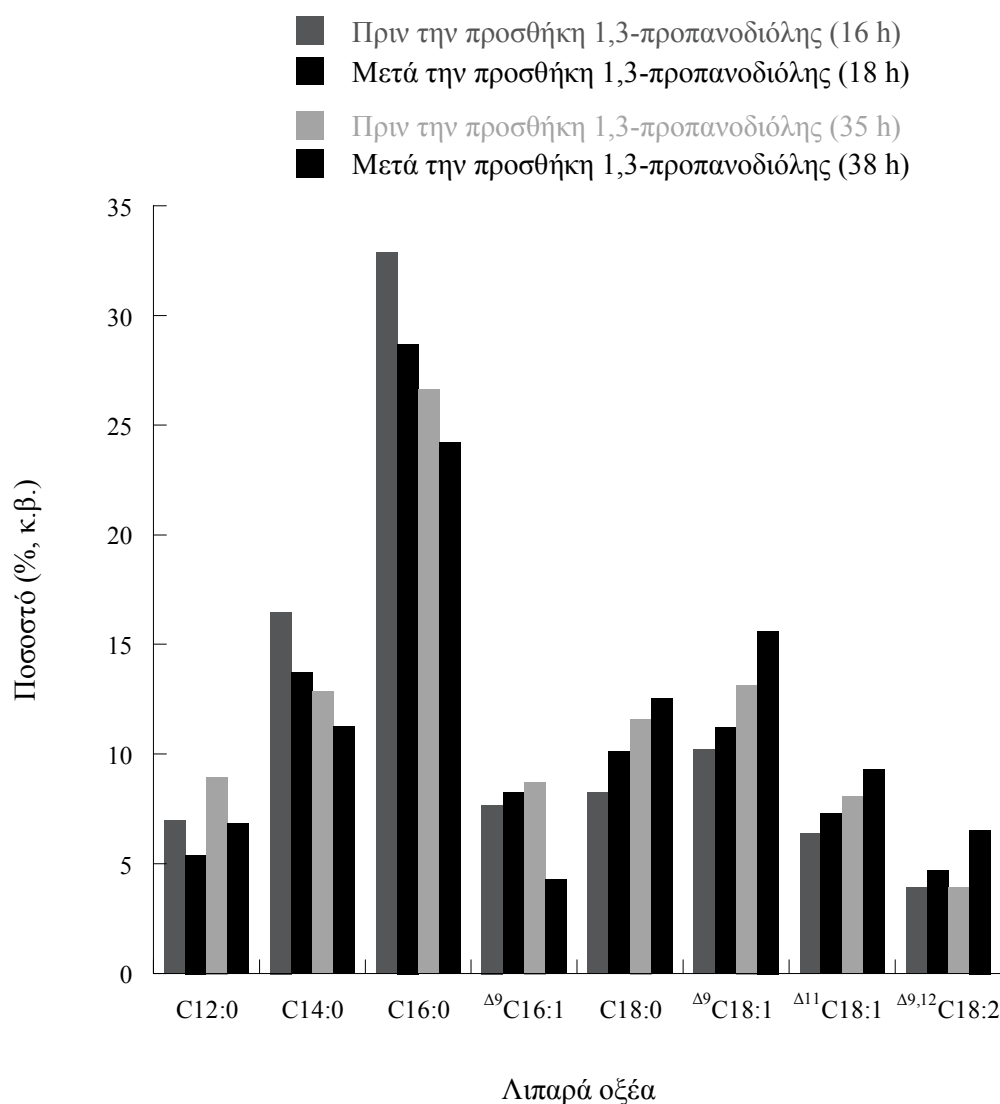


Γράφημα 3.11 Σύσταση των κυτταρικών λιπιδίων κατά την στάσιμη φάση του αυξητικού κύκλου της καλλιέργειας του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου, με αυξανόμενη αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης (καθαρή και ακάθαρτη).

Όπως διαπιστώνεται από το Γράφημα 3.11, η ύπαρξη της καθαρής γλυκερόλης επέφερε μείωση στα ποσοστά των περισσότερων κορεσμένων λιπιδίων (C12:0, C16:0 και C18:0) σε σχέση με την σύσταση των κυττάρων της μητρικής καλλιέργειας, ενώ παράλληλα αυξήθηκαν τα ποσοστά όλων των ακόρεστων λιπιδίων (Δ^9 C18:1, Δ^{11} C18:1 και $\Delta^{9,12}$ C18:2). Ομοίως, η αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης της ακάθαρτης γλυκερόλης επέφερε μείωση των ποσοστών των κορεσμένων λιπιδίων και αύξηση στο ποσοστό των ακόρεστων. Εξαίρεση αποτέλεσε το λινελαϊκό οξύ ($\Delta^{9,12}$ C18:2), το ποσοστό του οποίου βρέθηκε να μειώνεται παράλληλα με την αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης της ακάθαρτης γλυκερόλης, καθώς επίσης και το στεατικό οξύ, το οποίο εμφάνισε τάση σταθεροποίησης, ανεξάρτητα από την αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα.

Εν συνεχεία, μελετήθηκε το προφίλ των κυτταρικών λιπιδίων του βακτηρίου *C. butyricum*, τόσο κατά την καλλιέργεια του σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου, όσο και κατά την κατάσταση δυναμικής ισορροπίας στην περίπτωση της συνεχούς καλλιέργειας του, πριν και μετά την εξωγενή προσθήκη της 1,3-προπανοδιόλης. Αναφορικά με την καλλιέργεια του μικροοργανισμού σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου με αρχική συγκέντρωση ακάθαρτης γλυκερόλης ($S_0=60$ g/L), πραγματοποιήθηκαν δυο εξωγενείς προσθήκες 1,3-προπανοδιόλης, η πρώτη κατά την πρώιμη στάσιμη φάση και η δεύτερη κατά την στάσιμη φάση του αυξητικού κύκλου. Στο ακόλουθο Γράφημα 3.12 παρουσιάζεται η σύσταση των κυτταρικών λιπιδίων του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718, πριν (16 h καλλιέργειας) και μετά (18 h καλλιέργειας) την εξωγενή προσθήκη της 1,3-προπανοδιόλης. Διαπιστώνεται ότι η πρώτη προσθήκη της 1,3-προπανοδιόλης στο θρεπτικό μέσο, ήτοι 22 g/L, επέφερε μια εμφανή αύξηση στα ακόρεστα λιπαρά οξέα, με ταυτόχρονη μείωση του ποσοστού των κορεσμένων λιπαρών οξέων. Μάλιστα, η παραμονή της διόλης εντός του βιοαντιδραστήρα σε συνδυασμό με την παραγόμενη 1,3-προπανοδιόλη από τον μικροοργανισμό φαίνεται να εντείνει την μείωση του ποσοστού των κορεσμένων λιπαρών οξέων στην σύσταση των κυτταρικών λιπιδίων. Η δεύτερη προσθήκη 1,3-προπανοδιόλης, ήτοι 25 g/L, στο χρονικό σημείο των 34 h της καλλιέργειας, επέδρασε με τον ίδιο

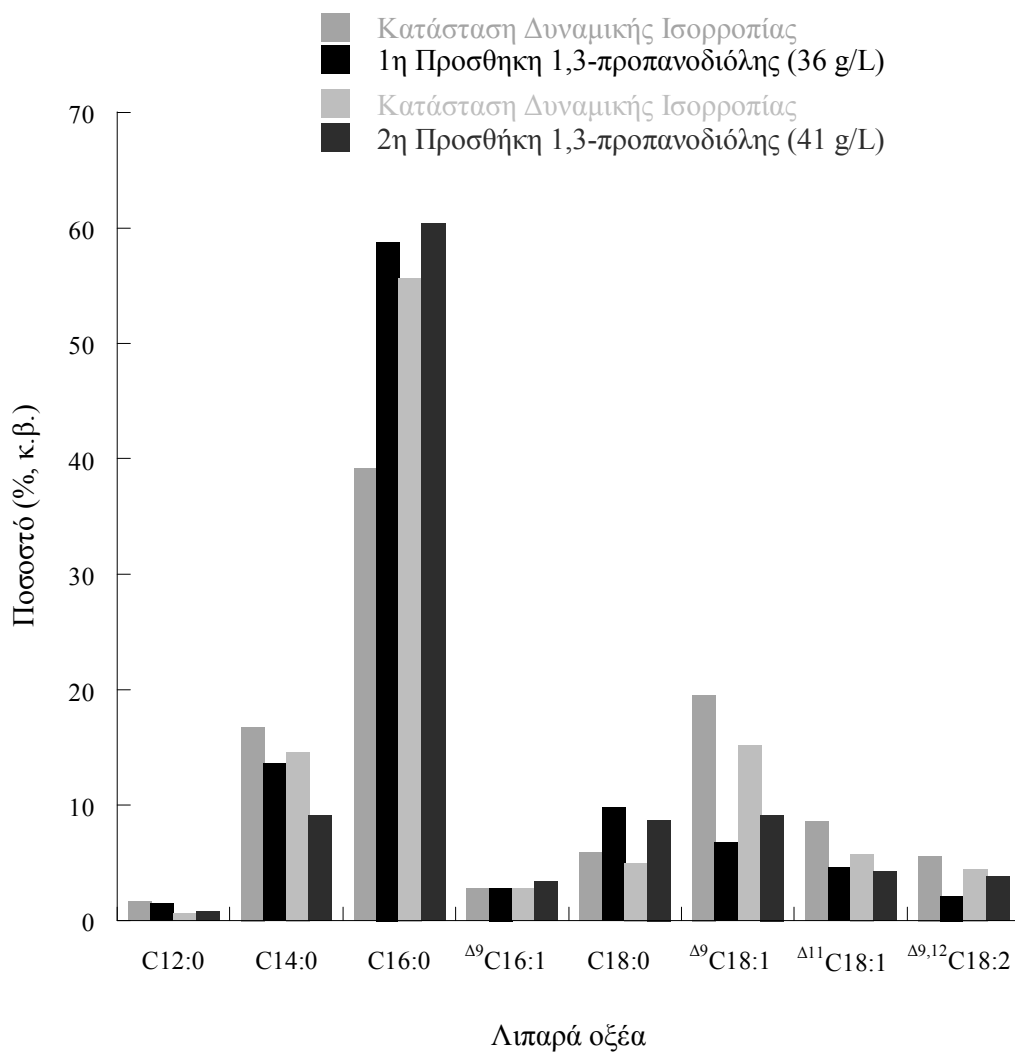
τρόπο στην σύσταση του προφίλ των λιπαρών οξέων του βακτηρίου (Γράφημα 3.12), μειώνοντας περαιτέρω το ποσοστό των κορεσμένων λιπιδίων και αυξάνοντας το ποσοστό των ακόρεστων λιπαρών οξέων. Χαρακτηριστική είναι, άλλωστε, και η μεταβολή του λόγου των κορεσμένων λιπιδίων προς τα ακόρεστα λιπίδια (SFA/UFA), αφού πριν την πρώτη προσθήκη της διόλης ο λόγος SFA/UFA ήταν ίσος με 2.29, ενώ μετά την προσθήκη της 1,3-προπανοδιόλης μειώθηκε στο 1.84. Κατά την εξέλιξη της ζύμωσης (35 h), ο λόγος SFA/UFA βαίνει μειούμενος και ίσος με 1.77, καταλήγοντας μετά την δεύτερη προσθήκη της 1,3-προπανοδιόλης στα 1.53.



Γράφημα 3.12 Σύσταση των κυτταρικών λιπιδίων κατά την καλλιέργεια του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου, με υπόστρωμα ακάθαρτης γλυκερόλης ($S_0=60$ g/L), πριν και μετά την εξωγενή προσθήκη 1,3-προπανοδιόλης κατά την εξέλιξη της διεργασίας

Μοναδικές εξαιρέσεις αποτέλεσαν το λαυρικό οξύ (C12:0), το ποσοστό του οποίου παρουσιάζει διακυμάνσεις παρουσία της διόλης, καθώς επίσης και το παλμιτελαϊκό οξύ ($^{13}\text{C}16:1$), που εμφάνισε αισθητή μείωση στο ποσοστό του μετά την δεύτερη προσθήκη της 1,3-προπανοδιόλης.

Εν αντιθέσει, κατά την συνεχή καλλιέργεια του βακτηρίου, με ρυθμό αραίωσης (D) ίσο με 0.05 h^{-1} και συγκέντρωση ακάθαρτης γλυκερόλης στο μέσο εισόδου (S_0) ίση με 80 g/L , παρατηρήθηκαν αξιόλογες διαφοροποιήσεις στο προφίλ των κυτταρικών λιπιδίων, τόσο κατά την κατάσταση δυναμικής ισορροπίας, όσο και μετά την τέλεση εξωγενών προσθηκών της 1,3-προπανοδιόλης (Γράφημα 3.13). Συγκεκριμένα, για τον επαγόμενο ρυθμό αραίωσης και την δεδομένη αρχική συγκέντρωση της ακάθαρτης γλυκερόλης, το συνολικό προφίλ των κυτταρικών λιπιδίων εμφανίζεται ιδιαίτερος πιο κορεσμένο από τα αντίστοιχα αποτελέσματα στον βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου. Είναι χαρακτηριστικό ότι το ποσοστό του παλμιτικού οξέος, το οποίο αποτελεί εμφανώς το επικρατέστερο λιπαρό οξύ στην σύσταση των κυτταρικών λιπιδίων του μικροοργανισμού, βρέθηκε στην κατάσταση δυναμικής ισορροπίας ίσο με 40% (κ.β.), ενώ μετά την εξωγενή προσθήκη της 1,3-προπανοδιόλης, το αντίστοιχο ποσοστό του εν λόγω λιπαρού οξέος έφτασε το 60% (κ.β.). Επιπροσθέτως, η προσθήκη της 1,3-προπανοδιόλης φαίνεται να επιδρά αρνητικά στο ποσοστό όλων των ακόρεστων λιπαρών οξέων των κυτταρικών λιπιδίων του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718. Ωστόσο, είναι χαρακτηριστικό το γεγονός ότι μετά την έκπλυση της προστιθέμενης 1,3-προπανοδιόλης από τον χημειοστάτη, τα ποσοστά των λιπιδίων τείνουν να επανέλθουν σε επίπεδα όμοια με εκείνα κατά την επίτευξη της πρώτης κατάστασης δυναμικής ισορροπίας (Γράφημα 3.13). Επιπλέον, η δεύτερη προσθήκη 1,3-προπανοδιόλης, ήτοι 41 g/L , εντός του χημειοστάτη προκάλεσε την ίδια επίδραση στην σύσταση των κυτταρικών λιπιδίων, αυξάνοντας το ποσοστό των κορεσμένων λιπαρών οξέων στο σύνολο τους.



Γράφημα 3.13 Σύσταση των κυτταρικών λιπιδίων κατά την καλλιέργεια του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 σε συνεχή καλλιέργεια ($D=0.05 \text{ h}^{-1}$, $S_0=80 \text{ g/L}$), κατά την κατάσταση δυναμικής ισορροπίας και μετά τις εξωγενείς προσθήκες ποσοτήτων 1,3-προπανοδιόλης.

Τεκμαίρεται, συνεπώς, ότι κατά την καλλιέργεια του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου, η αυξανόμενη συγκέντρωση της ακάθαρτης γλυκερόλης έχει την ίδια επίδραση στο προφίλ των κυτταρικών λιπιδίων του μικροοργανισμού με αυτή που ασκεί η εξωγενώς προστιθέμενη 1,3-προπανοδιόλη, ήτοι την αύξηση της ακορεστότητας των λιπιδίων. Αντιθέτως, κατά την συνεχή καλλιέργεια του βακτηρίου *C. butyricum* παρατηρείται η τάση αναστροφής της επίδρασης της προστιθέμενης 1,3-προπανοδιόλης μεταξύ των παρεμβαλλόμενων

στάσιμων σταδίων. Το γεγονός αυτό δύναται να εξηγηθεί λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι στην περίπτωση των καλλιέργειών σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου, ο παράγοντας που προκαλεί στρες στην κυτταρική μεμβράνη, δηλαδή η προστιθέμενη 1,3-προπανοδιόλη, παραμένει στο περιβάλλον της καλλιέργειας καθ' όλη την διάρκεια της τέλεσης της διεργασίας. Ως εκ τούτου, τα κύτταρα εκτίθενται για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε αυξημένες συγκεντρώσεις της εν λόγω διόλης, γεγονός που φαίνεται ότι επιδρά συσσωρευτικά στην σύσταση των κυτταρικών λιπιδίων του μικροοργανισμού. Εν αντιθέσει, κατά την συνεχή καλλιέργεια του μικροοργανισμού, η αύξηση του ποσοστού των κορεσμένων λιπαρών οξέων που προκαλεί η προσθήκη της 1,3-προπανοδιόλης αίρεται κατά το μεταβατικό στάδιο της καλλιέργειας και μέχρι την επίτευξη στάσιμου σταδίου, ως αποτέλεσμα της βαθμιαίας απομάκρυνσης της διόλης από τον χημειοστάτη.

Η διερεύνηση της επίδρασης της 1,3-προπανοδιόλης στην σύσταση των κυτταρικών λιπιδίων του βακτηρίου *C. butyricum* όπως πραγματοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, αποτελεί και την πρώτη σχετική αναφορά στην διεθνή βιβλιογραφία. Στο γενικότερο πρίσμα της επίδρασης διαφόρων αλκοολών επί της σύστασης των λιπαρών οξέων ορισμένων βακτηριών αναφέρεται ένας μικρός αριθμός μελετών. Ειδικότερα, οι Lepage et al. (1987), μελετώντας την επίδραση διαφόρων αλκοολών (αιθανόλη, βουτανόλη, εξανόλη, οκτανόλη) και ακετόνης στο προφίλ των λιπιδίων του βακτηρίου *C. acetobutylicum*, διαπίστωσαν ότι η αύξηση της συγκέντρωσης της εκάστοτε οργανικής ένωσης επέφερε ταυτόχρονη αύξηση στον λόγο των κορεσμένων λιπιδίων προς τα ακόρεστα (SFA/UFA). Όμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν κατά την αύξηση του βακτηρίου *Escherichia coli* K-12, παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης διαφόρων αλκοολών. Μάλιστα, διαπιστώθηκε ότι η προσθήκη αλκοολών μικρής αλύσου (από ένα έως τέσσερα άτομα άνθρακα) επέφερε αύξηση στο ποσοστό του βαξενικού οξέος (Δ^{11} C18:1), μειώνοντας παράλληλα το ποσοστό του παλμιτελαϊκού οξέος (Ingram, 1976). Εξάλλου, οι Vollherbst-Schneck et al. (1984) και Baer et al. (1987), μελετώντας την επίδραση της βουτανόλης στην σύσταση των λιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης φυσικών και μεταλλαγμένων στελεχών του βακτηρίου *C. acetobutylicum*, κατέληξαν

στο συμπέρασμα ότι η παρουσία της εν λόγω υδροφοβικής αλκοόλης προκαλεί την αύξηση του λόγου των κορεσμένων προς τα ακόρεστα λιπίδια.

Συνεπώς, μπορεί να λεχθεί ότι η επίδραση που ασκούν οι ουσίες αλκοολικής φύσεως, όπως μπορεί να θεωρηθεί η 1,3-προπανοδιόλη, στους ανωτέρω μικροοργανισμούς έγκειται στην αντίδραση προσαρμογής των λιπιδίων της κυτταρικής τους μεμβράνης στο περιβάλλον της καλλιέργειας και δει, στην παρουσία αυξημένων συγκεντρώσεων των αλκοολών (Ingram, 1976). Η φύση των εν λόγω ουσιών προκαλεί αλλαγές στην λειτουργία της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και κατ' επέκταση στις φυσικοχημικές ιδιότητές της (Baer et al., 1987). Ως γνωστόν, τα βακτήρια έχουν την ιδιότητα να προσαρμόζουν την δομή των λιπιδίων της κυτταρικής τους μεμβράνης, προκειμένου να επιβιώσουν σε δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες. Η ιδιότητα αυτή είναι γνωστή με τον όρο “homeoviscous adaptation” (Sinensky, 1974; Kimelberg, 1977), και θεωρείται ως ένας μηχανισμός αντιστάθμισης των φυσικοχημικών αλλαγών της κυτταρικής μεμβράνης, με σκοπό την διατήρηση της βέλτιστης κυτταρικής λειτουργίας, μέσω της ρύθμισης της ρευστότητάς της και της ιοντικής της ισορροπίας (Kimelberg, 1977; Baer et al., 1987).

Τα αποτελέσματα του παρόντος κεφαλαίου έχουν δημοσιευθεί:

Chatzifragkou A, Aggelis G, Gardeli C, Galiotou-Panayotou M, Komaitis M, Papanikolaou S (2012)

“Adaptation dynamics of *Clostridium butyricum* in high 1,3-propanediol content media”. Applied

Microbiology and Biotechnology, *accepted manuscript*.

3.4 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ 1,3-ΠΡΟΠΑΝΟΔΙΟΛΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ *C. BUTYRICUM* VPI 1718 ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΣΥΝΕΧΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΟΥ ΣΕ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΑΚΑΘΑΡΤΗΣ ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ

Επόμενο σκέλος του πειραματικού σχεδιασμού αποτέλεσε η διερεύνηση της βιοχημικής συμπεριφοράς του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718, κατά την αύξηση του σε συνεχή συστήματα καλλιέργειας. Ως γνωστόν από την διεθνή βιβλιογραφία, οι συνεχείς καλλιέργειες αποτελούν δημοφιλή συστήματα για την τέλεση μικροβιακών ζυμώσεων σε ημι-βιομηχανική και βιομηχανική κλίμακα. Παράγοντες όπως η απόδοση σε τελικό προϊόν, η τελική συγκέντρωση αυτού αλλά και η παραγωγικότητα, κρίνουν σε μεγάλο βαθμό την δυνατότητα εφαρμογής της εκάστοτε βιοδιεργασίας σε βιομηχανική κλίμακα (González-Pajuelo et al., 2005; Xiu and Zeng, 2008). Μάλιστα, η επίτευξη υψηλών τελικών συγκεντρώσεων των επιθυμητών μεταβολιτών δύναται να σηματοδοτήσει την μείωση του κόστους της κατιούσας επεξεργασίας (downstream process), μια σημαντική παράμετρος που λαμβάνεται υπ' όψιν κατά τον σχεδιασμό της παραγωγής προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας σε βιομηχανική κλίμακα μέσω της βιοτεχνολογικής οδού (Zeng and Biebl, 2002; Willke and Vorlop, 2008).

Επομένως, κρίθηκε σκόπιμη η ενδελεχής μελέτη της δυνατότητας του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718, να τελέσει επιτυχώς την ζύμωση της 1,3-προπανοδιόλης, κατά την καλλιέργεια του σε μονοβάθμιο συνεχές σύστημα καλλιέργειας. Σε αυτό το σημείο, ο πειραματικός σχεδιασμός προέβλεπε αφενός μεν την εφαρμογή διαφορετικών ρυθμών αραίωσης (D) με σταθερή συγκέντρωση της ακάθαρτης γλυκερόλης στο θρεπτικό μέσο εισόδου της συνεχούς καλλιέργειας, αφετέρου δε την εφαρμογή αυξανόμενων συγκεντρώσεων της ακάθαρτης γλυκερόλης στον χημειοστάτη με την ταυτόχρονη διατήρηση σταθερού ρυθμού αραίωσης. Επιπροσθέτως, κατά την επίτευξη κατάστασης δυναμικής ισορροπίας εντός του χημειοστάτη, μελετήθηκε η επίδραση των συνθηκών καλλιέργειας (ρυθμός αραίωσης, αρχική συγκέντρωση ακάθαρτης γλυκερόλης και

στρατηγική της εφαρμογής αναερόβιου περιβάλλοντος στον βιοαντιδραστήρα) στην σύσταση των κυτταρικών λιπιδίων του μικροοργανισμού.

3.4.1 Παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης κατά την συνεχή καλλιέργεια του βακτηρίου *C. butyricum*

VPI 1718, υπό συνθήκες διαρκούς εμφύσησης αζώτου

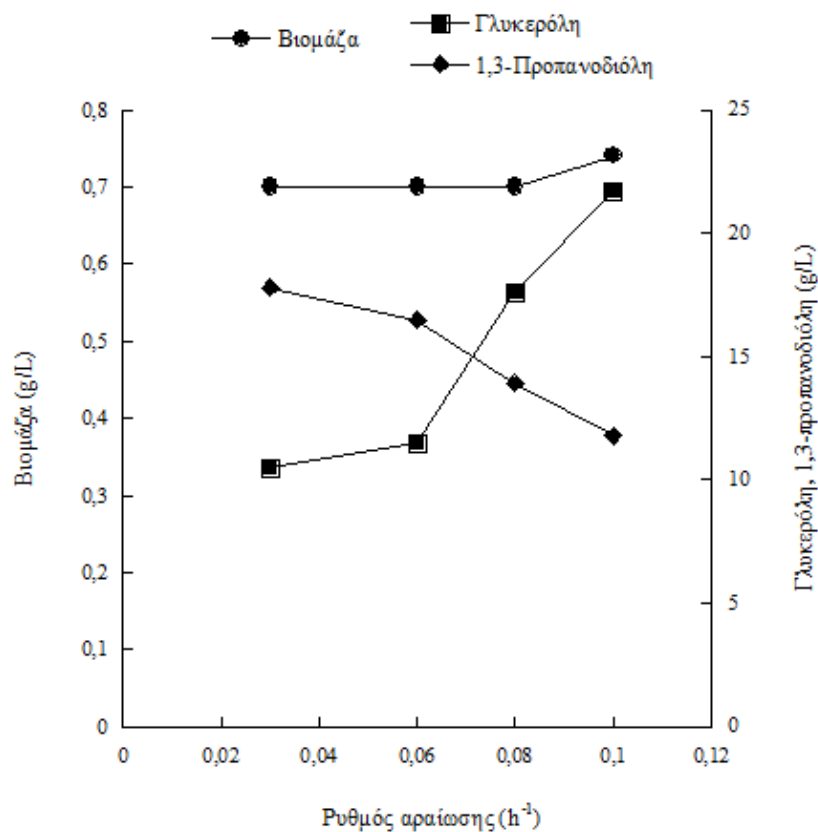
Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν συνεχείς καλλιέργειες του βακτηρίου *C. butyricum* υπό συνεχή εμφύσηση αερίου αζώτου στο περιβάλλον της καλλιέργειας, εφαρμόζοντας διαφορετικούς ρυθμούς αραίωσης (D) και διατηρώντας σταθερή την συγκέντρωση της ακάθαρτης γλυκερόλης στο θρεπτικό μέσο εισόδου ($S_0=45$ g/L). Στον Πίνακα 3.14 που ακολουθεί, συνοψίζονται οι τιμές των παραμέτρων που ελήφθησαν κατά τα στάσιμα στάδια της συνεχούς καλλιέργειας. Αρχικά διαπιστώνεται ότι η βιομάζα παρέμεινε σε σταθερά επίπεδα, ανεξάρτητα από τον εκάστοτε εφαρμοζόμενο ρυθμό αραίωσης (0.70-0.74 g/L).

Πίνακας 3.14 Πειραματικά αποτελέσματα του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 σε κατάσταση δυναμικής ισορροπίας κατά την συνεχή καλλιέργεια του υπό συνεχή εμφύσηση αερίου αζώτου, με την γλυκερόλη ως μοναδική πηγή άνθρακα ($S_0=45$ g/L) κατά την εφαρμογή διαφορετικών ρυθμών αραίωσης.

D (h⁻¹)	S_r (g/L)	X (g/L)	1,3-PDO (g/L)	But (g/L)	Ace (g/L)	Lac (g/L)	Y_{PDO/S} (g/g)	P_{PDO} (g/L/h)	R_C (% w/w)
0.03	10.5	0.70	17.8	3.6	0.9	4.7	0.52	0.53	93.4
0.06	11.5	0.70	16.5	3.1	0.9	1.6	0.50	0.99	83.9
0.08	17.6	0.70	13.9	2.7	0.6	1.3	0.51	1.11	87.7
0.10	21.7	0.74	11.8	2.4	0.4	0.7	0.51	1.19	88.5

Αύξηση σε ακάθαρτη γλυκερόλη. Εμφάνιση του ρυθμού αραίωσης (D, h⁻¹), της υπολειπόμενης γλυκερόλης (S_r, g/L), της παραγόμενης βιομάζας (X, g/L), της παραγόμενης 1,3-προπανοδιόλης (1,3-PDO, g/L), του παραγόμενου βουτυρικού οξέος (But, g/L), του παραγόμενου οξικού οξέος (Ace, g/L), του παραγόμενου γαλακτικού οξέος (Lac, g/L), του συντελεστή απόδοσης της παραγόμενης 1,3-προπανοδιόλης προς την καταναλωθείσα γλυκερόλη (Y_{PDO/S}, g/g), της παραγωγικότητας της 1,3-προπανοδιόλης (P_{PDO}, g/L/h) και του ποσοστού ανάκτησης του άνθρακα (R_C, % w/w).

Επιπλέον, αξιολογημένη θεωρείται και η διαπίστωση της σταθερότητας της βιοδιεργασίας, αφού σε κάθε περίπτωση ο συντελεστής απόδοσης της 1,3-προπανοδιόλης ($Y_{PDO/S}$) κυμαίνονταν εντός του ικανοποιητικού εύρους των 0.50-0.52 g ανά g καταναλωθέντος υποστρώματος. Όσον αφορά στην παραγωγή των λοιπών μεταβολικών προϊόντων, ήτοι των οργανικών οξέων, διαπιστώθηκε ότι η μείωση του ρυθμού αραίωσης επέδρασε θετικά τόσο στη παραγωγή του βουτυρικού, όσο και στην παραγωγή του γαλακτικού οξέος. Η ίδια επίδραση φαίνεται να ασκείται και στην περίπτωση του οξικού οξέος, ωστόσο η τελική συγκέντρωση του δεν ξεπέρασε τα 0.9 g/L εντός του χημειοστάτη. Εξάλλου, όπως διαπιστώνεται και από το ακόλουθο Γράφημα 3.14, κατά την συνεχή καλλιέργεια του μικροοργανισμού, δεν παρατηρήθηκε εξάντληση της ακάθαρτης γλυκερόλης από το μέσο της καλλιέργειας.



Γράφημα 3.14 Επίδραση του ρυθμού αραίωσης στην παραγωγή βιομάζας, την κατανάλωση της ακάθαρτης γλυκερόλης και την παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης, κατά την κατάσταση δυναμικής ισορροπίας της συνεχούς καλλιέργειας του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 ($S_0=45$ g/L) με συνεχή εμφύσηση αζώτου.

Αντίθετα, όπως άλλωστε ήταν αναμενόμενο, η αύξηση του ρυθμού αραίωσης επέφερε ταυτόχρονη αύξηση της συγκέντρωσης της πηγής άνθρακα στον χημειοστάτη. Ως επακόλουθο αυτού, η συγκέντρωση της 1,3-προπανοδιόλης εμφάνισε πτωτική τάση με την αύξηση του ρυθμού αραίωσης της συνεχούς καλλιέργειας.

Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκε επεξεργασία των κινητικών δεδομένων που ελήφθησαν κατά τα διάφορα στάσιμα στάδια των συνεχών καλλιεργειών του βακτηρίου *C. butyricum* υπό συνεχή εμφύσηση αερίου αζώτου. Ως γνωστόν από την βιοχημική μηχανική, η συσχέτιση του ειδικού ρυθμού παράγωγης της 1,3-προπανοδιόλης (q_{PDO}) με τον εφαρμοζόμενο ρυθμό αραίωσης (D) κατά την κατάσταση δυναμικής ισορροπίας σε μια συνεχή καλλιέργεια γίνεται με βάση την εξίσωση (1),

$$q_{PDO} = \frac{D \cdot (PDO)}{X} \quad (1)$$

Η χάραξη της καμπύλης $q=f(D)$ με βάση τις τιμές της εξίσωσης (1) δίδει πληροφορίες σχετικά με την συσχέτιση του παραγόμενου προϊόντος ως μεταβολίτη κυρίως, μερικώς ή μη συνδεδεμένο με την κυτταρική αύξηση, καθώς επίσης και την τιμή του συντελεστή $K_{PDO/X}$ (g/g). Ως εκ τούτου, από το Γράφημα 3.15 Α διαπιστώνεται ότι η 1,3-προπανοδιόλη δύναται να θεωρηθεί ως ένα μεταβολικό προϊόν μερικώς συνδεδεμένο με την μικροβιακή αύξηση κατά την αύξηση του μικροοργανισμού υπό συνθήκες συνεχούς εμφύσησης αερίου αζώτου. Ακόμη, ο συντελεστής $K_{PDO/X}$ υπολογίστηκε ίσος με 12.09 g/g.

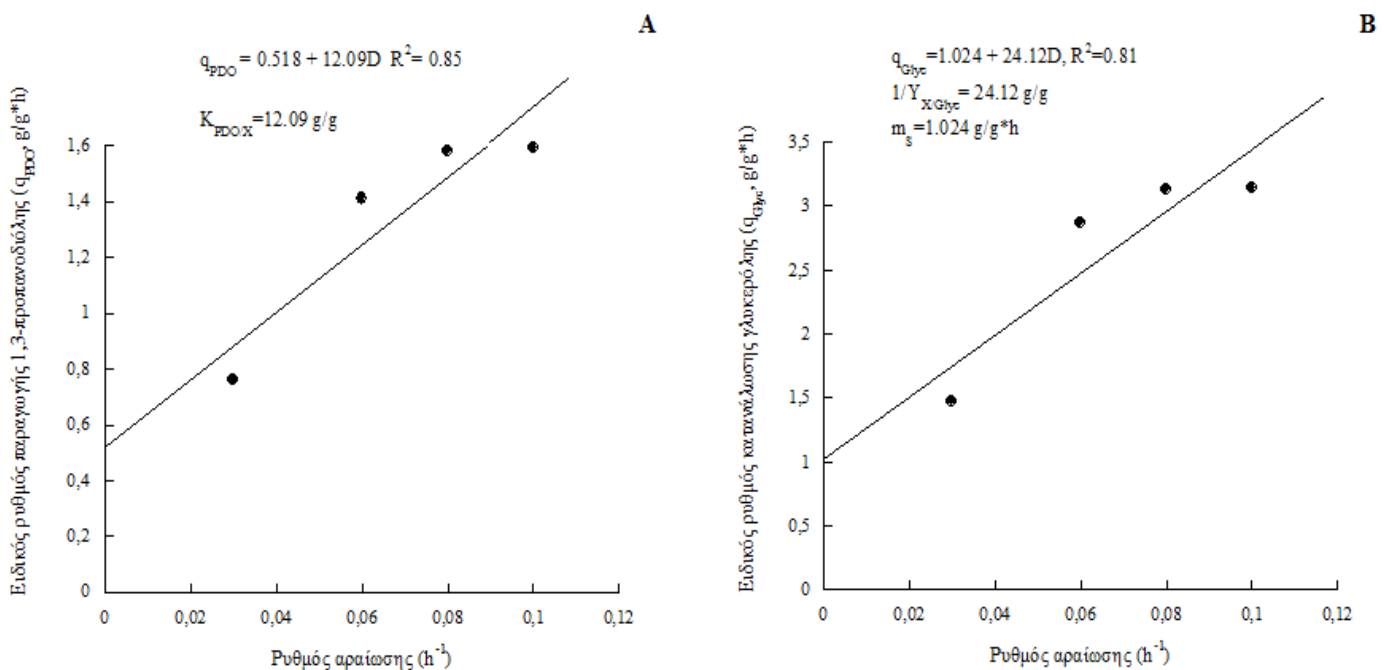
Ακολούθως, κατά την συνεχή καλλιέργεια, η συσχέτιση του ειδικού ρυθμού κατανάλωσης της γλυκερόλης (q_{Glyc}) με τον εκάστοτε ρυθμό αραίωσης (D) γίνεται με βάση την εξίσωση (2),

$$q_{Glyc} = -\frac{dGlyc}{dt} \cdot \frac{1}{X} = \frac{D}{Y_{X/Glyc}} + m_s \quad (2)$$

Κατά την επίτευξη στάσιμου σταδίου, με βάση τον υπολογισμό του ισοζυγίου άνθρακα προκύπτει ότι ο ειδικός ρυθμός κατανάλωσης της γλυκερόλης δύναται να υπολογιστεί με βάση την εξίσωση (3),

$$q_{Glyc} = \frac{D \cdot (Glyc_0 - Glyc)}{X} \quad (3)$$

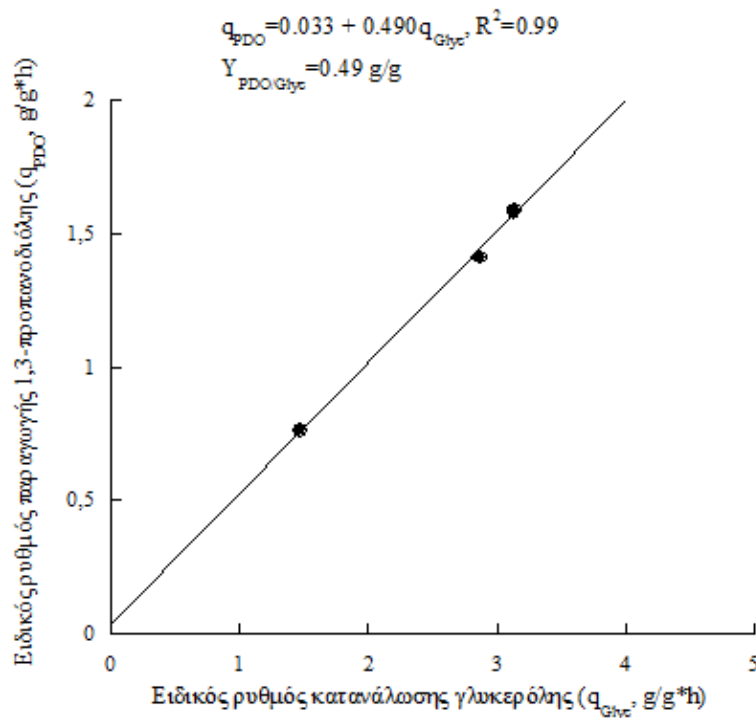
Η χάραξη της καμπύλης που προκύπτει από τις πειραματικές τιμές της εξίσωσης (3) δίδει πληροφορίες σχετικά με τον μέγιστο θεωρητικό συντελεστή απόδοσης της βιομάζας ($Y_{X/Glyc}$), καθώς επίσης και για τον συντελεστή κατανάλωσης ενέργειας για την συντήρηση του κυτταρικού πληθυσμού (cell maintenance coefficient, m_s). Έτσι, όπως διαπιστώνεται στο Γράφημα 3.15 Β, ο συντελεστής $Y_{X/Glyc}$ ήταν ίσος με 0.04 g ανά g καταναλωθείσας γλυκερόλης, ενώ ο συντελεστή κατανάλωσης ενέργειας (m_s) βρέθηκε ίσος με 1.024 g/g/h.



Γράφημα 3.15. Παρουσίαση της συσχέτισης του ειδικού ρυθμού παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης ως προς τον ρυθμό αραιώσης (A) και του ειδικού ρυθμού κατανάλωσης της ακάθαρτης γλυκερόλης ως προς τον ρυθμό αραιώσης (B), κατά την συνεχή καλλιέργεια του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 με συνεχή εμφύσηση αζώτου ($S_0=45$ g/L).

Τέλος, η συσχέτιση μεταξύ του ειδικού ρυθμού παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης και του ειδικού ρυθμού κατανάλωσης της γλυκερόλης (Γράφημα 3.16), οδηγεί στον υπολογισμό του μέγιστου θεωρητικού συντελεστή απόδοσης της 1,3-προπανοδιόλης ($Y_{PDO/Glyc}$). Ως εκ τούτου, στην περίπτωση της τέλεσης συνεχούς καλλιέργειας του μικροοργανισμού με διαρκή εμφύσηση αερίου

αζώτου στον χημειοστάτη, ο εν λόγω συντελεστής απόδοσης έλαβε την τιμή 0.49 g παραγόμενης 1,3-προπανοδιόλης ανά g καταναλωθείσας γλυκερόλης.



Γράφημα 3.16 Παρουσίαση της συσχέτισης του ειδικού ρυθμού παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης ως προς τον ειδικό ρυθμό κατανάλωσης της ακάθαρτης γλυκερόλης, κατά την συνεχή καλλιέργεια του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 με συνεχή εμφύσηση αζώτου ($S_0=45 \text{ g/L}$).

Στην διεθνή βιβλιογραφία απαντάται ένας μικρός αριθμός μελετών στον οποίο γίνεται λόγος μεταξύ άλλων για την τιμή του συντελεστή κατανάλωσης ενέργειας για την συντήρηση του κυτταρικού πληθυσμού (cell maintenance coefficient, m_s), κατά την τέλεση διαφόρων ειδών βιομετατροπών. Οι τιμές που δύναται να λάβει ο εν λόγω συντελεστής, εξαρτώνται αφενός μεν από την σύνδεση ή μη του εκάστοτε μεταβολικού προϊόντος με την μικροβιακή αύξηση, και αφετέρου, από την τέλεση της ζύμωσης υπό αναερόβιες ή αερόβιες συνθήκες καλλιέργειας. Μια σύνοψη από τις διάφορες τιμές του συντελεστή m_s κατά την τέλεση μικροβιακών ζυμώσεων παρουσιάζεται στον ακόλουθο Πίνακα 3.15.

Πίνακας 3.15 Τιμές του συντελεστή m_s κατά την τέλεση μικροβιακών ζυμώσεων με βάση την διεθνή βιβλιογραφία

Μικροοργανισμός	Υπόστρωμα	Μεταβολικό προϊόν	m_s (g/g/h)	Αναφορά
<i>Apiotricum curvatum</i>	Γλυκόζη	Λιπίδια	0.005-0.039	Ykema et al. (1989)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Γλυκόζη	Αιθανόλη	0.16	Uribelarrea et al. (1990)
<i>Aspergillus niger</i>	Σάκχαρα	Κιτρικό οξύ	0.026	Krzystek et al. (1996)
<i>Clostridium butyricum</i>	Γλυκερόλη	1,3-Προπανοδιόλη	0.47	Papanikolaou et al. (2000)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Γλυκερόλη	Λιπίδια	0.034	Papanikolaou and Aggelis (2002)
<i>Umbelopsis isabellina</i>	Γλυκόζη	Λιπίδια	0.05	Meeuwse et al. (2011)
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	Οκτανοϊκό	PHA	0.11	Durner et al. (2000)
<i>Clostridium butyricum</i>	Γλυκερόλη	1,3-Προπανοδιόλη	0.58	Παρούσα μελέτη

3.4.2 Παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης κατά την συνεχή καλλιέργεια του βακτηρίου *C. butyricum*

VPI 1718 υπό συνθήκες αυτό-παραγόμενης αναερόβιωσης

Εν συνεχεία, ακολούθησε μια σειρά πειραμάτων στην οποία έλαβε χώρα η αύξηση του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 σε μονοβάθμιο συνεχές σύστημα καλλιέργειας, εφαρμόζοντας διαφορετικούς ρυθμούς αραίωσης και διατηρώντας ίδια την αρχική συγκέντρωση ακάθαρτης γλυκερόλης στο θρεπτικό μέσο εισόδου, αλλά αυτή τη φορά κατά την επίτευξη αυτό-παραγόμενης αναερόβιωσης. Στόχος αυτών των πειραμάτων ήταν η διερεύνηση της βιοχημικής απόκρισης του μικροοργανισμού κατά την καλλιέργεια του στις εν λόγω συνθήκες. Υπενθυμίζεται ότι σε προηγούμενη παράγραφο του παρόντος κεφαλαίου (3.2) έγινε εκτενής αναφορά στις βιοχημικές

μεταβολές του μικροοργανισμού που παρατηρήθηκαν κατά την καλλιέργεια του σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου διαφορετικής γεωμετρίας–ενεργού όγκου, ανάλογα με την στρατηγική επίτευξης της αναεροβίωσης που ακολουθείτο. Συγκεκριμένα, είχε επισημανθεί ότι η επίτευξη αυτό-παραγόμενου αναερόβιου περιβάλλοντος στο μέσο της καλλιέργειας, όταν αυτή λαμβάνει χώρα σε βιοαντιδραστήρα χαμηλού όγκου και σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκερόλης, συνοδεύεται από αύξηση του παραγόμενου γαλακτικού οξέος με άμεση επίπτωση στην παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης.

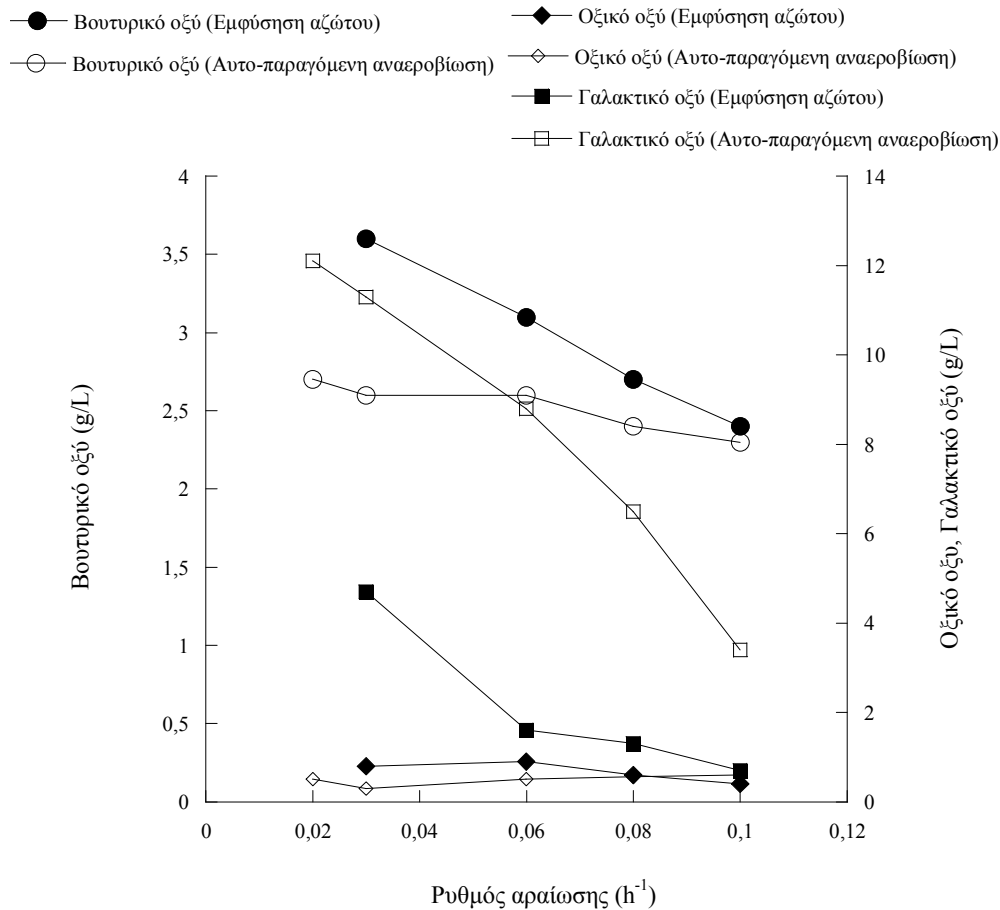
Στην περίπτωση, λοιπόν, της συνεχούς καλλιέργειας του μικροοργανισμού σε συνθήκες αυτό-παραγόμενης αναεροβίωσης, όπως διαπιστώνεται από τον Πίνακα 3.16, η συγκέντρωση της βιομάζας εμφάνισε μικρές διακυμάνσεις παράλληλα με την αύξηση του ρυθμού αραίωσης, κυμαινόμενη σε τιμές συγκρίσιμες με αυτές που σημειώθηκαν κατά την συνεχή καλλιέργεια του μικροοργανισμού με διαρκή εμφύσηση αερίου αζώτου στο περιβάλλον της καλλιέργειας (0.74-0.78 g/L). Ωστόσο, οι μέγιστες τιμές της παραγόμενης 1,3-προπανοδιόλης βρέθηκαν σε χαμηλότερα επίπεδα, ενώ αξιοπρόσεχτη είναι και η μείωση του συντελεστή απόδοσης της εν λόγω διόλης, ο οποίος έλαβε τιμές εντός του εύρους 0.43-0.50 g ανά g καταναλωθείσας γλυκερόλης. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην αυξημένη παραγωγή του γαλακτικού οξέος, φτάνοντας έως τα 12.1 g/L. Μάλιστα, φαίνεται ότι η εφαρμογή χαμηλού ρυθμού αραίωσης ευνοεί την παραγωγή του εν λόγω οργανικού οξέος, υπό τις δεδομένες συνθήκες καλλιέργειας. Παράλληλα, σημειώνεται ότι και σε αυτή την περίπτωση δεν παρατηρήθηκε εξάντληση της ακάθαρτης γλυκερόλης από το μέσο της καλλιέργειας, αφού ακόμη και κατά την διεξαγωγή της συνεχούς καλλιέργειας με αρκετά χαμηλό ρυθμό αραίωσης, ήτοι 0.02 h^{-1} , κατά την επίτευξη κατάστασης δυναμικής ισορροπίας, η συγκέντρωση της πηγής άνθρακα ευρίσκονταν στα 9.4 g/L.

Πίνακας 3.16 Πειραματικά αποτελέσματα του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 σε κατάσταση δυναμικής ισορροπίας κατά την συνεχή καλλιέργεια του σε συνθήκες αυτό-παραγόμενης αναεροβίωσης, με την γλυκερόλη ως μοναδική πηγή άνθρακα ($S_0=45$ g/L) κατά την εφαρμογή διαφορετικών ρυθμών αραιώσης.

D (h⁻¹)	S_r (g/L)	X (g/L)	1,3-PDO (g/L)	But (g/L)	Ace (g/L)	Lac (g/L)	Y_{PDO/S} (g/g)	P_{PDO} (g/L/h)	R_C (% w/w)
0.02	9.4	0.74	16.1	2.7	0.3	12.1	0.46	0.32	99.4
0.03	13.6	0.76	15.7	2.6	0.3	11.3	0.50	0.47	103.4
0.06	14.1	0.76	13.4	2.6	0.5	8.8	0.43	0.80	95.1
0.08	21.1	0.76	11.1	2.4	0.6	6.5	0.46	0.88	97.7
0.10	22.4	0.78	10.8	2.3	0.6	3.4	0.48	1.08	93.6

Αύξηση σε ακάθαρτη γλυκερόλη. Συντιμήσεις όπως στον Πίνακα 3.14

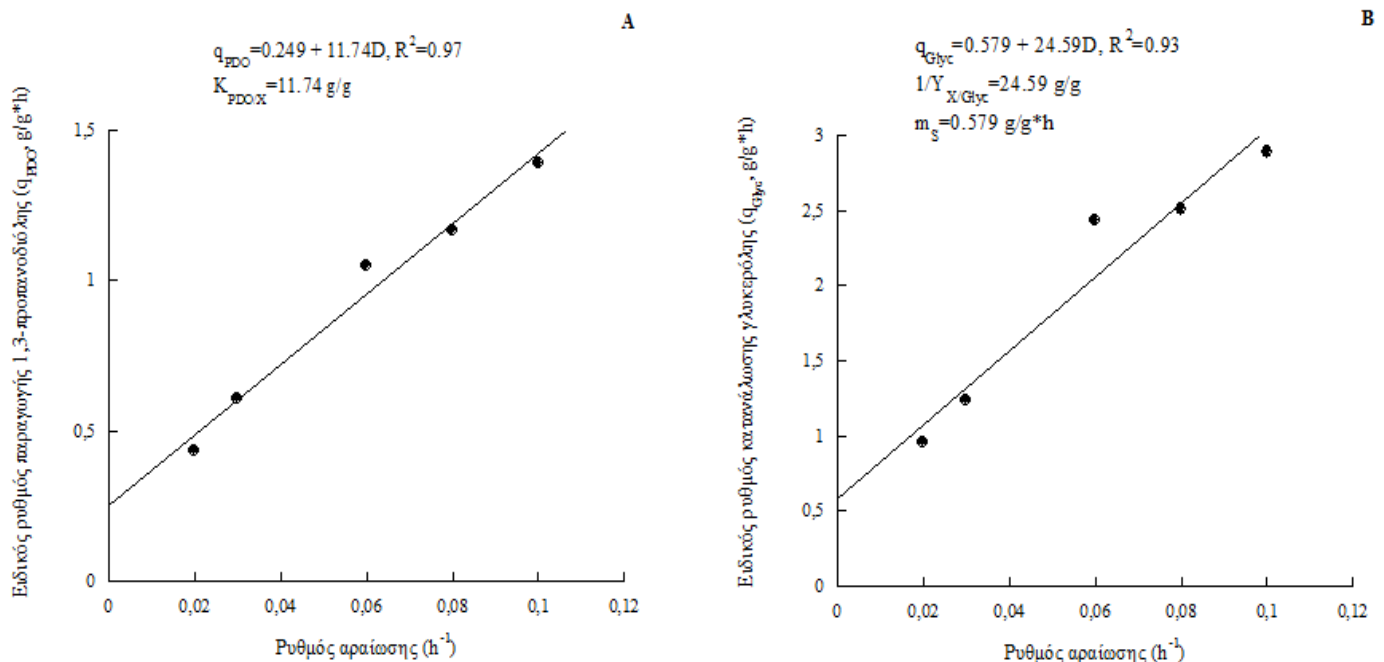
Όσον αφορά στα υπόλοιπα οργανικά οξέα που παράγονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες της ζύμωσης της 1,3-προπανοδιόλης (Γράφημα 3.17), η συγκέντρωση του βουτυρικού οξέος δεν φαίνεται να επηρεάζεται σημαντικά από την αλλαγή του ρυθμού αραιώσης, εμφανίζοντας μικρή τάση μείωσης. Αντίθετα, η συγκέντρωση του οξικού οξέος αυξάνει ταυτόχρονα με την αύξηση του ρυθμού αραιώσης, κυμαινόμενη ωστόσο σε χαμηλές τιμές εντός του χημειοστάτη (έως 0.6 g/L). Από τα ανωτέρω συνεπώς διαπιστώνεται ότι κατά την συνεχή καλλιέργεια του μικροοργανισμού *C. butyricum* VPI 1718 απουσία εμφύσησης αερίου αζώτου, σημειώνονται αξιοσημείωτες βιοχημικές μεταβολές, οφειλόμενες ως επί το πλείστον στην αύξηση της συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέος. Μάλιστα, είναι προφανές ότι στις εν λόγω συνθήκες καλλιέργειας, η παραγωγή του γαλακτικού οξέος ευνοείται κατά την εφαρμογή χαμηλών ρυθμών αραιώσης.



Γράφημα 3.17 Επίδραση του ρυθμού αραιώσεως στην παραγωγή των οργανικών οξέων κατά την κατάσταση δυναμικής ισορροπίας της συνεχούς καλλιέργειας του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 ($S_0=45$ g/L), με συνεχή εμφύσηση αερίου αζώτου (σύμβολα με μαύρο χρώμα) ή κατά την εφαρμογή αυτό-παραγόμενης αναεροβίωσης (σύμβολα με περίγραμμα)

Και σε αυτή την περίπτωση πραγματοποιήθηκε επεξεργασία των κινητικών δεδομένων των συνεχών καλλιεργειών, υπό συνθήκες αυτό-παραγόμενης αναεροβίωσης, προκειμένου να διαπιστωθούν τυχόν αποκλείσεις των τιμών των παραμέτρων, σε σχέση με αυτές που βρέθηκαν κατά την συνεχή καλλιέργεια του μικροοργανισμού υπό συνεχή εμφύσηση αζώτου. Συγκεκριμένα, από τα ακόλουθα γραφήματα 3.18 Α και Β, διαπιστώνεται ότι στην περίπτωση της τέλεσης της διεργασίας υπό συνθήκες αυτό-παραγόμενης αναεροβίωσης, η 1,3-προπανοδιόλη δύναται να θεωρηθεί ως μεταβολίτης συνδεδεμένος με την κυτταρική αύξηση του μικροοργανισμού, αφού η εξίσωση της ευθείας $q=f(D)$ τέμνει τον άξονα των y στο σημείο 0,25 g/g/h. Επιπλέον, ο

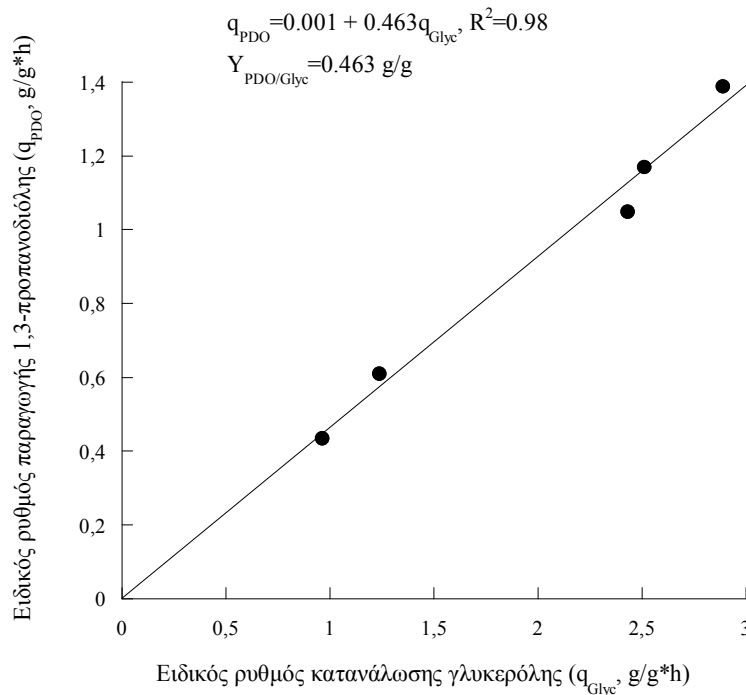
συντελεστής $K_{PDO/X}$ φαίνεται να μην μεταβάλλεται σημαντικά, λαμβάνοντας την τιμή 11.74 g ανά g παραγόμενης βιομάζας. Επιπρόσθετα, η συσχέτιση μεταξύ του ειδικού ρυθμού κατανάλωσης της γλυκερόλης με την αύξηση του εφαρμοζόμενου ρυθμού αραίωσης έδειξε ότι ο συντελεστής απόδοσης βιομάζας προς καταναλωθείσα γλυκερόλη ($Y_{X/Glyc}$) παρέμεινε ίδιος με την αντίστοιχη τιμή που επετεύχθη κατά την συνεχή καλλιέργεια του μικροοργανισμού υπό διαρκή εμφύσηση αζώτου, ήτοι 0.04 g/g (Γράφημα 3.18 B). Εν αντιθέσει, κατά τις συνθήκες αυτό-παραγόμενης αναεροβίωσης, παρατηρήθηκε μείωση του συντελεστή συντήρησης των κυττάρων (m_s), ο οποίος βρέθηκε ίσος με 0.579 g/g/h.



Γράφημα 3.18. Παρουσίαση της συσχέτισης του ειδικού ρυθμού παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης ως προς τον ρυθμό αραίωσης (A) και του ειδικού ρυθμού κατανάλωσης της ακάθαρτης γλυκερόλης ως προς τον ρυθμό αραίωσης (B), κατά την συνεχή καλλιέργεια του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 σε συνθήκες αυτό-παραγόμενης αναεροβίωσης ($S_0=45 \text{ g/L}$).

Τέλος, με βάση το ακόλουθο γράφημα 3.19, δεικνύεται ότι ο μέγιστος θεωρητικός συντελεστής απόδοσης της 1,3-προπανοδιόλης κατά την διεξαγωγή συνεχούς καλλιέργειας υπό τις προαναφερθείσες συνθήκες εμφανίζεται μειωμένος, λαμβάνοντας την τιμή 0.46 g ανά g

καταναλωθείσας γλυκερόλης. Σημειώνεται δε, ότι με βάση τον Πίνακα 3.14, ο συντελεστής απόδοσης του μικροοργανισμού σε 1,3-προπανοδιόλη κατά τα διάφορα στάσιμα στάδια κυμαίνονταν εντός του εύρους των 0.43 με 0.50 g/g.



Γράφημα 3.19 Παρουσίαση της συσχέτισης του ειδικού ρυθμού παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης ως προς τον ειδικό ρυθμό κατανάλωσης της ακάθαρτης γλυκερόλης, κατά την συνεχή καλλιέργεια του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 σε συνθήκες αυτό-παραγόμενης αναερόβιωσης ($S_0=45 \text{ g/L}$).

3.4.3 Παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης κατά την συνεχή καλλιέργεια του βακτηρίου *C. butyricum*

VPI 1718 με σταθερό ρυθμό αραίωσης και αυξανόμενη αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης

Επόμενο σκέλος της πειραματικής διαδικασίας αποτέλεσε η εφαρμογή συνεχούς καλλιέργειας του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718, διατηρώντας σταθερό αυτή την φορά τον ρυθμό αραίωσης και αυξάνοντας μετά από την επίτευξη καταστάσεως δυναμικής ισορροπίας την συγκέντρωση της ακάθαρτης γλυκερόλης στο θρεπτικό μέσο εισόδου της καλλιέργειας. Αξίζει να σημειωθεί ότι σκοπίμως επιλέχθηκε μια χαμηλή τιμή του ρυθμού αραίωσης ($D=0.02 \text{ h}^{-1}$), με σκοπό την διερεύνηση της βιοχημικής απόκρισης του μικροοργανισμού σε υψηλές συγκεντρώσεις

γλυκερόλης, οι οποίες με βάση την διεθνή βιβλιογραφία, αναφέρονται και ως παρεμποδιστικές για την τέλεση της ζύμωσης της 1,3-προπανοδιόλης για αρκετά στελέχη βακτηρίων, καθώς επίσης και για να αποφευχθούν φαινόμενα εκπλύσεως (washout) της καλλιέργειας. Ειδικότερα, στον ακόλουθο Πίνακα 3.17 συνοψίζονται τα κινητικά δεδομένα που παρελήφθησαν κατά τα διάφορα στάδια στάδια της συνεχούς καλλιέργειας του μικροοργανισμού.

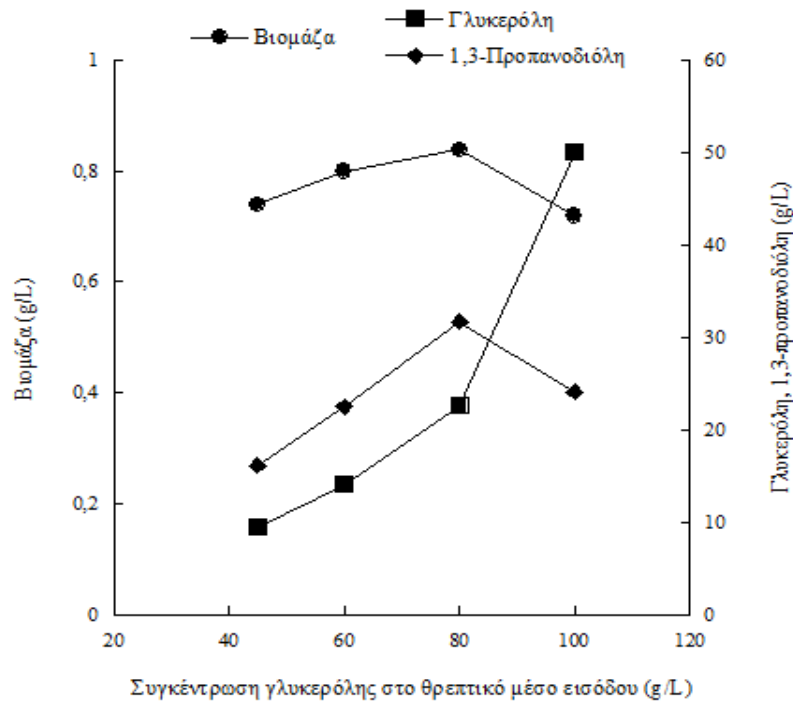
Πίνακας 3.17 Πειραματικά αποτελέσματα του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 σε κατάσταση δυναμικής ισορροπίας κατά την συνεχή καλλιέργεια του με εφαρμογή αυτό-παραγόμενης αναεροβίωσης, με σταθερό ρυθμό αραιώσης ($D=0.02 \text{ h}^{-1}$) και αυξανόμενη αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης στο θρεπτικό μέσο εισόδου.

S_0	S_r	X	1,3-PDO	But	Ace	Lac	$Y_{\text{PDO/S}}$	P_{PDO}	R_C
(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/g)	(g/L/h)	(% w/w)
45	9.4	0.74	16.1	2.7	0.5	4.6	0.46	0.32	99.4
60	14.1	0.80	22.5	5.2	1.0	8.0	0.49	0.63	95.2
80	22.6	0.84	31.1	7.1	1.7	8.4	0.54	0.45	99.7
100	50.1	0.78	24.1	4.3	1.2	13.6	0.48	0.32	99.6

Αύξηση σε ακάθαρτη γλυκερόλη. Εμφάνιση της αρχικής συγκέντρωσης της γλυκερόλης (S_0 , g/L) και λοιπές συντιμήσεις όπως στον Πίνακα 3.14

Διαπιστώνεται ότι μολονότι οι συνεχείς καλλιέργειες έλαβαν χώρα σε χαμηλό ρυθμό αραιώσης, σε καμία περίπτωση δεν παρατηρήθηκε εξάντληση της ακάθαρτης γλυκερόλης από το θρεπτικό μέσο. Ωστόσο, ιδιαίτερα ικανοποιητική ήταν η επίδοση του μικροοργανισμού κατά την καλλιέργεια του με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης στο θρεπτικό μέσο εισόδου ίση με 80 g/L. Στην εν λόγω περίπτωση, κατά την επίτευξη κατάστασης δυναμικής ισορροπίας, εντός του χημειοστάτη βρίσκονταν 31.1 g/L της παραγόμενης 1,3-προπανοδιόλης, με τον αντίστοιχο συντελεστή απόδοσης να λαμβάνει την τιμή των 0.54 g ανά g καταναλωθέντος υποστρώματος. Εν αντιθέσει, η συγκέντρωση των 100 g/L ακάθαρτης γλυκερόλης στο θρεπτικό μέσο εισόδου φάνηκε

να είναι λιγότερο ανεκτή από τον μικροοργανισμό, δεδομένου ότι κατά την κατάσταση δυναμικής ισορροπίας, σχεδόν το 50% της αρχικής συγκέντρωσης του υποστρώματος παρέμενε ακατανάλωτο (Γράφημα 3.20). Ως εκ τούτου, τόσο η παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης, όσο και ο αντίστοιχος συντελεστής βιομετατροπής $Y_{PDO/X}$, μειώθηκαν αισθητά. Επιπλέον, μειωμένη εμφανίστηκε και η παραγωγή της βιομάζας κατά την κατάσταση δυναμικής ισορροπίας στον χημειοστάτη.



Γράφημα 3.20 Επίδραση αρχικής συγκέντρωσης της ακάθαρτης γλυκερόλης του θρεπτικού μέσου εισόδου, στην παραγωγή βιομάζας, την κατανάλωση της ακάθαρτης γλυκερόλης και την παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης, κατά την κατάσταση δυναμικής ισορροπίας της συνεχούς καλλιέργειας του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 ($D=0.02 \text{ h}^{-1}$), με επίτευξη αυτό-παραγόμενης αναεροβίωσης.

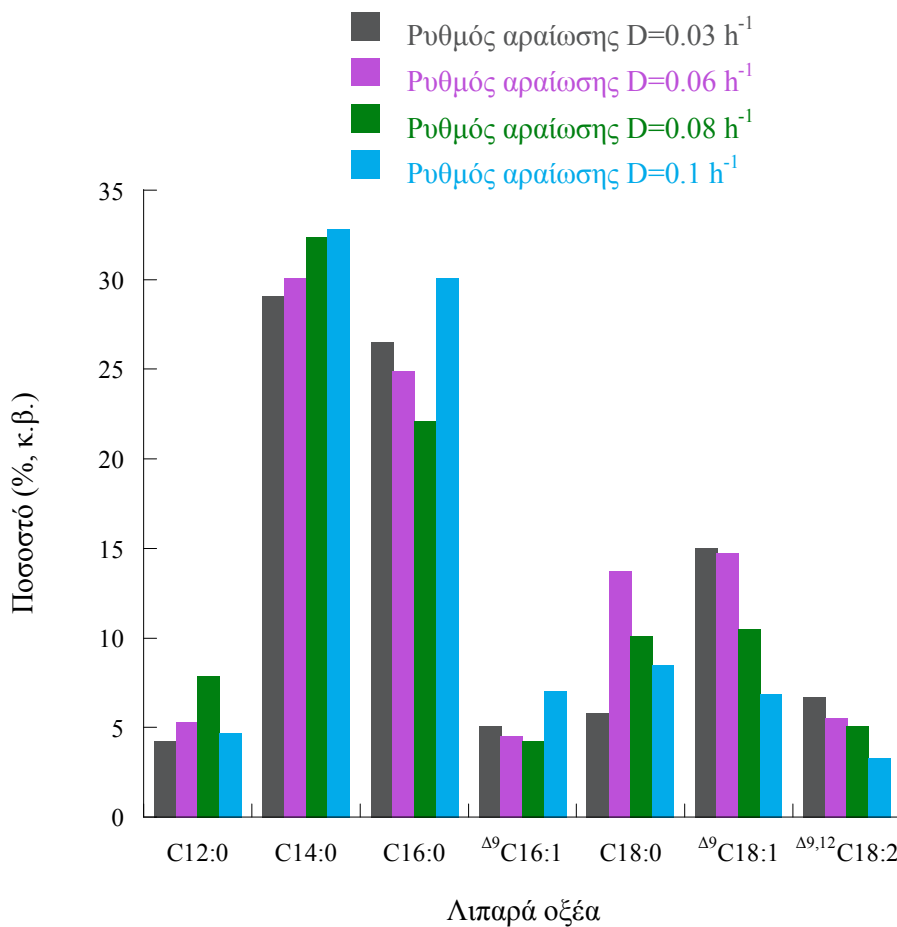
Επιπλέον, άξια λόγου κρίνεται και η παραγωγή του γαλακτικού οξέος, αφού στις δεδομένες συνθήκες καλλιέργειας βρέθηκε να είναι το κύριο παραγόμενο οργανικό οξύ εντός του χημειοστάτη. Μάλιστα, κατά την συνεχή καλλιέργεια του βακτηρίου με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης ίση με 100 g/L, κατά την κατάσταση δυναμικής ισορροπίας, το γαλακτικό οξύ βρέθηκε ίσο με 13.6 g/L. Όπως ήδη διαπιστώθηκε και σε προαναφερθέντα πειράματα του παρόντος

εδάφιου, η επιβολή χαμηλών ρυθμών αραίωσης ευνοεί την παραγωγή του γαλακτικού οξέος για τον συγκεκριμένο στέλεχος *C. butyricum*, μια παρατήρηση που φαίνεται να επαναλαμβάνεται και σε αυτή την σειρά πειραμάτων. Όσον αφορά τα υπόλοιπα οργανικά οξέα, η συγκέντρωσή τους έβαινε αυξανόμενη παράλληλα με την αύξηση της ακάθαρτης γλυκερόλης στο θρεπτικό μέσο εισόδου, με εξαίρεση την περίπτωση των 100 g/L γλυκερόλης όπου η παραγωγή τόσο του βουτυρικού όσο και του οξικού οξέος ήταν μειωμένη.

3.4.4 Σύσταση των κυτταρικών λιπιδίων του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 κατά την συνεχή καλλιέργεια του σε υπόστρωμα ακάθαρτης γλυκερόλης.

Όπως αναφέρθηκε και στην αρχή του παρόντος κεφαλαίου, ειδική μνεία δόθηκε στην διερεύνηση του προφίλ των κυτταρικών λιπιδίων του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718, μέσω της παρατήρησης τυχόν διαφοροποιήσεων ως προς την σύσταση αυτού, κατά την επίτευξη των καταστάσεων δυναμικής ισορροπίας των συνεχών καλλιεργειών. Αξίζει να σημειωθεί ότι ανατρέχοντας στο σύνολο της διεθνούς βιβλιογραφίας σχετικά με το αντικείμενο που παρουσιάζεται στο παρόν εδάφιο, διαπιστώνεται πως δεν υπάρχουν άλλες αναφορές σχετικά με την μελέτη της σύστασης των κυτταρικών λιπιδίων του εν λόγω μικροοργανισμού, κατά την αύξηση του σε σύστημα συνεχούς καλλιέργειας. Επιπρόσθετα, λαμβάνοντας υπ' όψιν τις παρατηρήσεις που σημειώθηκαν σε προηγούμενο κεφάλαιο (3.3) σχετικά με το προφίλ των λιπαρών οξέων που απαντώνται στο σύνολο των κυτταρικών λιπιδίων του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718, κρίθηκε ενδιαφέρουσα η μελέτη αυτών κατά την αύξηση του μικροοργανισμού σε συνεχές σύστημα και ειδικότερα κατά την επίτευξη καταστάσεως δυναμικής ισορροπίας υπό διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας. Ως εκ τούτου, στο ακόλουθο Γράφημα 3.21 παρουσιάζονται τα ποσοστά των λιπαρών οξέων των κυτταρικών λιπιδίων του βακτηρίου, κατά τα στάσιμα στάδια της συνεχούς καλλιέργειας του, με εφαρμογή διαφορετικών ρυθμών αραίωσης και σταθερή αρχική συγκέντρωση της ακάθαρτης γλυκερόλης ($S_0=45$ g/L), υπό συνεχή εμφύσηση αερίου αζώτου στο περιβάλλον της

καλλιέργειας. Από το γράφημα, δύναται να διαπιστωθεί ότι σε κάθε περίπτωση το ολικό κλάσμα των λιπιδίων του μικροοργανισμού αποτελείται σε ποσοστό 50% (κ.β.) από κορεσμένα λιπαρά οξέα και ειδικότερα από το μυριστικό (C14:0) και το παλμιτικό οξύ (C16:0). Σε μικρότερα ποσοστά, αλλά μη αμελητέα, ευρίσκονται το στεατικό (C18:0) και το λαυρικό οξύ (C12:0), καθώς επίσης και τα ακόρεστα ελαϊκό (Δ^9 C18:1), λινελαϊκό ($\Delta^{9,12}$ C18:2) και παλμιτελαϊκό οξύ (Δ^9 C16:1).

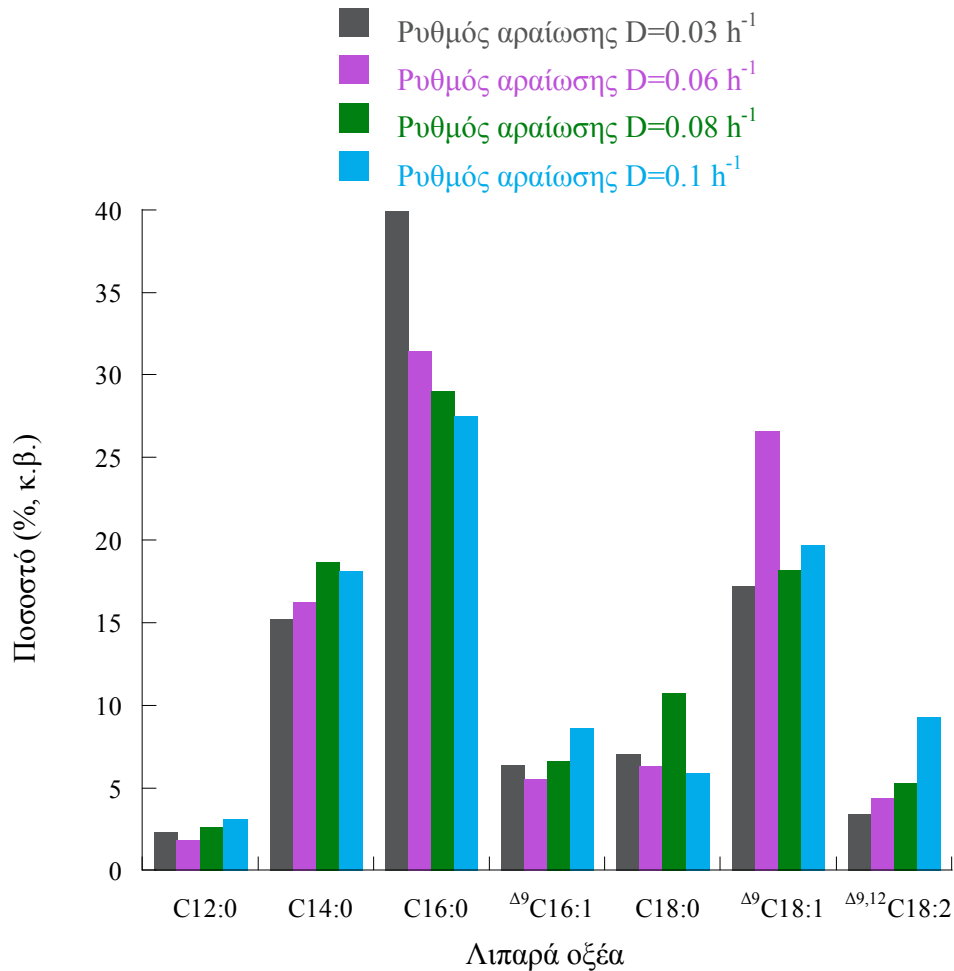


Γράφημα 3.21 Σύσταση των κυτταρικών λιπιδίων κατά την κατάσταση δυναμικής ισορροπίας της συνεχούς καλλιέργειας του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 σε υπόστρωμα ακάθαρτης γλυκερόλης ($S_0=45$ g/L), με εφαρμογή διαφορετικών ρυθμών αραίωσης και διαρκή εμφύσηση αερίου αζώτου.

Συγκεκριμένα, το ποσοστό του λαυρικού οξέος παρουσιάζει διακυμάνσεις παράλληλα με την αύξηση του ρυθμού αραίωσης, κυμαινόμενο σε κάθε περίπτωση μεταξύ του εύρους των 4 με 8% (κ.β.). Αντίθετα, το μυριστικό οξύ αυξάνει παράλληλα με την αύξηση του ρυθμού αραίωσης,

φτάνοντας σε ποσοστό έως και 33% (κ.β.). Στην περίπτωση του παλμιτικού και του παλμιτελαϊκού οξέος, αμφότερα τα λιπαρά οξέα φαίνεται να μειώνονται με την αύξηση του υπαγόμενου ρυθμού αραίωσης, ωστόσο συνοδεύονται από απότομη αύξηση στο ποσοστό τους κατά το στάσιμο στάδιο της συνεχούς καλλιέργειας με $D=0.10 \text{ h}^{-1}$. Εξάλλου, το ποσοστό του στεατικού οξέος εμφανίζεται να αυξάνεται σε χαμηλούς ρυθμούς αραίωσης ($D=0.06 \text{ h}^{-1}$) και, εν συνεχεία, βαίνει μειούμενο σε μεγαλύτερες τιμές ρυθμού αραίωσης. Τέλος, όσον αφορά στα ακόρεστα ελαϊκό και λινελαϊκό οξύ, τα ποσοστά τους εμφανίζονται να μειώνονται με την εφαρμογή υψηλών ρυθμών αραίωσης.

Εν συνεχεία, μελετήθηκε η σύσταση των λιπιδίων του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1781 κατά την κατάσταση δυναμικής ισορροπίας των συνεχών καλλιεργειών του, με αυξανόμενο ρυθμό αραίωσης, σταθερή συγκέντρωση της ακάθαρτης γλυκερόλης στο μέσο εισόδου και με επίτευξη αυτό-παραγόμενης αναεροβίωσης στο περιβάλλον της καλλιέργειας. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στο ακόλουθο Γράφημα 3.22. Ως πρώτη παρατήρηση, μπορεί να ειπωθεί ότι στις δεδομένες συνθήκες καλλιέργειας, παρατηρείται αισθητή μείωση στο ποσοστό του μυριστικού οξέος, το οποίο ανεξαρτήτως ρυθμού αραίωσης δεν ξεπερνά το 18% (κ.β.) επί του συνολικού κλάσματος των κυτταρικών λιπιδίων του βακτηρίου. Αντίθετα, το ποσοστό του παλμιτικού οξέος επί των συνολικών λιπιδίων αυξάνεται σημαντικά, ξεπερνώντας το 40% (κ.β.) κατά την εφαρμογή χαμηλών ρυθμών αραίωσης. Επίσης, διαπιστώνεται ότι η εφαρμογή αυτο-παραγόμενης αναεροβίωσης φαίνεται να ευνοεί την σύνθεση του ελαϊκού οξέος, το ποσοστό του οποίου σε χαμηλούς ρυθμούς αραίωσης βρέθηκε να φτάνει το 27% (κ.β.). Ακόμη, αναφορικά με το λινελαϊκό οξύ, μολονότι δεν διαφοροποιείται σημαντικά το ποσοστό του επί του συνόλου των λιπιδίων, υπό συνθήκες αυτό-παραγόμενης αναεροβίωσης εμφανίζει ανοδικές τάσεις παράλληλα με την αύξηση του εφαρμοζόμενου ρυθμού αραίωσης.

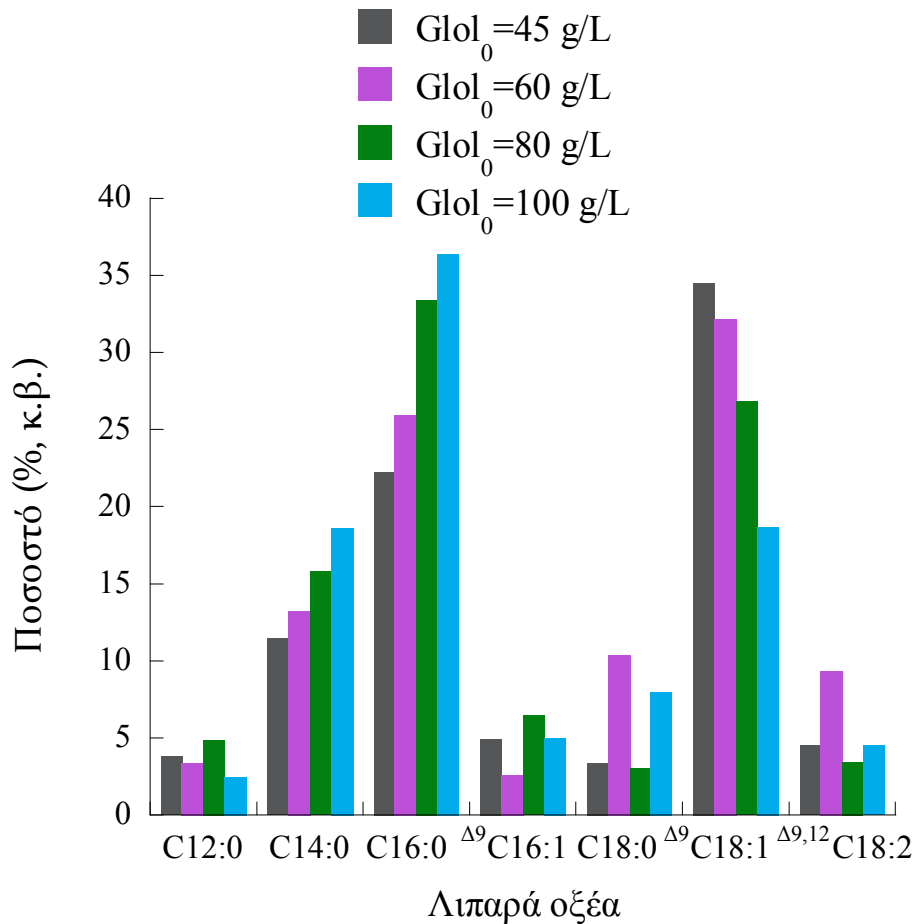


Γράφημα 3.22 Σύσταση των κυτταρικών λιπιδίων κατά την κατάσταση δυναμικής ισορροπίας της συνεχούς καλλιέργειας του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 σε υπόστρωμα ακάθαρτης γλυκερόλης ($S_0=45$ g/L), με εφαρμογή διαφορετικών ρυθμών αραίωσης και αυτό-παραγόμενης αναερόβωσης.

Όσον αφορά στα υπόλοιπα λιπαρά οξέα, το λαυρικό οξύ παρουσίασε τάσεις σταθεροποίησης, κυμαινόμενο ωστόσο σε μικρότερο ποσοστό, από 2 έως 4% (κ.β.). Παρόμοια συμπεριφορά παρουσίασε το παλμιτελαϊκό οξύ, του οποίου το ποσοστό δεν ξεπέρασε το 8% (κ.β.), αλλά και το στεατικό οξύ, που με εξαίρεση το στάσιμο στάδιο με ρυθμό αραίωσης 0.08 h⁻¹, δεν υπερέβη το 11% (κ.β.).

Τέλος, διερευνήθηκε το προφίλ των κυτταρικών λιπιδίων του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718, κατά τα στάσιμα στάδια της συνεχούς καλλιέργειας του, με αυξανόμενη αρχική

συγκέντρωση της ακάθαρτης γλυκερόλης στο θρεπτικό μέσο εισόδου της καλλιέργειας. Σε αυτή την περίπτωση, διαπιστώθηκε ότι η αύξηση της ακάθαρτης γλυκερόλης επηρέασε σημαντικά τα ποσοστά των κορεσμένων λιπιδίων μυριστικού και παλμιτικού οξέος, αλλά και το αντίστοιχο ποσοστό του ακόρεστου ελαϊκού οξέος (Γράφημα 3.23).



Γράφημα 3.23 Σύσταση των κυτταρικών λιπιδίων κατά την κατάσταση δυναμικής ισορροπίας της συνεχούς καλλιέργειας του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718, με εφαρμογή σταθερού ρυθμού αραιώσης ($D=0.02 \text{ h}^{-1}$) και αυξανόμενης αρχικής συγκέντρωσης ακάθαρτης γλυκερόλης.

Ειδικότερα, το ποσοστό του μυριστικού οξέος αυξάνεται παράλληλα με την αύξηση της ακάθαρτης γλυκερόλης, φτάνοντας έως το 18% (κ.β.). Την ίδια συμπεριφορά εμφανίζει και το παλμιτικό οξύ, το οποίο αποτελεί και το επικρατέστερο εκ των λοιπών λιπαρών οξέων, φτάνοντας σε ποσοστό έως και 39% (κ.β.). Αντίθετα, το ποσοστό του ελαϊκού οξέος μειώνεται με την αύξηση της γλυκερόλης στο περιβάλλον της καλλιέργειας. Αναφορικά με τα υπόλοιπα λιπαρά οξέα, τα ποσοστά αυτών

εμφανίζουν διακυμάνσεις, ενώ σε κάθε περίπτωση καθένα από αυτά δεν ξεπερνά το 10% (κ.β.) επί του συνόλου των λιπιδίων.

Σαν γενική παρατήρηση, μπορεί να ειπωθεί ότι η σύσταση των κυτταρικών λιπιδίων του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 παρουσιάζει διαφοροποιήσεις, σχετιζόμενες με την συνεχή εμφύσηση ή μη αερίου αζώτου κατά την διάρκεια της συνεχούς καλλιέργειάς του. Ειδικότερα, η ύπαρξη αερίου αζώτου στο περιβάλλον της καλλιέργειας καθιστά το κλάσμα των κυτταρικών λιπιδίων του μικροοργανισμού πιο κορεσμένο, εν συγκρίσει με την αντίστοιχη κατανομή της σύστασης των λιπιδίων κατά την επίτευξη στάσιμου σταδίου υπό συνθήκες αυτό-παραγόμενης αναεροβίωσης. Επιπρόσθετα, διαπιστώθηκε ότι κατά την συνεχή καλλιέργεια του βακτηρίου, η αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης της πηγής άνθρακα καθιστά την σύσταση των κυτταρικών λιπιδίων του βακτηρίου σαφώς πιο κορεσμένη (Γράφημα 3.23). Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε αντίθεση με τα αντίστοιχα αποτελέσματα που ελήφθησαν κατά την καλλιέργεια του μικροοργανισμού σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου (Παράγραφος 3.3.2.2), όπου είχε διαπιστωθεί ότι η αυξανόμενη αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης καθιστούσε το σύνολο των κυτταρικών λιπιδίων πιο ακόρεστο. Η διαφοροποίηση αυτή οφείλεται πιθανώς στο γεγονός ότι τα ανωτέρω αποτελέσματα αφορούν στην αύξηση του μικροοργανισμού σε διαφορετικά συστήματα καλλιέργειας. με άμεσο επακόλουθο την ενδεχόμενη διαφοροποίηση της βιοχημικής απόκρισης του βακτηρίου, ακόμα και σε επίπεδο σύστασης των κυτταρικών λιπιδίων του.

Από όλα τα παραπάνω, καθίσταται σαφές ότι η κυτταρική μεμβράνη του βακτηρίου *C. butyricum*, δύναται να εμφανίσει αξιοσημείωτες μεταβολές σε επίπεδο σύστασης των κυτταρικών της λιπιδίων, ως αποδέκτης των διαφόρων συνθηκών καλλιέργειας που εφαρμόζονται κατά περίπτωση.

3.5 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΗΣ 1,3-ΠΡΟΠΑΝΟΔΙΟΛΗΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΥΞΗΣΗ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ *C. BUTYRICUM* VPI 1718 ΣΕ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΑΚΑΘΑΡΤΗΣ ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ ΥΠΟ ΜΗ-ΣΤΕΙΡΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Τελευταίο στάδιο του πειραματικού σχεδιασμού αποτέλεσε η διερεύνηση της κινητικής συμπεριφοράς του βακτηρίου *C. butyricum* και της παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης κατά την καλλιέργεια του σε υπόστρωμα ακάθαρτης γλυκερόλης, υπό μη-στείρες συνθήκες καλλιέργειας. Το ενδεχόμενο της επιτυχούς τέλεσης της εν λόγω βιοδιεργασίας υπό μη-στείρες συνθήκες καλλιέργειας αποτελεί ένα ελπιδοφόρο πλεονέκτημα, το οποίο κατά την εφαρμογή της ζύμωσης σε βιομηχανική κλίμακα, δύναται να μειώσει σημαντικά το κόστος της σε επίπεδο υποδομής και λειτουργικών εξόδων.

Εξάλλου, η δυνατότητα εφαρμογής της ζύμωσης της 1,3-προπανοδιόλης σε βιομηχανική κλίμακα αναφέρεται σε έναν περιορισμένο αριθμό μελετών στην διεθνή βιβλιογραφία (Günzel et al., 1991; Barbirato et al., 1995; Biebl et al., 1999; Willke and Vorlop, 2004; 2008; Xiu and Zeng, 2008; Zheng et al., 2009). Ωστόσο, για να καταστεί η εν λόγω βιοδιεργασία οικονομικώς βιώσιμη, είναι επιτακτική η εύρεση τρόπων για την μείωση του κόστους αυτής, κυρίως σε ότι αφορά τις δαπάνες σε ενέργεια και πρώτες ύλες, καθώς επίσης και την περαιτέρω επεξεργασία και καθαρισμό του τελικού προϊόντος (1,3-προπανοδιόλη). Η ραγδαία αύξηση των αποθεμάτων ακάθαρτης γλυκερόλης ως παραπροϊόντος της βιομηχανίας παραγωγής βιολογικού πετρελαίου τα τελευταία χρόνια και η συνακόλουθη πτώση της τιμής της, συνέβαλαν στην ενθάρρυνση της επιστημονικής κοινότητας προς την κατεύθυνση της εφαρμογής της ζύμωσης της 1,3-προπανοδιόλης σε βιομηχανική κλίμακα, αφού η ακάθαρτη γλυκερόλη αποτελεί πλέον μια πρώτη ύλη ευρισκόμενη σε αφθονία (Paranikolaou and Aggelis, 2009), η οποία αποτελεί ένα άριστο υλικό εκκινήσεως για την βιοτεχνολογική παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης (Paranikolaou, 2009).

3.5.1 Καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου με υπόστρωμα ακάθαρτης γλυκερόλης διαφορετικής σύστασης υπό στείρες ή μη συνθήκες ζύμωσης

Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες του βακτηρίου *C. butyricum* σε υπόστρωμα καθαρής και απόβλητης γλυκερόλης, αρχικής συγκέντρωσης ($S_0=20$ g/L), υπό στείρες συνθήκες ζυμώσεως σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου, συνολικού όγκου 3-L. Οι εν λόγω καλλιέργειες χρησίμευσαν ως μάρτυρες του πειραματικού σχεδιασμού και τα κινητικά αποτελέσματα παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα 3.18. Η απόδοση του μικροοργανισμού τόσο από πλευράς μικροβιακής αύξησης, όσο και από πλευράς 1,3-προπανοδιόλης βρέθηκαν να είναι παρόμοια, ανεξαρτήτως της καθαρότητας της γλυκερόλης. Η 1,3-προπανοδιόλη αποτέλεσε το κύριο μεταβολικό προϊόν, ενώ τα αναμενόμενα οργανικά οξέα οξικό, βουτυρικό και γαλακτικό, παρήχθησαν σε μικρότερες τελικές συγκεντρώσεις σε κάθε περίπτωση.

Πίνακας 3.18 Κινητικά αποτελέσματα του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 σε καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου, συνολικού όγκου 3-L, με υπόστρωμα γλυκερόλης διαφορετικής καθαρότητας ($S_0=20$ g/L), υπό στείρες ή μη συνθήκες ζύμωσης.

Συνθήκες καλλιέργειας	Είδος γλυκερόλης (Καθαρότητα, % κ.β.)	S_f (g/L)	X (g/L)	1,3-PDO (g/L)	But (g/L)	Ace (g/L)	Lac (g/L)	$Y_{PDO/S}$ (g/g)	R_c (% w/w)
Στείρες	Καθαρή (99.0%)	0.1	0.8	11.3	2.3	0.5	0.3	0.57	96.4
	Ακάθαρτη (81.0%)	0.2	0.8	11.3	2.1	0.4	0.3	0.57	95.2
Μη-στείρες	Ακάθαρτη (81.0%)	0.1	0.9	11.5	2.7	0.4	0.4	0.58	92.9
	Ακάθαρτη (90.0%)	0.2	1.1	11.2	2.9	0.5	0.3	0.57	96.9
	Ακάθαρτη (85.5%)	0.1	1.1	11.1	2.6	0.5	0.4	0.56	93.9

Εμφάνιση της εναπομείνουσας γλυκερόλης (S_f , g/L), της παραγόμενης βιομάζας (X, g/L), της παραγόμενης 1,3-προπανοδιόλης (1,3-PDO, g/L), του παραγόμενου βουτυρικού οξέος (But, g/L), του παραγόμενου οξικού οξέος (Ace, g/L), του παραγόμενου γαλακτικού οξέος (Lac, g/L), του συντελεστή απόδοσης της παραγόμενης 1,3-προπανοδιόλης προς την καταναλωθείσα γλυκερόλη ($Y_{PDO/S}$, g/g) και του ποσοστού ανάκτησης του άνθρακα (R_c , % w/w). Συνθήκες καλλιέργειας: θερμοκρασία επώασης $\Theta=35^\circ\text{C}$, ρυθμός ανάδευσης 200 rpm, εμφύσηση αερίου αζώτου 0.1 vvm, pH=6.8 (προσθήκη 5M NaOH).

Εν αντιθέσει, στην διεθνή βιβλιογραφία αναφέρεται ότι η χρήση μη προ-επεξεργασμένης ακάθαρτης γλυκερόλης ως υπόστρωμα ενδέχεται να δράσει ως παρεμποδιστικός παράγοντας της μικροβιακής αύξησης και της παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης για ορισμένα στελέχη βακτηρίων ανήκοντα στα γένη *Klebsiella* sp. και *Clostridium* sp. (Moon et al., 2010). Μάλιστα, στην ίδια μελέτη παρατηρήθηκαν διαφορές ως προς την μέγιστη παραχθείσα συγκέντρωση της 1,3-προπανοδιόλης κατά την καλλιέργεια των μικροοργανισμών σε ακάθαρη γλυκερόλη διαφορετικής σύστασης, παρόλο που κατά την διάρκεια παραγωγής του βιολογικού πετρελαίου απ' όπου οι εν λόγω γλυκερόλες προήλθαν, χρησιμοποιήθηκε η ίδια λιπαρή ύλη ως υλικό εκκινήσεως.

Εν συνεχεία, ο μικροοργανισμός καλλιεργήθηκε υπό μη στείρες συνθήκες ζύμωσης, σε θρεπτικό υπόστρωμα ακάθαρτης γλυκερόλης ίδιας αρχικής συγκέντρωσης ($S_0=20$ g/L) αλλά διαφορετικής σύστασης, προερχόμενης από διάφορες βιομηχανίες παραγωγής βιολογικού πετρελαίου. Το βακτήριο *C. butyricum* ολοκλήρωσε την ζύμωση εντός 12 h σε κάθε περίπτωση, παράγοντας ίσες ποσότητες 1,3-προπανοδιόλης (μεταξύ 11.3 και 11.6 g/L). Το προφίλ των οργανικών που πρόεκυψε από την ανάλυση με την βοήθεια της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (H.P.L.C) ήταν το ίδιο τόσο κατά την τέλεση της διεργασίας υπό στείρες, όσο και υπό μη στείρες συνθήκες καλλιέργειας (Πίνακας 3.18). Επιπλέον, ανά τακτά χρονικά διαστήματα πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες, προκειμένου να γίνει έλεγχος της καθαρότητας της καλλιέργειας στο οπτικό μικροσκόπιο. Σε κάθε περίπτωση το βακτήριο *C. butyricum* βρέθηκε να αποτελεί τον μοναδικό μικροοργανισμό εντός του βιοαντιδραστήρα.

Υπό αυτό το πρίσμα, ακολούθησαν ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα υπό μη στείρες συνθήκες, με αυξανόμενη αρχική συγκέντρωση της ακάθαρτης γλυκερόλης (από 30 έως 80 g/L), προκειμένου να διερευνηθεί η απόκριση του μικροοργανισμού σε συνθήκες περίσσειας γλυκερόλης, καθώς επίσης και η επίδραση της παρατεταμένης λανθάνουσας φάσης αύξησης (προκαλούμενη από την περίσσεια γλυκερόλης) στην τέλεση της ζύμωσης και στην καθαρότητα της καλλιέργειας. Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 3.19, η αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης της

γλυκερόλης είχε ως αποτέλεσμα την επιμήκυνση της λανθάνουσας φάσης του αυξητικού κύκλου του μικροοργανισμού. Σε κάθε περίπτωση, κύριο μεταβολικό προϊόν αποτέλεσε η 1,3-προπανοδιόλη, με την μέγιστη συγκέντρωση αυτής τα 41.9 g/L, ενώ σε μικρότερες τελικές συγκεντρώσεις παρήχθησαν τα οργανικά οξέα (οξικό, βουτυρικού και γαλακτικό οξύ). Επιπρόσθετα, στις καλλιέργειες με αρχική συγκέντρωση ακάθαρτης γλυκερόλης έως 60 g/L, ο συντελεστής απόδοσης της 1,3-προπανοδιόλης ($Y_{PDO/S}$) βρέθηκε να κυμαίνεται στο εύρος 0.55 έως 0.56 g ανά g καταναλωθείσας γλυκερόλης. Ωστόσο, στην καλλιέργεια με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης ίση με 80 g/L, παρατηρήθηκε σημαντική επιμήκυνση της λανθάνουσας φάσης του μικροοργανισμού, ήτοι 14 h, ενώ μειωμένη εμφανίστηκε και η παραγωγή βιομάζας (Πίνακας 3.19) εν συγκρίσει με τις αντίστοιχες μέγιστες τιμές στα πειράματα με μικρότερη αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης, γεγονός που υποδηλώνει πιθανή παρεμπόδιση της μικροβιακής αύξησης λόγω υψηλής συγκέντρωσης του υποστρώματος (Zeng et al., 1994).

Πίνακας 3.19 Κινητικά αποτελέσματα του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 σε καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου, συνολικού όγκου 3-L, με υπόστρωμα γλυκερόλης, υπό μη στείρες συνθήκες ζύμωσης

S_0 (g/L)	Χρόνος (h)	S_f (g/L)	X (g/L)	1,3-PDO (g/L)	But (g/L)	Ace (g/L)	Lac (g/L)	$Y_{PDO/S}$ (g/g)	R_C (% κ.β.)
30.5	18	0.0	1.1	17.1	4.4	0.7	0.6	0.56	91.5
39.2	26	0.0	0.9	22.2	5.7	0.9	0.8	0.56	92.3
50.2	32	0.1	1.6	28.1	6.1	1.1	0.9	0.56	89.7
62.5	36	0.0	1.9	34.5	7.3	1.4	1.2	0.55	88.6
70.1	42	0.1	1.7	36.3	6.2	1.3	3.4	0.52	82.8
80.1	52	0.1	1.4	41.9	6.1	1.2	4.2	0.52	81.1

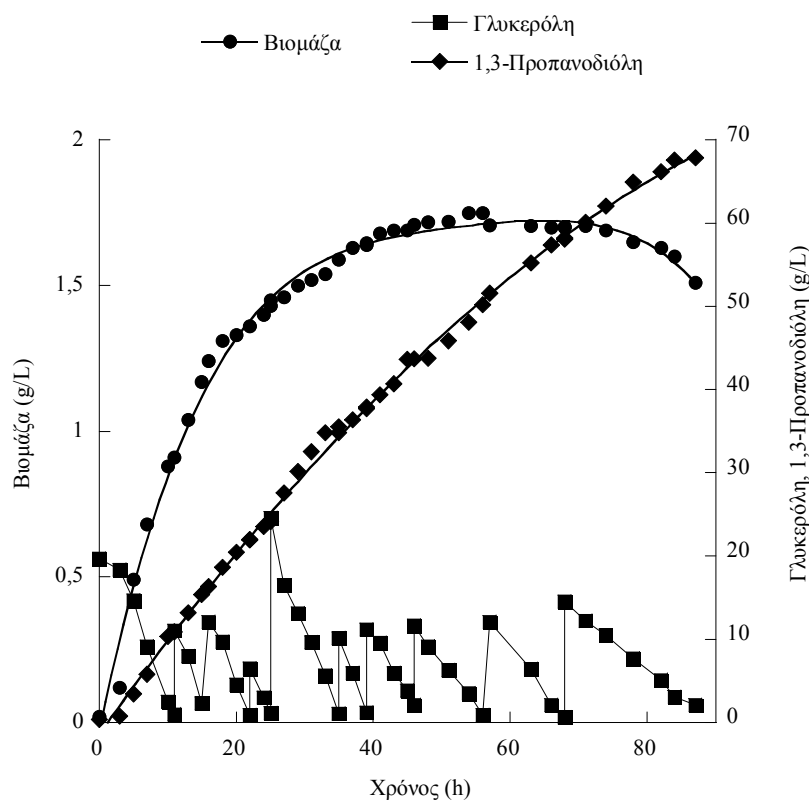
Αύξηση σε ακάθαρτη γλυκερόλη (81% κ.β.). Συντμήσεις όπως στον πίνακα 3.16

Ακόμη, σε συνθήκες περίσσειας πηγής άνθρακα, παρατηρήθηκε αύξηση στην παραγωγή του γαλακτικού οξέος, όντας το δεύτερο σε συγκέντρωση οργανικό οξύ στο μέσο της καλλιέργειας μετά το βουτυρικό. Τέλος, οι μικροσκοπικές παρατηρήσεις που διενεργήθηκαν κατά την διάρκεια όλων των πειραμάτων υπό μη στείρες συνθήκες έδειξαν ότι το βακτήριο *C. butyricum* ήταν σε κάθε περίπτωση ο μοναδικός μικροοργανισμός εντός της καλλιέργειας. Γενικά, η εφαρμογή μικροβιακών ζυμώσεων υπό μη στείρες συνθήκες ζύμωσης είναι γνωστή στην διεθνή βιβλιογραφία και ως επί το πλείστον εφαρμόζεται κατά την ζύμωση της αιθανόλης ή του οξικού οξέος. Ειδικότερα, στελέχη του βακτηρίου *Zymomonas mobilis* και της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae* έχουν χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή βιοαιθανόλης σε μη στείρα συστήματα καλλιέργειας (Ohta et al., 1994; Tao et al., 2005; Sarris et al., 2009), ενώ υπό το ίδιο καθεστώς καλλιέργειας, στελέχη του βακτηρίου *Ethanoligenens harbinense* έχουν χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή βιο-υδρογόνου (Xing et al., 2008).

3.5.2 Ημι-συνεχείς καλλιέργειες σε υπόστρωμα ακάθαρτης γλυκερόλης υπό μη στείρες συνθήκες ζύμωσης

Δεδομένου ότι τα ανωτέρω πειράματα αποδείχθηκαν ενθαρρυντικά ως προς τη τέλεση της βιομετατροπής της ακάθαρτης γλυκερόλης σε 1,3-προπανοδιόλη υπό μη στείρες συνθήκες ζύμωσης, αποφασίστηκε η περαιτέρω μελέτη της προτεινόμενης βιοδιεργασίας σε ημι-συνεχές σύστημα καλλιέργειας. Σκοπός της εφαρμογής του εν λόγω συστήματος καλλιέργειας ήταν η αύξηση της διαθέσιμης γλυκερόλης, γεγονός που συνεπάγεται την επιμήκυνση της εκθετικής φάσης της αύξησης του μικροοργανισμού και την παραγωγή υψηλότερων ποσοτήτων 1,3-προπανοδιόλης, ως προϊόν του πρωτογενούς μεταβολισμού του βακτηρίου. Η κινητική της εξέλιξης της ημι-συνεχούς καλλιέργειας του βακτηρίου *C. butyricum* υπό μη στείρες συνθήκες απεικονίζεται στο παρακάτω γράφημα 3.24. Η ζύμωση ξεκίνησε αρχικά ως ασυνεχής καλλιέργεια, με αρχική συγκέντρωση ακάθαρτης γλυκερόλης ίση με 20 g/L και μετά την εξάντλησή της από το μέσο της

καλλιέργειας ακολούθησε προσθήκη συμπυκνωμένου διαλύματος ακάθαρτης γλυκερόλης ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Κατά τις πρώτες ώρες της εξέλιξης της ημι-συνεχούς ζύμωσης, ο ρυθμός κατανάλωσης της ακάθαρτης γλυκερόλης ήταν σχεδόν σταθερός και ίσος με 2.0 ± 0.1 g/L/h. Μετά την τελευταία προσθήκη γλυκερόλης (περί τις 70 h ζύμωσης), ο ρυθμός κατανάλωσης της γλυκερόλης μειώθηκε στα 1.0 ± 0.1 g/L/h. Η μέγιστη συγκέντρωση παραγόμενης 1,3-προπανοδιόλης που επετεύχθη ήταν 67.9 g/L περί τις 80 h ζύμωσης, με τον αντίστοιχο συντελεστή απόδοσης ($Y_{PDO/S}$) να είναι ίσος με 0.55 g ανά g καταναλωθείσας γλυκερόλης.



Γράφημα 3.24 Κινητική της αύξησης της βιομάζας, κατανάλωσης της ακάθαρτης γλυκερόλης και παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης, κατά την ημι-συνεχή καλλιέργεια του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 σε βιοαντιδραστήρα 3-L, υπό μη στείρες συνθήκες καλλιέργειας.

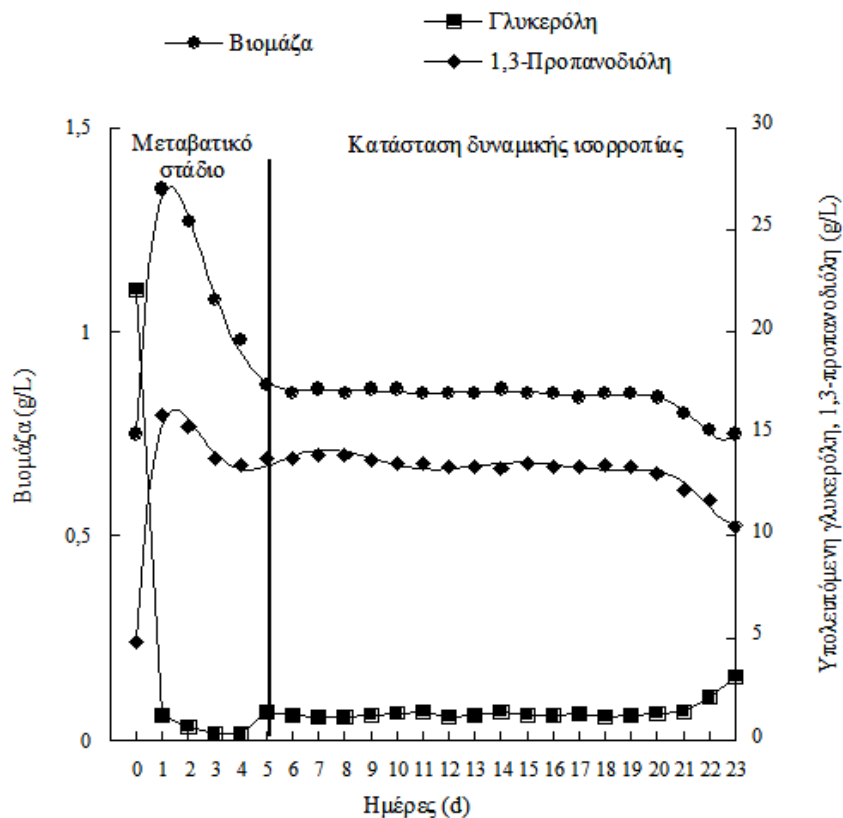
Επιχειρώντας μια αξιολόγηση της παραχθείσας 1,3-προπανοδιόλης υπό μη στείρες συνθήκες, διαπιστώνεται ότι η μέγιστη τιμή αυτής είναι άμεσα συγκρίσιμη με την μέγιστη

ποσότητα που επετεύχθη κατά την ημι-συνεχή καλλιέργεια του βακτηρίου *C. butyricum* υπό στείρες συνθήκες, ήτοι 70.8 g/L, όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο 3.2 της παρούσας μελέτης. Μετά το χρονικό σημείο των 80 h, η ζύμωση πρακτικά σταματά, αφού παρουσιάζονται σημάδια αυτόλυσης των κυττάρων, ενώ στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας έχουν απομείνει περίπου 2 g/L γλυκερόλης ακατανάλωτα. Το γεγονός αυτό αποδίδεται στην υψηλή συγκέντρωση τόσο του μεταβολίτη-στόχου, δηλαδή της 1,3-προπανοδιόλης (67.9 g/L), αλλά και του βουτυρικού οξέος (14.5 g/L) στο μέσο της καλλιέργειας. Ακόμη, μπορεί να λεχθεί ότι η παύση της ζύμωσης οφείλεται εν μέρει και στον κορεσμό των ενζύμων που εμπλέκονται στον καταβολισμό της γλυκερόλης (αφυδρατάση της γλυκερόλης και αφυδρογονάση της γλυκερόλης), δοθέντος του γεγονότος ότι στην δεδομένη χρονική στιγμή, περισσότερα από 100 g/L γλυκερόλης είχαν καταναλωθεί από τον μικροοργανισμό. Όσον αφορά στη παραγωγή των υπολοίπων οργανικών οξέων, το οξικό οξύ βρέθηκε σε μέγιστη συγκέντρωση ίση με 4.3 g/L και το γαλακτικό οξύ στα 1.9 g/L αντιστοίχως. Ακόμη, περιοδικές παρατηρήσεις της καλλιέργειας στο οπτικό μικροσκόπιο έδειξαν ότι μόνο κύτταρα του βακτηρίου *C. butyricum* ευρίσκονταν στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας καθ' όλη την διάρκεια της ζύμωσης.

3.5.3 Συνεχείς καλλιέργειες σε υπόστρωμα ακάθαρτης γλυκερόλης υπό μη στείρες συνθήκες ζύμωσης

Επόμενο βήμα του πειραματικού σχεδιασμού αποτέλεσε η τέλεση της ζύμωσης της 1,3-προπανοδιόλης υπό μη στείρες συνθήκες, σε συνεχή συστήματα καλλιέργειας, με απώτερο στόχο την διερεύνηση της σταθερότητας της ζύμωσης υπό τις δεδομένες συνθήκες. Ο ρυθμός αραίωσης (D) που εφαρμόστηκε σε πρώτο στάδιο για την συνεχή καλλιέργεια ήταν ίσος με 0.06 h^{-1} , ενώ το θρεπτικό μέσο τροφοδοσίας της συνεχούς καλλιέργειας περιείχε ως πηγή άνθρακα την ακάθαρτη γλυκερόλη σε συγκέντρωση 30 g/L. Αξίζει να αναφερθεί ότι το σύστημα διατηρήθηκε σε κατάσταση δυναμικής ισορροπίας για περισσότερο από 16 ημέρες, κατά την διάρκεια των οποίων η

συγκέντρωση της 1,3-προπανοδιόλης ήταν 13.9 g/L εντός του χημειοστάτη (Γράφημα 3.25). Η παραγωγικότητα της 1,3-προπανοδιόλης (q_{PDO}) ήταν 0.83 g/L/h και ο αντίστοιχος συντελεστής απόδοσης $Y_{PDO/S}$ ίσος με 0.52 g/g. Ωστόσο, το κύριο οργανικό οξύ κατά την συνεχή καλλιέργεια του μικροοργανισμού ήταν το γαλακτικό, σε αντίθεση με το αναμενόμενο βουτυρικό οξύ, και μάλιστα σε μη αμελητέα συγκέντρωση (6.5 g/L), ενώ η συγκέντρωση του βουτυρικού και του οξικού οξέος στον χημειοστάτη ήταν 0.9 g/L έκαστο. Τελικά, μετά το πέρας 21 ημερών ζύμωσης, παρατηρήθηκαν στοιχεία εκφυλισμού της καλλιέργειας, με τις συγκεντρώσεις της βιομάζας και της 1,3-προπανοδιόλης να φθίνουν και την συγκέντρωση της υπολειπόμενης ακάθαρτης γλυκερόλης να αυξάνει.



Γράφημα 3.25 Εξέλιξη της συνεχούς καλλιέργειας του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 υπό μη στειρές συνθήκες ζύμωσης

Η δυνατότητα του εν λόγω μικροοργανισμού να παράγει γαλακτικό οξύ έχει περιγραφεί εκτενώς σε προηγούμενο κεφάλαιο της παρούσας μελέτης (Κεφάλαιο 3.2). Φαίνεται ότι ο επιλεγμένος ρυθμός

αραίωσης ($D=0.06 \text{ h}^{-1}$) ευνοεί την έκφραση του ενζύμου της γαλακτικής αφυδρογονάσης, εις βάρος των αντίστοιχων ενζύμων υπεύθυνων για την σύνθεση των υπολοίπων οργανικών οξέων (κινάση του βουτυρικού και του οξικού οξέος), με άμεσο επακόλουθο την παραγωγή μη αμελητέων συγκεντρώσεων γαλακτικού οξέος στον χημειοστάτη.

Επίσης, κατά την κατάσταση δυναμικής ισορροπίας της συνεχούς καλλιέργειας του βακτηρίου *C. butyricum* πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες, με σκοπό τον έλεγχο της μικροβιακής καθαρότητας της καλλιέργειας και διαπιστώθηκε ότι και σε αυτή την περίπτωση ο εν λόγω μικροοργανισμός ήταν ο μοναδικός που ευρίσκοντο εντός του χημειοστάτη. Παρ' όλα αυτά, κρίθηκε αναγκαία η εφαρμογή μιας πιο ενδεδειγμένης μεθόδου για την επιβεβαίωση της καθαρότητας της καλλιέργειας, που αφορούσε στην ανάλυση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και της ηλεκτροφόρησης σε διαβαθμισμένο αποδιατακτικό πήκτωμα (PCR-DGGE analysis). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης αυτής επιβεβαίωσαν την ύπαρξη μόνο του βακτηρίου *C. butyricum* στον χημειοστάτη, δεδομένου ότι κατά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR διαπιστώθηκε μόνο μια ζώνη, η οποία αντιστοιχούσε στην ζώνη της μητρικής καλλιέργειας του μικροοργανισμού (Εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1 Αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της PCR. Στην θέση A, η ζώνη που αντιστοιχεί στο δείγμα της μητρικής καλλιέργειας του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 και στην θέση B, η ζώνη που αντιστοιχεί στο δείγμα κυττάρων από την συνεχή καλλιέργεια.

Τα αποτελέσματα της PCR-DGGE ανάλυσης αναφορικά με την καθαρότητα της καλλιέργειας ενισχύονται επίσης από την απουσία ανίχνευσης αγνώστων μεταβολικών προϊόντων στο μέσο της καλλιέργειας με την βοήθεια της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, αλλά και από το ικανοποιητικό ποσοστό ανάκτησης του ισοζυγίου του άνθρακα ($R_C=95.6$ % κ.β.). Παρόλα αυτά πρέπει να υπογραμμιστεί ότι ο όριο ανίχνευσης της μεθόδου PCR-DGGE έγκειται στο εύρος των 3 έως 4 λογαριθμικών κύκλων ($\log_{10}CFU/g$) του μικροβιακού πληθυσμού (Cocolin et al., 2001), αρά η πιθανότητα της παρουσίας άλλων μικροοργανισμών στον χημειοστάτη δεν μπορεί να αποκλειστεί ολοκληρωτικά, αλλά ενδεχομένως ο πληθυσμός αυτών να είναι σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα και σε βαθμό τέτοιο, ώστε να μην διακινδυνεύσει η ομαλή τέλεση της ζύμωσης. Γενικά, η βιομετατροπή της γλυκερόλης σε 1,3-προπανοδιόλη θεωρείται ως μια εξειδικευμένη βιοδιεργασία, δοθέντος του γεγονότος ότι η εν λόγω διόλη παράγεται από φυσικά στελέχη βακτηρίων μόνον κατά την παρουσία γλυκερόλης στο θρεπτικό μέσο ως μοναδική πηγή άνθρακα ή ως συν-υπόστρωμα (Biebl et al., 1999; Zeng and Biebl, 2002; Papanikolaou, 2009). Ακόμη, η παρουσία αυτής καθεαυτής της ακάθαρτης γλυκερόλης, και κατ' επέκταση των διαφόρων προσμίξεων που μπορεί να ευρίσκονται στην σύστασή της, δύναται να αποτελέσει περιοριστικό παράγοντα της μικροβιακής αύξησης για ορισμένα βακτήρια (Petitdemange et al., 1995), ενώ και η παρουσία αναερόβιων συνθηκών καλλιέργειας που απαιτούνται για την αύξηση του βακτηρίου *C. butyricum* θεωρείται ως ένας επιπλέον αποτρεπτικός-παρεμποδιστικός παράγοντας της αύξησης για ένα ευρύ φάσμα μικροοργανισμών. Εξάλλου, η παρουσία του μεταβολικού προϊόντος-στόχου της προτεινόμενης βιοδιεργασίας στο θρεπτικό μέσο, η 1,3-προπανοδιόλη, μπορεί να θεωρηθεί ως ανασταλτικός παράγοντας για την αύξηση μικροοργανισμών μη δυνάμενων να συνθέσουν την εν λόγω διόλη και επομένως μη ανθεκτικών στην παρουσία αυτής.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν την σταθερότητα της βιοδιεργασίας κατά την συνεχή καλλιέργεια του βακτηρίου *C. butyricum* υπό μη στείρες συνθήκες, επόμενο βήμα του πειραματικού σχεδιασμού αποτέλεσε μια σειρά από συνεχείς μη στείρες καλλιέργειες του μικροοργανισμού, με

υψηλή συγκέντρωση γλυκερόλης στο θρεπτικό μέσο εισόδου της καλλιέργειας ($S_0=80$ g/L, χρήση ακάθαρτης γλυκερόλης), σε συνδυασμό με διαφορετικούς ρυθμούς αραίωσης (D). Τα πειραματικά δεδομένα που ελήφθησαν κατά την επίτευξη κατάστασης δυναμικής ισορροπίας στον χημειοστάτη συνοψίζονται στον ακόλουθο Πίνακα 3.20. Σε κάθε περίπτωση, η παραγωγή βιομάζας ήταν σταθερή και ελάμβανε τιμές περί τα 0.8 g/L, ενώ η παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης βρέθηκε να αυξάνει κατά την εφαρμογή χαμηλών ρυθμών αραίωσης. Η μέγιστη δε συγκέντρωση αυτής ήταν 30.1 g/L σε ρυθμό αραίωσης $D=0.04$ h⁻¹, ενώ η μέγιστη παραγωγικότητα αυτής ήταν ίση με 1.87 g/L/h κατά την εφαρμογή της συνεχούς καλλιέργειας σε ρυθμό αραίωσης $D=0.08$ h⁻¹.

Πίνακας 3.20 Πειραματικά αποτελέσματα του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 σε κατάσταση δυναμικής ισορροπίας κατά την συνεχή καλλιέργεια του σε μη στειρές συνθήκες ζύμωσης, με την γλυκερόλη ως μοναδική πηγή άνθρακα ($S_0=80$ g/L) κατά την υπαγωγή της καλλιέργειας σε διαφορετικούς ρυθμούς αραίωσης

D (h ⁻¹)	S _r (g/L)	X (g/L)	1,3-PDO (g/L)	But (g/L)	Ace (g/L)	Lac (g/L)	Y _{PDO/S} (g/g)	P _{PDO} (g/L/h)	R _C (% w/w)
0.04	23.1	0.8	30.1	1.9	2.2	8.4	0.53	1.20	90.7
0.06	26.2	0.8	26.6	1.3	2.4	6.3	0.50	1.60	86.2
0.08	35.1	0.8	23.4	1.2	2.6	5.1	0.52	1.87	91.1
0.10	45.8	0.7	18.1	1.4	2.8	4.3	0.53	1.80	95.8

Αύξηση σε ακάθαρτη γλυκερόλη. Εμφάνιση του ρυθμού αραίωσης (D, h⁻¹), της υπολειπόμενης γλυκερόλης (S_r, g/L), της παραγόμενης βιομάζας (X, g/L), της παραγόμενης 1,3-προπανοδιόλης (1,3-PDO, g/L), του παραγόμενου βουτυρικού οξέος (But, g/L), του παραγόμενου οξικού οξέος (Ace, g/L), του παραγόμενου γαλακτικού οξέος (Lac, g/L), του συντελεστή απόδοσης της παραγόμενης 1,3-προπανοδιόλης προς την καταναλωθείσα γλυκερόλη (Y_{PDO/S}, g/g), της παραγωγικότητας της 1,3-προπανοδιόλης (P_{PDO}, g/L/h) και του ποσοστού ανάκτησης του άνθρακα (R_C, % w/w).

Όσον αφορά στην παραγωγή οργανικών οξέων, παρατηρήθηκε ότι η υπαγωγή της καλλιέργειας σε υψηλούς ρυθμούς αραίωσης ευνόησε την σύνθεση του οξικού οξέος, ενώ σε χαμηλούς ρυθμούς αραίωσης ευνοήθηκε η παραγωγή γαλακτικού οξέος. Άξιο αναφοράς είναι το γεγονός ότι το γαλακτικό οξύ βρέθηκε να είναι σε κάθε περίπτωση το επικρατέστερο οργανικό οξύ στον χημειοστάτη. Αντίθετα, η συγκέντρωση του βουτυρικού οξέος παρουσίασε διακυμάνσεις κατά την εφαρμογή διαφορετικών ρυθμών αραίωσης. Επιπρόσθετα, είναι χαρακτηριστική η σταθερότητα της βιομετατροπής της ακάθαρτης γλυκερόλης σε 1,3-προπανοδιόλη, δεδομένου ότι ο αντίστοιχος συντελεστής απόδοσης $Y_{PDO/S}$ κυμαινόταν στο εύρος 0.50 έως 0.53 g/g, ενώ μη αμελητέες ποσότητες της γλυκερόλης ευρίσκονταν σε κάθε υπαγόμενο ρυθμό αραίωσης στον χημειοστάτη. Συγκρίνοντας τα ανωτέρω αποτελέσματα με την διεθνή βιβλιογραφία, διαπιστώνεται πως παρόμοιες συγκεντρώσεις 1,3-προπανοδιόλης έχουν ληφθεί και σε άλλες μελέτες κατά την συνεχή καλλιέργεια στελεχών του βακτηρίου *C. butyricum* σε στείρες συνθήκες (Πίνακας 3.21). Συγκεκριμένα, οι González-Pajuelo et al. (2004) παρήγαγαν 30.5 g/L 1,3-προπανοδιόλης κατά την συνεχή καλλιέργεια του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 3266, χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα ακάθαρτη γλυκερόλη.

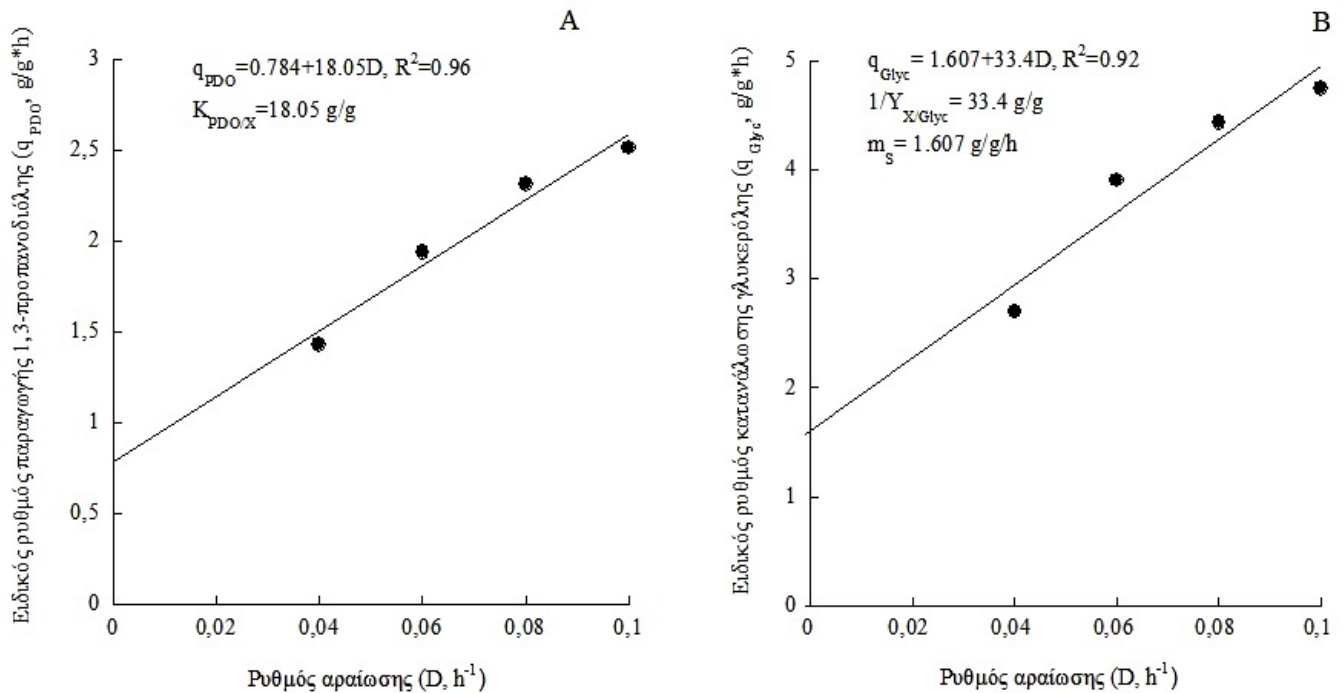
Πίνακας 3.21. Συγκριτικός πίνακας αποτελεσμάτων κατά την συνεχή καλλιέργεια άγριων στελεχών του βακτηρίου *C. butyricum* σε βιομηχανική γλυκερόλη.

Είδος	Στέλεχος	D (h ⁻¹)	PDO (g/L)	$Y_{PDO/Glyc}$ (g/g)	Q_{PDO} (g/L/h)	Αναφορά
<i>C. butyricum</i>	VPI 3266	0.1	31.5	0.61	3.1	González-Pajuelo et al. (2004))
<i>C. butyricum</i>	F2b	0.02	48.1	0.55	0.9	Papanikolaou et al. (2000)
<i>C. butyricum</i>	F2b	0.04	44.0	0.51	1.7	Papanikolaou et al. (2004)
<i>C. butyricum</i>	VPI 1718	0.06	30.1	0.53	1.2	Παρούσα μελέτη (Κεφ. 3.5 Μη-στείρες συνθήκες)
<i>C. butyricum</i>	VPI 1718	0.02	31.1	0.45	0.6	Παρούσα μελέτη (Κεφ. 3.4)

Εξάλλου, οι Papanikolaou et al. (2000) παρήγαγαν 48.1 g/L 1,3-προπανοδιόλης κατά την καλλιέργεια του βακτηρίου *C. butyricum* F2b σε συνεχές μονοβάθμιο σύστημα καλλιέργειας με υπόστρωμα ακάθαρτη γλυκερόλη, ενώ κατά την καλλιέργεια του ίδιου βακτηρίου σε διβάθμιο συνεχές σύστημα παρήχθησαν 42.8 g/L 1,3-προπανοδιόλης.

Επιπλέον, ακολούθησε η επεξεργασία των κινητικών δεδομένων που ελήφθησαν από τις συνεχείς καλλιέργειες του μικροοργανισμού *C. butyricum* υπό μη στείρες συνθήκες (οι εξισώσεις παρουσιάζονται στο Κεφ, 3.4). Συσχετίζοντας τον ειδικό ρυθμό παραγωγής της 1,3-προπανοδιόλης (q_{PDO}) με τον εκάστοτε ρυθμό αραίωσης (D), προέκυψε ότι η 1,3-προπανοδιόλη μπορεί να θεωρηθεί ως ένας μεταβολίτης μερικώς συνδεδεμένος με την μικροβιακή αύξηση για το συγκεκριμένο στέλεχος του βακτηρίου *C. butyricum*, με τον συντελεστή $K_{PDO/X}$ να λαμβάνει την τιμή 18.05 g/g (Γράφημα 3.26 A).

Αντιθέτως, οι Papanikolaou et al. (2000) έδειξαν ότι για το βακτήριο *C. butyricum* F2b η παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης ήταν μια μεταβολική διεργασία άμεσα συνδεδεμένη με την μικροβιακή αύξηση ($K_{PDO/X}=9.4$ g/g). Ακόμη, η συσχέτιση του ειδικού ρυθμού κατανάλωσης της γλυκερόλης (q_{Glyc}) με τον εκάστοτε ρυθμό αραίωσης (D) έδειξε ότι ο μέγιστος θεωρητικός συντελεστής απόδοσης της βιομάζας ($Y_{X/Glyc}$) ήταν ίσος με 0.029 g ανά g καταναλωθείσας γλυκερόλης, ενώ ο συντελεστής συντήρησης των κυττάρων (cell maintenance coefficient, m_s) έλαβε την τιμή 1.607 g/g/h (Γράφημα 3.26 B). Αντίστοιχα, οι Papanikolaou et al. (2000) αναφέρουν ότι κατά την συνεχή καλλιέργεια του βακτηρίου *C. butyricum* F2b, οι αντίστοιχες τιμές των ανωτέρω παραμέτρων ήταν 0.057 g/g για τον μέγιστο θεωρητικό συντελεστή απόδοσης της βιομάζας ($Y_{X/Glyc}$) και 0.47 g/g/h για τον συντελεστή συντήρησης των κυττάρων (cell maintenance coefficient, m_s).

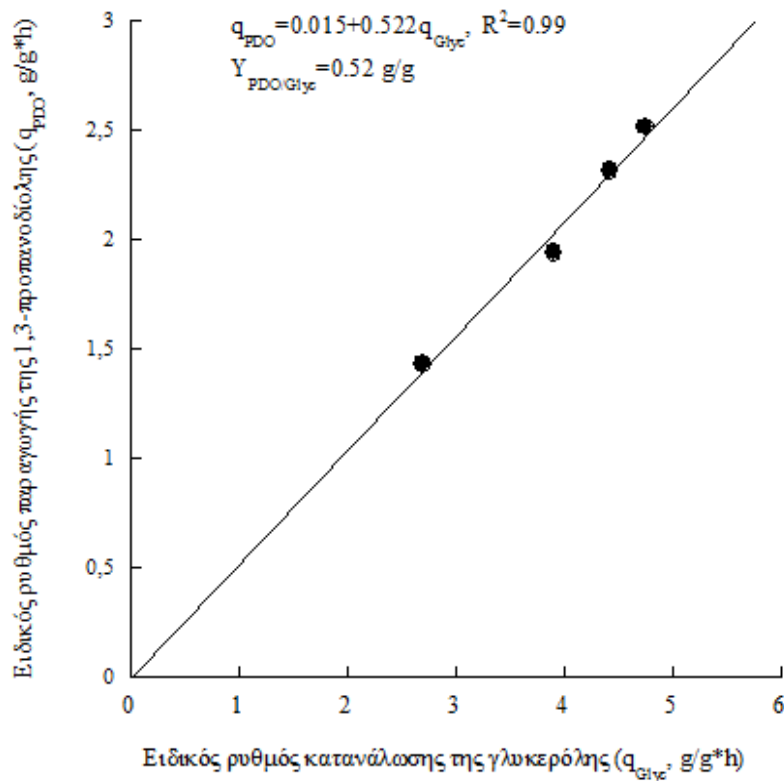


Γράφημα 3.26 Παρουσίαση της συσχέτισης του ειδικού ρυθμού παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης ως προς τον ρυθμό αραίωσης (A) και του ειδικού ρυθμού κατανάλωσης της ακάθαρτης γλυκερόλης ως προς τον ρυθμό αραίωσης (B), κατά την συνεχή καλλιέργεια του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 υπό μη στείρες συνθήκες ($S_0=80 \text{ g/L}$)

Επιπρόσθετα, κατά την συσχέτιση του ειδικού ρυθμού παραγωγής της 1,3-προπανοδιόλης (q_{PDO}) με τον ειδικό ρυθμό κατανάλωσης της ακάθαρτης γλυκερόλης (q_{Glyc}), προέκυψε ότι ο μέγιστος συντελεστής απόδοσης της 1,3-προπανοδιόλης κατά τις συνεχείς καλλιέργειες του βακτηρίου *C. butyricum* υπό μη στείρες συνθήκες ήταν ίσος με 0.52 g ανά g καταναλωθέντος υποστρώματος (Γράφημα 3.27).

Συμπερασματικά, στην παρούσα μελέτη παρουσιάστηκε η δυνατότητα της επιτυχούς τέλεσης της βιομετατροπής της ακάθαρτης γλυκερόλης σε 1,3-προπανοδιόλη υπό μη στείρες συνθήκες, σε ασυνεχή, ημι-συνεχή και συνεχή συστήματα καλλιέργειας. Υπό τις δεδομένες συνθήκες ζύμωσης, επετεύχθη τόσο αξιοσημείωτη παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης αλλά και ικανοποιητική παραγωγικότητα του εν λόγω μεταβολίτη. Επομένως, μπορεί να ειπωθεί ότι τα

ανωτέρω αποτελέσματα αποτελούν μια ελπιδοφόρα βάση στην εξέλιξη της εφαρμογής της προτεινόμενης βιοδιεργασίας σε βιομηχανική κλίμακα.



Γράφημα 3.7 Παρουσίαση της συσχέτισης του ειδικού ρυθμού παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης ως προς τον ειδικό ρυθμό κατανάλωσης της ακάθαρτης γλυκερόλης, κατά την συνεχή καλλιέργεια του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 υπό μη στείρες συνθήκες ($S_0=80$ g/L).

Τα αποτελέσματα του παρόντος κεφαλαίου έχουν δημοσιευθεί:

Chatzifragkou A, Papanikolaou S, Dietz D, Doulgeraki AI, Nychas GJE, Zeng AP (2011) “Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* growing on biodiesel-derived crude glycerol through a non-sterilized fermentation process”, Applied Microbiology and Biotechnology, 91 (1):101-102.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ- ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Η βιοτεχνολογική παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για το επιστημονικό πεδίο των μικροβιακών ζυμώσεων. Το παγκόσμιο ενδιαφέρον για την παραγωγή εναλλακτικών, οικολογικών καυσίμων, οδήγησε στη ραγδαία αύξηση της βιομηχανίας παραγωγής βιολογικών καυσίμων, όπως το βιολογικό πετρέλαιο και η βιολογική αιθανόλη, με άμεσο επακόλουθο την δημιουργία τεραστίων αποθεμάτων βιομηχανικής γλυκερόλης. Ως εκ τούτου, η ανάπτυξη νέων τεχνολογιών για την μετατροπή της βιομηχανικής γλυκερόλης σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας με την συνδρομή της επιστήμης της Βιοτεχνολογίας, αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη οδό για την αντιμετώπιση του φαινομένου αυτού. Εξάλλου, το σύνολο των εν λόγω τεχνολογιών έγκειται στο ευρύτερο πλαίσιο εφαρμογής της έννοιας της ολοκληρωμένης ανάπτυξης των βιοδιωλιστηρίων (Integrated biorefinery concept).

Παρόλο που, γενικά, η γλυκερόλη δεν αποτελεί επικίνδυνη ουσία και αποικοδομείται εύκολα στο περιβάλλον, το απόβλητο της γλυκερόλης από την βιομηχανία παραγωγής βιολογικών καυσίμων δύναται να περιέχει διάφορες συγκεντρώσεις από υπολείμματα καταλυτών, μεθανόλης, νερού, αλάτων, καθώς επίσης και ελεύθερων λιπαρών οξέων. Για την δυνατότητα πώλησής της, ο βαθμός καθαρότητας της βιομηχανικής γλυκερόλης πρέπει να κυμαίνεται στο 80% κ.β., με λιγότερο από 1% κ.β. μεθανόλης στην σύστασή της, ενώ κλάσματα αυτής με χαμηλή περιεκτικότητα σε γλυκερόλη ή υψηλή περιεκτικότητα σε μεθανόλη, πρακτικά δεν έχουν αξία. Εξάλλου, το γεγονός ότι τα απόνερα της βιομηχανικής γλυκερόλης ποικίλλουν σε σύσταση υπολειμμάτων καθιστά συχνά δύσκολη την απαλλαγή και την πώλησή τους από τις βιομηχανίες παραγωγής βιολογικού καυσίμου.

Υπό αυτό το πρίσμα, στη παρούσα διατριβή διερευνήθηκε πρωτίστως η επίδραση των διαφόρων προσμίξεων-υπολειμμάτων που δύναται να ευρεθούν στην σύσταση της βιομηχανικής γλυκερόλης, στην αύξηση του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718, αλλά και στην δυνατότητα

παραγωγής της 1,3-προπανοδιόλης από τον μικροοργανισμό. Οι προσμίξεις που μελετήθηκαν αφορούσαν στις συχνότερα απαντώμενες με βάση την διεθνή βιβλιογραφία, σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από αυτές που συνήθως αναφέρονται, και περιελάμβαναν φωσφορικά άλατα καλίου και νατρίου, μεθανόλη, καθώς επίσης και ελαϊκό οξύ. Αναφορικά με την παρουσία φωσφορικών αλάτων στο θρεπτικό μέσο, διαπιστώθηκε ότι η ύπαρξή τους σε συγκέντρωση έως 30% (κ.β. επί της γλυκερόλης) κατά την καλλιέργεια του μικροοργανισμού σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου, ήτοι σε βέλτιστες συνθήκες ζύμωσης, ουδόλως επηρέασε την μικροβιακή αύξηση και την σύνθεση της 1,3-προπανοδιόλης. Το ίδιο διαπιστώθηκε και στην περίπτωση της παρουσίας της μεθανόλης στο θρεπτικό μέσο, ενώ κατά την τέλεση συνεχούς συστήματος καλλιέργειας, η προσθήκη μεθανόλης έως και 5 g/L, δεν εμπόδισε την είσοδο της καλλιέργειας σε κατάσταση δυναμικής ισορροπίας μετά την απομάκρυνση της μεθανόλης από τον χημειοστάτη. Αντιθέτως, η παρουσία του ελαϊκού οξέος βρέθηκε να ασκεί πλήρη παρεμπόδιση στην μικροβιακή αύξηση, περὶν της συγκέντρωσης του 1% (κ.β.), η οποία αποτέλεσε το μέγιστο όριο ανεκτικότητας για το βακτήριο *C. butyricum* VPI 1718. Επιπρόσθετα, η τέλεση αντίστοιχου πειράματος κατά το οποίο το ελαϊκό οξύ αντικαταστάθηκε με την στεαρίνη (μίγμα κορεσμένων λιπαρών οξέων αποτελούμενο κυρίως από στεατικό οξύ) έδειξε ότι η αρνητική επίδραση που ασκεί το ελαϊκό οξύ οφείλεται στην παρουσία του διπλού δεσμού στο μόριο του εν λόγω λιπαρού οξέος. Από όλα τα παραπάνω, συμπεραίνεται ότι ο εν λόγω μικροοργανισμός παρουσιάζει σημαντική ανεκτικότητα στις διάφορες προσμίξεις της βιομηχανικής γλυκερόλης, ιδιότητα που δεν συναντάται συχνά σε βακτήρια δυνάμενα να αποικοδομήσουν την γλυκερόλη και αποτελεί έναν αδύναμο κρίκο στο ευρύτερο φάσμα εφαρμογής της προπανοδιολικής ζύμωσης. Στο σημείο αυτό, αξίζει να υπογραμμιστεί ότι η προαναφερθείσα ανεκτικότητα του στελέχους επιβεβαιώθηκε και κατά την εφαρμογή της ζύμωσης της 1,3-προπανοδιόλης υπό μη-στείρες συνθήκες καλλιέργειας. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιήθηκαν ως μόνη πηγή άνθρακα τρία κλάσματα βιομηχανικής γλυκερόλης, προερχόμενης από την βιομηχανία παραγωγής βιολογικού πετρελαίου, διαφορετικής σύστασης και

πραγματοποιήθηκε επιτυχής τέλεση της βιομετατροπής, με συγκρίσιμες τελικές συγκεντρώσεις της 1,3-προπανοδιόλης (Κεφ. 3.5). Συνεπώς, από την παρούσα μελέτη διαπιστώνεται ότι το εν λόγω στέλεχος του βακτηρίου *C. butyricum* δύναται να αποικοδομήσει ένα ευρύ φάσμα απόνερων γλυκερόλης, ποικίλης σύστασης και προελεύσεως, καθιστώντας τον ένα πολλά υποσχόμενο μικροοργανισμό στα πλαίσια της τέλεσης της προπανοδιολικής ζύμωσης.

Η τέλεση της βιομετατροπής της βιομηχανικής γλυκερόλης σε 1,3-προπανοδιόλη κατά την διεξαγωγή καλλιέργειών του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου οδήγησε σε σημαντικά ευρήματα, σχετιζόμενα τόσο με την εκάστοτε στρατηγική αναεροβίωσης που ακολουθείτο, όσο και με την γεωμετρία του βιοαντιδραστήρα. Ειδικότερα, για το συγκεκριμένο στέλεχος διαπιστώθηκε ότι η επίτευξη αναερόβιου περιβάλλοντος στην καλλιέργεια μέσω των παραγόμενων αερίων εκ του μικροβιακού μεταβολισμού, ήτοι της αποκαρβοξυλίωσης του πυροσταφυλικού οξέος, σε βιοαντιδραστήρα με χαμηλό λόγο διαμέτρου/ ύψους δοχείου, ευνόησε την ενεργότητα του ενζύμου της γαλακτικής αφυδρογονάσης. Ως εκ τούτου, έλαβε χώρα η παραγωγή μη αμελητέων ποσοτήτων γαλακτικού οξέος, ενός μεταβολικού προϊόντος ανταγωνιστικού σε αναγωγικούς παράγοντες (NADH) ως προς το βιοχημικό μονοπάτι της σύνθεσης της 1,3-προπανοδιόλης. Αξίζει να σημειωθεί ότι η εν λόγω παρατήρηση επί της βιοχημικής μεταβολής στελεχών βακτηρίων ανηκόντων στο είδος *C. butyricum* κατά την επίτευξη αναερόβιου περιβάλλοντος μέσω διαφορετικών στρατηγικών απομάκρυνσης του οξυγόνου από το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας, αναφέρεται για πρώτη φορά στην διεθνή βιβλιογραφία. Η διερεύνηση του φαινομένου αυτού οδήγησε στο συμπέρασμα ότι ο συνδυασμός συνθηκών αυτό-παραγόμενης αναεροβίωσης και εφαρμογής της διεργασίας σε βιοαντιδραστήρα μικρού όγκου, προκαλεί μείωση της ενεργότητας του ενζύμου της NADH-οξειδοαναγωγής της φερρεδοξίνης στο επίπεδο της φωσφοροκλαστικής αντίδρασης εξαιτίας της ανεπαρκούς επίτευξης αναερόβιου περιβάλλοντος. Ωστόσο, το φαινόμενο αυτό φαίνεται να αίρεται κατά την τέλεση της προπανοδιολικής ζύμωσης σε εργαστηριακό βιοαντιδραστήρα μεγαλύτερου όγκου, υπό συνθήκες

είτε αυτό-παραγόμενης αναεροβίωσης, είτε με συνεχή εμφύσηση αερίου αζώτου στο μέσο της καλλιέργειας.

Όσον αφορά στην διερεύνηση της ικανότητας του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 να παράγει ικανοποιητικές ποσότητες της 1,3-προπανοδιόλης κατά την αύξηση του σε υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης, τούτο κατέστη εφικτό με την εφαρμογή της βιοδιεργασίας σε βιοαντιδραστήρα ημι-διαλείποντος έργου. Πράγματι, ο μικροοργανισμός κατάφερε να συνθέσει 70.8 g/L 1,3-προπανοδιόλης, συνοδευόμενα από έναν εξίσου ικανοποιητικό συντελεστή βιομετατροπής $Y_{PDO/S}$ της τάξεως των 0.55 g ανά g καταναλωθείσας γλυκερόλης. Η εν λόγω τελική συγκέντρωση της 1,3-προπανοδιόλης συγκαταλέγεται μεταξύ των υψηλότερων της διεθνούς βιβλιογραφίας, σχετιζόμενων με την χρήση φυσικών στελεχών βακτηρίων και την αξιοποίηση της βιομηχανικής γλυκερόλης ως υπόστρωμα της μικροβιακής αύξησης (βλέπε επίσης και Πίνακα 1.1 του Κεφαλαίου 1). Υπό αυτό το πρίσμα, η συνέχιση της βελτιστοποίησης της διαδικασίας της καλλιέργειας σε βιοαντιδραστήρα ημι-διαλείποντος έργου, με την αυτοματοποίηση της τροφοδοσίας και την μέτρηση των παραμέτρων της καλλιέργειας σε πραγματικό χρόνο (on-line), δύναται να μεγιστοποιήσει την παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης από το βακτήριο *C. butyricum* VPI 1718. Η πεποίθηση αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι το εν λόγω στέλεχος εμφάνισε αξιοσημείωτη αντοχή κατά την αύξηση του σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος και συνεχούς έργου, με εξωγενή προσθήκη διαφόρων συγκεντρώσεων της 1,3-προπανοδιόλης. Ειδικότερα, στην περίπτωση της τέλεσης της βιοδιεργασίας σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου, ο μικροοργανισμός βρέθηκε να ανθίσταται ακόμα και στην περίπτωση που το σύνολο της εξωγενώς προστιθέμενης και της βιοχημικώς συντεθειμένης 1,3-προπανοδιόλης ξεπερνούσε τα 70 g/L, συνεχίζοντας τόσο τον καταβολισμό της διαθέσιμης γλυκερόλης, όσο και την παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης. Αντιστοίχως, κατά την τέλεση της ζύμωσης σε βιοαντιδραστήρα συνεχούς έργου με εξωγενή προσθήκη 1,3-προπανοδιόλης κατά την κατάσταση δυναμικής ισορροπίας της καλλιέργειας, δεν παρατηρήθηκαν φαινόμενα έκπλυσης και το σύστημα κατάφερε σε κάθε

περίπτωση να εισέλθει ξανά σε κατάσταση δυναμικής ισορροπίας μετά την απομάκρυνση της προστεθείσας διόλης.

Επιπρόσθετα, σημαντικό κομμάτι του πειραματικού σχεδιασμού αποτέλεσε η διερεύνηση της δυνατότητας διεξαγωγής της προπανοδιολικής ζύμωσης σε συνεχή συστήματα καλλιέργειας. Το επιστημονικό ενδιαφέρον της εφαρμογής συνεχούς καλλιέργειας κατά την τέλεση μικροβιακών ζυμώσεων, έγκειται στο γεγονός ότι το εν λόγω σύστημα εφαρμόζεται ως επί το πλείστον στο πεδίο των βιομηχανικών ζυμώσεων. Ως εκ τούτου, η επιτυχής τέλεση της ζύμωσης της 1,3-προπανοδιόλης κατά την συνεχή καλλιέργεια του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 δύναται να αποτελέσει ένα ελπιδοφόρο στοιχείο στο εγχείρημα της εφαρμογής της βιοδιεργασίας αυτής σε βιομηχανική κλίμακα. Επιπλέον, η τέλεση συνεχούς καλλιέργειας σε εργαστηριακή κλίμακα, προσφέρει την δυνατότητα της εις βάθος μελέτης της αύξησης και της φυσιολογίας του εκάστοτε μικροοργανισμού. Εν προκειμένω, οι παράμετροι που διερευνήθηκαν κατά την τέλεση της προπανοδιολικής ζύμωσης αφορούσαν στην αύξηση του εφαρμοζομένου ρυθμού αραίωσης με σταθερή συγκέντρωση της γλυκερόλης στο θρεπτικό μέσο εισόδου και επίτευξη αναερόβιου περιβάλλοντος μέσω εμφύσησης αερίου αζώτου ή αυτό-παραγόμενης αναεροβίωσης, καθώς επίσης και στην αυξανόμενη συγκέντρωση της γλυκερόλης με χαμηλό ρυθμό αραίωσης. Υπό συνθήκες αυτό-παραγόμενης αναεροβίωσης, κατά την επίτευξη στάσιμου σταδίου της καλλιέργειας, ευρέθησαν μη αμελητέες ποσότητες του γαλακτικού οξέος εντός του χημειοστάτη, γεγονός που επέφερε σημαντική μείωση στην παραγωγικότητα της 1,3-προπανοδιόλης. Κατά την συνεχή εμφύσηση αζώτου, η παραγωγικότητα της 1,3-προπανοδιόλης ήταν ικανοποιητική, τόσο κατά την εναλλαγή του ρυθμού αραίωσης, όσο και κατά την αύξηση της βιομηχανικής γλυκερόλης στο θρεπτικό μέσο εισόδου. Ωστόσο, το γεγονός ότι ακόμα και σε χαμηλούς ρυθμούς αραίωσης, δεν παρατηρήθηκε εξάντληση του υποστρώματος εντός του χημειοστάτη, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι το εν λόγω στέλεχος του βακτηρίου *C. butyricum* δεν δύναται να χρησιμοποιηθεί για την τέλεση της διεργασίας σε βιομηχανική κλίμακα σε συνεχή συστήματα καλλιέργειας, καθώς η

εναπομείνασα γλυκερόλη θα αποτελούσε ένα σημαντικό μειονέκτημα κατά την εφαρμογή της κατιούσας επεξεργασίας για την ανάκτηση της 1,3-προπανοδιόλης. Αντιθέτως, όπως ειπώθηκε και πριν, η χρήση του μικροοργανισμού σε καλλιέργειες ημι-διαλείποντος έργου, δύναται να αποφέρει σημαντικές αποδόσεις της παραγόμενης 1,3-προπανοδιόλης, καθιστώντας την εφαρμογή της βιοδιεργασίας σε βιομηχανική κλίμακα οικονομικά συμφέρουσα.

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, ειδική μνεία δόθηκε στην μελέτη της σύστασης των κυτταρικών λιπιδίων του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718, με έμφαση στην διαφοροποίηση του προφίλ των λιπαρών οξέων του μικροοργανισμού κατά την καλλιέργεια του σε διάφορες συγκεντρώσεις εξωγενώς προστιθέμενης 1,3-προπανοδιόλης, καθώς επίσης και κατά τα στάδια στάδια των συνεχών καλλιεργειών. Η εν λόγω διερεύνηση πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά στα πλαίσια στη διεθνούς βιβλιογραφίας. Αρχικά, με έκπληξη διαπιστώθηκε η ύπαρξη του λινελαϊκού οξέος στην σύσταση των κυτταρικών λιπιδίων του βακτηρίου. Στην διεθνή βιβλιογραφία αναφέρεται ότι το βιοχημικό μονοπάτι της σύνθεσης των ακόρεστων λιπιδίων στον μεταβολισμό των αναερόβιων βακτηρίων τελείται από ένα σύνολο ενζυμικών αντιδράσεων, υπεύθυνων για την επιμήκυνση της ανθρακικής αλυσίδας των ενδιάμεσων *cis*-3 ακόρεστων λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου. Η επιβεβαίωση της ύπαρξης του λινελαϊκού οξέος στην σύσταση των λιπιδίων του μικροοργανισμού με την αέρια χρωματογραφία-φασματοσκοπία μάζας, αποτελεί πιθανή ένδειξη της ύπαρξης ενός επιπλέον μηχανισμού ενζυμικής φύσεως, μέσω του οποίου προστίθεται ένας ακόμη διπλός δεσμός στο μόριο του ελαϊκού οξέος. Εξάλλου, η εξωγενής προσθήκη της 1,3-προπανοδιόλης κατά την καλλιέργεια του μικροοργανισμού σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου, επέφερε σημαντικές αλλαγές στο προφίλ των κυτταρικών λιπιδίων του βακτηρίου *C. butyricum*, αυξάνοντας την ακορεστότητά τους. Την ίδια επίδραση βρέθηκε να ασκεί και η αυξανόμενη αρχική συγκέντρωση της βιομηχανικής γλυκερόλης επί της συστάσεως των λιπαρών οξέων της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Αντιθέτως, κατά την συνεχή καλλιέργεια του βακτηρίου, παρόλο που η προσθήκη της 1,3-προπανοδιόλης κατέστησε πιο κορεσμένα τα λιπίδια

του μικροοργανισμού, παρατηρήθηκε τάση αναστροφής του φαινομένου αυτού κατά την επαναφορά του συστήματος σε κατάσταση δυναμικής ισορροπίας. Το γεγονός αυτό δύναται να εξηγηθεί λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι στην περίπτωση των καλλιεργειών σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου, ο παράγοντας που προκαλεί στρες στην κυτταρική μεμβράνη, δηλαδή η προστιθέμενη 1,3-προπανοδιόλη, παρέμενε στο περιβάλλον της καλλιέργειας καθ' όλη την διάρκεια της τέλεσης της διεργασίας. Ως εκ τούτου, τα κύτταρα εκτίθενται για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε αυξημένες συγκεντρώσεις της 1,3-προπανοδιόλης γεγονός που φαίνεται ότι επιδρά συσσωρευτικά στην σύσταση των κυτταρικών λιπιδίων του μικροοργανισμού. Εν αντιθέσει, κατά την συνεχή καλλιέργεια του μικροοργανισμού, η αύξηση του ποσοστού των κορεσμένων λιπαρών οξέων που προκάλεσε η προσθήκη της 1,3-προπανοδιόλης, αίρεται κατά την εξέλιξη του μεταβατικού σταδίου της καλλιέργειας και μέχρι την επίτευξη στάσιμου σταδίου, ως αποτέλεσμα της σταδιακής απομάκρυνσης της διόλης από τον χημειοστάτη.

Εξάλλου, η διερεύνηση του προφίλ των λιπαρών οξέων του βακτηρίου *C. butyricum* κατά την επίτευξη στάσιμων σταδίων προσέφερε πρωτότυπες πληροφορίες σχετικά με την διακύμανση της σύστασης των λιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης του μικροοργανισμού στις εκάστοτε εφαρμοζόμενες συνθήκες της συνεχούς καλλιέργειας του. Ειδικότερα, η ύπαρξη αερίου αζώτου στο περιβάλλον της καλλιέργειας βρέθηκε να καθιστά το κλάσμα των κυτταρικών λιπιδίων του μικροοργανισμού πιο κορεσμένο, εν συγκρίσει με την αντίστοιχη κατανομή της σύστασης των λιπιδίων κατά την επίτευξη στάσιμου σταδίου υπό συνθήκες αυτό-παραγόμενης αναερόβιωσης. Επιπρόσθετα, διαπιστώθηκε ότι η αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης της πηγής άνθρακα στο θρεπτικό μέσο εισόδου καθιστά την σύσταση των κυτταρικών λιπιδίων του βακτηρίου σαφώς πιο κορεσμένη. Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε αντίθεση με τα αντίστοιχα αποτελέσματα που ελήφθησαν κατά την καλλιέργεια του μικροοργανισμού σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου, όπου είχε διαπιστωθεί ότι η αυξανόμενη αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης καθιστούσε το σύνολο των κυτταρικών λιπιδίων πιο ακόρεστο. Η ανομοιομορφία αυτή οφείλεται πιθανώς στο γεγονός ότι

τα ανωτέρω αποτελέσματα αφορούν στην αύξηση του μικροοργανισμού σε διαφορετικά συστήματα καλλιέργειας, με άμεσο επακόλουθο την διαφοροποίηση της βιοχημικής απόκρισης του βακτηρίου, ακόμα και σε επίπεδο σύστασης των κυτταρικών λιπιδίων του. Από όλα τα παραπάνω, καθίσταται σαφές ότι η κυτταρική μεμβράνη του βακτηρίου *C. butyricum*, δύναται να εμφανίσει αξιοσημείωτες μεταβολές σε επίπεδο σύστασης των κυτταρικών της λιπιδίων, ως αποδέκτης των διαφόρων συνθηκών καλλιέργειας που εφαρμόζονται κατά περίπτωση. Τα σχετικά πειραματικά δεδομένα που προέκυψαν από την παρούσα διατριβή μπορούν να αποτελέσουν την απαρχή για την έρευνα επί της απόκρισης της κυτταρικής μεμβράνης των βακτηρίων σε επίπεδο λιπιδίων, κατά την αύξηση των κυττάρων σε διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες στρες. Στο σημείο αυτό αξίζει να τονιστεί ότι η ανάλυση των διαφόρων βιοχημικών μονοπατιών της σύνθεσης λιπιδίων των βακτηρίων, με έμφαση στους παθογόνους μικροοργανισμούς, αποτελεί στόχο και πεδίο έρευνας της Ιατρικής Μικροβιολογίας για την εύρεση φαρμάκων με αποτελεσματική και επιλεκτική αντιβακτηριακή δράση.

Τέλος, στη παρούσα διατριβή παρουσιάστηκε η δυνατότητα της επιτυχούς τέλεσης της ζύμωσης της προπανοδιόλης υπό μη στείρες συνθήκες καλλιέργειας για πρώτη φορά στην διεθνή βιβλιογραφία. Τούτο εκφράστηκε μέσα από την εφαρμογή της καλλιέργειας του μικροοργανισμού σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος, ημι-διαλείποντος και συνεχούς έργου. Ανεξάρτητα από τον εκάστοτε τύπο της καλλιέργειας, με βάση τον συντελεστή μετατροπής της βιομηχανικής γλυκερόλης σε 1,3-προπανοδιόλη ($Y_{PDO/S}$) διαπιστώθηκε η σταθερότητα της βιοδιεργασίας υπό τις δεδομένες συνθήκες καλλιέργειας, ενώ κατά την διεξαγωγή της ζύμωσης σε βιοαντιδραστήρα ημι-διαλείποντος έργου, παρήχθησαν αξιοσημείωτες ποσότητες της 1,3-προπανοδιόλης (67.9 g/L). Τα εν λόγω αποτελέσματα κρίνονται ως ιδιαίτερος ενθαρρυντικός, λαμβάνοντας υπ' όψιν την μείωση του κόστους της βιομηχανικής εφαρμογής της διεργασίας σε νερό και ενέργεια, μέσω της απαλοιφής της ανάγκης για την αποστείρωση του εξοπλισμού. Ως εκ τούτου, η προοπτική της εφαρμογής της προτεινόμενης διεργασίας σε ημι-βιομηχανική και βιομηχανική κλίμακα προκαλεί

ιδιαίτερο ενδιαφέρον, υπό το γενικότερο πρίσμα της προσπάθειας για την βιομηχανική εφαρμογή της προπανοδιολικής ζύμωσης.

Συμπερασματικά, η βιοτεχνολογική παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη διεργασία, η οποία σε συνδυασμό με την αξιοποίηση φθηνών, ανανεώσιμων υλικών ως υποστρωμάτων και την βελτιστοποίηση της τεχνολογίας της, δύναται να ανταγωνιστεί τις αντίστοιχες χημικές οδούς σύνθεσης της. Επιπροσθέτως, η ενδεχόμενη βιομηχανική εφαρμογή της προπανοδιολικής ζύμωσης, όπως αυτή εξετάστηκε στην παρούσα διατριβή, μπορεί να αποτελέσει το έναυσμα για την εφαρμογή μικροβιακών ζυμώσεων, απαλλαγμένων από την αποκλειστική εξάρτηση τους από τα διαρκώς μειούμενα αποθέματα ενέργειας, καθιστώντας την εκάστοτε βιομετατροπή φιλικότερη προς το περιβάλλον.



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ**

- Abbad-Andaloussi S, Manginot-Dürr C, Amine J, Petitdemange E, Petitdemange H (1995) Isolation and characterization of *Clostridium butyricum* DSM 5431 mutants with increased resistance to 1,3-propanediol and altered production of acids. *Appl Environ Microbiol* 61:4413-4417.
- Abbad-Andaloussi S, Guedon E, Spiesser E, Petitdemange H (1996) Glycerol dehydratase activity: The limiting step for 1,3-propanediol production by *Clostridium butyricum* DSM 5431. *Lett Appl Microbiol* 22:311-314.
- Abbad-Andaloussi S, Amine J, Gerard P, Petitdemange H (1998) Effect of glucose on glycerol metabolism by *Clostridium butyricum* DSM 5431. *J Appl Microbiol* 84:515-522.
- Achten WMJ, Mathijs E, Verchot L, Singh VP, Aerts R, Muys B (2007) *Jatropha* biodiesel fueling sustainability? *Biofuels, Bioprod Biorefin* 1:283-291.
- Ahmad F, Hughes JB, Bennett GN (2005) Biodegradation of hazardous materials by Clostridia. In: Dürre P (Ed.) *Handbook on Clostridia*, Taylor and Francis Group, LCC, pp.831-854.
- Amaral PF, Ferreira TF, Fontes GC, Coelho MAZ (2009) Glycerol valorization: New biotechnological routes. *Food Bioprocess Tech* 87(3):179-186.
- Ames TT (2002) Process for the isolation of 1,3-propanediol from fermentation broth. US Patent 6.361.983 B1
- André A, Diamantopoulou P, Philippoussis A, Sarris D, Komaitis M, Papanikolaou S (2010) Biotechnological conversions of bio-diesel derived water glycerol into added-value compounds by higher fungi: production of biomass, single cell oil and oxalic acid. *Ind Crop Prod* 31(2):407-416.
- Andreesen JR, Bahl H, Gottshark G (1989) Introduction to the physiology and biochemistry of the genus *Clostridium*. In: Minton NP, Clarke DJ (Eds.), *Clostridia*, Plenum Press, New York, pp. 27-62.

- Antoni D, Zverlov VV, Schwarz WH (2007) Biofuels from microbes. *App Microb Biotechnol* 77:23-35.
- Athalye SK, Garcia RA, Wen Z (2009) Use of biodiesel-derived crude glycerol for producing eicosapentaenoic acid (EPA) by the fungus *Pythium irregulare*. *J Agric Food Chem* 57:2739-2744.
- Baer SH, Blaschek HP, Smith TL (1987) Effect of butanol challenge and temperature on lipid composition and membrane fluidity of butanol-tolerant *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Environ Microbiol* 53(12):2854-2861.
- Balat M, Balat H, Oz C (2008) Progress in bioethanol processing. *Prog Energy Combust Sci* 34:551-573.
- Barbirato F, Camarasa-Claret C, Grivet JP (1995) Glycerol fermentation by a new 1,3-propanediol-producing microorganism: *Enterobacter agglomerans*. *Appl Microbiol Biotechnol* 43:786-793.
- Barbirato F, Soucaille P, Bories A (1996) Physiologic mechanisms involved in accumulation of 3-hydroxypropionaldehyde during fermentation of glycerol by *Enterobacter agglomerans*. *Appl Environ Microbiol* 62:4405-4409.
- Barbirato F, Astruc S, Soucaille P, Camarasa C, Salmon JM, Bories A (1997) Anaerobic pathways of glycerol dissimilation by *Enterobacter agglomerans* CNCM 1210: limitations and regulations. *Microbiology* 143:2423-2432.
- Barbirato F, Himmi EH, Conte T, Bories A (1998) 1,3-propanediol production by fermentation: An interesting way to valorize glycerin from the ester and ethanol industries. *Ind Crop Prod* 7:281-289
- Baumann NA, Hagen PO, Goldfine H (1964) Phospholipids of *Clostridium butyricum*. Studies on plasmalogen composition and biosynthesis. *J Biol Chem* 240(4):1559-1567.

- Berchmans HJ, Hirata S (2008) Biodiesel production from crude *Jatropha curcas* L. seed oil with high content of free fatty acids. *Bioresource Technol* 99:1716-1721.
- Biebl H (1991) Glycerol fermentation of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. Measurement of product inhibition by use of a pH-auxostat. *Appl Microbiol Biotechnol* 35:701-705.
- Biebl H, Menzel K, Zeng AP, Deckwer WD (1999) Microbial production of 1,3-propanediol. *Appl Microbiol Biotechnol* 52:289-297.
- Biebl H, Spröer C (2002) Taxonomy of the glycerol fermenting Clostridia and description of *Clostridium diolis* sp. nov. *System Appl Microbiol* 25:491-497
- 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* 50:24-29.
- Bloch K (1969) Enzymatic synthesis of monounsaturated fatty acids. *Accounts Chem Res* 2(7):193-202.
- Bloomfield DK, Bloch K (1960) The formation of Δ^9 -unsaturated fatty acids. *J Biol Chem* 235:337-345.
- Boenigk R, Bowien S, Gottschalk G (1993) Fermentation of glycerol in continuous cultures of *Citrobacter freundii*. *Appl Microbiol Biotechnol* 38:453-457.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Cameron DC, Altaras NE, Hoffman ML, Shaw AJ (1998) Metabolic engineering of propanediol pathways. *Biotechnol Prog* 14:116-125.
- Chatzifragkou A, Makri A, Belka A, Bellou S, Mavrou M, Mastoridou M, Mysteriote P, Onjaro G, Aggelis G, Papanikolaou S (2011) Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. *Energy* 36(2):1097-1108.

- Chen X, Zhang DJ, Qi WT, Gao SJ, Xiu ZL, Xu P (2003) Microbial fed-batch production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* under micro-aerobic conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* 63:143-146.
- Chen Z, Liu HJ, Zhang JA, Liu DH (2009) Cell physiology and metabolic flux response of *Klebsiella pneumoniae* to aerobic conditions. *Process Biochem* 44:862-868.
- Cheng KK, Zhang JA, Liu DH, Sun Y, Liu HJ, Yang MD, Xu JM (2007) Pilot-scale production of 1,3-propanediol using *Klebsiella pneumoniae*. *Process Biochem* 42:740-744.
- Cho MH, Joen SI, Pyo SH, Mun S, Kim JH (2006) A novel separation and purification process for 1,3-propanediol. *Process Biochem* 41(3):739–744.
- Claude S (1999) Research of new outlets for glycerol-recent developments in France. *Fett/Lipid* 101:101–104.
- Cocolin L, Manzano M, Cantoni C, Comi G (2001) Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian sausages. *Appl Environ Microbiol* 67:5113-5121.
- Colin T, Bories A, Moulin G (2000) Inhibition of *Clostridium butyricum* by 1,3-propanediol and diols during glycerol fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 54:201-205.
- Corbin DR, Norton T (2003) Process to separate 1,3-propanediol or glycerol, or a mixture thereof from a biological mixture. United States Patent 6 603 048.
- Dabrock B, Bahl H, Gottschalk G (1992) Parameters affecting solvent production by *Clostridium pasteurianum*. *Appl Environ Microbiol* 58:1233-1239.
- da Silva GP, Mack M, Contiero J (2008) Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnol Adv* 27:30-39.
- Deckwer WD (1995) Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol. *FEMS Microbiol Rev* 16:143-149.

- Dobson G, Christie WW (2002) Mass spectrometry of fatty acid derivatives. *Eur J Lipid Sci Technol* 104:36-43.
- Dorado MP, Ballesteros E, Lopez FJ, Mittelbach M (2004) Optimization of alkali-catalyzed transesterification of *Brassica C. arinata* oil for biodiesel production. *Energ Fuels* 18:77-83.
- Draye X, Lin YR, Qian XY, Bowers JE, Burow GB, Morrell PL, Peterson DG, Presting GG, Ren SX, Wing RA, Paterson AH (2001) Toward integration of comparative genetic, physical, diversity, and cytomolecular maps for grasses and grains, using the sorghum genome as a foundation. *Plant Physiol* 125(3):1325–1341.
- Durner R, Witholt B, Egli T (2000) Accumulation of poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] in *Pseudomonas oleovorans* during growth with octanoate in continuous culture at different dilution rates. *Appl Environ Microbiol* 66(8):3408-3414.
- Ercolini D, Russo F, Torrieri E, Masi P, Villani F (2006) Changes in the spoilage-related microbiota of beet during refrigerated storage under different packaging conditions. *Appl Environ Microbiol* 72:4663-4671.
- Fan X, Burton R (2009) Recent Development of Biodiesel Feedstocks and the Applications of Glycerol: A Review. *The Open Fuels and Energy Science Journal* 2:100-109.
- Fan X, Burton R, Zhou Y (2010) Glycerol (Byproduct of biodiesel production) as a source for fuels and chemicals-Mini review. *The Open Fuels and Energy Science Journal* 3:17-22.
- Freund A (1881) Über die Bildung und Darstellung von Trimethylenalkohol aus Glycerin. *Monatsh Chem* 2:636–641.
- Friedmann W, Zeng AP (2008) Process and apparatus for the microbial production of a certain product and methane. Patent Application PCT/EP2008/063493.
- Forage RG, Lin ECC (1982) Dha systems mediating aerobic and anaerobic dissimilation of glycerol in *Klebsiella pneumoniae*. NCIB 418. *J Bacteriol* 151:591-599.

- Forsberg CW (1987) Production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium acetobutylicum* and other *Clostridium* species. *Appl Environ Microbiol* 53:639-643.
- Fulco AJ (1983) Fatty acid metabolism in bacteria. *Prog Lipid Res* 22:133-160.
- Gheshlaghi R, Scharer JM, Moo-Young M, Chou CP (2009) Metabolic pathways of clostridia for producing butanol. *Biotechnol Adv* 27:764-781.
- Gray KA, Zhao L, Emptage M (2006) Bioethanol. *Curr Opin Chem Biol* 10:141-146.
- Goldfine H, Bloch K (1961) On the origin of unsaturated fatty acids in Clostridia. *J Biol Chem* 236(10):2596-2601.
- Gong Y, Tong Y, Wang XL, Liu DH (2004) The possibility of the desalination of actual 1,3-propanediol fermentation broth by electro dialysis. *Desalination* 161:169–178.
- González-Pajuelo M, Andrade JC, Vasconcelos I (2004) Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 using a synthetic medium and raw glycerol. *J Ind Microbiol Biotechnol* 31:442-446.
- González-Pajuelo M, Meynial-Salles I, Mendes F, Andrade JC, Vasconcelos I, Soucaille P (2005) Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* for the industrial production of 1,3-propanediol from glycerol. *Metab Eng* 7:329-336.
- Günzel B, Yonsel S, Deckwer WD (1991) Fermentative production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium butyricum* up to a scale of 2 m². *Appl Microbiol Biotechnol* 36:289-294.
- Hao J, Liu DH (2005) Desalination of fermented broth containing 1,3-propanediol by electro dialysis. *Chinese J Proc Eng* 5:36–39.
- Hao J, Xu F, Liu H, Liu D (2006) Downstream processing of 1,3-propanediol fermentation broth. *J Chem Technol Biotechnol* 81:102–108.

- Hao J, Lin R, Zheng Z, Liu H, Liu D (2008) Isolation and characterization of microorganisms able to produce 1,3-propanediol under aerobic conditions. *W J Microbiol Biotechnol* 24:1731-1740.
- Heyndrickx M, De Vos P, Vancanneyt M, De Ley J (1991) The fermentation of glycerol by *Clostridium butyricum* LMG 1212_{t2} and 1213_{t1} and *C. pasteurianum* LMG 3285. *Appl Microbiol Biotechnol* 34:637-642.
- Himmi EH, Bories A, Barbirato F (1999) Nutrient requirements for glycerol conversion to 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. *Bioresource Technol* 67:123-128.
- Hirschmann S, Baganz K, Koschik I, Vorlop KD (2005) Development of an integrated bioconversion process for the production of 1,3-propanediol from raw glycerol waters. *Landbauforsch Volk* 55:261-267.
- Homann T, Tag C, Biebl H, Deckwer WD, Schink B (1990) Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella* and *Citrobacter* strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 53:435-440.
- Huang H, Gong CS, Tsao GT (2002) Production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae*. *Appl Biochem Biotechnol* 98-100: 687-698.
- Ingram LO (1976) Adaptation of membrane lipids to alcohols. *J Bacteriol* 125:670-678.
- Ingram LO, Buttke TM (1984) Effect of alcohol on microorganisms. In: *Advances in Microbial Physiology*. London: Academic Press. pp 254-301.
- Ingram LO (1986) Microbial tolerance to alcohols: role of the cell membrane. *Trends Biotechnol* 4(2):40-44.
- Ito T, Nakashimada Y, Senba K, Matsui T, Nishio N (2005) Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. *J Biosci Bioeng* 100:260-265.

- Jin P, Li S, Lu S, Zhu J, Huang H (2011) Improved 1,3-propanediol production with hemicellulosic hydrolysates (corn straw) as cosubstrate: Impact of degradation products on *Klebsiella pneumoniae* growth and 1,3-propanediol fermentation. *Bioresource Technol* 102:1815-1821.
- Jain MK, Gleeson J, Upreti A, Upreti GC (1978) Intrinsic perturbing ability of alkanols in lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta* 509:1-8.
- Johnson DT, Taconi KA (2007) The glycerin glut: Options for the value-added conversion of crude glycerol resulting from biodiesel production. *Environ Prog* 26:338-348.
- Johnson EA (2009) Clostridia. In: Schaechter M (Ed.) *Encyclopedia of Microbiology*, 3rd Edition, Academic Press, CA, USA, pp.87-93.
- Jones DT, Woods DR (1986) Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiol Rev* 50(4):484-524.
- Jones DT (2001) Applied acetone-butanol fermentation. In: Bahl H, Dürre P (Eds.) *Clostridia: Biotechnology and Medical Applications*, Wiley-VCH Verlag GmbH, pp.125-168.
- Jun SA, Moon C, Kang CH, Kong SW, Sang BI, Um Y (2010) Microbial fed-batch production of 1,3-propanediol using raw glycerol with suspended and immobilized *Klebsiella pneumoniae*. *Appl Biochem Biotechnol* 161:491-50
- Khulusi S, Ahmed HA, Patel P, Mendall MA, Northfield TC (1995) The effects of unsaturated fatty acids on *Helicobacter pylori in vitro*. *J Med Microbiol* 42:276-282.
- Kimelberg HK (1977) The influence of membrane fluidity on the activity of membrane-bound enzymes. *Cell Surface Rev* 3:205-293.
- Kodicek E, Worden AN (1945) The effect of unsaturated fatty acids on *Lactobacillus helveticus* and other Gram-positive micro-organisms. *Biochem J* 39:78-85.
- Koller M, Bona R, Braunegg G, Hermann C, Horvat P, Kroutil M, Martinz J, Neto J, Pereira L, Varila P (2005) Production of polyhydroxyalkanoates from agricultural waste and surplus materials. *Biomacromolecules* 6:561–565.

- Kong Q, He GQ, Chen F, Ruan H (2006) Studies on a kinetic model for butyric acid bioproduction by *Clostridium butyricum*. Lett Appl Microbiol 43(1):71-77.
- Krzystek L, Gluszczyk P, Ledakowicz S (1996) Determination of yield and maintenance coefficients in citric acid production by *Aspergillus niger*. Chem Eng J 62:215-222.
- Lange JP (2007) Lignocellulose conversion: an introduction to chemistry, process and economics. Biofuels, Bioprod Biorefin 16:577-583.
- Lee SY, Hong SH, Lee SH, Park SJ (2004) Fermentative production of chemicals that can be used for polymer synthesis. Macromol Biosci 4:157-164.
- Lenz TG, Moller AR (1980) Economic evaluation of the acetone-butanol fermentation. Ind Eng Chem Prod Res Dev 19(4):478-483.
- Lepage C, Fayouille F, Hermann M, Vandecasteele JP (1987) Changes in membrane lipid composition of *Clostridium acetobutylicum* during acetone-butanol fermentation: effects of solvents, growth temperature and pH. J Gen Microbiol 133:103-110.
- Li S, Tuan VA, Falconer JL, Noble RD (2001) Effects of zeolite membrane structure on the separation of 1,3-propanediol from glycerol and glucose by pervaporation. Chem Mater 13(5):1865-1873.
- Li S, Tuan VA, Falconer JL, Noble RD (2002) X-type zeolite membranes: preparation, characterization, and pervaporation performance. Micropor Mesopor Mat 53(1-3):59-70.
- Liu HJ, Zhang DJ, Xu YH, Mu YM, Sun YQ, Xiu ZL (2007) Microbial production of 1,3-propanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* under micro-aerobic conditions up to a pilot scale. Biotechnol Lett 29:1281-1285.
- Liu H, Ou X, Zhou S, Liu D (2010) Microbial 1,3-propanediol, its copolymerization with terephthalate and applications, in: Chen GQ (Ed.) Plastics from bacteria: Natural functions and applications, Microbiology Monographs, Vol. 14, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 405-425.

- Luque R, Herrero-Davila L, Campelo JM, Clark JH, Hidalgo JM, Luna D, Marinas JM, Romero AA (2008) Biofuels: a technological perspective. *Energy Environ Sci* 1:542-564.
- Lüthi-Peng Q, Dileme FB, Puhán Z (2002) Effect of glucose on glycerol bioconversion by *Lactobacillus reuteri*. *Appl Microbiol Biotechnol* 59:289-296.
- MacDonald DL, Goldfine H (1991) Effects of solvents and alcohols on the polar lipid composition of *Clostridium butyricum* under conditions of controlled lipid chain composition. *Appl Environ Microbiol* 57(12):3517-3521.
- Maervoet VET, De Mey M, Beauprez J, De Maeseneire S, Soetaert WK (2011) Enhancing the microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol using metabolic engineering. *Org Process Res Dev* 15:189-202.
- Marlatt JA, Datta R (2008) Acetone-butanol fermentation process development and economic evaluation. *Biotechnol Progr* 2(1):23-28.
- Marquis RE (1968) Salt-induced contraction of bacterial cell walls. *J Bacteriol* 95:775-781.
- Matthews G (2008) Fermentation equipment selection: Laboratory scale bioreactor design considerations. In: McNeil B, Harvey ML (Eds.) *Practical Fermentation Technology*, Wiley and Sons, Ltd, West Sussex PO19 8SQ, England, pp.3-36.
- Meeuwse P, Tramper J, Rinzema A (2011) Modeling lipid accumulation in oleaginous fungi in chemostat cultures: I. Development and validation of a chemostat model for *Umbelopsis isabellina*. *Bioprocess Biosyst Eng* 34(8):939-949.
- Meesters PAEP, Huijberts GNM, Eggink G (1996) High cell density cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a carbon source. *Appl Microbiol Biotechnol* 45:575-579.
- Menzel K, Zeng AP, Deckwer WD (1997) High concentration and productivity of 1,3-propanediol from continuous fermentation of glycerol by *Klebsiella pneumoniae*. *Enzyme Microb Technol* 20:82-86.

- Metsoviti M, Paramithiotis S, Drosinos EH, Galiotou-Panayotou M, Nychas GJE, Zeng AP, Papanikolaou S (2012) Screening of bacterial strains capable of converting biodiesel-derived raw glycerol into 1,3-propanediol, 2,3-butanediol and ethanol. *Eng Life Sci* 12(1):1-12.
- Millet P (1993) Retournement de la situation de la glycerine. *Informations Chimie* 345:102-104.
- Mitchell WJ (2001) General biology and physiology. In: Bahl H, Dürre P (Eds.) *Clostridia*, Willey-VCH Verlag, GmbH, pp. 49-104.
- Moon C, Ahn JH, Kim SW, Sang BI, Um Y (2010) Effect of biodiesel-derived raw glycerol on 1,3-propanediol production by different microorganisms. *App Biochem Biotechnol* 161:502-510.
- Mu Y, Teng H, Zhang DJ, Wang W, Xiu ZL (2006) Microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* using crude glycerol biodiesel preparations. *Biotechnol Lett* 28:1755-1759.
- Muyzer G, De Waal EC, Uitterlinden AG (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59:695–700.
- Nakamura CE, Whited GM (2003) Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol. *Curr Opin Biotechnol* 14:454-459.
- Nakas JP, Schaedle M, Parkinson CM, Coonley CE, Tanenbaum SW (1983) System development for linked-fermentation products of solvents from algal biomass. *Appl Environ Microbiol* 46:1017-1023
- Nemeth Á, Kupcsulick B, Sevelle B (2003) 1,3-Propanediol oxidoreductase production with *Klebsiella pneumoniae* DSM 2026. *W J Microbiol Biotechnol* 19(7):659-663.
- Nichols DS, Nichols PD, McMeekin TA (1992) Anaerobic production of polyunsaturated fatty acids by *Shewanella putrefaciens* strain ACAM 342. *FEMS Microbiol Lett* 98:117-122.
- Nieman C (1954) Influence of trace amounts of fatty acids on the growth of microorganisms. *Bacteriol Rev* 18:147-163.

- Ohta T, Ogbonna JC, Tanaka H, Yajima M (1994) Development of a fermentation method using immobilized cells under unsterile conditions. 2. Ethanol and L-Lactic acid production without heat and filter sterilization. *Appl Microbiol Biotechnol* 42:246-250.
- Otte B, Grunwaldt E, Mahmoud O, Jennewein S (2009) Genome shuffling in *Clostridium diolis* DSM 15410 for improved 1,3-propanediol production. *Appl Environ Microbiol* 75:7610-7616.
- Pagliari M, Ciriminna R, Kimura H, Rossi M, Della Pina, C (2007) From glycerol to value-added products. *Angewandte Chemie* 46:4434-4440.
- Papanikolaou S, Ruiz-Sanchez P, Pariset B, Blanchard F, Fick M (2000) High production of 1,3-propanediol from industrial glycerol by a newly isolated *Clostridium butyricum* strain. *J Biotechnol* 77:191-208.
- Papanikolaou S, Aggelis G (2002) Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. *Bioresource Technol* 82(1):43-49.
- Papanikolaou S, Muniglia L, Chevalot I, Aggelis G, Marc I (2002) *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. *J Appl Microbiol* 92:737-744.
- Papanikolaou S, Aggelis G (2003) Modeling aspects of the biotechnological valorization of raw glycerol: production of citric acid by *Yarrowia lipolytica* and 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. *J Chem Technol Biotechnol* 78:542-547.
- Papanikolaou S, Fick M, Aggelis G (2004) The effect of raw glycerol concentration on the production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. *J Chem Technol Biotechnol* 79:1189-1196.
- Papanikolaou S, Fakas S, Fick M, Chevalot I, Galiotou-Panayotou M, Komaitis M, Marc I, Aggelis G (2008) Biotechnological valorization of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: Production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil. *Biomass Bioenerg* 32:60-71.

- Papanikolaou S, Aggelis G (2009) Biotechnological valorization of biodiesel derived glycerol waste through production of single cell oil and citric acid by *Yarrowia lipolytica*. *Lipid Technol* 21:83-87.
- Papanikolaou S (2009) Microbial conversion of glycerol into 1,3-propanediol: Glycerol assimilation, biochemical events related with 1,3-propanediol biosynthesis and biochemical engineering of the process. In: Aggelis G (Ed) *Microbial conversions of raw glycerol*, Nova Science Publishers Inc, New York, pp 137-168.
- Papanikolaou S, Aggelis G (2011) Lipids of oleaginous yeasts. Part II: Technology and potential applications. *Eur J Lipid Sci Technol* 113(8):1052-1073.
- Patra S, Sangyoka S, Boonmee M, Reungsang A (2008) Bio-hydrogen production from the fermentation of sugarcane bagasse hydrolysate by *Clostridium butyricum*. *Int J Hydrogen Energ* 33(19):5256-5265.
- Petitdemange E, Dürr C, Abbad Andaloussi S, Raval G (1995) Fermentation of raw glycerol to 1,3-propanediol by new strains of *Clostridium butyricum*. *J Ind Microbiol* 15:498-502.
- Pflugmacher U, Gottschalk G (1994) Development of an immobilized cell reactor for the production of 1,3-propanediol by *Citrobacter freundii*. *Appl Microbiol Biotechnol* 41:313-316.
- Pyle D, Garcia R, Wen Z (2008) Producing docosahexanoic acid-rich algae from biodiesel derived-crude glycerol: effects of impurities on DHA production and algal biomass composition. *J Agric Food Chem* 56:3933-3939.
- Rahmat N, Abdullah AZ, Mohamed AR (2010) Recent progress on innovative and potential technologies for glycerol transformation into fuel additives: A critical review. *Renew Sust Energ Rev* 14(3):987-1000.
- Ratlidge C, Cohen Z (2008) Microbial and algal lipids: Do they have a future for biodiesel or as commodity oils? *Lipid Technol* 20:155–160.

- Raynaud C, Sarçabal P, Maynial-Salles I, Croux C, Soucaille P (2003) Molecular characterization of the 1,3-propanediol (1,3-PD) operon of *Clostridium butyricum*. Proc Natl Acad Sci USA 100:5010-5015.
- Rehman A, Matsimura, M. Nomura N, Sato S (2008) Growth and 1,3-propanediol production on pre-treated sunflower oil bio-diesel raw glycerol using a strict anaerobe-*Clostridium butyricum*. Curr Res Bacteriol 1:7-16.
- Reimann A, Biebl H (1996) Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* DSM 5431 and product tolerant mutants in fed-batch culture: Feeding strategy for glycerol and ammonium. Biotechnol Lett 18:827-832.
- Reimann A, Biebl H, Deckwer WD (1998) Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* in continuous culture with cell recycling. Appl Microbiol Biotechnol 49:359-363.
- Rigomier D, Bohin JP, Lubochinsky B (1980) Effects of ethanol and methanol on lipid metabolism in *Bacillus subtilis*. Microbiology 121(1):139-149.
- Ruch F, Lin ECC (1975) Independent constitutive expression of the aerobic and anaerobic pathways of glycerol catabolism in *Klebsiella aerogenes*. J Bacteriol 124:348-352.
- Russell NJ, Nichols DS (1999) Polyunsaturated fatty acids in marine bacteria-a dogma rewritten. Microbiology 145:767-779.
- Saint-Amans S, Perlot P, Goma G, Soucaille P (1994) High production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 in a simply controlled fed-batch system. Biotechnol Lett 16:832-60.
- Saka S, Kusdiana D (2001) Biodiesel fuel from rapeseed oil as prepared in supercritical methanol. Fuel 80(2):225-231.
- Sanz MT, Blanco B, Beltran S, Cabezas JI (2001) Vapor liquid equilibria of binary and ternary systems with water, 1,3-propanediol, and glycerol. J Chem Eng Data 46:635-639.

- Sarris D, Kotseridis Y, Linga M, Galiotou-Panayotou M, Papanikolaou S (2009) Enhanced ethanol production, volatile compound biosynthesis and fungicide removal during growth of a newly isolated *Saccharomyces cerevisiae* strain on enriched pasteurized grape musts. *Eng Life Sci* 9:29-37.
- Saxena RK, Anand P, Saran S, Isar J (2009) Microbial production of 1,3-propanediol: Recent developments and emerging opportunities. *Biotechnol Adv* 27:895-913.
- Scheuerbrandt G, Bloch K (1962) Unsaturated fatty acids in microorganisms. *J Biol Chem* 237(7):2064-2068.
- Schlieker H, Günzel B, Deckwer WD (1992) Use of adsorption for product isolation in the fermentation of glycerol to 1,3-propanediol. *Chem Ing Tech* 64:727-728.
- Schütz H, Radler F (1984) Anaerobic reduction of glycerol to 1,3-propanediol by *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus buchneri*. *Syst Appl Microbiol* 5:169-178.
- Seo MY, Seo JW, Heo SY, Baek JO, Rairakhwada D, Oh BR, Seo PS, Choi MH, Kim CH (2009) Elimination of by-product formation during production of 1,3-propanediol in *Klebsiella pneumoniae* by inactivation of glycerol oxidative pathway. *Appl Microbiol Biotechnol* 84:527-534.
- Simon E (1947) The formation of lactic acid by *Clostridium acetobutylicum* (Weizman). *Arch Biochem* 13:237-243.
- Sinensky M (1974) Homeoviscous adaptation-a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 71:522-525.
- Šmidová D, Mikulášek P, Stloukal R, Hirschmann S (2006) The biodiol production: separation of model biomass by microfiltration. *Desalination* 200:466-467.
- Solomon BO, Zeng AP, Biebl H, Schlieker H, Posten C, Deckwer WD (1995) Comparison of the energetic efficiencies of hydrogen and oxychemicals formation in *Klebsiella pneumoniae* and *Clostridium butyricum* during anaerobic growth on glycerol. *J Biotechnol* 39:107-117.

- Song H, Lee SY (2006) Production of succinic acid by bacterial fermentation. *Enzyme Microb Technol* 39:352–61.
- Subramaniam R, Dufreche S, Zappi M, Bajpai R (2010) Microbial lipids from renewable resources: production and characterization. *J Ind Microbiol Biotechnol* 37:1271-1287.
- Sullivan CJ (1993) Propanediols. In: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Vol. A, 22. VCH, Weinheim.
- Sun J, van den Heuvel, J, Soucaille P, Qu Y, Zeng AP (2003) Comparative genomic analysis of *dha* regulon and related genes for anaerobic glycerol metabolism in bacteria. *Biotechnol Prog* 19(2):263-272.
- Tang X, Tan Y, Zhu H, Zhao K, Shen W (2009) Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol by an engineered strain of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 75:1628-1634.
- Tag CG (1990) Mikrobielle Herstellung von 1,3-Propandiol. Dissertation, University of Oldenburg, Germany.
- Tao F, Miao JY, Shi GY, Zhang KC (2005) Ethanol fermentation by an acid-tolerant *Zymomonas mobilis* under non-sterilized condition. *Process Biochem* 40:183-187.
- Tilman D, Hill J, Lehman C (2006) Carbon-negative biofuels from low-input high-diversity grassland biomass. *Science* 314:1598-1600.
- Tiwari AL, Kumar A, Raheman H (2007) Biodiesel production from jatropha oil (*Jatropha curcas*) with high free fatty acids: An optimized process. *Biomass Bioenerg* 31:569-575.
- Uribelarrea JL, Winter J, Goma G, Pareilleux A (1990) Determination of maintenance coefficients of *Saccharomyces cerevisiae* cultures with cell recycle by cross-flow membrane filtration. *Biotechnol Bioeng* 35:201-206.

- van Andel JG, Zoutberg GR, Crabbendam PM, Breure AM (1985) Glucose fermentation by *Clostridium butyricum* grown under a self generated gas atmosphere in chemostat culture. *Appl Microbiol Biotechnol* 23:21-26.
- Vassault A (1987) Lactate dehydrogenase. UV-method with pyruvate and NADH. In: Bergmeyer HU (Ed.) *Methods of Enzymatic Analysis*, Verlag Chemie, Weinheim, pp. 118-126.
- Veiga-da-Cunha M, Foster MA (1992) 1,3-Propanediol NAD⁺ oxidoreductases of *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus buchneri*. *Appl Environ Microbiol* 58:2005-2010.
- Vetter W, Thurnhofer S (2007) Analysis of fatty acids by mass spectrometry in the selected ion monitoring mode. *Lipid Technol* 19(8):184-186.
- Vincente G, Bautista LF, Rodríguez R, Gutiérrez, Sádaba I, Ruiz-Vázquez R, Torres-Martinez S, Garre V (2009) Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus. *Biochem Eng J* 48(1):22-27.
- Voegelé RT, Sweet GD, Boos W (1993) Glycerol kinase of *Escherichia coli* is activated by interaction with the glycerol facilitator. *J Bacteriol* 175:1087–1094.
- Vollherbst-Schneck K, Sands JA, Montenecourt BS (1984) Effect of butanol on lipid composition and fluidity of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl Environ Microbiol* 47:193-194.
- Wang ZX, Zhuge J, Fang H, Prior BA (2001) Glycerol production by microbial fermentation: A review. *Biotechnol Adv* 19:201-223.
- Wang X, Jin B (2009) Process optimization of biological hydrogen production from molasses by a newly isolated *Clostridium butyricum* W5. *J Biosci Bioeng* 107(2):138-144.
- Wilkens E, Ringel AK, Hortig D, Willke T, Vorlop KD (2011) High-level production of 1,3-propanediol from crude glycerol by *Clostridium butyricum* AKR102a. *Appl Microbiol Biotechnol* doi:10.1007/s00253-011-3595-6.
- Willke T, Vorlop KD (2004) Industrial bioconversion of renewable resources as an alternative to conventional chemistry. *Appl Microbiol Biotechnol* 66:131-142.

- Willke T, Vorlop KD (2008) Biotransformation of glycerol into 1,3-propanediol. *Eur J Lipid Sci Technol* 110:831-840.
- Wong CL, Huang CC, Chen WM, Chang JS (2011) Converting crude glycerol to 1,3-propanediol using resting and immobilized *Klebsiella* sp. HE-2 cells. *Biochem Eng J*, doi:10.1016/j.bej.2011.09015.
- Xing D, Ren N, Wang A, Li Q, Feng Y, Ma F (2008) Continuous hydrogen production of auto-aggregative *Ethanoligenes harbinense* YUAN-3 under non-sterile condition. *Int J Hydrogen Energ* 33:1489-1495.
- Xiu ZL, Song BH, Wang ZT, Sun LH, Feng EM, Zeng AP (2004) Optimization of dissimilation of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* in one- and two-stage anaerobic cultures. *Biochem Eng J* 19:189–197.
- Xiu ZL, Zeng AP (2008) Present state and perspective of downstream processing of biologically produced 1,3-propanediol and 2,3-butanediol. *Appl Microbiol Biotechnol* 78:917-926.
- Xu YZ, Guo NN, Zheng ZM, Ou XJ, Liu HJ, Liu DH (2009) Metabolism in 1,3-propanediol fed-batch fermentation by a D-lactate deficient mutant of *Klebsiella pneumoniae*. *Biotechnol Bioeng* 104:965-972.
- Xue XD, Li W, Li ZM, Xia YL, Ye Q (2010) Enhanced 1,3-propanediol production by supply of organic acids and repeated fed-batch culture. *J Ind Microbiol Biotechnol* 37:681-687.
- Yang G, Tian J, Li J (2007) Fermentation of 1,3-propanediol by a lactate deficient mutant of *Klebsiella oxytoca* under microaerobic conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* 73:1017-1024.
- Yazdani SS, Gonzalez R (2007) Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Curr Opin Biotechnol* 18:213-219.
- Ykema A, Bakels RHA, Verwoert IIGS, Smit H, van Verseveld HW (1989) Growth yield, maintenance and lipid formation in the oleaginous yeast *Apiotrichum curvatum*. *Biotechnol Bioeng* 34:1268-1276.

- Zeng AP, Ross A, Biebl H, Tag C, Günzel B, Deckwer WD (1994) Multiple product inhibition and growth modeling of *Clostridium butyricum* and *Klebsiella pneumoniae* in glycerol fermentation. *Biotechnol Bioeng* 44:902-922.
- Zeng AP (1996) Pathway and kinetic analysis of 1,3-propanediol production from glycerol fermentation by *Clostridium butyricum*. *Bioproc Eng* 14:169-175.
- Zeng AP, Biebl H (2002) Bulk chemicals from biotechnology: The case of 1,3-propanediol production and the new trends. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 74:239-259.
- Zeng AP, Sabra W (2011) Microbial production of diols as platform chemicals: Recent progresses. *Curr Opin Biotechnol*, doi 10.1016/j.copbio.2011.05.005.
- Zhang YM, Rock CO (2008) Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nat Rev Microbiol* 6:222-233.
- Zhao YN, Chen G, Yao SJ (2006) Microbial production of 1,3-propanediol from glycerol by encapsulated *Klebsiella pneumoniae*. *Biochem Eng J* 32:93–99.
- Zheng ZM, Guo NN, Hao J, Cheng KK, Sun Y, Liu DH (2009) Scale-up of micro-aerobic 1,3-propanediol production with *Klebsiella pneumoniae* CGMCC 1.6366. *Process Biochem* 44:944-948.
- Zigová J, Šturdík E, Vandák, Schlosser Š (1999) Butyric acid production by *Clostridium butyricum* with intergrated extraction and pertraction. *Process Biochem* 34(8):835-843.
- Zong MH, Duan ZQ, Lou WY, Smith TJ, Wu H (2007) Preparation of a sugar catalyst and its use for highly efficient production of biodiesel. *Green Chem* 9:434-437.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ

Αγγελής Γ (2007) Μικροβιολογία και Μικροβιακή Τεχνολογία, Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Η Αφροδίτη Χατζηφράγκου γεννήθηκε στο Αγρίνιο Αιτωλοακαρνανίας στις 8 Σεπτεμβρίου 1982. Αποφοίτησε από το 5^ο Ενιαίο Λύκειο Καλλιθέας το 2000 και κατόπιν φοίτησε στο Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Απέκτησε πτυχίο Γεωπόνου το 2006 και μεταπτυχιακό τίτλο ειδίκευσης στην «Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του Ανθρώπου» από το Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών το 2008. Τον Φεβρουάριο του 2009 ξεκίνησε την διδακτορική της διατριβή στο Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. S. Papanikolaou, **A. Chatzifragkou**, S. Fakas, M. Galiotou-Panayotou, M. Komaitis, J.M. Nicaud, G. Aggelis. (2009) “Biosynthesis of lipids and organic acids by *Yarrowia lipolytica* strains cultivated on glucose”. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111:1221-1232.
2. A. André, **A. Chatzifragkou**, P. Diamantopoulou, D. Sarris, A. Philippoussis, M. Galiotou-Panayotou, M. Komaitis, S. Papanikolaou. (2009) “Biotechnological conversions of bio-diesel derived crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* strains”. *Engineering in Life Sciences*, 9:468-478.
3. **A. Chatzifragkou**, D. Dietz, M. Komaitis, A. P. Zeng and S. Papanikolaou. (2010) “Effect of biodiesel-derived waste glycerol impurities on biomass and 1,3-propanediol production of *Clostridium butyricum* VPI 1718”. *Biotechnology and Bioengineering*, 107:76-84.
4. S. Papanikolaou, P. Diamantopoulou, **A. Chatzifragkou**, A. Philippoussis, G. Aggelis. (2010) “Suitability of low-cost sugars as substrates for lipid production by the fungus *Thamnidium elegans*”. *Energy and Fuels*, 24:4078-4086.
5. **A. Chatzifragkou**, S. Fakas, M. Galiotou-Panayotou, M. Komaitis, G. Aggelis, S. Papanikolaou. (2010) “Commercial sugars as substrates for lipid accumulation by *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina* fungi”. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112:1048-1057.
6. **A. Chatzifragkou**, A. Makri, A. Belka, S. Bellou, M. Mavrou, M. Mastoridou, P. Mystrioti, G. Onjaro, G. Aggelis, S. Papanikolaou. (2010) “Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species”. *Energy*, 36:1097-1108.
7. **A. Chatzifragkou**, S. Papanikolaou, D. Dietz, A.I. Doulgeraki, G.J.E. Nychas, A.P. Zeng (2011) “Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* growing on biodiesel-derived crude glycerol through a non-sterilized fermentation process”. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91:101-102
8. **A. Chatzifragkou**, I. Petrou, C. Gardeli, M. Komaitis, S. Papanikolaou (2011) “Effect of *Origanum vulgare* L. essential oil on growth and lipid profile of *Yarrowia lipolytica* cultivated on glycerol-based media”. *JAOCs*, 88:1955-1964.
9. **A. Chatzifragkou**, G. Aggelis, M. Komaitis, A.P. Zeng, S. Papanikolaou (2011) “Impact of anaerobiosis strategy and bioreactor geometry on the biochemical response of *Clostridium butyricum* VPI 1718 during 1,3-propanediol fermentation”. *Bioresource Technology*, 102:10625-10632.
10. **A. Chatzifragkou**, G. Aggelis, Chryssavgi Gardeli, Maria Galiotou-Panayotou, M. Komaitis, S. Papanikolaou (2012) “Adaptation dynamics of *Clostridium butyricum* in high 1,3-propanediol content media”. *Applied Microbiology and Biotechnology*, DOI: 10.1007/s00253-012-4003-6, *in press*.