

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ «ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΤΜΗΜΑ

**«ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ
ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ «ΒΙΟΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΒΙΟΔΙΥΛΙΣΤΗΡΙΑ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ 1,3-
ΠΡΟΠΑΝΟΔΙΟΛΗΣ ΜΕΣΩ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΖΥΜΩΣΕΩΝ»**

ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ:

ΜΑΡΙΝΑ Τ. ΜΠΑΛΑΣΚΑ

Επιβλέπων: ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ ΣΕΡΑΦΕΙΜ (Επίκουρος Καθηγητής)

ΑΘΗΝΑ

ΙΟΥΛΙΟΣ 2014

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ 1,3-
ΠΡΟΠΑΝΟΔΙΟΛΗΣ ΜΕΣΩ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΖΥΜΩΣΕΩΝ»**

ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ:

ΜΑΡΙΝΑ Τ. ΜΠΑΛΑΣΚΑ

Επιβλέπων: ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ ΣΕΡΑΦΕΙΜ (Επίκουρος Καθηγητής)

Επιτροπή:

ΚΟΥΤΙΝΑΣ ΑΠΟΣΤΟΛΗΣ (Επίκουρος Καθηγητής)

ΚΟΥΚΟΣ ΙΩΑΝΝΗΣ (Επίκουρος Καθηγητής)

Περίληψη

Η παρούσα μελέτη είχε ως σκοπό την επιλογή των καταλληλότερων πηγών άνθρακα για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Lactobacillus diolivorans* DSM 14421. Τα σάκχαρα που μελετήθηκαν ήταν η εμπορική γλυκόζη, η εμπορική σακχαρόζη, η εμπορική φρουκτόζη, η εμπορική λακτόζη και η εμπορική ξυλόζη. Σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε ως συνυπόστρωμα ακάθαρτη γλυκερόλη 90%. Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε φιάλες Duran, με ανάδευση 180 ± 5 rpm, ή βιοαντιδραστήρες, με ανάδευση 250 rpm, και θερμοκρασία επώασης σε αμφότερα 30°C . Το pH διορθωνόταν καθ'όλη τη διάρκεια της ζύμωσης, ώστε να είναι μεταξύ 5,8 και 6,3. Πριν από τον εμβολιασμό πραγματοποιούταν εμφύσηση αζώτου για 20-30 λεπτά ώστε να δημιουργηθούν αναερόβιες συνθήκες.

Στις περιπτώσεις της γλυκόζης, της φρουκτόζης και της ξυλόζης ο συντελεστής απόδοσης είναι 0,63 g/g, 0,60 g/g και 0,65 g/g αντίστοιχα. Οι τιμές αυτές είναι αρκετά κοντά στο θεωρητικό, 0,83 g/g. Επίσης στην περίπτωση της ξυλόζης παρατηρείται μια σημαντική ποσότητα βιομάζας (3,6 g/L), σχεδόν διπλάσια από τις ποσότητες βιομάζας που παράγονται από τα άλλα σάκχαρα.

Στην περίπτωση της σακχαρόζης η μέγιστη τιμή 1,3-προπανοδιόλης ήταν 4,4 g/L. Ο μεγαλύτερος συντελεστής απόδοσης που παρατηρήθηκε ήταν 0,64 g/g. Η υψηλότερη συγκέντρωση βιομάζας ήταν 1,4 g/L και η χαμηλότερη 0,7 g/L. Στην περίπτωση της μελάσας η μέγιστη τιμή της 1,3-προπανοδιόλης ήταν 2,0 g/L και ο συντελεστής απόδοσης 0,45 g/g και η παραγωγικότητα ήταν 0,02 g/L/h. Η βιομάζα έφτασε το 1,1 g/L. Στην περίπτωση της ξυλόζης η μέγιστη τιμή 1,3-προπανοδιόλης ήταν 12,4 g/L. Ο μεγαλύτερος συντελεστής απόδοσης που παρατηρήθηκε ήταν 0,65 g/g. Η υψηλότερη συγκέντρωση βιομάζας ήταν 4,2 g/L και η χαμηλότερη 3,1 g/L. Στην περίπτωση της λακτόζης η μέγιστη τιμή 1,3-προπανοδιόλης που παρατηρήθηκε ήταν 8,8 g/L με συντελεστή απόδοσης 0,78 g/g. Η υψηλότερη συγκέντρωση βιομάζας ήταν 2,0 g/L και η χαμηλότερη 1,8 g/L. Στην περίπτωση του τυρογάλακτος η μέγιστη τιμή 1,3-προπανοδιόλης που παρατηρήθηκε ήταν 2,5 g/L. Ο μεγαλύτερος συντελεστής απόδοσης που παρατηρήθηκε ήταν 0,45 g/g. Η υψηλότερη συγκέντρωση βιομάζας ήταν 3,5 g/L και η χαμηλότερη 1,4 g/L.

Στην ημισυνεχή τροφοδοτούμενη καλλιέργεια σε διάστημα 140h καταναλώθηκαν συνολικά 60,5 g/L γλυκόζης και 70 g/L γλυκερόλη. Η 1,3-προπανοδιόλη που παρήχθη έφτασε τα 43 g/L με συντελεστή απόδοσης 0,61 g/g και παραγωγικότητα 0,3 g/L/h.

Συνοψίζοντας, ο μικροοργανισμός *L.diolivorans* DSM 14421 μπορεί να αναπτυχθεί σε συνθήκες αυτοπαραγόμενης αναεροβίωσης με χαμηλές στροφές, σε ρυθμιζόμενο pH στο 5,8 στους 30°C. Η καλλιέργεια αυτή είναι πιο οικονομική σε σχέση με τις συνθήκες συνεχούς εμφύσησης αζώτου και 400 στροφές όμως ο συντελεστής απόδοσης του προϊόντος και η παραγωγικότητα του κυμαίνονται σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Κατά συνέπεια θα πρέπει να διεξαχθεί περαιτέρω μελέτη ώστε να επιτευχθεί ο συνδυασμός ιδανικών συνθηκών καλλιέργειας με υψηλό συντελεστή απόδοσης και παραγωγικότητα σε συνδυασμό με εξασφάλιση του χαμηλού κόστους παραγωγής.

Λέξεις κλειδιά: 1,3-προπανοδιόλη, *Lactobacillus diolivorans* DSM 14421, γλυκερόλη, γλυκόζη, σακχαρόζη, φρουκτόζη, ξυλόζη, λακτόζη

Abstract

The present thesis focuses on the selection of the most efficient carbon sources for the growth of the microorganism *Lactobacillus diolivorans* DSM 14421. The sugars commercial glucose, commercial sucrose, commercial lactose and commercial xylose were implemented and examined. During all experiments, a cosubstrate of 90% crude glycerol was used. All microbial cultures were grown at 30° C, with stirring at 180±5 rpm for the Duran bottles and at 250 rpm for the bioreactors. The pH was controlled and adjusted during the whole fermentation process, remaining between 5.8 and 6.3. Prior to incubation, nitrogen sparging was performed for a period of 20-30 min., in order to create anaerobic conditions.

In the case of glucose, fructose and xylose the yield coefficient was found at 0.63 g/g, 0.60 g/g and 0.65 g/g respectively. These values are approximating the theoretical yield coefficient (0.83 g/g). Additionally, in the case of xylose, a considerable quantity of biomass (3.6 g/L) was observed, almost double the quantity produced by any other of the aforementioned sugars.

Firstly, in the case of sucrose, the highest value of 1.3-propanediol achieved was 4.4 g/L. The highest yield coefficient observed was 0.64 g/g. The highest biomass concentration was at 1.4 g/L and the lowest at 0.7 g/L. Secondly, in the case of molasses, the highest value of 1.3-propanediol achieved was 2.0 g/L, the yield coefficient was found at 0.45 g/g and the productivity rate at 0.02 g/L/h. The highest biomass concentration reached 1.1 g/L. Thirdly, in the case of xylose, the highest value of 1.3-propanediol achieved reached 12.4 g/L. The highest yield coefficient observed was 0.65 g/g. The highest biomass concentration was at 4.2 g/L and the lowest at 3.1 g/L. Fourthly, in the case of lactose, the highest value of 1.3-propanediol observed reached 8.8 g/L, with a yield coefficient of 0.78 g/g. The highest biomass concentration was at 2.0 g/L, while the lowest at 1.8 g/L. Moreover, in the case of whey, the highest value of 1.3-propanediol produced was 2.5 g/L. The highest yield coefficient observed was 0.45 g/g. The highest biomass concentration was at 3.5 g/L, while the lowest at 1.4 g/L.

During the fed-batch culture, in a period of 140 hours a total amount of 60.5 g/L glucose and 70 g/L glycerol was consumed. The overall quantity of 1.3-propanediol

produced reached the 43 g/L, with a yield coefficient of 0.61 g/g and a productivity rate of 0.3 g/L/h.

In conclusion, the microorganism *L.diolivorans* DSM 14421 can be grown under self-generated anaerobic conditions at a low round-per-minute rate, with controlled pH at 5.8 and at 30° C. This type of culture is more cost-efficient in regard to the continuous nitrogen sparging conditions and 400 rpm rate; however, the product's yield coefficient and productivity rate range at considerably low levels.

Key words: 1,3-propanediol, *Lactobacillus diolivorans* DSM 14421, glycerol, glucose, sucrose, fructose, xylose, lactose

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με το τέλος της παρούσας πτυχιακής μελέτης, που εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, και κατ'επέκτασιν των μεταπτυχιακών μου σπουδών, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους με βοήθησαν να κάνω τους στόχους μου πραγματικότητα.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα της μελέτης κ. Σεραφείμ Παπανικολάου, Επίκουρο Καθηγητή, για την πολύτιμη καθοδήγηση του και τις καίριες επισημάνσεις του κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της μελέτης αλλά και γενικότερα καθ'όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Αποστόλη Κουτίνα, Επίκουρο Καθηγητή, για την ουσιαστική του συνδρομή και τις καθοριστικές του συμβουλές κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της μελέτης αλλά και γενικότερα καθ'όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Ιωάννη Κούκο, Επίκουρο Καθηγητή, μέλος της τριμελούς επιτροπής, για τη βοήθεια που μου προσέφερε στην εκπόνηση της παρούσας μελέτης.

Δε θα μπορούσα να παραλείψω όλα τα μέλη των εργαστηρίων και ιδιαίτερα τις υποψήφιες διδάκτορες κα. Χρυσάνθη Πατεράκη και κα. Αναστασία-Μαρίνα Παλαιογεώργου για την βοήθεια τους και τις χρήσιμες συμβουλές τους τόσο κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας αλλά και κατά τη συγγραφή της μελέτης.

Ακόμη, θερμές ευχαριστίες οφείλω σε όλους του συμφοιτητές μου και κυρίως στην κα. Χάρις Κοντού-Βρεττού και κα. Αικατερίνη Μαρκοπούλου για τη στήριξη τους όλο αυτό το διάστημα.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά τον πατέρα μου Τρύφωνα και τον Αχιλλέα για την υπομονή, τη στήριξη και τη συνεχή ενθάρρυνση καθ'όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Μαρίνα Μπαλάσκα

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Περίληψη	3
Abstract	5
I. Εισαγωγή	10
I.1 Γλυκερόλη	10
I.1.1 Παραγωγή γλυκερόλης	11
I.1.2 Παραγωγή βιολογικού πετρελαίου	12
I.1.2.1 Βιολογικά καύσιμα 1 ^{ης} γενιάς	12
I.1.2.2 Βιολογικά καύσιμα επόμενης γενιάς	16
I.1.3 Βιομηχανική γλυκερόλη	17
I.1.4 Χημική αξιοποίηση της γλυκερόλης	18
I.1.5 Βιοτεχνολογική αξιοποίηση της γλυκερόλης	19
I.1.6 Μεταβολισμός της γλυκερόλης	19
I.2 1,3-προπανοδιόλη	24
I.2.1 Χημική παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης	26
I.2.2 Βιοτεχνολογική παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης	27
I.3 Γαλακτικά βακτήρια	37
I.3.1 Το γένος <i>Lactobacillus</i>	38
I.4 Σκοπός της μελέτης	39
II. Υλικά και μέθοδοι	40
II.1 Βιολογικό υλικό	40
II.2 Γλυκερόλη	40
II.3 Υποστρώματα ανάπτυξης	41
II.4 Συνθήκες καλλιέργειας	42
II.5 Αναλύσεις	43
II.5.1 Προσδιορισμός pH	43
II.5.2 Προσδιορισμός βιομάζας	44
II.5.3 Προσδιορισμός σακχάρων, γλυκερόλης, 1,3-προπανοδιόλης και οργανικών οξέων	44
III. Αποτελέσματα	49
III.1 Μελέτη επιλογής καταλληλότερων πηγών άνθρακα για ανάπτυξη	49
III.2 Κλειστές καλλιέργειες	54
III.2.1 Κλειστές καλλιέργειες με τη χρήση σακχαρόζης ως πηγή άνθρακα	54

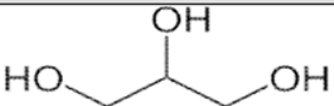
III.2.1.1 Κλειστές καλλιέργειες σε φιάλες Duran	56
III.2.1.2 Κλειστές καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα	60
III.2.2 Κλειστές καλλιέργειες με τη χρήση μελάσας ως πηγή άνθρακα	62
III.2.2.1 Κλειστές καλλιέργειες σε φιάλες Duran	63
III.2.3 Κλειστές καλλιέργειες με τη χρήση ξυλόζης ως πηγή άνθρακα	64
III.2.3.1 Κλειστές καλλιέργειες σε φιάλες Duran	66
III.2.3.2 Κλειστές καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα	68
III.2.4 Κλειστές καλλιέργειες με τη χρήση λακτόζης ως πηγή άνθρακα	69
III.2.4.1 Κλειστές καλλιέργειες σε φιάλες Duran	70
III.2.4.2 Κλειστές καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα	71
III.2.5 Κλειστές καλλιέργειες με τη χρήση τυρογάλακτος ως πηγή άνθρακα	72
III.2.5.1 Κλειστές καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα	73
III.3 Ημισυνεχείς τροφοδοτούμενες καλλιέργειες	76
III.3.1 Ημισυνεχείς τροφοδοτούμενες καλλιέργειες με τη χρήση γλυκόζης ως πηγή άνθρακα	76
III.4 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα	79
IV. Συμπεράσματα –Συζήτηση	81
Βιβλιογραφία	87

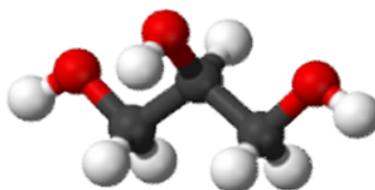
I. Εισαγωγή

I.1. Γλυκερόλη

Η γλυκερόλη ή γλυκερίνη αποτελεί την εμπειρική ονομασία της χημικής οργανικής ένωσης 1,2,3-προπανοτριόλης, μιας τρισθενούς αλκοόλης με χημικό τύπο $\text{CH}_2\text{OH}-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$. Η γλυκερόλη περιέχει στο μόριο της τρεις υδροξυλομάδες, στις οποίες οφείλει την υδατοδιαλυτή της ικανότητα και την υδρόφιλη φύση της (Rahmat et al., 2010). Ο όρος γλυκερίνη αναφέρεται κυρίως στα εμπορικά σκευάσματα της γλυκερόλης με νερό. Αποτελεί ένα βιομηχανικό προϊόν με ευρύ φάσμα χρήσεων όπως ως διαλύτης, ως μέσο διαβροχής, ως πλαστικοποιητής, καθώς επίσης και ως πρώτη ύλη στην παραγωγή φαρμάκων, καλλυντικών, βερνικιών, σαπώνων και εκρηκτικών υλών (όπως η νιτρογλυκερίνη) (Wang et al., 2001). Είναι ημίρρευτη σε κανονικές θερμοκρασίες, διαυγής, άχρωμη, σχεδόν άοσμη, με γλυκιά γεύση, σε αυτό οφείλει και την ονομασία της. Είναι διαλυτή στο νερό και τις αλκοόλες, αναμιγνύεται με τους περισσότερους κοινούς οργανικούς διαλύτες, αλλά είναι αδιάλυτη στους υδρογονάνθρακες (Agarwal, 1990; Gupta & Kumar, 2012).

Πίνακας I.1: Φυσικοχημικές ιδιότητες γλυκερόλης (Μετσοβίτη Μ., 2013)

Γενικά χαρακτηριστικά		Συντακτικός τύπος
Χημική ονομασία:	1,2,3-προπανοτριόλη	
Μοριακός τύπος:	$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$	
Μοριακή μάζα:	92,10 g/mol	
Χημικές Ιδιότητες		Φυσικές Ιδιότητες
Σημείο τήξης:	17,8 °C	Άχρωμη
Σημείο βρασμού:	290 °C	Άοσμη (σχεδόν)
Σημείο ανάφλεξης:	177 °C	Διαυγής
Ειδικό βάρος:	1,26 (20 °C)	Υγροσκοπική
Πυκνότητα:	1,261 g /mL	Ημίρρευτη
Τρισδιάστατη απεικόνιση μορίου γλυκερόλης		



Ο συνδυασμός των φυσικοχημικών ιδιοτήτων της, συνιστά δυνατή τη χρήση της γλυκερόλης σε μεγάλο εύρος βιοτεχνολογικών εφαρμογών, είτε ως πρώτη ύλη είτε ως πρόσθετο. Μια από τις σημαντικότερες ιδιότητες της είναι η υγροσκοπικότητα της, η ιδιότητας να απορροφά νερό από το περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται, με αποτέλεσμα να αποτελεί σημαντικό ενυδατικό παράγοντα. Η γλυκερόλη βρίσκει εφαρμογή στη βιομηχανία τροφίμων, στη βιομηχανία καλλυντικών, λιπαντικών, φαρμάκων, καπνού, πλαστικών, εκρηκτικών κ.α.. Πιο συγκεκριμένα, στη βιομηχανία των τροφίμων, επειδή είναι μη τοξική, χρησιμοποιείται ως πρόσθετο με τον κωδικό E422. Σαν γλυκαντικό είναι 60% πιο γλυκιά συγκριτικά με τη σακχαρόζη και δεν αυξάνει τα επίπεδα σακχάρου στο αίμα (Μετσοβίτη Μ, 2013). Χάρη στην υγροσκοπικότητας της συμβάλει στη διατήρηση της υγρασίας στα ψημένα τρόφιμα, ώστε να μην αφυδατώνονται κατά την αποθήκευση τους, αυξάνοντας έτσι το χρόνο ζωής τους. Αποτελεί επίσης σημαντική πρώτη ύλη στην παραγωγή πολυολών και πολυουρεθάνης, χρησιμοποιείται ως πλαστικοποιητής για να προσδώσει ευελιξία, ευκαμψία και αντοχή στις βαφές (Claude, 1999; Pagliano et al., 2007; Pagliano & Rossi, 2010).

1.1.1 Παραγωγή γλυκερόλης

Η παραγωγή της γλυκερόλης μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω α) μικροβιακών ζυμώσεων από διάφορους μικροοργανισμούς, όπως βακτήρια, ζύμες, μύκητες και φύκη, με πιο γνωστή την περίπτωση της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae* κατά την τέλεση της αλκοολικής ζύμωσης, β) μέσω χημικής σύνθεσης από τη πετροχημική βιομηχανία και γ) από την υδρόλυση των λιπών κατά την διαδικασία παραγωγής σαπώνων (Vijaikishore & Karanth, 1986; Rehm, 1996; Wang et al., 2001; Taherzadeh et al., 2002; Pagliaro et al., 2007). Τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί σε παγκόσμιο επίπεδο η αύξηση των διαθέσιμων ποσοτήτων ακάθαρτης γλυκερόλης, καθώς αποτελεί το κύριο παραπροϊόν της παραγωγής του βιολογικού πετρελαίου (βιοντήζελ) (Johnson & Taconi, 2007; Yazdani & Gonzalez, 2007; Da Silva et al., 2009; Wolfson et al., 2009; Gupta & Kumar, 2012; Leoneti et al., 2012).

I.1.2. Παραγωγή βιολογικού πετρελαίου

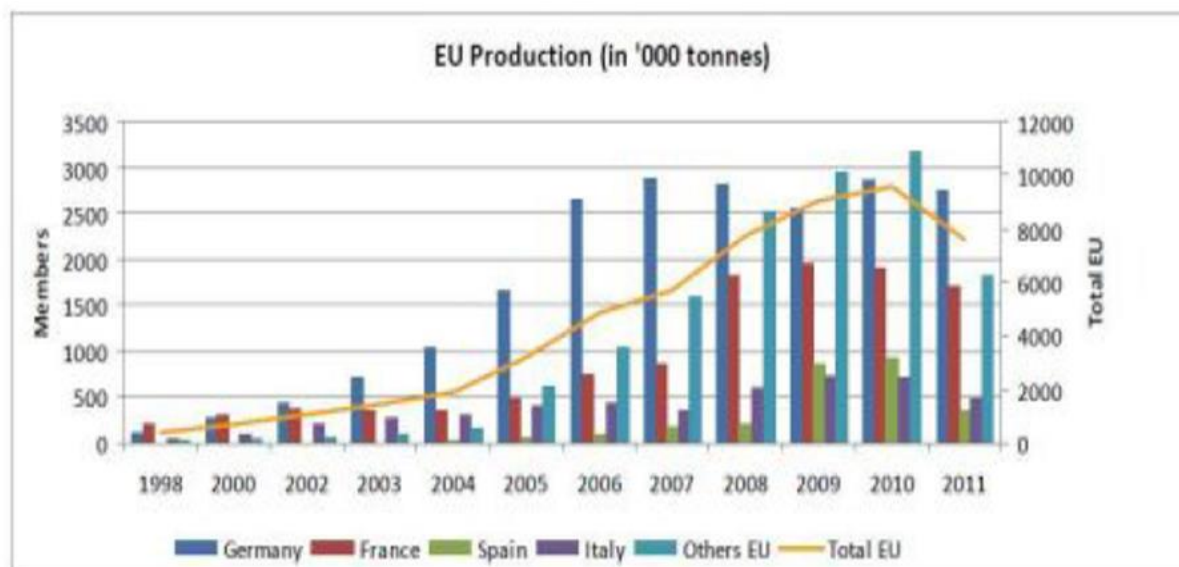
Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται η συνεχώς αυξανόμενη ζήτηση πετρελαίου από τις αναπτυσσόμενες χώρες. Η σταδιακή μείωση των αποθεμάτων του, η επακόλουθη αύξηση των τιμών αυτού καθώς και οι περιβαλλοντικές επιπτώσεις από την αύξηση της χρήσης του συμβατικού πετρελαίου, έστρεψε τις έρευνες προς την αναζήτηση εναλλακτικών καυσίμων φιλικότερων προς το περιβάλλον. Το γεγονός αυτό οδήγησε στην ανάπτυξη της βιομηχανίας παραγωγής βιολογικών καυσίμων, όπως το βιοντήζελ, η βιοαιθανόλη και το βιοαέριο.

I.1.2.1 Βιολογικά καύσιμα 1^{ης} γενιάς

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) (Χατζηφράγκου Α., 2012). Το βιοντήζελ θεωρείται ανανεώσιμη πηγή ενέργεια λόγω της προέλευσης των πρώτων υλών που συμμετέχουν στην παραγωγή του και η χρήση του παρουσιάζει σημαντικά περιβαλλοντικά και ενεργειακά οφέλη.

Το βιοντήζελ 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. 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. Πρόσφατα, με βάση την Οδηγία 2009/28/EK της Ευρωπαϊκής Ένωσης, έως το 2020 τα κράτη-μέλη υποχρεούνται να καλύπτουν τουλάχιστον το 10% της κατανάλωσης ενέργεια στον τομέα των μεταφορών με ανανεώσιμες πηγές ενέργειας. Η Ελλάδα εναρμόνισε την εθνική της νομοθεσία με την Οδηγία 2003/30/EK, σχετικά με την προώθηση της χρήσης βιοκαυσίμων ή άλλων ανανεώσιμων καυσίμων στις μεταφορές το Δεκέμβριου του 2005. Οι διάφοροι τύποι βιοκαυσίμων ορίζονται σύμφωνα με τον Νόμο 3423/05 και τίθεται ως στόχος για το 2000 η κατανάλωση 5,75% βιοκαυσίμων ως ποσοστό στα καύσιμα μεταφορών. Η παραγωγή

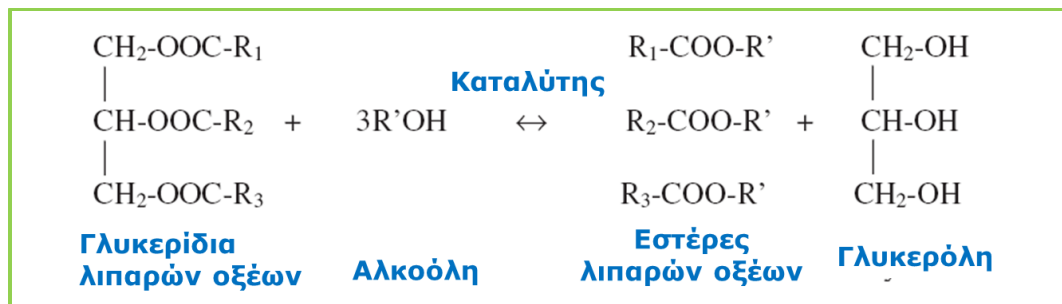
βιοκαυσίμων στην Ελλάδα ξεκίνησε πριν από μερικά χρόνια και σήμερα δραστηριοποιούνται στο χώρο αυτό 16 εταιρείες. Στον τομέα των μεταφορών το βιοντήζελ κατέχει την κυριότερη θέση καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε αναμεμιγμένο με συμβατικό ντίζελ σε διάφορες αναλογίες ή αυτούσιο με περιορισμένης έκτασης μετατροπές στους κινητήρες (EBB,2011) (Μετσοβίτη Μ, 2013).



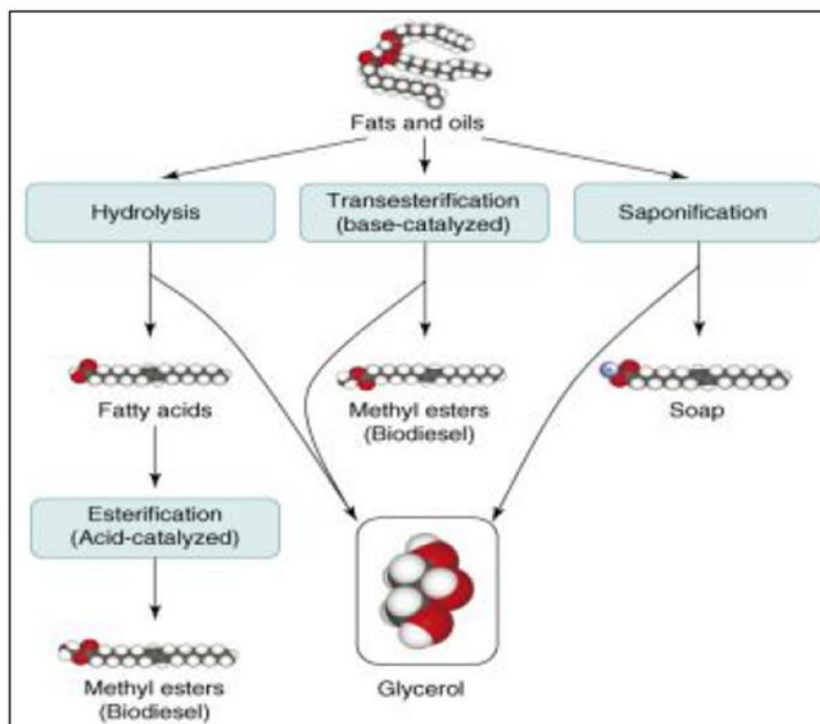
Σχήμα Ι.1: Ετήσια παραγωγή βιοντήζελ στην Ευρώπη (European Biodiesel Board, 2011)

Η βιομηχανική μέθοδος παραγωγής βιοντήζελ που εφαρμόζεται σε παγκόσμιο επίπεδο, περιλαμβάνει την μετεστεροποίηση των τριγλυκεριδίων των φυτικών ελαίων με μεθανόλη, ή σε μικρότερο βαθμό με αιθανόλη, που καταλύεται με NaOH ή KOH, ή βιολογικούς καταλύτες-ένζυμα. Οι παραγόμενοι μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων συνιστούν το βιοντήζελ.

Η παραγωγή βιοντήζελ παρουσιάζεται στο παρακάτω σχήμα:



Σχήμα I.2: Παραγωγή βιοντήζελ



Σχήμα I.3: Σχηματισμός γλυκερόλης ως το κύριο παραπροϊόν παραγωγής βιοντήζελ (Yazdani & Gonzalez, 2007)

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).

Οι πρώτες ύλες από τις οποίες παράγεται το βιοντήζελ είναι ο ηλίανθος, η ελαιοκράμβη, διάφορα σπορέλαια όπως βαμβακέλαιο, φοινικέλαιο, σογιέλαιο και χρησιμοποιημένα έλαια από εργοστάσια τροφίμων, εστιατόρια κ.λπ. Στην Ευρώπη χρησιμοποιείται κυρίως κραμβέλαιο, ενώ στη Βραζιλία έλαια από σπέρματα σόγιας και ηλίανθου, καθώς και φοινικέλαιο (da Silva et al., 2009).

Πιο συγκεκριμένα, τα στάδια παραγωγής του βιοντήζελ είναι τα παρακάτω: α) Τα έλαια, μετά από κατάλληλη επεξεργασία ραφινάρισματος, ώστε να απομακρυνθούν η λεκιθίνη, ο φώσφορος και τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, θερμαίνονται στους 55°C με περίσσεια μεθανόλης και καταλύτη και μετά από αντίδραση 2 ωρών το μείγμα αφήνεται σε ηρεμία. Το μείγμα μεθανόλης-γλυκερόλης είναι βαρύτερο με συνέπεια να καθιζάνει στον πυθμένα, από όπου και απομακρύνεται. Το υπόλοιπο μείγμα υφίσταται αρχικά απόσταξη για να απομακρυνθεί η μεθανόλη, η οποία, λόγω του υψηλού κόστους, επαναχρησιμοποιείται στην αντίδραση, ενώ ακολουθεί φυγοκέντριση κατά την οποία συλλέγεται η ακάθαρτη γλυκερόλη. Το τελικό μείγμα αποτελείται από βιοντήζελ και νερό, οπότε ξηραίνεται υπό κενό (Pagliaro & Rossi, 2010). Τα μίγματα της ακάθαρτης γλυκερόλης περιέχουν γλυκερόλη σε ποσοστά που κυμαίνονται από 55 έως 90% καθώς και νερό, μεθανόλη, ανόργανα άλατα, ελεύθερα λιπαρά οξέα και πληθώρα άλλων οργανικών ενώσεων σε ποικίλες αναλογίες, ενώ το χρώμα τους είναι από κίτρινο έως σκούρο καφέ. Τα καύσιμα που προέρχονται από την παραπάνω μέθοδο παραγωγής χαρακτηρίζονται ως βιοκαύσιμα πρώτης γενιάς ή τυπικά βιοκαύσιμα (Μετσοβίτη Μ., 2013). Τα βιοκαύσιμα πρώτης γενιάς 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, εισήχθη η τεχνολογία παραγωγής βιολογικών καυσίμων δεύτερης γενιάς στον τομέα των εναλλακτικών τύπων καυσίμων.

I.1.2.2 Βιολογικά καύσιμα επόμενης γενιάς

Τα βιοκαύσιμα δεύτερης γενιάς παράγονται με πρωτοποριακές διεργασίες, από περισσότερους τύπους βιομάζας όπως λιγνοκυτταρινούχα υποστρώματα, ξυλώδη φυτά, γεωργικά υπολείματα ακόμη και απόβλητα. Ο στόχος της παραγωγής δεύτερης γενιάς βιοκαυσίμων είναι γενικότερα η χρήση βιομάζας μη εδώδιμων τμημάτων των καλλιεργειών όπως φύλλα, βλαστοί και φλούδες, μη εδώδιμες καλλιέργειες όπως γρασίδι, μισχανθοί, δημητριακά μικρών σιτηρών, καθώς επίσης και γεωργοβιομηχανικά απόβλητα όπως πολτός φρούτων (Berndes et al.,2012; Naik et al.,2012; Sims et al.,2010; Damartzis & Zabaniotou,2011; Verdugo et al.,2012; Fiorese et al.,2013).

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 (Zeng 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).

Τέλος στα βιοκαύσιμα τρίτης γενιάς η πρώτη ύλη για την παραγωγή τους είναι τα άλγη, δηλαδή μικροφύκη ή μακροφύκη, τα οποία καλλιεργούνται σε νερό και επομένως

δεν απαιτούν αρώσιμες εκτάσεις, ενώ ταυτόχρονα έχουν υψηλές αποδόσεις (Costa & de Morais,2011; Lam & Lee,2012).

I.1.3 Βιομηχανική γλυκερόλη

Η παραγωγή βιολογικών καυσίμων έχει αρκετά οφέλη σε περιβαλλοντικό και οικονομικό επίπεδο. Για το λόγο αυτό τα τελευταία χρόνια παρατηρείται ραγδαία αύξηση στην παραγωγή τους. Άμεση συνέπεια της αύξησης της παραγωγής είναι η συσσώρευση μεγάλων ποσοτήτων αποβλήτων της διαδικασίας παραγωγής. Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά την διαδικασία παραγωγής βιοντήζελ, η ραγδαία αύξηση της παραγωγής του έχει ως αποτέλεσμα την συσσώρευση μεγάλων ποσοτήτων βιομηχανικής-ακάθαρτης γλυκερόλης, καθώς κατά την παραγωγή 10 kg βιοντήζελ παράγεται περίπου 1 kg γλυκερόλης. Η αυξημένη αυτή παραγωγή της γλυκερόλης έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση της τιμής της, καθώς οι ποσότητες που παράγονται υπερβαίνουν τη ζήτηση και επίσης τη δημιουργία περιβαλλοντικών προβλημάτων που προκύπτουν από την απόρριψη της. 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 (Χατζηφράγκου Α., 2012). Η σημαντική μείωση της τιμής της γλυκερόλης έχει άμεσο αντίκτυπο και στο κόστος παραγωγής του βιοντήζελ, καθώς εκτιμάται ότι το 75-95% του τελικού κόστους του βιοντήζελ προκύπτει από το οικονομικό αποτέλεσμα της διάθεσης ή επεξεργασίας των παραπροϊόντων του (Yuste & Dorado, 2006; Vlysidis et al., 2011). Για να ενισχυθεί ουσιαστικά η παραγωγή βιοντήζελ είναι επιτακτική πλέον η ανάγκη εξεύρεσης προηγμένων και καινοτόμων διεργασιών μετατροπής της ακάθαρτης γλυκερόλης σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας. Ο συνδυασμός των μέχρι τώρα συμβατικών χημικών τεχνικών αλλά και νέων βιοτεχνολογικών διεργασιών σε βιομηχανικό επίπεδο,

ενδέχεται να ενισχύσει τη βιωσιμότητα και την κερδοφορία των μονάδων. Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται σημαντικός αριθμός δημοσιεύσεων και άρθρων ανασκόπησης σχετικά με τις μεθόδους αξιοποίησης της γλυκερόλης (Johnson & Taconi, 2007; Amaral et al., 2009; Papanikolaou et al., 2009).

I.1.4 Χημική αξιοποίηση της γλυκερόλης

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

Οι παραδοσιακές χημικές διεργασίες αξιοποίησης μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες: α) στις αντιδράσεις οξείδωσης ή αναγωγής κατά τις οποίες η γλυκερόλη μετατρέπεται σε ενώσεις με τρία άτομα άνθρακα και β) στις αντιδράσεις με άλλα μόρια. Οι σημαντικότερες ενώσεις που παράγονται με τις παραπάνω μεθόδους είναι η επιγλωρυδρίνη, η 1,2-προπανοδιόλη, 1,3-προπανοδιόλη, το προπιονικό οξύ, η προπανόλη, η ισοπροπανόλη και η ακρολεΐνη (Johnson & Taconi, 2007; Pagliaro et al., 2007; Posada et al., 2012, Chatzifragkou & Papanikolaou, 2012). Οι παραπάνω ενώσεις έχουν υψηλή τιμή πώλησης σε σχέση με το κόστος της ακάθαρτης γλυκερόλης και ικανοποιητική δυνατότητα απορρόφησης από την αγορά, με αποτέλεσμα η παραγωγή τους να είναι οικονομικά συμφέρουσα. Παρόλα αυτά οι χημικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα κατά τη διαδικασία παραγωγής των παραπάνω ουσιών, πραγματοποιούνται σε συνθήκες υψηλής πίεσης και θερμοκρασίας και απαιτείται η κατανάλωση υψηλών ποσοτήτων ενέργειας. Επίσης σε αρκετές περιπτώσεις τα παραπροϊόντα της διαδικασίας είναι επικίνδυνα για το περιβάλλον και τη δημόσια υγεία. Από την άλλη πλευρά οι βιοτεχνολογικές εφαρμογές μπορεί να έχουν χαμηλότερες αποδόσεις και τελικές συγκεντρώσεις, πραγματοποιούνται

όμως σε ηπιότερες συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης ενώ τα προϊόντα και τα αντιδρώντα είναι κυρίως βιοδιασπώμενα. Πρόκειται λοιπόν για αντιδράσεις πιο φιλικές προς το περιβάλλον, αλλά και με χαμηλότερο ενεργειακό κόστος (Willke, 2004; Koutikaw, 2007; Dobson et al., 2001; Leonteri et al., 2012).

I.1.5 Βιοτεχνολογική αξιοποίηση της γλυκερόλης

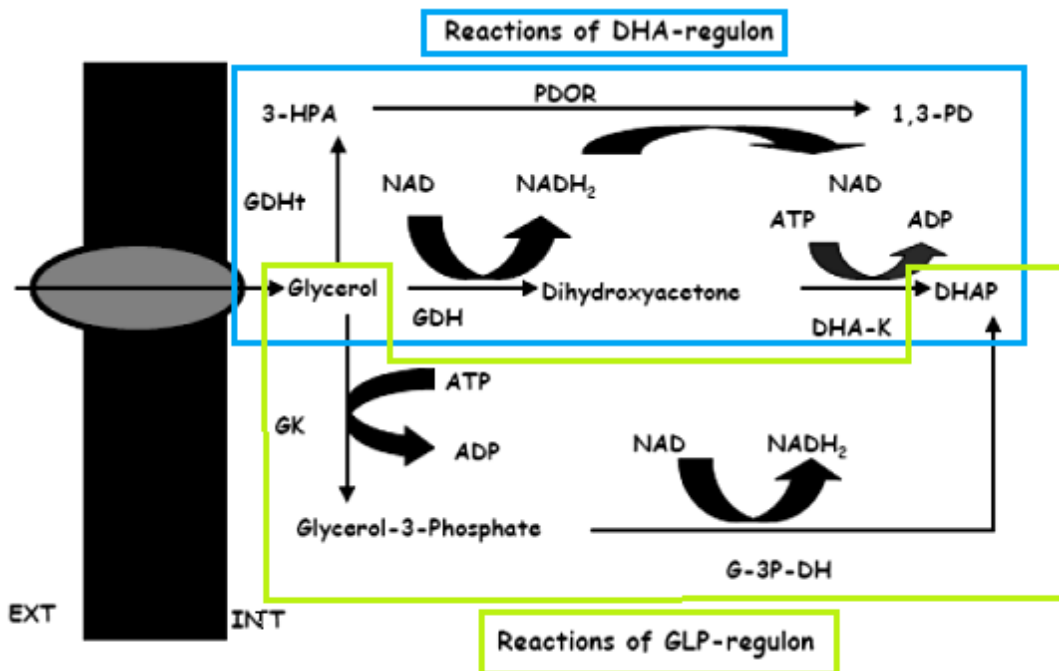
Οι παραπάνω λόγοι οδήγησαν τα τελευταία χρόνια τη χημική βιομηχανία στην εξεύρεση νέων βιοτεχνολογικών μεθόδων αξιοποίησης των μεγάλων ποσοτήτων ακάθαρτης γλυκερόλης που βρίσκονται πλέον διαθέσιμες στην αγορά. Μια από της πλέον ελπιδοφόρες μεθόδους αξιοποίησης της ακάθαρτης γλυκερόλης αποτελεί η δυνατότητα 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-υδρόξυ-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). Το μεγαλύτερο ενδιαφέρον 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).

I.1.6 Μεταβολισμός της γλυκερόλης

Αρκετοί προκαρυωτικοί μικροοργανισμοί έχουν ως σήμερα μελετηθεί για την ικανότητά τους να μεταβολίζουν την γλυκερόλη, δίνοντας πληθώρα μεταβολικών προϊόντων. Οι προκαρυωτικοί οργανισμοί που μπορούν να πραγματοποιήσουν τη ζύμωση της 1,3-προπανοδιόλης χρησιμοποιούν δυο διαφορετικούς μηχανισμούς για την είσοδο της γλυκερόλης στο κύτταρο. Η γλυκερόλη μπορεί να εισέλθει στο κύτταρο είτε α) μέσω της παθητικής διάχυσης ως μη φορτισμένο μικρομόριο, είτε β) μέσω της διευκολυνόμενης μεταφοράς (Voegele et al., 1993; da Silva et al., 2009). Στη συνέχεια τα μεταβολικά

μονοπάτια που θα ακολουθήσουν εξαρτώνται από την παρουσία ή απουσία οξυγόνου στο περιβάλλον της ζύμωσης.

Συνεπώς, κατά την τέλεση της ζύμωσης παρουσία οξυγόνου (συνήθως από μικροοργανισμούς που ανήκουν 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-υδροξυακετόνη (dihydroxyacetone phosphate, DHA-P), μέσω μίας αναερόβιας αφυδρογονάσης (G-3P-DH). Τα γονίδια των ανωτέρω ενζύμων απαρτίζουν ένα σύμπλεγμα (regulon), γνωστό ως σύμπλεγμα GLP (Forage and Lin, 1982; Papanikolaou, 2009). 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).

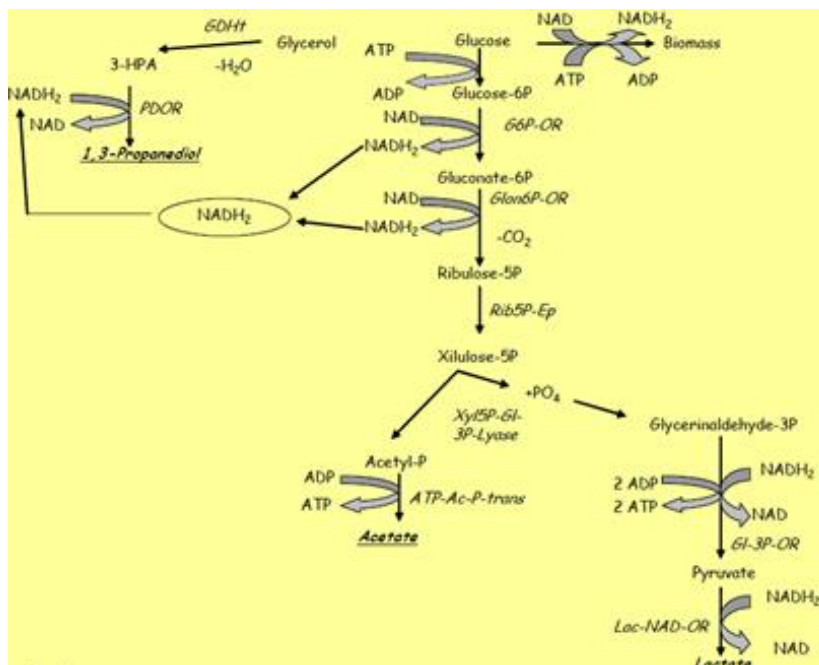


Σχήμα 1.4: Είσοδος γλυκερόλης στο εσωτερικό του προκαρυωτικού κυττάρου και βιοσύνθεση 1,3-προπανοδιόλης. Σύμπλεγμα DHA: Ένζυμα: GDHt: αφυδατάση της γλυκερόλης, PDOR: οξειδοοδουκτάση της 1,3-προπανοδιόλης, GDH: NAD-εξαρτημένη αφυδρογονάση της γλυκερόλης, DHA-K: κινάση της δι-

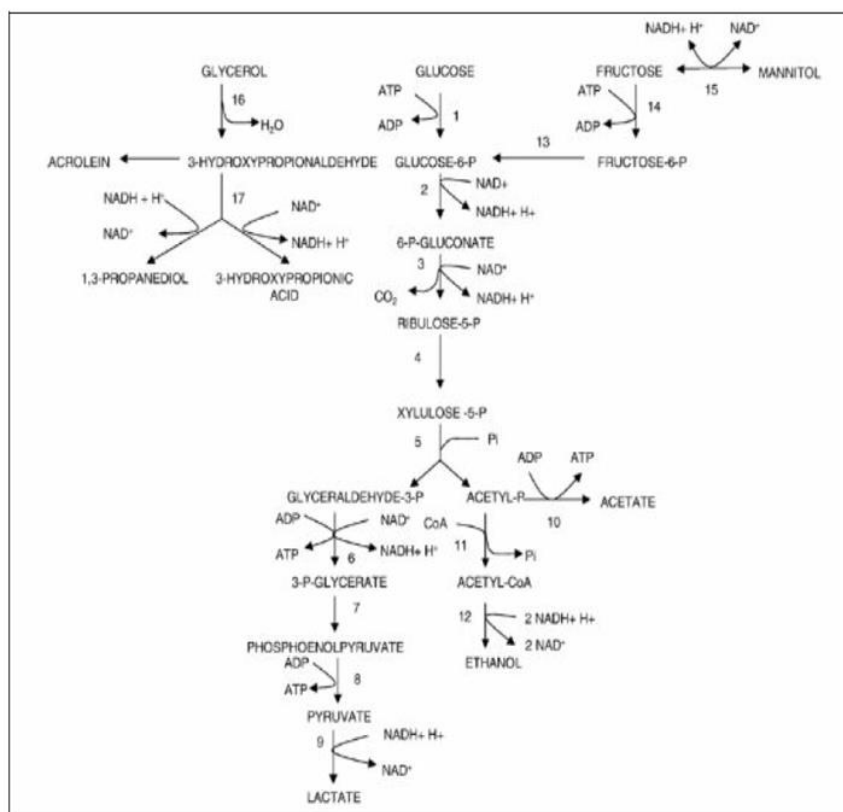
υδροξυακετόνης. Σύμπλεγμα GLF: Ένζυμα: GK: κινάση της γλυκερόλης, G-3P-DH: αφυδρογονάση της 3-φωσφο-γλυκερόλης (Papanikolaou, 2009).

Εναλλακτικά, η απουσία εξωγενών αποδεκτών ηλεκτρονίων σηματοδοτεί την έναρξη ενός τελείως διαφορετικού βιοχημικού μηχανισμού, κατά τον οποίο η γλυκερόλη καθίσταται 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-υδρόξυ-προπιοναλδεΐδη (3-HPA) με την επίδραση της B-12 εξαρτημένης αφυδατάσης της γλυκερόλης (GDHt). Εν συνεχεία, η 3-υδρόξυ-προπιοναλδεΐδη ανάγεται σε 1,3-προπανοδιόλη, μέσω του ενζύμου της οξειδοαναγωγίας της 1,3-προπανοδιόλης (PDOR), μια διαδικασία συνοδευόμενη από την αναγέννηση των αναγωγικών παραγόντων (NADH₂). Το γεγονός αυτό αποδεικνύει 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-εξαρτημένης αφυδρογονάσης της γλυκερόλης (GDH) και εν συνεχεία, φωσφορυλιώνεται σε φωσφο-δι-υδροξυακετόνη μέσω της κινάσης της δι-υδροξυακετόνης (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 οξειδοαναγωγίας της 1,3-προπανοδιόλης (dhaT) (Raynaud et al., 2003; Gonzalez-Pajuelo et al., 2004; 2006).

Ιδιαίτερα χαρακτηριστική είναι η αναερόβια ζύμωση της γλυκερόλης από τα γαλακτικά βακτήρια. Στην πλειονότητα τους τα στελέχη αυτής της ομάδας δεν μπορούν να μεταβολίσουν τη γλυκερόλη ως μοναδική πηγή άνθρακα και μια επιπλέον πηγή όπως γλυκόζη, φρουκτόζη κ.α. απαιτείται συνήθως για τη σύνθεση βιομάζας και τη δημιουργία μορίων ATP (Biebl et al., 1999). Στην περίπτωση αυτή η γλυκερόλη χρησιμοποιείται ως τελικός αποδέκτης ηλεκτρονίων. Στις περισσότερες μελέτες η γλυκερόλη αποτελεί συμπληρωματικό υπόστρωμα κάποιου σακχάρου, του οποίου ο μεταβολισμός γίνεται μέσω ετεροζυμωτικού μονοπατιού, ενώ η σύνθεση της 1,3-προπανοδιόλης συνοδεύει τον σχηματισμό των κύριων μεταβολικών προϊόντων που είναι το οξικό και το γαλακτικό οξύ, καθώς και η αιθανόλη (Veiga de Cuncha & Foster, 1992; De Valdez et al., 1997; Claisse & Lonvud-Funel, 2000; Garai-Ibabe et al., 2000; Papanikolaou, 2009).



Σχήμα 1.5: Αναερόβιος μεταβολισμός της γλυκερόλης με ταυτόχρονο μεταβολισμό της γλυκόζης από γαλακτικά βακτήρια (Papanikolaou, 2009)




Σχήμα Ι.6: Ταυτόχρονος μεταβολισμός της γλυκόζης και της γλυκερόλης από το στέλεχος *Lactobacillus collinoides* 17. Στο σχήμα εμφανίζονται τα κυριότερα ένζυμα του μεταβολισμού: 1) glukokinase, 2) glucose 6-phosphate dehydrogenase, 3) 6-phosphogluconate dehydrogenase, 4) epimerase, 5) phosphoketolase, 6) glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase & phosphoglycerate kinase, 7) phosphoglyceromutase & enolase, 8) pyruvate kinase, 9) lactate dehydrogenase, 10) acetate kinase, 11) phosphate acetyltransferase, 12) acetaldehyde dehydrogenase & alcoholdehydrogenase, 13) glucose phosphate isomerrase, 14) fructokinase, 15) mannitol dehydrogenase, 16) glycerol ddehydratase και 17) 1,3-propanediol dehydrogenase (Garai-Ibaba et al.,2008)

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).

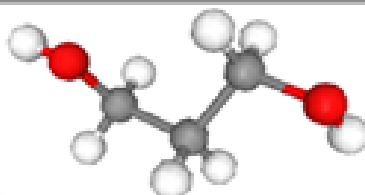
I.2 1,3-προπανοδιόλη

Η 1,3-προπανοδιόλη ή τριμέθυλο γλυκόλη ή 1,3-διυδροξυπροπάνιο, είναι μια οργανική ένωση με μοριακό τύπο $\text{CH}_2(\text{CH}_2\text{OH})_2$. Έχει μοριακή μάζα 76.09 g/mol και πυκνότητα 1.0597 g/mL. Το σημείο τήξης της είναι -28°C , ενώ το σημείο βρασμού κυμαίνεται από 210 έως 212°C . Πρόκειται για ένα άχρωμο, με ελαφρώς γλυκιά γεύση παχύρευστο υγρό, το οποίο αναμειγνύεται εύκολα με το νερό και την αιθανόλη (Wilke & Vorlop, 2008; Liu et al., 2010).

Πίνακας I.2: Φυσικοχημικές ιδιότητες 1,3-προπανοδιόλης (Μετσοβίτη Μ, 2013)

Γενικά χαρακτηριστικά		Συντακτικός τύπος
Χημική ονομασία:	1,3-προπανοδιόλη	
Μοριακός τύπος:	$\text{CH}_2(\text{CH}_2\text{OH})_2$	
Μοριακή μάζα:	76.09 g/mol	
Χημικές Ιδιότητες		Φυσικές Ιδιότητες
Σημείο τήξης:	-26.7°C	Άχρωμη
Σημείο βρασμού:	210-212 $^\circ\text{C}$	Ευδιάλυτη στο H_2O
Σημείο ανάφλεξης:	ASTM D-92 79 $^\circ\text{C}$	
Πυκνότητα:	1.0597 g /mL (20 $^\circ\text{C}$)	
Δείκτης διάθλασης:	1.438 (25 $^\circ\text{C}$)	

Τρισδιάστατη απεικόνιση μορίου 1,3-προπανοδιόλης



Ανακαλύφθηκε το 1881 από τον August Freund κατά τη ζύμωση της γλυκερόλης από μικτή καλλιέργεια, με κυρίαρχο μικροοργανισμό το *Clostridium pasteurianum* (Saxena et al., 2009). 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). Χάρη στην παρουσία δύο υδροξυλομάδων στις θέσεις 1 και 3 κατέχει ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών, με κυριότερη την παραγωγή πολυμερών. 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 αξιολογές 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.

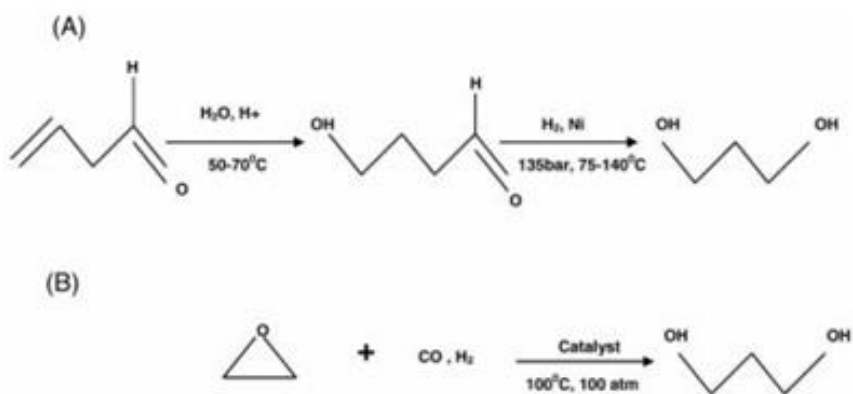
Επιπλέον, εκτός από τις δυνατότητες της χρήσης της 1,3-προπανοδιόλης ως μονομερές, η εν λόγω οργανική ένωση παρουσιάζει πλήθος συμπληρωματικών ιδιοτήτων, καθιστώντας την χρήσιμη και σε άλλους τομείς της βιομηχανίας. Ειδικότερα, η 1,3-προπανοδιόλη προσδίδει βελτιωμένες ιδιότητες κατά την προσθήκη της 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).

Επίσης η 1,3-προπανοδιόλη σε συνδυασμό με 2,2,4,4-τετραμεθυλο-1,3-κυκλοβουτανοδιόλη και διμέθυλο-τεραφθαλικό-εστέρα, έχει χρησιμοποιηθεί στην κατασκευή ενός διαφανούς βαλλιστικού πολυμερούς. Η σύνθεση του μπορεί να προσαρμοστεί για την ενίσχυση ιδιοτήτων όπως η διαφάνεια, η αντοχή στην κρούση και η σταθερότητα στην ακτινοβολία UV. Το πολυμερές μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε φακούς γυαλιών ανθεκτικούς σε χτυπήματα, σε γυαλιά για λάμπες θυέλλης και σε αλεξίσφαιρα γυαλιά (Saxena et al., 2009). Τα πολυμερή με βάση την 1,3-προπανοδιόλη έχουν καλύτερες ιδιότητες και μεγαλύτερη σταθερότητα συγκριτικά με εκείνα που παράγονται με βάση την 1,2-προπανοδιόλη, τις βουτανοδιόλες ή την αιθυλενογλυκόλη (Kurian, 2005; Celinska, 2010).

1.2.1 Χημική παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης

Η συμβατική μέθοδος παραγωγής της 1,3-προπανοδιόλης σε βιομηχανικό επίπεδο βασίζεται στην πραγματοποίηση χημικών διεργασιών μέσω δύο βασικών μεθόδων. Η πρώτη μέθοδος, που ονομάζεται “Degussa” και ανήκει 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-προπιοναλδεΐδη, υπό την άσκηση ιδιαίτερα υψηλών συνθηκών πίεσεως (περίπου 150 bar). Εν συνεχεία, η αλδεΐδη 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). Ο συντελεστής απόδοσης στην περίπτωση της πρώτης μεθόδου δεν υπερβαίνει το 65%, λόγω ταυτόχρονου σχηματισμού 1,2-προπανοδιόλης, ενώ στη δεύτερη μέθοδο παρασκευής φτάνει έως το 80%. Με δεδομένο ότι το αιθυλενοξείδιο είναι αρκετά φθηνότερο από την ακρολεΐνη, προκύπτει ότι η μέθοδος της εταιρείας Shell είναι οικονομικά, τουλάχιστον, πιο συμφέρουσα (Zeng & Biebl, 2002; Papanikolaou, 2009).



Σχήμα Ι.7: Χημική σύνθεση της 1,3-προπανοδιόλης Α) Μέθοδος Degussa από ακρολεΐνη και Β) Μέθοδος Shell από αιθυλενοξείδιο (Saxena et al., 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. Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα παραπάνω, 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).

Ι.2.2 Βιοτεχνολογική παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης

Όπως αναφέρεται και παραπάνω η σύνθεση της 1,3-προπανοδιόλης μέσω μικροβιακών ζυμώσεων είναι γνωστή από το 1881, μόλις τα τελευταία χρόνια η διαδικασία βιοσύνθεσης της προσέκλυσε την προσοχή των ερευνητών και κατ' επέκταση της βιομηχανίας, λόγω του σχετικά χαμηλού κόστους, των ήπιων αντιδράσεων και της φιλικότητας προς το περιβάλλον (Zeng & Biebl, 2002; Liu et al., 2010).

Η ζύμωση της γλυκερόλης προς παραγωγή 1,3 προπανοδιόλης σε ικανοποιητικές αποδόσεις είναι μέχρι σήμερα γνωστή μόνο από βακτήρια (Biebl et al,1999). Αρκετοί μικροοργανισμοί μπορούν να ζυμώσουν σάκχαρα σε γλυκερόλη, αλλά δεν μπορούν να μετατρέψουν την γλυκερόλη σε 1,3 προπανοδιόλη. Ένας περιορισμένος αριθμός βακτηριακών στελεχών έχει την ικανότητα να μεταβολίσει τη γλυκερόλη ή μίγματα σακχάρων-γλυκερόλης σε 1,3 –προπανοδιόλη, ωστόσο κανένα φυσικό στέλεχος δεν μπορεί να ζυμώσει απευθείας σάκχαρα σε 1,3-προπανοδιόλη (Cameron et al.,1998; Saxena et al.,2009). Εξαιρέση αποτελούν τα ανασυνδυασμένα στελέχη του είδους *Escherichia coli*, τα οποία είναι σε θέση να χρησιμοποιούν ως υπόστρωμα για την παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης τη γλυκόζη (Nakamura and Whited, 2003; Jin & Lee, 2008; Liang et al., 2011; Zeng and Sabra, 2011).

Η μεταβολική οδός της παραγωγής της 1,3-προπανοδιόλης από τη γλυκερόλη έχει μελετηθεί εκτενώς στο παρελθόν και τα τελευταία χρόνια ελκύει ξανά το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, λόγω της αύξησης των αποθεμάτων της γλυκερόλης, ως αποτέλεσμα 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).

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-Pajuelo 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*, *L. reuteri* και ο *L. diolivorans* 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 (NADH₂) (Schülz and Radler 1984; Veiga da Cunha and Foster, 1992; Lüthi-Peng et al., 2002, Pflügl et al., 2012).

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι κυριότεροι προκαρυωτικοί μικροοργανισμοί που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα για την ικανότητα τους να συνθέτουν 1,3-προπανοδιόλη.

Πίνακας 1.3: Παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης από προκαρυωτικούς μικροοργανισμούς σε υπόστρωμα καθαρής και βιομηχανικής γλυκερόλης (Μετσοβίτη Μ., 2013)

Μικροοργανισμός	Στέλεχος	PD (g/L)	Y _{PDO/Glyc} (g/g)	Pr (g/L/h)	Είδος καλλιέργειας	Αναφορά
Καθαρή γλυκερόλη						
<i>Citrobacter freundii</i>	– ^a	25,4	0,51	– ^a	Ασυνεχής σε φιάλες	Anand & Saxena (2011)
	ATCC 8090	30,8	0,44	0,34	Ασυνεχής	Barbirato et al. (1998)
	DSM 30040	41,4	1,74	0,50	Συνεχής (Διβάθμια)	Boeningk et al. (1993)
	DSM Zu	28,1	0,53	1,33	Ασυνεχής	Homann et al. (1990)
	DSM 30040	16,4	0,47	8,20	Συνεχής ακίνητοποιημένα κύτταρα	Pflugmacher & Gottschalk (1994)
<i>Clostridium butyricum</i>	AKR 102a	93,7	0,52	2,98	Ημι-συνεχής	Wilkens et al. (2011)
	CNCM 12111	67,0	0,52	– ^a	Ασυνεχής	Himmi et al. (1999)
	DSM 5431	58,0	0,56	2,7	Ημι-συνεχής	Günzel et. al. (1991)
	DSM 5431	56,0	0,51	2,2	Ασυνεχής	Biebl et. al. (1992)
	VPI 3266	29,7	0,51	3,0	Συνεχής	González-Pajuelo et al. (2004)
	DSM 5431	25,6	0,51	1,8	Ασυνεχής	Rehman et. al. (2008)
<i>Clostridium diolis</i>	GSHM 4 ^γ	84,6	0,50	2,74	Ημι-συνεχής	Otte et al. (2009)
	DSM 15410	48,8	0,54	2,14	Ημι-συνεχής	Otte et al. (2009)
<i>Clostridium</i> sp.	IK 124	87,7	0,54	1,9	Ημι-συνεχής	Hirshmann et al. (2005)
<i>Enterobacter agglomerans</i>	CNCM 1210	18,1	0,46	0,70	Ασυνεχής	Barbirato et al. (1995)
<i>Escherichia coli</i>	K-12 ER 2925 ^γ	104,4	0,90	2,61	Ημι-συνεχής (Διβάθμια)	Tang et al. (2009)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	LDH3 ^γ	62,6	0,41	1,04	Ημι-συνεχής	Yang et al. (2007)
		56,7	0,44	0,83	Ημι-συνεχής	Yang et al. (2007)
	M5al	43,3	0,30	0,86	Ημι-συνεχής	Yang et al. (2007)
		39,1	0,34	0,63	Ημι-συνεχής	Yang et al. (2007)
	ZG36	27,1	0,28	0,28	Ημι-συνεχής	Zhang et al. (2011)
	M5al	24,0	0,17	0,41	Ημι-συνεχής	Zhang et al. (2011)
	Lin	18,2	0,36	0,91	Ασυνεχής	Homann et al. (1990)
	NRCC 3006	16,9	0,34	0,68	Ασυνεχής	Homann et al. (1990)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	LDH56 ^γ	102,0	0,43	2,13	Ημι-συνεχής	Xu et al. (2009)
	HR 526	95,4	0,40	1,98	Ημι-συνεχής	Xu et al. (2009)
	ME-308	70,0	0,58	0,97	Ημι-συνεχής	Ji et al. (2009c)
	XHPD-Li	65,2	0,46	1,36	Ημι-συνεχής	Ma et al. (2009)
		60,8	0,50	1,27	Ημι-συνεχής	Ma et al. (2009)
	DSM 4799	63,3	0,53	0,92	Ημι-συνεχής με ακίνητοποιημένα κύτταρα	Jun et al. (2010)

DSM 2026	61,9	0,40	2,00	Ημι-συνεχής	Mu et al. (2009)
DSM 2026	59,5	0,44	1,57	Ημι-συνεχής	Chen et al. (2003a)
	56,0	0,44	0,80	Ημι-συνεχής	Chen et al. (2003a)

Βιομηχανική γλυκερόλη

<i>Clostridium butyricum</i>	AKR102a	76,2	0,51	2,3	Ημι-συνεχής	Wilkens et al. (2011)
	VPI 1718	67,9	0,55		Ημι-συνεχής	Chatzifragkou et al. (2011a)
	E5	58,4	0,54	1,2	Ημι-συνεχής	Petitdimanche et al. (1995)
	F2b	48,1	0,55	– ^a	Συνεχής	Papanikolaou et al. (2000)
	AKR 91b	38,0	– ^a	– ^a	DWP	Ringel et al. (2011)
	VPI 3266	31,5	0,50	3,15	Συνεχής	González-Pajuelo et al. (2004)
	DSM 5431	25,0	0,50	–	Ασυνεχής	Rehman et al. (2008)
<i>Clostridium</i> sp.	IK 124	80,1	0,56	–	Ημι-συνεχής	Hirshman et al. (2005)

–^a: Δεν αναφέρεται στη μελέτη

^γ: ανασυνδυασμένο στέλεχος

DWP: Deep Well Plate ($V_w=1\text{mL}$)

Η σύνθεση της 1,3-προπανοδιόλης μέσω μικροβιακών ζυμώσεων είναι ιδιαίτερος εκλυστική, καθώς αποφεύγεται η παραγωγή τοξικών υποπροϊόντων, όπως παρατηρείται στην περίπτωση των χημικών μεθόδων παραγωγής, ενώ παράλληλα τα τελευταία χρόνια πλήθος βακτηριακών στελεχών μελετάται ως προς την δυνατότητα χρησιμοποίησης φθηνότερου υποστρώματος, αυτού της βιομηχανικής/ακάθαρτης γλυκερόλης (Saxena et al., 2009). Παρ'όλα αυτά η τέλεση της βιοδιεργασίας σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος και συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση του συντελεστή απόδοσης και της παραγωγικότητας συγκριτικά με την χημικά συντιθέμενη προπανοδιόλη. Στην προσπάθεια να ξεπεραστούν αυτοί οι περιορισμοί, οι έρευνες επικεντρώνονται στην ανάπτυξη διαφόρων στρατηγικών της βιοδιεργασίας, αλλά και στη χρήση της μεταβολικής μηχανικής για τη δημιουργία βελτιωμένων βακτηριακών στελεχών (Saxena et al., 2009; Celinska, 2010).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η βιοτεχνολογική παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης τελείται με την χρήση διαφόρων προκαρυωτικών μικροοργανισμών, που ανήκουν 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, Μετσοβίτη Μ., 2013; Χατζηφράγκου Α., 2012).

Προκειμένου να επιτευχθεί βελτιστοποίηση της διεργασίας της παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης, έχει αξιολογηθεί σχεδόν το σύνολο των εν δυνάμει εφαρμοζόμενων συστημάτων καλλιέργειας, ήτοι των καλλιεργειών σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου, ημι-διαλείποντος έργου, καθώς επίσης και συνεχών καλλιεργειών 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-Rajuelo 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, 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 καλλιεργειών 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-Rajuelo et al., 2005; Xu et al., 2009; Wilkens et al., 2011). 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 I.4: Παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης από φυσικά και γενετικώς τροποποιημένα στελέχη βακτηρίων σε διάφορα συστήματα καλλιέργειας (Χατζηφράγκου Α, 2012)

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	87,7	0,56	Hirschmann et al. (2005)
	<i>C. acetobutylicum</i> DGI [†]	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> AKR 102a	Βιομηχανική	76,2	0,51	Wilkens et al. (2011)
	Διβάθμιο	<i>E. coli</i> K-12 ER2925 [†]	Καθαρή (συν-ζύμωση)	104,4	0,90

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> DGI [†]	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*. 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).

Γενικά, για την επιτυχή εδραίωση της βιοτεχνολογικής παραγωγής της 1,3-προπανοδιόλης στο ευρύτερο φάσμα των βιομηχανικών ζυμώνσεων, 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).

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. 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).

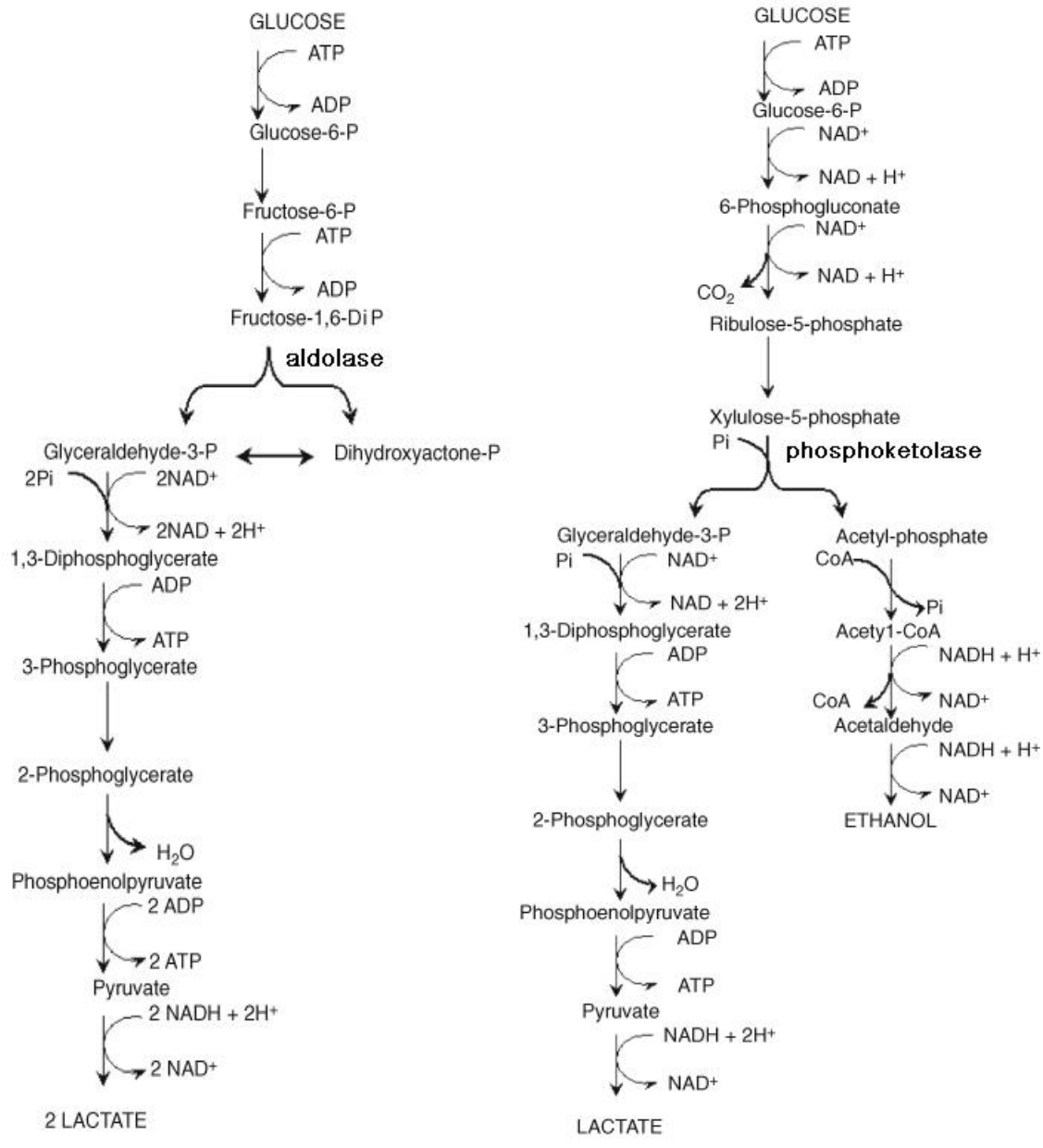
1.3 Γαλακτικά βακτήρια

Τα γαλακτικά βακτήρια αναφέρονται σε μια ομάδα βακτηρίων, τα οποία κατά το μεταβολισμό των υδατανθράκων παράγουν ως κύριο μεταβολικό προϊόν το γαλακτικό οξύ. Είναι θετικά κατά Gram, αρνητικά στην καταλάση και στην οξειδάση, μη σποριογόνα, μικροαερόφιλα βακτήρια και περιλαμβάνουν κόκκους και βάκιλους. Διακρίνονται σε ομοζυμωτικά και ετεροζυμωτικά ανάλογα με το τελικό προϊόν μεταβολισμού της γλυκόζης. Τα ομοζυμωτικά παράγουν σχεδόν μόνο γαλακτικό οξύ, ενώ τα ετεροζυμωτικά παράγουν εκτός από γαλακτικό οξύ και άλλα προϊόντα κυρίως οξικό οξύ, αιθανόλη, διοξειδίο του άνθρακα, καθώς και ακεταλδεύδη και διακετύλιο (Carr et al., 2002)

Στη βιομηχανία τροφίμων χρησιμοποιούνται παραδοσιακά ως εναρκτήριες καλλιέργειες στην παρασκευή ζυμούμενων γαλακτοκομικών προϊόντων όπως τυριά, γιαούρτι, βούτυρο, κεφίρ καθώς επίσης στην Παρασκευή αλκοολούχων ποτών, πίκλας λαχανικών, και αλλαντικών ζύμωσης (Vandenbergh, 1993). Ο ρόλος τους είναι πολλαπλός. Συνεισφέρουν στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των προϊόντων καθώς και στη συντήρησή τους με την *in situ* παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών, ενώ στελέχη γαλακτικών βακτηρίων χρησιμοποιούνται ως προβιοτικές καλλιέργειες και επιδρούν ευεργετικά στην υγεία βελτιώνοντας της ισορροπία της εντερικής χλωρίδας. Πιο συγκεκριμένα η παραγωγή του γαλακτικού οξέος στο γάλα κατά τη ζύμωση της λακτόζης μειώνει το pH προκαλώντας έτσι αλλοδόμηση των πρωτεϊνών με αποτέλεσμα να αλλάζει η υφή του προϊόντος, ενώ ταυτόχρονα του προσδίδει ελαφρώς όξινη γεύση. Η ακεταλδεύδη προσδίδει το χαρακτηριστικό άρωμα στο γιαούρτι και το διακετύλιο συνεισφέρει το χαρακτηριστικό βουτυρώδες άρωμα και γεύση (Jay, 1982). Εκτός από το γαλακτικό οξύ που μειώνοντας το pH αποτελεί άλλο ένα εμπόδιο στην ανάπτυξη αλλοιωγόνων μικροοργανισμών, άλλες αντιμικροβιακές ουσίες όπως το οξικό οξύ, το υπεροξειδίο του υδρογόνου και οι βακτηριοσίνες επεκτείνουν τη διάρκεια ζωής των προϊόντων (Tag et al., 1976; Klaenhammer, 1988; Lindgren & Dbrogosz, 1990; Lewus et al., 1991; Vandenbergh, 1993; De Vuyst & Vandamme, 1994; Cleveland et al., 2001; Degan et al., 2006; Metsoviti et al., 2011).

Τα γαλακτικά βακτήρια περιλαμβάνουν τα γένη *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Aerococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*, *Kosurria*, *Propionibacterium*, *Brevibacterium*, *Carnobacterium* και *Bifidobacterium* (Limsowtin et al., 2002). Για τη βιομηχανία τροφίμων ιδιαίτερο ρόλο

έχουν τα γένη *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Propionibacterium* και *Carnobacterium* (O'Sullivan et al., 2002; Metsoviti et al., 2011).



Σχήμα 1.8: Ομοζυμωτική γαλακτική ζύμωση και ετεροζυμωτική γαλακτική ζύμωση (Πανεπιστημιακές παραδόσεις)

1.3.1 Το γένος *Lactobacillus*

Το μεγαλύτερο και σπουδαιότερο γένος της οικογένειας είναι το γένος *Lactobacillus*, το μοναδικό της οικογένειας *Lactobacillaceae* του οποίου τα μέλη είναι

ράβδοι που απαντώνται κατά ζεύγη ή μικρές αλυσίδες και, σπανιότερα, κοκκοβάκιλοι. Τα βακτήρια του γένους αυτού είναι προαιρετικά αναερόβια ή μικροαερόφυλλα, αρνητικά σε καταλάση και δεν διαθέτουν κυτοχρώματα. Απομονώνονται από την επιφάνεια φυτών, από γαλακτοκομικά προϊόντα, προϊόντα κρέατος, νερά κ. ά. Αποτελούν τμήμα της φυσιολογικής χλωρίδας του ανθρώπινου σώματος και προστατεύουν, μερικώς τουλάχιστον, τον οργανισμό από μολύνσεις. Συνήθως δεν είναι παθογόνα. Μεταβολίζουν τα σάκχαρα (εξόζες) προς γαλακτικό οξύ είτε μέσω της γλυκολυτικής οδού Embden-Meyerhof (ομογαλακτική ζύμωση) είτε μέσω της οδού των φωσφοροπεντοζών (ετερογαλακτική ζύμωση). Στην πρώτη περίπτωση, το σάκχαρο μετατρέπεται, σε ποσοστό της τάξης του 90%, σε γαλακτικό οξύ, ενώ στην δεύτερη περίπτωση προς ίσες ποσότητες γαλακτικού οξέος, αιθανόλης και διοξειδίου του άνθρακα. Αναπτύσσονται με σχετική ευχέρεια σε μεσόφιλο και ελαφρώς όξινο περιβάλλον, σε pH 4,5-6,4.

Οι γαλακτοβάκιλοι διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στην βιομηχανία τροφίμων. Χρησιμοποιούνται στην παραγωγή ζυμωμένων τροφίμων φυτικής προέλευσης, όπως πίκλες και ελιές, ή ζωικής προέλευσης, όπως αλλαντικά και γαλακτοκομικά προϊόντα. Χρησιμοποιούνται, επίσης, στην βιοτεχνολογική παραγωγή γαλακτικού οξέος, το οποίο βρίσκει εφαρμογές ως πρόσθετο τροφίμων και ως πρώτη ύλη στην παραγωγή βιοπολυμερών, όπως το πολυγαλακτικό οξύ (Αγγελής Γ., 2007).

I.4. Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η εύρεση των καταλληλότερων σακχαρούχων υποστρωμάτων που μπορούν να καταναλωθούν από το βακτηριακό στέλεχος *Lactobacillus diolivorans* DSM 14421, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν σε συνζύμωση με τη βιομηχανική γλυκερόλη ώστε να παραχθεί η μεγαλύτερη δυνατή ποσότητα της 1,3-προπανοδιόλης.

II. Υλικά και μέθοδοι

II.1 Βιολογικό υλικό

Το στέλεχος *Lactobacillus diolivorans* DSM 14421 αποτελεί τον μικροοργανισμό που χρησιμοποιήθηκε αποκλειστικά κατά τη διάρκεια της παρούσας μελέτης.

Ταξινόμηση:

Σύμφωνα με τον *Catalogue of Life* ο μικροοργανισμός ανήκει:

- Βασίλειο: *Bacteria*
- Φύλο: *Firmicutes*
- Τάξη: *Bacilli*
- Κλάση: *Lactobacillales*
- Οικογένεια: *Lactobacillaceae*
- Γένος: *Lactobacillus*
- Είδος: *diolivorans*

Ο μικροοργανισμός έχει σχήμα ραβδίου και δεν έχει δυνατότητα κίνησης. Είναι δυνατόν να απαντηθεί σαν ένα κύτταρο, σε ζευγάρια και ενίοτε και σε μικρές αλυσίδες. Κατάλληλο θρεπτικό μέσο για την ανάπτυξη του *Lactobacillus diolivorans* θεωρείται το MRS-medium. Τα κύτταρα όταν αναπτύσσονται σε γλυκόζη μπορούν να φτάσουν μέχρι τα 10μm. Οι αποικίες στο MRS-medium εμφανίζονται ως υπόλευκες. Είναι υποχρεωτικά ετεροζυμωτικό βακτήριο. Το στέλεχος απομονώθηκε στην Ολλανδία από ενσιρώματα αραβόσιτου (Bergey, 2009)

II.2 Γλυκερόλη

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε βιομηχανική γλυκερόλη που προήλθε από την εταιρεία «GF Energy» (Κόρινθος). Το υλικό εκκίνησης ήταν απόβλητες λιπαρές ύλες φυτικής ή ζωικής προέλευσης.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται η επί τοις εκατό κατά βάρος σύσταση της χρησιμοποιούμενης ακάθαρτης γλυκερόλης.

Πίνακας II.1: Σύσταση ακάθαρτης γλυκερόλης

Σύσταση (% κ.β.)	
Γλυκερόλη	85,5
Νερό	9,7
Άλατα	4,1
Λιπαρά οξέα	-
Μεθανόλη	0,7

Για τους σκοπούς της πειραματικής διαδικασίας, σε ορισμένες περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα η καθαρή γλυκερόλη (99% καθαρότητας, Sigma Aldrich). Η γλυκερόλη (ακάθαρτη ή καθαρή) αποτέλεσε την πηγή ενέργειας για τις μικροβιακές ζυμώσεις, ενώ η συγκέντρωση της διαφοροποιούνταν ανάλογα με τους σκοπούς του πειράματος, κυμαινόμενη από 0 έως 60 g/L. Στην περίπτωση της χρήσης οποιασδήποτε ακάθαρτης γλυκερόλης, για τον υπολογισμό της τελικής της συγκέντρωσης στο θρεπτικό μέσο, λαμβάνονταν υπ' όψιν η καθαρότητα της.

II.3 Υπόστρωμα ανάπτυξης

Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία των εναιωρημάτων κυττάρων (εμβόλιο) καθώς και για τις ζυμώσεις ήταν το MRS Medium, το οποίο είχε την ακόλουθη σύσταση (σε g/L):

Πίνακας II.2: Σύσταση θρεπτικού μέσου

Σύσταση (g/L)	
Casein peptone, tryptic digest	10.00
Meat extract	10.00
Yeast extract	5.00
Glucose	20.00
Tween 80	1.00

K₂HPO₄	2.00
Na-acetate	5.00
(NH₄)₂ citrate	2.00
MgSO₄ x 7 H₂O	0.20
MnSO₄ x H₂O	0.05

Τόσο κατά την παρασκευή του εμβολίου όσο και κατά την παρασκευή του υγρού ζύμωσης πραγματοποιείται έλεγχος του pH πριν τον εμβολιασμό και αν είναι απαραίτητο γίνεται διόρθωση μεταξύ 6.2-6.5.

Η πηγή άνθρακα και η σύσταση της στο υγρό ζύμωσης άλλαζε ανάλογα με το πείραμα. Ως πηγές άνθρακα χρησιμοποιήθηκαν η εμπορική γλυκόζη, η εμπορική σακχαρόζη, η εμπορική ξυλόζη, η εμπορική φρουκτόζη, η εμπορική λακτόζη, το ξινό τυρόγαλα και η μελάσα. Η απόβλητη μελάσα που χρησιμοποιήθηκε προήλθε από την Ελληνική Βιομηχανία Ζάχαρης και περιείχε 60% σάκχαρα, κυρίως σακχαρόζη, αλλά και σημαντικό ποσοστό ελεύθερης γλυκόζης περίπου 50%. Το απόβλητο τυρόγαλα που χρησιμοποιήθηκε περιείχε περίπου 400g/L λακτόζη.

Π.4 Συνθήκες καλλιέργειας

Κατά την παρασκευή της προκαλλιέργειας είναι σημαντικό να χρησιμοποιούμε μικροοργανισμούς που έχουν ανανεωθεί 2 φορές. Ο μικροοργανισμός φυλάσσεται στην κατάψυξη σε cryovials των 2ml με την προσθήκη 1ml καθαρής γλυκερόλης, ώστε να αποφευχθεί η καταστροφή των κυττάρων από τις θερμοκρασίες της καταψυξης, Η προκαλλιέργεια είχε τελικό όγκο 80ml, σε αυτή προστέθηκαν 4 cryovials. Στη συνέχεια η προκαλλιέργεια αφήνεται για επώαση για 20h στους 30°C σε 180rpm.

Αρχικά πραγματοποιείται διαδικασία επιλογής των καταλληλότερων πηγών άνθρακα για την μέγιστη παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης κατά τον μεταβολισμό της γλυκερόλης. Η πειραματική διαδικασία έλαβε χώρα σε φιάλες τύπου Duran 0.5L , πληρωμένες κατά τα 4/5 τους (0.4 L) ώστε να μελετηθεί η αύξηση του μικροοργανισμού και η παραγωγή των μεταβολικών προϊόντων. Στη συνέχεια η παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης πραγματοποιήθηκε σε ασυνεχείς και ημι-συνεχείς τροφοδοτούμενες καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα 1-L με ενεργό όγκο 0.8 L.

Συγκεκριμένα, η παρούσα μελέτη πραγματοποιείται τη ζύμωση της γλυκερόλης από τον *L.diolivorans* DSM 14421. Τόσο στις ασυνεχείς καλλιέργειες σε φιάλες Duran , όσο και στους βιοαντιδραστήρες ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία: εμφύσηση αερίου αζώτου εντός των φιαλών για την απομάκρυνση του οξυγόνου από το υγρό θρεπτικό μέσο και επίτευξη αναερόβιων συνθηκών για 20-30 λεπτά, ευθύς αμέσως κλείσιμο των φιαλών και αποστείρωση στο αυτόκλειστο ($T=121^{\circ}\text{C}$, 20 min). Στους βιοαντιδραστήρες πρώτα πραγματοποιείται αποστείρωση σε αυτόκλειστο και στη συνέχεια η σπαργή αζώτου. Οι φιάλες εμβολιάζονταν υπό ασηπτικές συνθήκες με 10% (κ.ο.) εναιωρήματος κυττάρων και τοποθετούνταν για επώαση σε ανακινούμενο επωαστικό κλίβανο τύπου Labline. Η θερμοκρασία επώασης ήταν 30°C και ο ρυθμός ανάδευσης 180rpm. Στους βιοαντιδραστήρες η θερμοκρασία επώασης ήταν 30°C και ο ρυθμός ανάδευσης 250rpm. Για τις αναλύσεις και τον τον προσδιορισμό της τιμής του pH της καλλιέργειας, της βιομάζας, της συγκέντρωσης της πηγής άνθρακα, της συγκέντρωσης της γλυκερόλης, της 1,3-προπανοδιόλης, της αιθανόλης και των οργανικών οξέων λαμβάνονται δείγματα από τις καλλιέργειες ανά τακτά χρονικά διαστήματα, συνήθως ανά 2-3 ώρες.

II.5 Αναλύσεις

Οι αναλύσεις της παρούσας πτυχιακής αφορούν τον προσδιορισμό της τιμής του pH της καλλιέργειας, της βιομάζας, της συγκέντρωσης της πηγής άνθρακα, της συγκέντρωσης της γλυκερόλης, της 1,3-προπανοδιόλης, της αιθανόλης και των οργανικών οξέων.

II.5.1 Προσδιορισμός pH

Το pH της καλλιέργειας μετρήθηκε με pH-μέτρο τύπου Jenway 3020 pHmeter. Μετά την μέτρηση του εκάστοτε σημείου της κινητικής, πραγματοποιήθηκε διόρθωση του pH στο θρεπτικό μέσο, όπου ήταν αναγκαίο, ώστε η τιμή του να κυμαίνεται μεταξύ 5.8-6.5. Η διόρθωση του pH έγινε με προσθήκη καυστικού νατρίου NaOH 5M υπό ασηπτικές συνθήκες, ενώ στην περίπτωση του βιοαντιδραστήρα, η προσθήκη του αλκαλικού διαλύματος γίνονταν αυτόματα με περισταλτική αντλία.

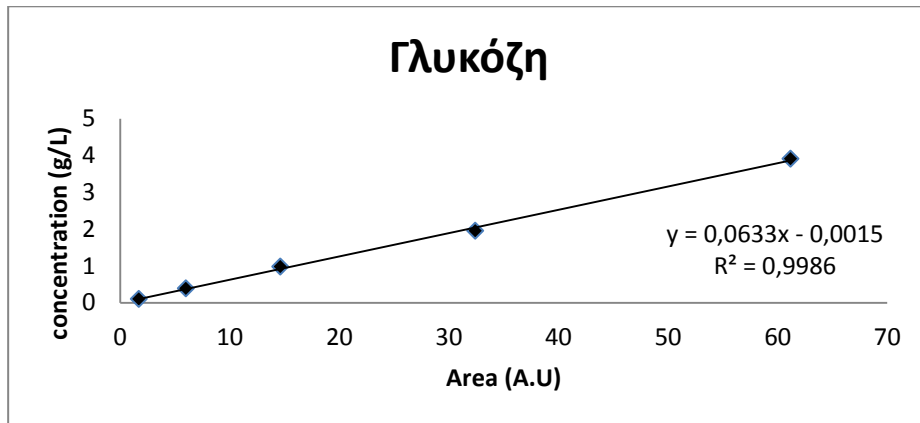
Π.5.2 Προσδιορισμός βιομάζας

Ο προσδιορισμός της βιομάζας γίνεται με 2 τρόπους: α) άμεσα με τη μέτρηση του ξηρού βάρους και β) έμμεσα με την μέτρηση της οπτικής πυκνότητας. Κατά τη μέτρηση του ξηρού βάρους λαμβάνεται δείγμα 5ml το οποίο φυγοκεντρείται σε φυγόκεντρο τύπου Universal 320R (Hettich Zentrifugen, Germany) (9000 rpm, 15min, 5 oC). Το υπερκείμενο απορριπτεται και ακολουθεί έκπλυση με απιονισμένο νερό και στη συνέχεια τα κύτταρα φυγοκεντρούνται για δεύτερη φορά. Μετά τη στράγγιση, η βιομάζα μεταφέρεται σε προζυγισμένα φιαλίδια και στη συνέχεια σε φούρνο προς ξήρανση (85 oC) για 24 ώρες μέχρι σταθεροποίησης του βάρους. Το ξηρό υπόλειμμα ζυγίζεται σε ζυγό ακριβείας τύπου Sartorius basic (4 δεκαδικών ψηφίων) και εκφράζεται σε g/L. Η οπτική πυκνότητα (Optical density, OD) υπολογίζεται με τον ακόλουθο τρόπο: Λαμβάνεται 1ml δείγματος και τοποθετείται σε κυψελίδα του 1.5 mL. Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας έγινε στο μήκος κύματος των 650 nm σε φασματοφωτόμετρο διπλής θέσεως τύπου Hitachi U-2000 (Hitachi, Tokyo, Japan). Αν είναι απαραίτητο πραγματοποιούνται δεκαδικές αραιώσεις του δείγματος για τον υπολογισμό της οπτικής πυκνότητας.

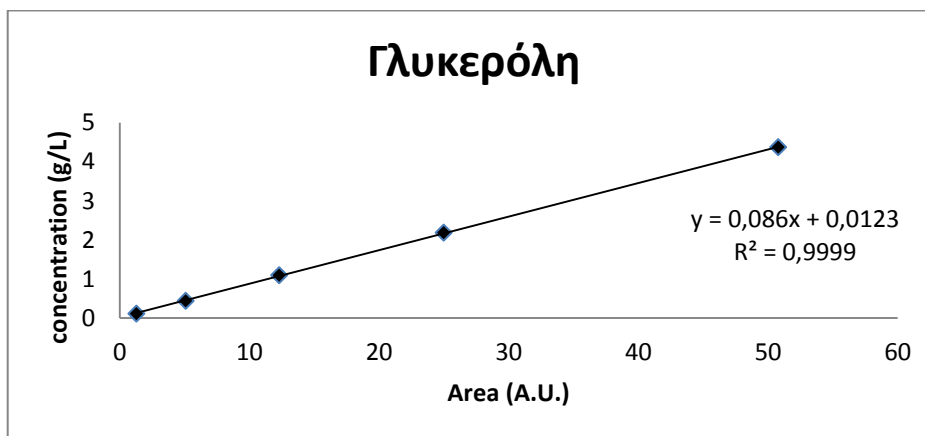
Π.5.3 Προσδιορισμός σακχάρων, γλυκερόλης, 1,3-προπανοδιόλης, αιθανόλης και οργανικών οξέων

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των σακχάρων, της γλυκερόλης, 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 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.). Η ταυτοποίηση των μεταβολικών προϊόντων βασίστηκε στον χρόνο κατακράτησης, ο οποίος συγκρίθηκε με γνωστά δείγματα αυτών. Με τη χρήση

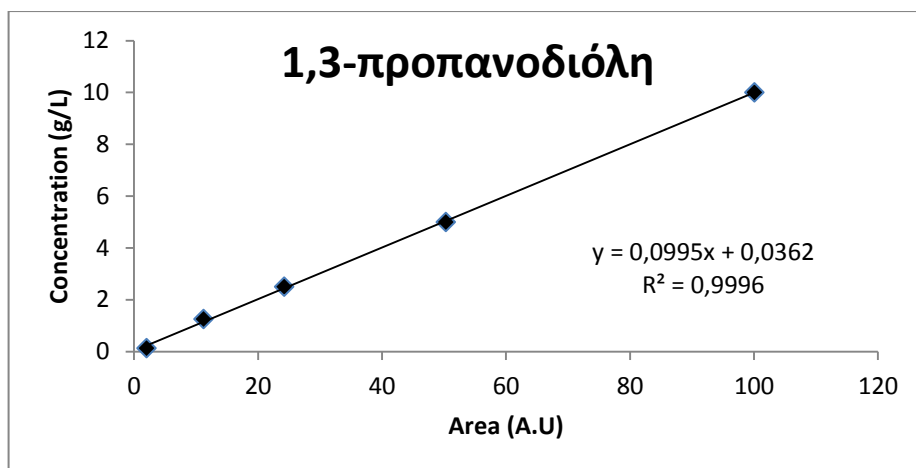
προτύπων διαλυμάτων προέκυψαν οι ακόλουθες εξισώσεις με την βοήθεια των οποίων υπολογίστηκε η συγκέντρωση των σακχάρων, της γλυκερόλης της 1,3-προπανοδιόλης, των οργανικών οξέων και της αιθανόλης.



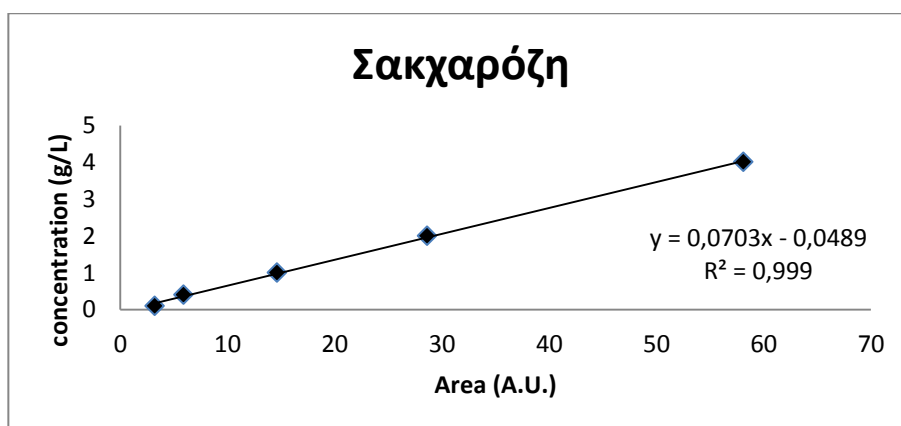
Γράφημα Π.2: Πρότυπη καμπύλη υπολογισμού γλυκόζης



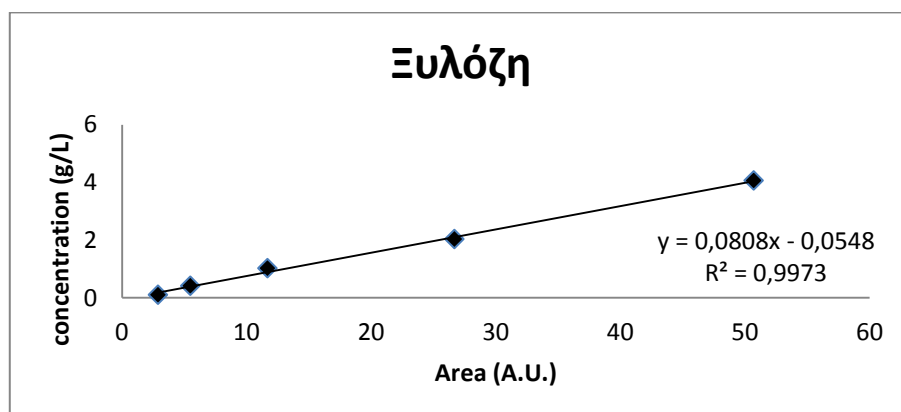
Γράφημα Π.3: Πρότυπη καμπύλη υπολογισμού γλυκερόλης



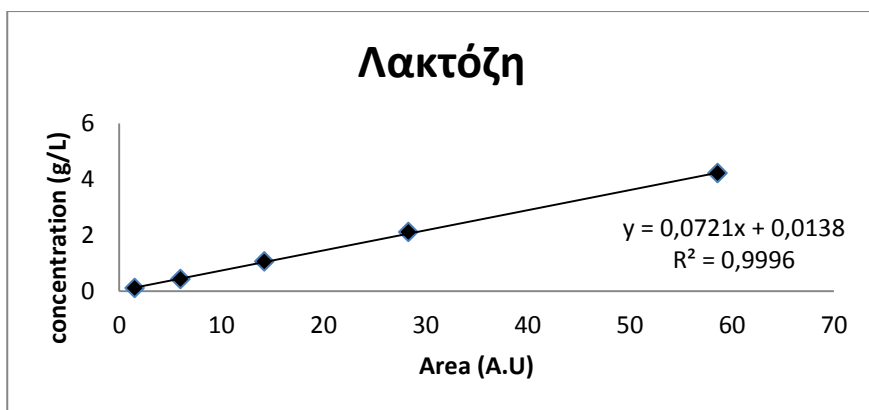
Γράφημα Π.4: Πρότυπη καμπύλη υπολογισμού 1,3-προπανοδιόλης



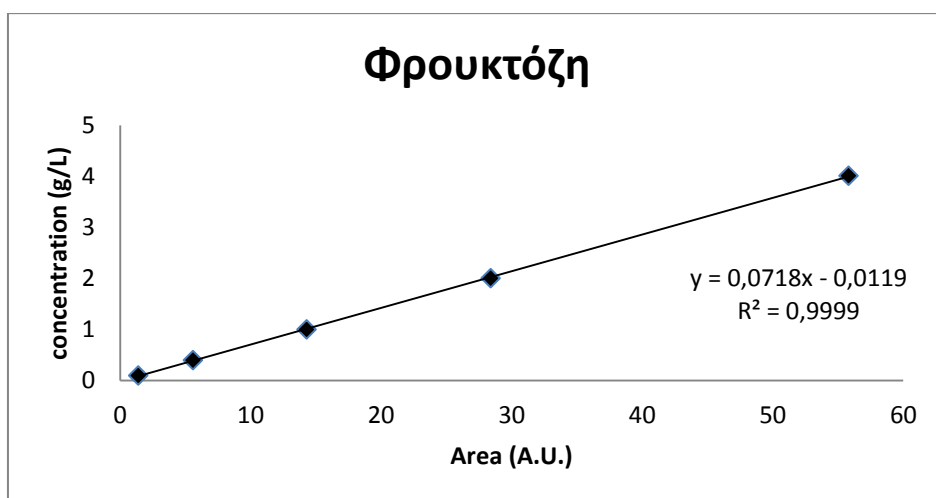
Γράφημα Π.5: Πρότυπη καμπύλη υπολογισμού σακχαρόζης



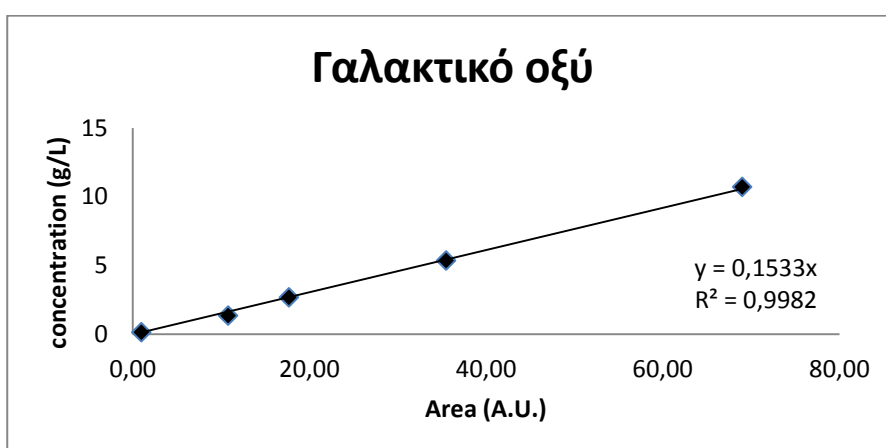
Γράφημα Π.6: Πρότυπη καμπύλη υπολογισμού Ξυλόζης



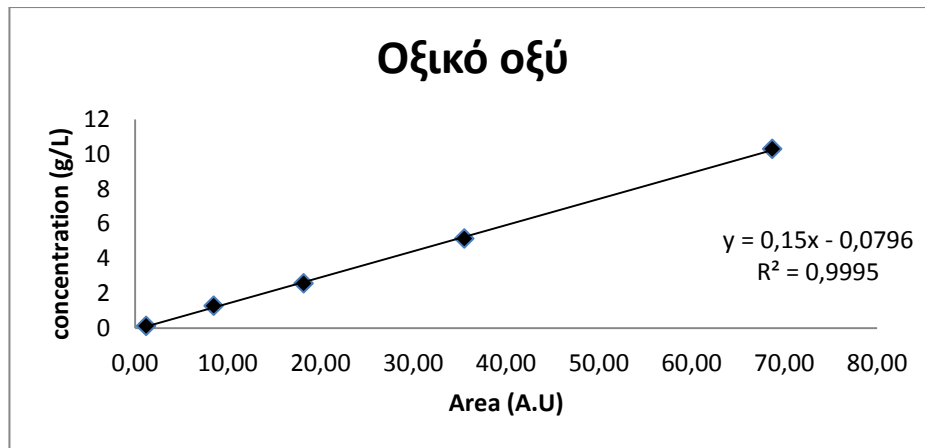
Γράφημα Π.7: Πρότυπη καμπύλη υπολογισμού λακτόζης



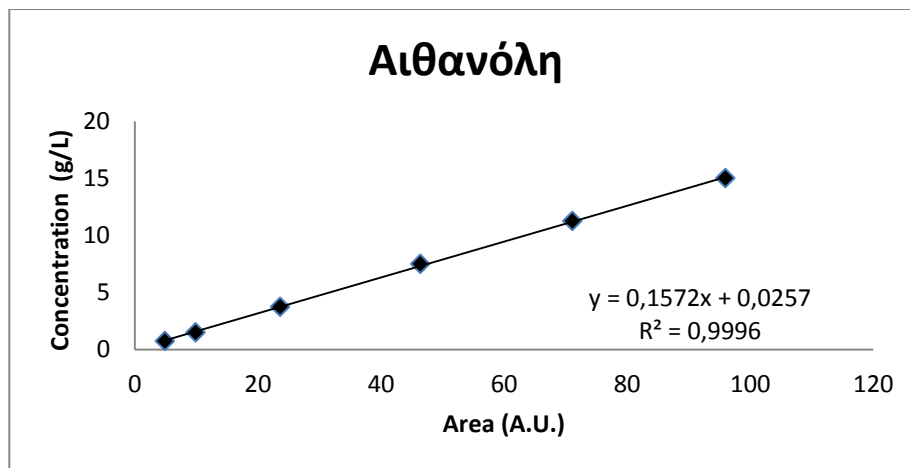
Γράφημα Π.8: Πρότυπη καμπύλη υπολογισμού φρουκτόζης



Γράφημα Π.9: Πρότυπη καμπύλη υπολογισμού γαλακτικού οξέος



Γράφημα Π.10: Πρότυπη καμπύλη υπολογισμού οξικού οξέος



Γράφημα Π.11: Πρότυπη καμπύλη υπολογισμού αιθανόλης

III. Αποτελέσματα

III.1 Μελέτη επιλογής καταλληλότερων πηγών άνθρακα για ανάπτυξη

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, στην πλειονότητα τους τα στελέχη του είδους *Lactobacillus diolivorans* δεν μπορούν να μεταβολίσουν τη γλυκερόλη ως μοναδική πηγή άνθρακα και μια επιπλέον πηγή όπως γλυκόζη, φρουκτόζη κ.α. απαιτείται συνήθως για τη σύνθεση βιομάζας και τη δημιουργία μορίων ATP (Biebl et al., 1999). Στην περίπτωση αυτή η γλυκερόλη χρησιμοποιείται ως τελικός αποδέκτης ηλεκτρονίων. Στις περισσότερες μελέτες η γλυκερόλη αποτελεί συμπληρωματικό υπόστρωμα κάποιου σακχάρου, του οποίου ο μεταβολισμός γίνεται μέσω ετεροζυμωτικού μονοπατιού, ενώ η σύνθεση της 1,3-προπανοδιόλης συνοδεύει τον σχηματισμό των κύριων μεταβολικών προϊόντων που είναι το οξικό και το γαλακτικό οξύ, καθώς και η αιθανόλη (Veiga de Cuncha & Foster, 1992; De Valdez et al., 1997; Claisse & Lonvud-Funel, 2000; Garai-Ibabe et al., 2000; Papanikolaou, 2009).

Το πρώτο στάδιο της παρούσας μελέτης είχε σκοπό την επιλογή των καταλληλότερων πηγών άνθρακα για την αύξηση του μικροοργανισμού *Lactobacillus diolivorans* DSM 14421. Τα σάκχαρα που μελετήθηκαν ήταν η εμπορική γλυκόζη, η εμπορική σακχαρόζη, η εμπορική φρουκτόζη, η εμπορική λακτόζη και η εμπορική ξυλόζη. Σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε ακάθαρτη γλυκερόλη 90%. Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε φιάλες Duran, με ανάδευση 180 ± 5 rpm και θερμοκρασία επώασης 30°C. Το pH διορθωνόταν καθ'όλη τη διάρκεια της ζύμωσης, ώστε να είναι μεταξύ 5,8 και 6,3. Πριν από τον εμβολιασμό πραγματοποιούνταν εμφύσηση αζώτου για 20-30 λεπτά ώστε να δημιουργηθούν αναερόβιες συνθήκες.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν κινητικές στις οποίες υπολογίζονταν οι παρακάτω παράμετροι:

- Η παραγωγή βιομάζας, X (g/L)
- Η κατανάλωση της γλυκόζης, Glu (g/L), της σακχαρόζης, Suc (g/L), της λακτόζης, Lac (g/L), της φρουκτόζης (g/L), της ξυλόζης, Xyl (g/L)
- Η παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης, 1,3-PDO (g/L), αιθανόλης, Eth (g/L), του γαλακτικού οξέος, Lac (g/L), και του οξικού οξέος, Ace (g/L).
- Ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης, $Y_{1,3-PDO}$ (g παραχθείσας 1,3-προπανοδιόλης ανά g καταναλωθείσας γλυκερόλης),

- Η παραγωγικότητα της 1,3-προπανοδιόλης, $P_{1,3-PDO}$ (g/L παραχθείσας 1,3-προνοδιόλης ανά ώρα)

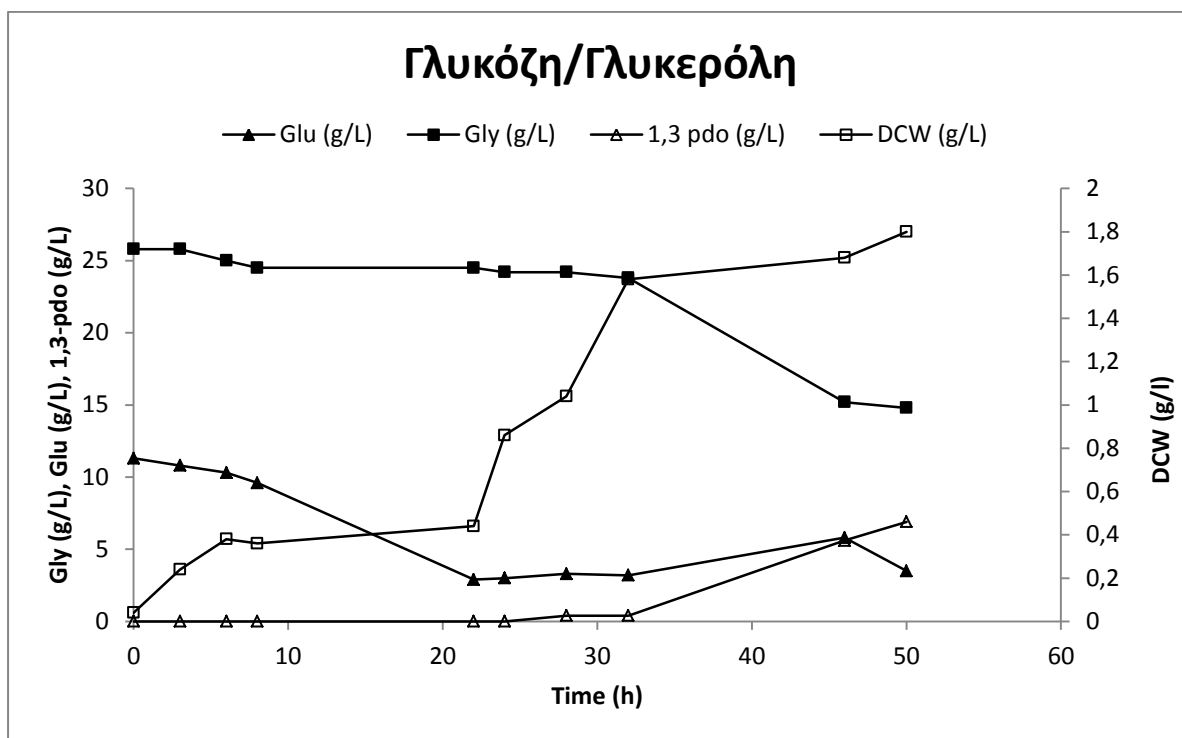
Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν και οι τιμές που παρουσιάζονται αποτελούν τον μέσο όρο των δύο αυτών επαναλήψεων. Το σφάλμα ήταν μικρότερο από 10%.

Πίνακας III.1: Κατανάλωση σακχάρου (g/L), γλυκερόλης (g/L) και παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης (g/L) κατά την διεργασία ζυμώσεων σε αναδευόμενες φιάλες Duran

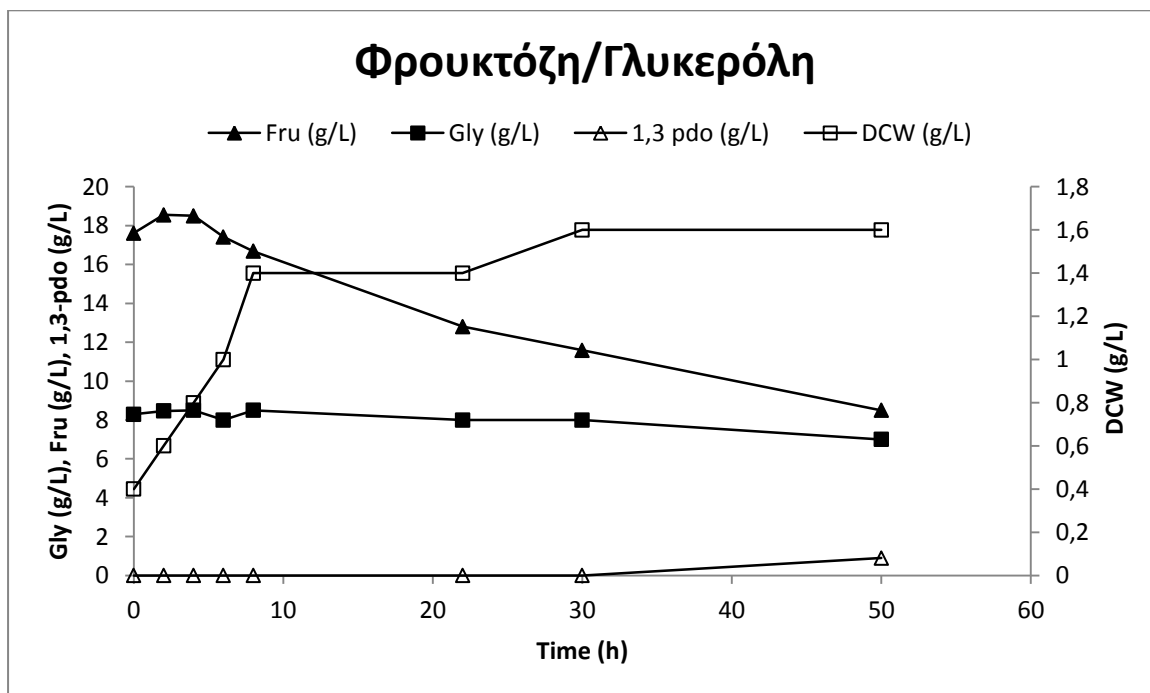
Πηγή άνθρακα	Time (h)	Αρχική Συγκέντρωση (g/L)	Κατανάλωσή σακχάρου (g/L)	X _{max} (g/L)	Gly _{in} (g/L)	Κατανάλωση Gly (g/L)	1,3-PDO (g/L)	Y _{1,3-PDO} (g/g)	P _{1,3-PDO} (g/L*h)
Γλυκόζη	50	11,3	7,8	1,8	25,8	11,0	6,9	0,63	0,14
Φρουκτόζη	50	18,5	10,0	1,6	8,5	1,5	0,9	0,60	0,02
Λακτόζη	50	25,0	16,7	2,0	8,3	7,3	3,3	0,45	0,07
Σακχαρόζη	50	26,5	10,5	1,0	19,4	7,9	3,8	0,48	0,08
Ξυλόζη	50	25,0	25,0	3,6	7,8	2,6	1,7	0,65	0,03

Όπως παρατηρείται από τον παραπάνω πίνακα (Πίνακας III.1) στις περιπτώσεις της γλυκόζης, της φρουκτόζης και της ξυλόζης ο συντελεστής απόδοσης είναι 0,63 g/g, 0,60 g/g και 0,65 g/g αντίστοιχα. Οι τιμές αυτές είναι αρετά κοντά στο θεωρητικό, 0,83 g/g. Επίσης στην περίπτωση της ξυλόζης παρατηρείται μια σημαντική ποσότητα βιομάζας (3,6 g/L), σχεδόν διπλάσια από τις ποσότητες βιομάζας που παράγονται από τα άλλα σάκχαρα. Η μικρότερη ποσότητα βιομάζας (1 g/L) παρατηρείται στην σακχαρόζη. Η μέγιστη κατανάλωση γλυκερόλης, 11 g/L, παρατηρείται στην περίπτωση της γλυκόζης καθώς επίσης και η μέγιστη παραγωγή προπανοδιόλης, 6,9g/L, παρόλα αυτά δεν παρατηρείται ο μέγιστος συντελεστής απόδοσης. Η παραγωγικότητα σε όλες τις ζυμώσεις κινείται σε πολύ χαμηλά επίπεδα μεταξύ 0,02-0,14 g/L*h.

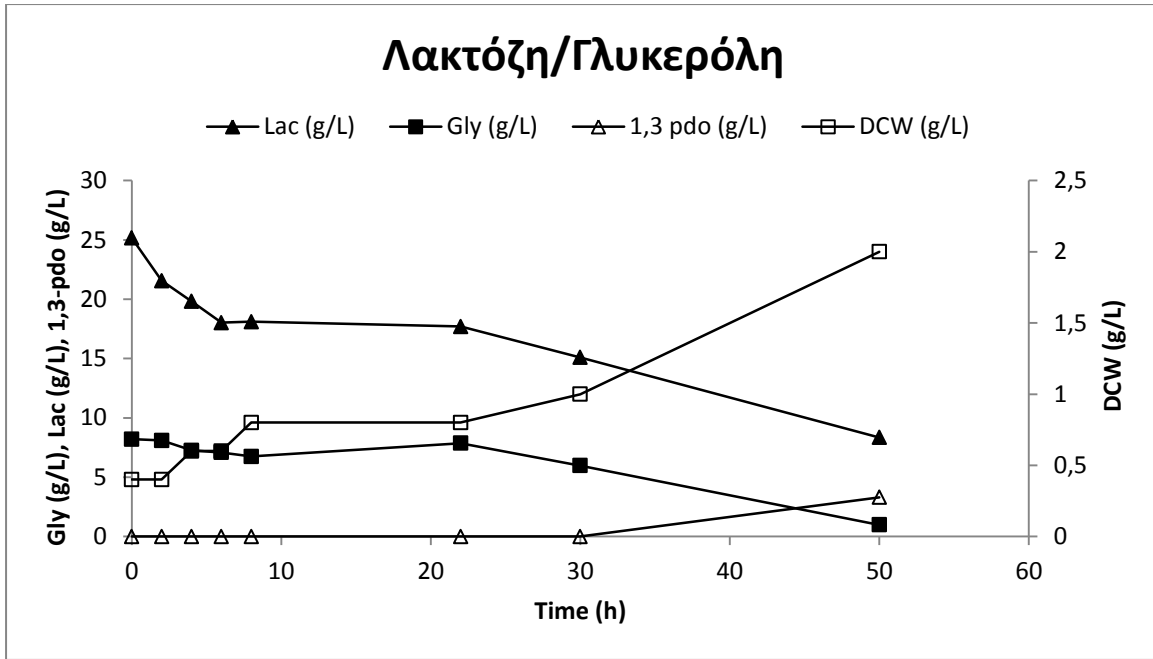
Τα παραπάνω απεικονίζονται και στα ακόλουθα διαγράμματα:



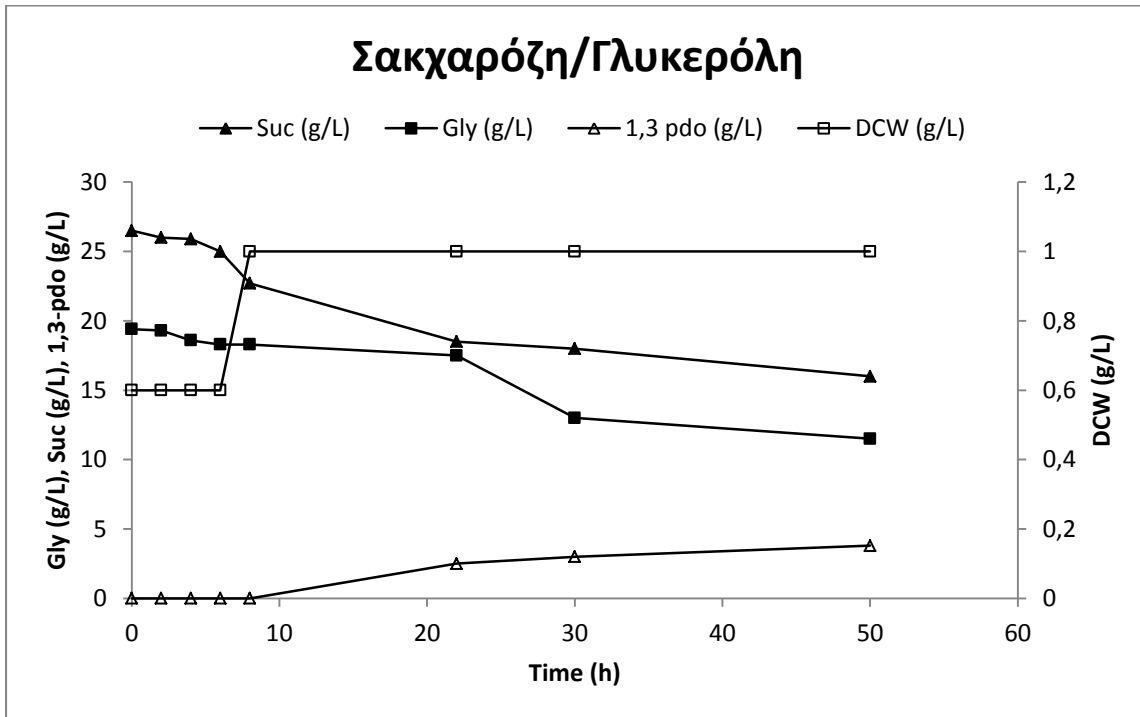
Διάγραμμα III.1:Κλειστή καλλιέργεια συνζύμωσης γλυκόζης/γλυκερόλης σε φιάλες Duran



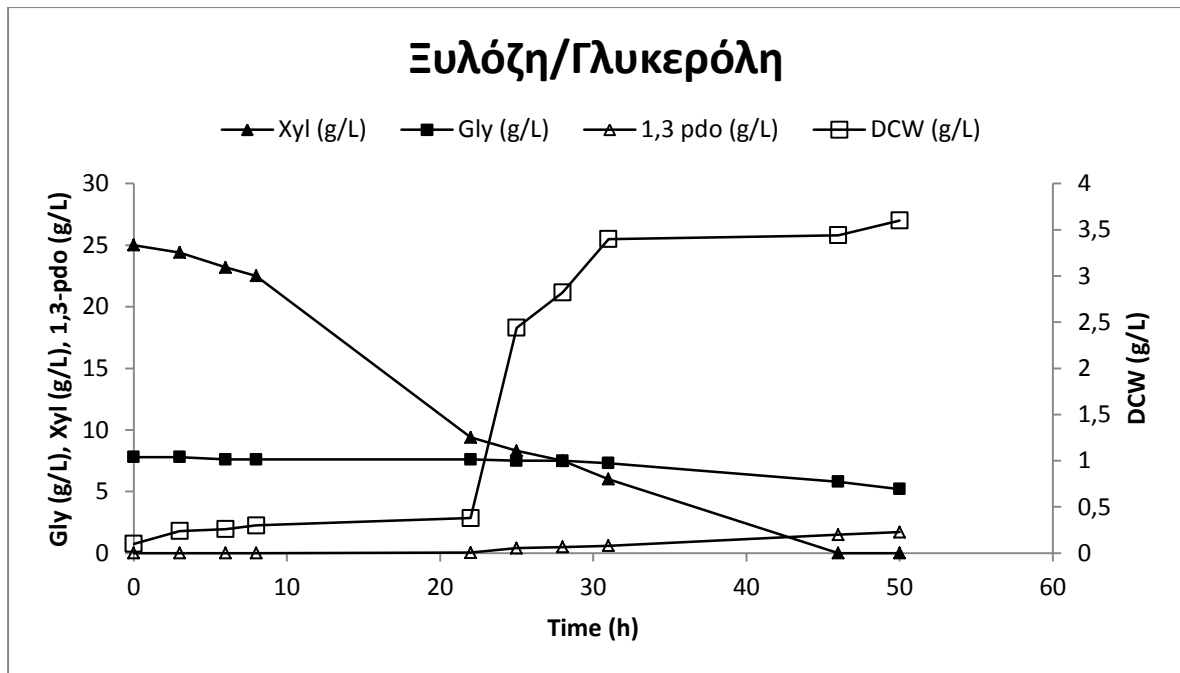
Διάγραμμα III.2:Κλειστή καλλιέργεια συνζύμωσης φρουκτόζης/γλυκερόλης σε φιάλες Duran



Διάγραμμα ΠΙ.3:Κλειστή καλλιέργεια συνζύμωσης λακτόζης/γλυκερόλης σε φιάλες Duran



Διάγραμμα ΠΙ.4:Κλειστή καλλιέργεια συνζύμωσης σακχαρόζης/γλυκερόλης σε φιάλες Duran



Διάγραμμα III.5:Κλειστή καλλιέργεια συνζύμωσης ξυλόζης/γλυκερόλης σε φιάλες Duran

Όπως είναι γνωστό τα απόβλητα επεξεργασίας τροφίμων θεωρούνται εδώ και πολύ καιρό ένα μεγάλο πρόβλημα λόγω των επιπτώσεων τους κατά τη διάθεση τους στο περιβάλλον. Για το λόγο αυτό και αφού λήφθηκαν υπόψιν οι παραπάνω παρατηρήσεις θεωρήθηκε σκόπιμη η περαιτέρω έρευνα στη δυνατότητα κατανάλωσης από τον μικροοργανισμό *Lactobacillus diolivorans* DSM 14421 τόσο της σακχαρόζης, αλλά και της λακτόζης καθώς αποτελούν τα κύρια σάκχαρα δύο σημαντικών υπολειμμάτων της βιομηχανιάς των τροφίμων αυτών της μελάσας και του τυρογάλακτος.

III.2 Κλειστές καλλιέργειες

III.2.1 Κλειστές καλλιέργειες με τη χρήση σακχαρόζης ως πηγή άνθρακα

Το στέλεχος *Lactobacillus diolivorans* DSM 14421 αναπτύχθηκε σε διάφορες συγκεντρώσεις του συνυποστρώματος σακχαρόζης/γλυκερόλης για την παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης. Οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε φιάλες Duran 1-L (Batch-Duran Cultures) με ενεργό όγκο 0.8 L σε θερμοκρασία 30°C και 180rpm με εμφύσηση αζώτου για 20 λεπτά και το pH διορθωνόταν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης για να διατηρείται σε τιμή 5,8-6,5. Επίσης πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις και σε βιοαντιδραστήρα 2L με ενεργό όγκο 1L, η θερμοκρασία, η εμφύσηση αζώτου και η διατήρηση του pH ήταν ίδια. Στο βιοαντιδραστήρα εφαρμόστηκαν 250rpm.

Πίνακας III.2: Κατανάλωση εμπορικής σακχαρόζης (g/L), γλυκερόλης και παραγωγή προϊόντων κατά την ανάπτυξη του *L.diolivorans* DSM14421 σε αναδευόμενες φιάλες Duran και σε βιοαντιδραστήρα

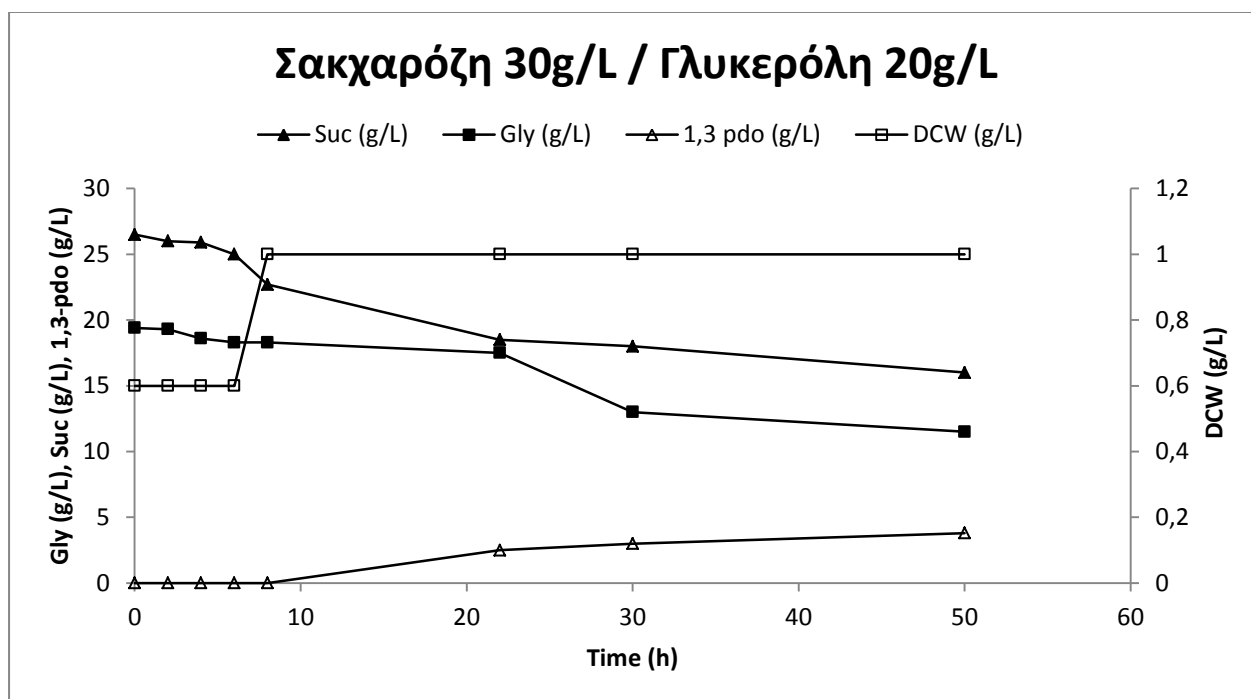
Time (h)	Suc _{in} (g/L)	Suc _{con} (g/L)	X _{max} (g/L)	Gly _{in} (g/L)	Gly _{con} (g/L)	1,3-PDO (g/L)	Y _{1,3-PDO} (g/g)	P _{1,3-PDO} (g/L/h)	Eth (g/L)	Lac (g/L)	Ace (g/L)	
A	50	26,5	10,5	1,0	19,4	7,9	3,8	0,48	0,01	6,8	0	0,4
	50	31,0	6,1	1,1	26,5	9,0	4,4	0,48	0,01	4,8	0	0,6
	72	29,8	12,6	1,4	40,8	6,2	4,0	0,64	0,01	7,3	0	0,8
	72	28,6	10,6	1,1	56,7	16,2	3,3	0,20	0,002	7,4	0	0,6
B	72	4,0	0,5	0,7	32,0	3,8	1,7	0,45	0,02	2,0	0	0,6
	72	15,1	7,0	1,0	22,7	5,8	2,6	0,48	0,02	7,5	0	5,6

A: φιάλες Duran, **B:** βιοαντιδραστήρας, **Time:** η διάρκεια ζύμωσης (h), **Suc_{in}:** η αρχική συγκέντρωση σακχαρόζης (g/L), **Suc_{con}:** η καταναλωθείσα συγκέντρωση σακχαρόζης (g/L), **X_{max}:** η μέγιστη βιομάζα (g/L), **Gly_{in}:** η αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης (g/L), **Gly_{con}:** η καταναλωθείσα συγκέντρωση γλυκερόλης (g/L), **1,3-PDO:** η συγκέντρωση της 1,3-προπανοδιόλης (g/L), **Y_{1,3-PDO}:** ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης προς την καταναλωθείσα γλυκερόλη (g/g), **P_{1,3-PDO}:** η παραγωγικότητα της 1,3-προπανοδιόλης ανά ώρα (g/L/h), **Eth:** η συγκέντρωση της αιθανόλης (g/L), **Lac:** η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος (g/L), **Ace:** η συγκέντρωση του οξικού οξέος

Όπως προκύπτει από τον πίνακα III.2 η μέγιστη τιμή 1,3-προπανοδιόλης παρατηρήθηκε στη ζύμωση με αρχική συγκέντρωση σακχαρόζης 31 g/L και αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 26,5 g/L και ήταν 4,4 g/L με συντελεστή απόδοσης 0,48 g/g. Παρόλο που η τιμή της 1,3-προπανοδιόλης ήταν η μεγαλύτερη που παρατηρήθηκε δεν

συμβαίνει το ίδιο και με το συντελεστή απόδοσης. Ο μεγαλύτερος συντελεστής απόδοσης παρατηρήθηκε στη ζύμωση με αρχική συγκέντρωση σακχαρόζης 29,8 g/L και αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 40,8 g/L και ήταν 0,64 g/g. Η υψηλότερη συγκέντρωση βιομάζας ήταν 1,4 g/L και η χαμηλότερη 0,7 g/L, που παρατηρήθηκαν στη ζύμωση με αρχική συγκέντρωση σακχαρόζης 29,8 g/L και αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 40,8 g/L και στη ζύμωση με αρχική συγκέντρωση σακχαρόζης 31 g/L και αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 26,5 g/L αντίστοιχα. Σε καμιά από τις ζυμώσεις δεν παρατηρήθηκε παραγωγή γαλακτικού οξέος. Η μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης ήταν 7,4 g/L και παρατηρήθηκε στη ζύμωση με αρχική συγκέντρωση σακχαρόζης 28,6 g/L και αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 56,7 g/L. Το οξικό οξύ σε όλες τις ζυμώσεις κυμάνθηκε μεταξύ 0,4-0,8 g/L. Στη ζύμωση με αρχική συγκέντρωση σακχαρόζης 28,6 g/L και αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 56,7 g/L σε διάστημα 72 ωρών παρατηρήθηκε η μέγιστη κατανάλωση γλυκερόλης που έφτασε τα 16,2 g/L, παρόλα αυτά η παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης δεν ήταν η αναμενόμενη καθώς έφτασε μόλις τα 3,3 g/L με συντελεστή απόδοσης 0,2 g/g. Η παραγωγικότητα σε όλες τις περιπτώσεις κινήθηκε σε πολύ χαμηλά επίπεδα μεταξύ 0,002-0,03 g/L*h.

III.2.1.1 Κλειστές καλλιέργειες σε φιάλες Duran

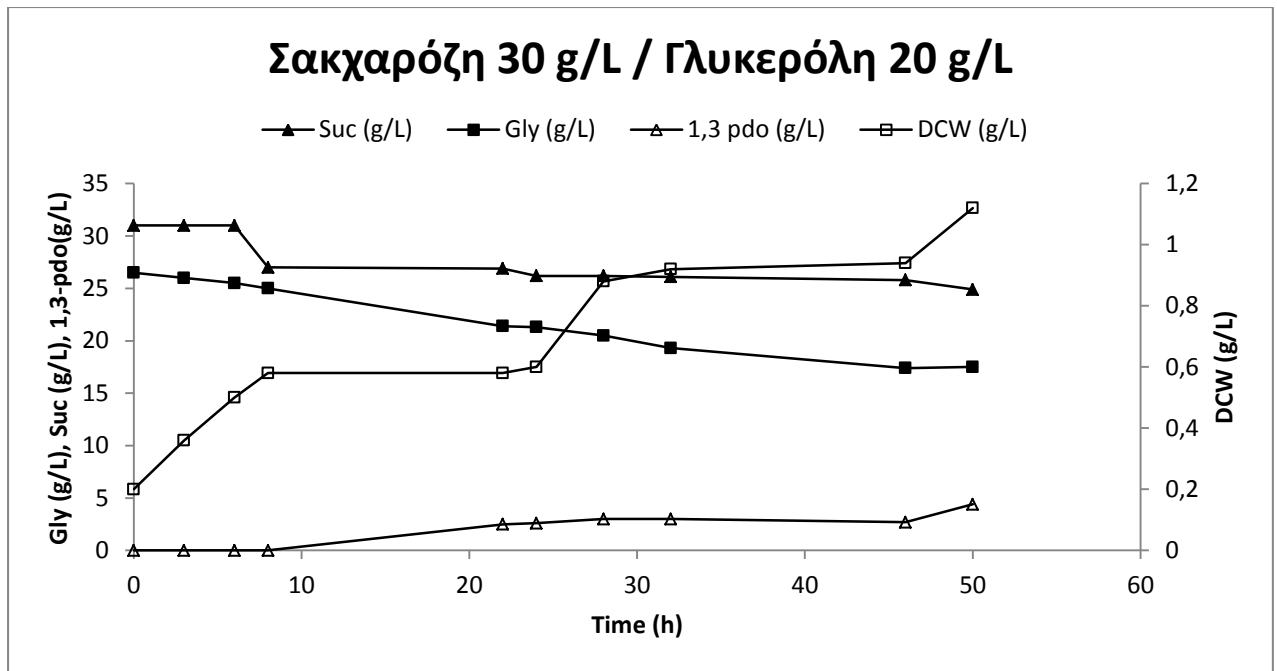


Διάγραμμα III.6: Κινητική της παραγωγής βιομάζας (X), της κατανάλωσης σακχαρόζης(Suc) και της παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης (1,3-pdo), σε υγρή καλλιέργεια συνυπόστρωμα σακχαρόζης/γλυκερόλης με συγκέντρωση 30/20 g/L υπό ανάδευση 180rpm.

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχείες καλλιέργειες σε φιάλες Duran 1-L, πληρωμένες κατά τα 4/5, υπό αναερόβιες συνθήκες, αρχική τιμή pH=5,8-6,3 και θερμοκρασία 30 °C.

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

Από τα δεδομένα του Διαγράμματος III.6 προκύπτει ότι η κατανάλωση του υποστρώματος ξεκινάει λίγες ώρες μετά τον εμβολιασμό. Στην αρχή ο μικροοργανισμός καταναλώνει κάποια ποσότητα σακχαρόζης, παρατηρείται αύξηση και της βιομάζας του και στη συνέχεια ξεκινά η κατανάλωση της γλυκερόλης και κατά συνέπεια η παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης. Η παραγωγή προπανοδιόλης ξεκινά στη στάσιμη φάση ανάπτυξης του μικροοργανισμού και η μέγιστη συγκέντρωση της ήταν 3,8 g/L. Ο μικροοργανισμός εμφάνισε ικανοποιητική κυτταρική αύξηση με μέγιστη τιμή 1 g/L.

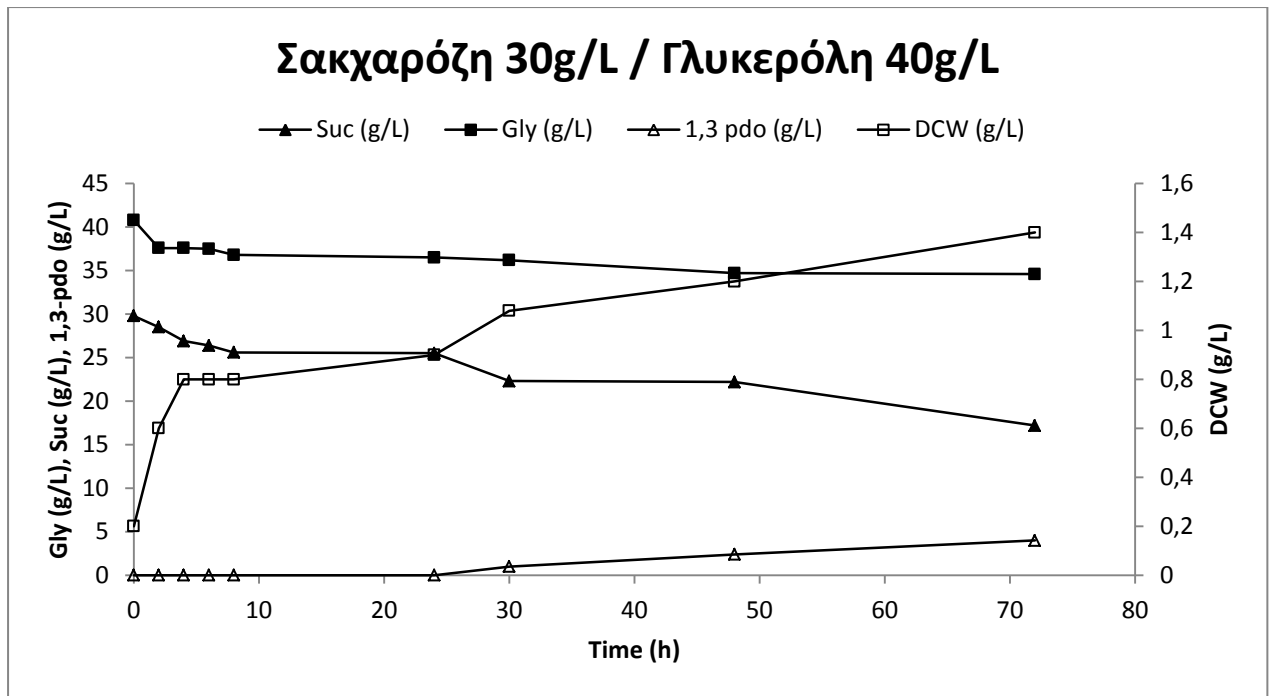


Διάγραμμα III.7: Κινητική της παραγωγής βιομάζας (X), της κατανάλωσης σακχαρόζης(Suc) και της παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης (1,3-pdo), σε υγρή καλλιέργεια συνυπόστρωμα σακχαρόζης/γλυκερόλης με συγκέντρωση 30/20 g/L υπό ανάδευση 180rpm.

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχείς καλλιέργειες σε φιάλες Duran 1-L, πληρωμένες κατά τα 4/5, υπό αναερόβιες συνθήκες, αρχική τιμή pH=5,8-6,3 και θερμοκρασία 30 °C.

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

Από τα δεδομένα του Διαγράμματος III.7 προκύπτει ότι η κατανάλωση του υποστρώματος ξεκινάει λίγες ώρες μετά τον εμβολιασμό. Στην αρχή ο μικροοργανισμός καταναλώνει κάποια ποσότητα σακχαρόζης, παρατηρείται αύξηση και της βιομάζας του και στη συνέχεια ξεκινά η κατανάλωση της γλυκερόλης και κατά συνέπεια η παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης. Η παραγωγή προπανοδιόλης ξεκινά στη στάσιμη φάση ανάπτυξης του μικροοργανισμού και η μέγιστη συγκέντρωση της ήταν 4,4 g/L. Ο μικροοργανισμός εμφάνισε ικανοποιητική κυτταρική αύξηση με μέγιστη τιμή 1,1 g/L.

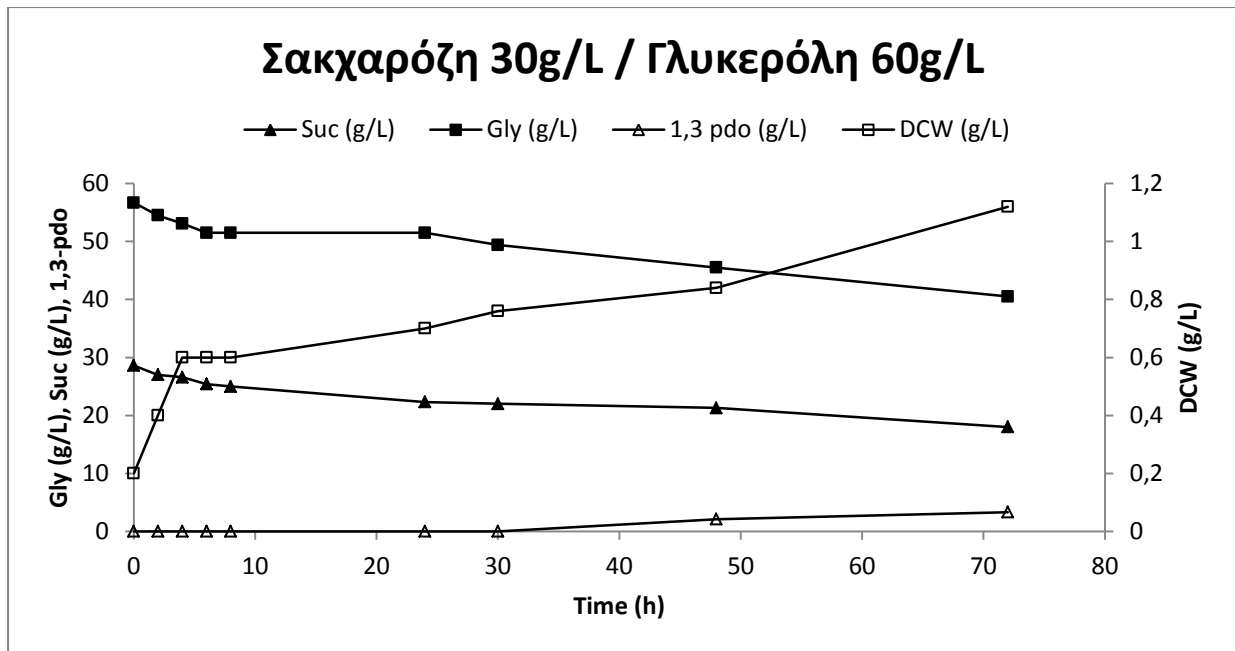


Διάγραμμα III.8: Κινητική της παραγωγής βιομάζας (X), της κατανάλωσης σακχαρόζης(Suc) και της παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης (1,3-pdo), σε υγρή καλλιέργεια συνυπόστρωμα σακχαρόζης/γλυκερόλης με συγκέντρωση 30/40 g/L υπό ανάδευση 180rpm.

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχείς καλλιέργειες σε φιάλες Duran 1-L, πληρωμένες κατά τα 4/5, υπό αναερόβιες συνθήκες, αρχική τιμή pH=5,8-6,3 και θερμοκρασία 30 °C.

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

Από τα δεδομένα του Διαγράμματος III.8 προκύπτει ότι η κατανάλωση του υποστρώματος ξεκινάει λίγες ώρες μετά τον εμβολιασμό. Στην αρχή ο μικροοργανισμός καταναλώνει κάποια ποσότητα σακχαρόζης, παρατηρείται αύξηση και της βιομάζας του και στη συνέχεια ξεκινά η κατανάλωση της γλυκερόλης και κατά συνέπεια η παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης. Η παραγωγή προπανοδιόλης ξεκινά στη στάσιμη φάση ανάπτυξης του μικροοργανισμού και η μέγιστη συγκέντρωση της ήταν 4,0 g/L. Στη συγκεκριμένη ζύμωση ο μικροοργανισμός εμφάνισε τη μεγαλύτερη κυτταρική αύξηση, με τιμή 1,4 g/L, από όλες τις ζυμώσεις με συνυπόστρωμα σακχαρόζης/γλυκερόλης.



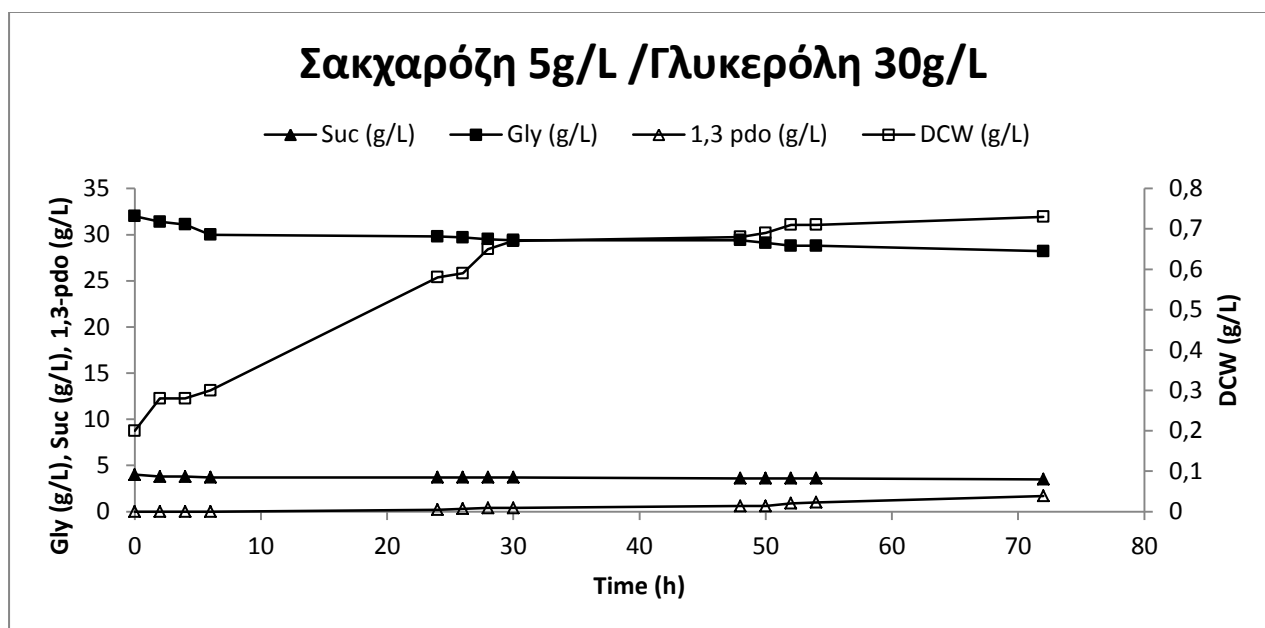
Διάγραμμα III.9: Κινητική της παραγωγής βιομάζας (X), της κατανάλωσης σακχαρόζης(Suc) και της παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης (1,3-pdo), σε υγρή καλλιέργεια συνυπόστρωμα σακχαρόζης/γλυκερόλης με συγκέντρωση 30/60 g/L υπό ανάδευση 180rpm.

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχείς καλλιέργειες σε φιάλες Duran 1-L, πληρωμένες κατά τα 4/5, υπό αναερόβιες συνθήκες, αρχική τιμή pH=5,8-6,3 και θερμοκρασία 30 °C.

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

Όπως προκύπτει από το Διάγραμμα III.9 η κατανάλωση του υποστρώματος ξεκινάει λίγες ώρες μετά τον εμβολιασμό. Στην αρχή ο μικροοργανισμός καταναλώνει κάποια ποσότητα σακχαρόζης, παρατηρείται αύξηση και της βιομάζας του και στη συνέχεια ξεκινά η κατανάλωση της γλυκερόλης και κατά συνέπεια η παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης. Η παραγωγή προπανοδιόλης ξεκινά στη στάσιμη φάση ανάπτυξης του μικροοργανισμού και η μέγιστη συγκέντρωση της ήταν 3,3 g/L. Ο μικροοργανισμός εμφάνισε ικανοποιητική κυτταρική αύξηση με μέγιστη τιμή 1,1 g/L.

III.2.2 Κλειστές καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα

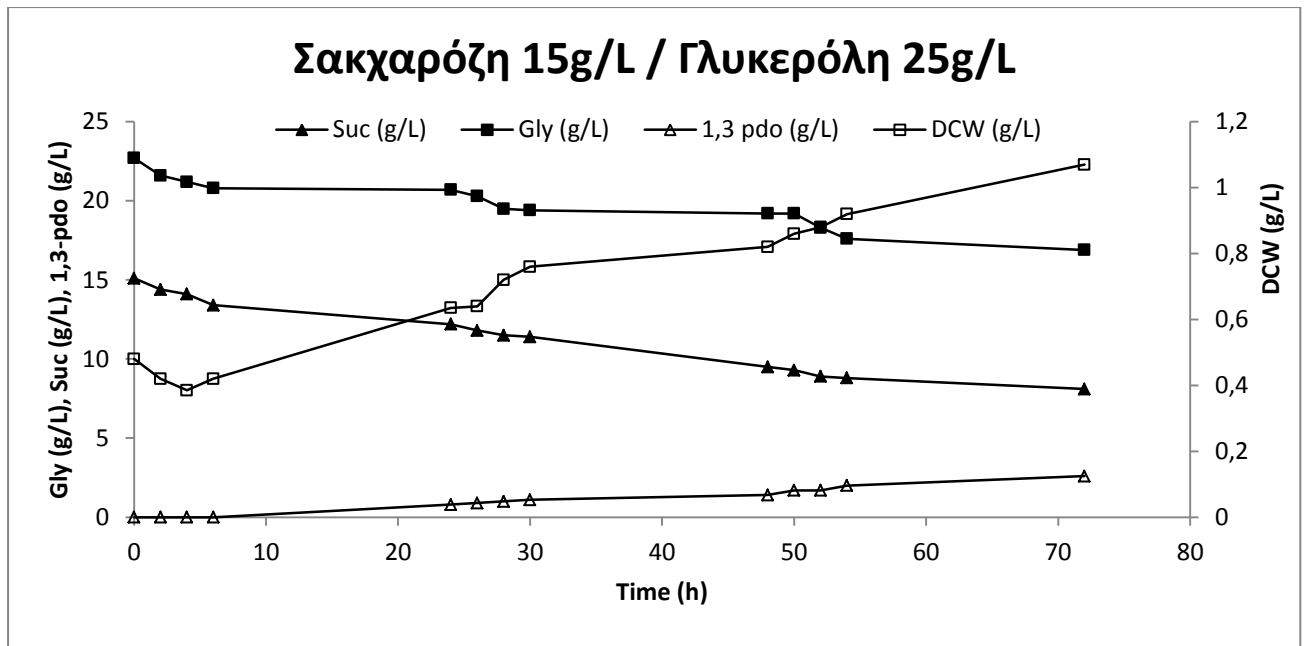


Διάγραμμα III.10: Κινητική της παραγωγής βιομάζας (X), της κατανάλωσης σακχαρόζης(Suc) και της παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης (1,3-pdo), σε υγρή καλλιέργεια συνυπόστρωμα σακχαρόζης/γλυκερόλης με συγκέντρωση 15/25 g/L υπό ανάδευση 250rpm.

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα 2-L, πληρωμένο κατά το 1/2, υπό αναερόβιες συνθήκες, αρχική τιμή pH=5,8-6,3 και θερμοκρασία 30 °C.

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

Όπως προκύπτει από το Διάγραμμα III.10 η κατανάλωση του υποστρώματος ξεκινάει λίγες ώρες μετά τον εμβολιασμό. Στην αρχή ο μικροοργανισμός καταναλώνει κάποια ποσότητα σακχαρόζης, παρατηρείται αύξηση και της βιομάζας του και στη συνέχεια ξεκινά η κατανάλωση της γλυκερόλης και κατά συνέπεια η παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης. Η παραγωγή προπανοδιόλης ξεκινά στη στάσιμη φάση ανάπτυξης του μικροοργανισμού και η μέγιστη συγκέντρωση της ήταν 1,7 g/L. Ο μικροοργανισμός εμφάνισε ικανοποιητική κυτταρική αύξηση με μέγιστη τιμή 0,7 g/L.



Διάγραμμα III.11: Κινητική της παραγωγής βιομάζας (X), της κατανάλωσης σακχαρόζης(Suc) και της παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης (1,3-pdo), σε υγρή καλλιέργεια συνυπόστρωμα σακχαρόζης/γλυκερόλης με συγκέντρωση 15/25 g/L υπό ανάδευση 250rpm.

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιραστήρα 2-L, πληρωμένο κατά το 1/2, υπό αναερόβιες συνθήκες, αρχική τιμή pH=5,8-6,3 και θερμοκρασία 30 °C.

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

Όπως προκύπτει από το Διάγραμμα III.11 η κατανάλωση του υποστρώματος ξεκινάει λίγες ώρες μετά τον εμβολιασμό. Στην αρχή ο μικροοργανισμός καταναλώνει κάποια ποσότητα σακχαρόζης, παρατηρείται αύξηση και της βιομάζας του και στη συνέχεια ξεκινά η κατανάλωση της γλυκερόλης και κατά συνέπεια η παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης. Η παραγωγή προπανοδιόλης ξεκινά στη στάσιμη φάση ανάπτυξης του μικροοργανισμού και η μέγιστη συγκέντρωση της ήταν 2,6 g/L. Ο μικροοργανισμός εμφάνισε ικανοποιητική κυτταρική αύξηση με μέγιστη τιμή 1,0 g/L.

III.2.2 Κλειστές καλλιέργειες με τη χρήση μελάσας ως πηγή άνθρακα

Το στέλεχος *Lactobacillus diolivorans* DSM 14421 αναπτύχθηκε σε μια συγκέντρωση του συνυποστρώματος μελάσας/γλυκερόλης για την παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης. Οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε φιάλες Duran 1-L (Batch-Duran Cultures) με ενεργό όγκο 0.8 L σε θερμοκρασία 30°C και 180rpm με εμφύσηση αζώτου για 20 λεπτά και το pH διορθωνόταν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης για να διατηρείται σε τιμή 5,8-6,5.

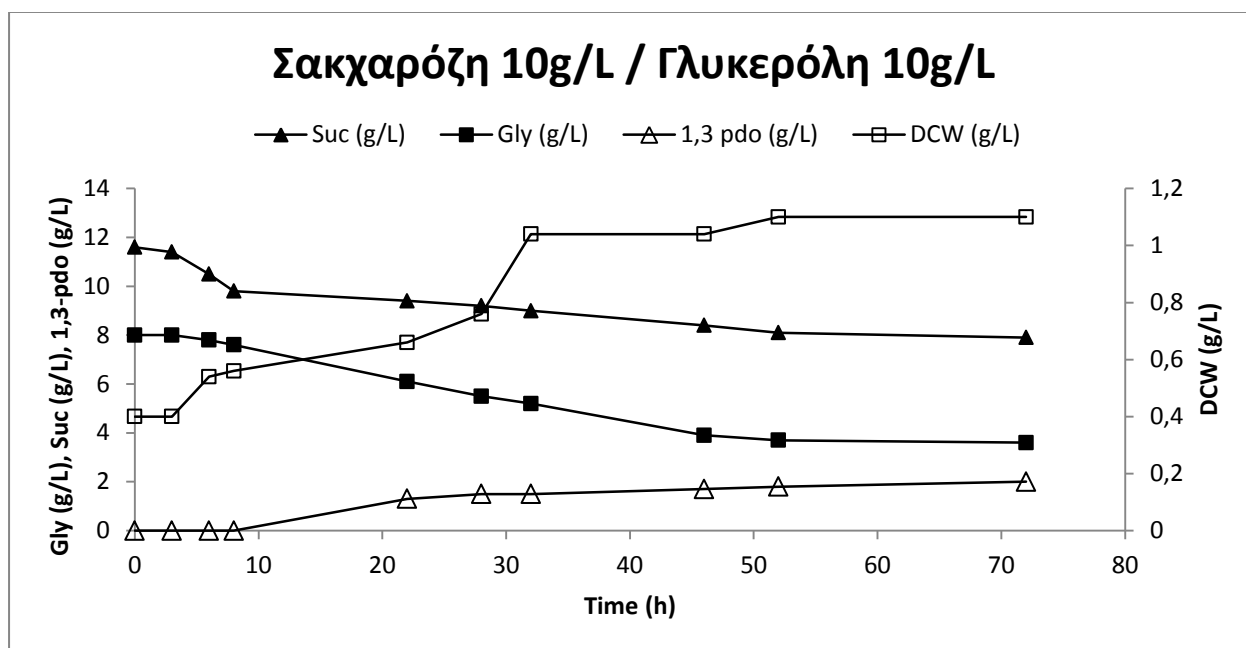
Πίνακας III.3: Κατανάλωση σακχαρόζης (g/L) από μελάσα, γλυκερόλης και παραγωγή προϊόντων κατά την ανάπτυξη του *L.diolivorans* DSM14421 σε αναδεδυόμενες φιάλες Duran (180rpm)

Time (h)	Suc _{in} (g/L)	Suc _{con} (g/L)	X _{max} (g/L)	Gly _{in} (g/L)	Gly _{con} (g/L)	1,3-PDO (g/L)	Y _{1,3-PDO} (g/g)	P _{1,3-PDO} (g/L/h)	Eth (g/L)	Lac (g/L)	Ace (g/L)	
A	72	11,6	3,7	1,1	12,4	5,7	2,0	0,45	0,02	1	0	0,4

A: φιάλες Duran, **Time:** η διάρκεια ζύμωσης (h), **Suc_{in}:** η αρχική συγκέντρωση σακχαρόζης (g/L), **Suc_{con}:** η καταναλωθείσα συγκέντρωση σακχαρόζης (g/L), **X_{max}:** η μέγιστη βιομάζα (g/L), **Gly_{in}:** η αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης (g/L), **Gly_{con}:** η καταναλωθείσα συγκέντρωση γλυκερόλης (g/L), **1,3-PDO:** η συγκέντρωση της 1,3-προπανοδιόλης (g/L), **Y_{1,3-PDO}:** ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης προς την καταναλωθείσα γλυκερόλη (g/g), **P_{1,3-PDO}:** η παραγωγικότητα της 1,3-προπανοδιόλης ανά ώρα (g/L/h), **Eth:** η συγκέντρωση της αιθανόλης (g/L), **Lac:** η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος (g/L), **Ace:** η συγκέντρωση του οξικού οξέος

Όπως προκύπτει από τον Πίνακα III.3 η μέγιστη τιμή της 1,3-προπανοδιόλης ήταν 2,0 g/L και ο συντελεστής απόδοσης 0,45 g/g και η παραγωγικότητα ήταν 0,02 g/L/h. Η βιομάζα έφτασε το 1,1 g/L. Η ποσότητα της σακχαρόζης που καταναλώθηκε ήταν 3,7 g/L και της γλυκερόλης 4,4 g/L. Δεν παρατηρήθηκε παραγωγή γαλακτικού οξέος, το οξικό οξύ έφτασε τα 0,4 g/L και η αιθανόλη το 1 g/L.

III.2.2.1 Κλειστές καλλιέργειες σε φιάλες Duran



Διάγραμμα III.12: Κινητική της παραγωγής βιομάζας (X), της κατανάλωσης σακχαρόζης(Suc) και της παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης (1,3-pdo), σε υγρή καλλιέργεια συνυπόστρωμα σακχαρόζης/γλυκερόλης με συγκέντρωση 15/25 g/L υπό ανάδευση 250rpm.

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιραστήρα 2-L, πληρωμένο κατά το 1/2, υπό αναερόβιες συνθήκες, αρχική τιμή pH=5,8-6,3 και θερμοκρασία 30 °C.

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

Όπως προκύπτει από το Διάγραμμα III.12 η κατανάλωση του υποστρώματος ξεκινάει λίγες ώρες μετά τον εμβολιασμό. Στην αρχή ο μικροοργανισμός καταναλώνει κάποια ποσότητα σακχαρόζης, παρατηρείται αύξηση και της βιομάζας του και στη συνέχεια ξεκινά η κατανάλωση της γλυκερόλης και κατά συνέπεια η παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης. Η παραγωγή προπανοδιόλης ξεκινά στη στάσιμη φάση ανάπτυξης του μικροοργανισμού και η μέγιστη συγκέντρωση της ήταν 2,0 g/L. Ο μικροοργανισμός εμφάνισε ικανοποιητική κυτταρική αύξηση με μέγιστη τιμή 1,1 g/L. Στη ζύμωση με συνυπόστρωμα μελάσας/γλυκερόλης παρατηρείται μια πιο αργή κατανάλωση της σακχαρόζης, σε σχέση με τα πειράματα με εμπορική σακχαρόζη, αυτό ενδεχομένως να οφείλεται στην παρεμπόδιση που ίσως ασκούν άλλες ουσίες που βρίσκονται στη μελάσα.

III.2.3 Κλειστές καλλιέργειες με τη χρήση ξυλόζης ως πηγή άνθρακα

Το στέλεχος *Lactobacillus diolivorans* DSM 14421 αναπτύχθηκε σε διάφορες συγκεντρώσεις του συνυποστρώματος ξυλόζης/γλυκερόλης για την παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης. Οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε φιάλες Duran 1-L (Batch-Duran Cultures) με ενεργό όγκο 0.8 L σε θερμοκρασία 30°C και 180rpm με εμφύσηση αζώτου για 20 λεπτά και το pH διορθωνόταν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης για να διατηρείται σε τιμή 5,8-6,5. Επίσης πραγματοποιήθηκε ζύμωση και σε βιοαντιδραστήρα 2L με ενεργό όγκο 1L, η θερμοκρασία, η εμφύσηση αζώτου και η διατήρηση του pH ήταν ίδια. Στο βιοαντιδραστήρα εφαρμόστηκαν 250rpm.

Πίνακας III.4: Κατανάλωση εμπορικής ξυλόζης (g/L), γλυκερόλης και παραγωγή προϊόντων κατά την ανάπτυξη του *L.diolivorans* DSM14421 σε αναδεδυόμενες φιάλες Duran (180rpm) και βιοαντιδραστήρα (250rpm)

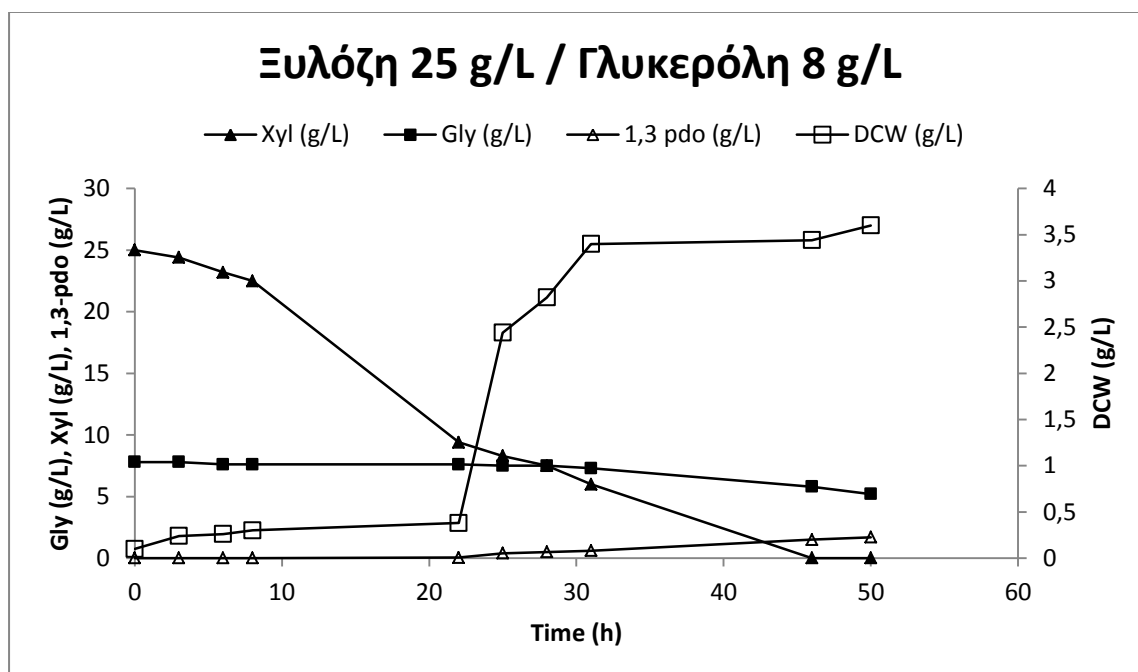
	Time (h)	Xyl _{in} (g/L)	Xyl _{con} (g/L)	X _{max} (g/L)	Gly _{in} (g/L)	Gly _{con} (g/L)	1,3-PDO (g/L)	Y _{1,3-PDO} (g/g)	P _{1,3-PDO} (g/L/h)	Eth (g/L)	Lac (g/L)	Ace (g/L)
A	50	25,0	25,0	3,6	7,8	2,6	1,7	0,65	0,03	1,5	3,8	18,5
	72	20,0	20,0	4,2	29,0	20,3	12,4	0,61	0,17	0,6	3,5	19,4
B	72	16,8	16,8	3,3	21,4	7,8	4,8	0,61	0,06	1,9	8,3	13,7

A: φιάλες Duran, **B:** βιοαντιδραστήρας, **Time:** η διάρκεια ζύμωσης (h), **Xyl_{in}:** η αρχική συγκέντρωση ξυλόζης (g/L), **Xyl_{con}:** η καταναλωθείσα συγκέντρωση ξυλόζης (g/L), **X_{max}:** η μέγιστη βιομάζα (g/L), **Gly_{in}:** η αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης (g/L), **Gly_{con}:** η καταναλωθείσα συγκέντρωση γλυκερόλης (g/L), **1,3-PDO:** η συγκέντρωση της 1,3-προπανοδιόλης (g/L), **Y_{1,3-PDO}:** ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης προς την καταναλωθείσα γλυκερόλη (g/g), **P_{1,3-PDO}:** η παραγωγικότητα της 1,3-προπανοδιόλης ανά ώρα (g/L/h), **Eth:** η συγκέντρωση της αιθανόλης (g/L), **Lac:** η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος (g/L), **Ace:** η συγκέντρωση του οξικού οξέος

Όπως προκύπτει από τον πίνακα III.4 η μέγιστη τιμή 1,3-προπανοδιόλης παρατηρήθηκε στη ζύμωση με αρχική συγκέντρωση ξυλόζης 20 g/L και αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 29 g/L και ήταν 12,4 g/L με συντελεστή απόδοσης 0,61 g/g. Παρόλο που η τιμή της 1,3-προπανοδιόλης ήταν η μεγαλύτερη που παρατηρήθηκε δεν συμβαίνει το ίδιο και με το συντελεστή απόδοσης. Ο μεγαλύτερος συντελεστής απόδοσης

παρατηρήθηκε στη ζύμωση με αρχική συγκέντρωση σακχαρόζης 25,0 g/L και αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 7,8 g/L και ήταν 0,65 g/g. Η υψηλότερη συγκέντρωση βιομάζας ήταν 4,2 g/L και η χαμηλότερη 3,1 g/L, που παρατηρήθηκαν στη ζύμωση με αρχική συγκέντρωση ξυλόζης 20,0 g/L και αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 29,0 g/L και στη ζύμωση με αρχική συγκέντρωση ξυλόζης 20,0 g/L και αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 29,0 g/L αντίστοιχα. Η μέγιστη συγκέντρωση γαλακτικού οξέος ήταν 8,3 g/L και παρατηρήθηκε στη ζύμωση με αρχική συγκέντρωση σακχαρόζης 16,8 g/L και αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 21,4 g/L. Η μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης ήταν 1,9 g/L και παρατηρήθηκε στη ζύμωση με αρχική συγκέντρωση ξυλόζης 16,8 g/L και αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 21,4 g/L. Η μέγιστη συγκέντρωση οξικού οξέος ήταν 19,4 g/L και παρατηρήθηκε στη ζύμωση με αρχική συγκέντρωση ξυλόζης 20,0 g/L και αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 29,0 g/L. Στη ζύμωση με αρχική συγκέντρωση ξυλόζης 20,0 g/L και αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 29,0 g/L σε διάστημα 72 ωρών παρατηρήθηκε η μέγιστη κατανάλωση γλυκερόλης που έφτασε τα 20,3 g/L, στη συγκεκριμένη ζύμωση παρατηρήθηκε και η μέγιστη ποσότητα 1,3-προπανοδιόλης που ήταν 12,4 g/L, με συντελεστή απόδοσης 0,61 g/g και παραγωγικότητα 0,17g/L/h.

III.2.3.1 Κλειστές καλλιέργειες σε φιάλες Duran

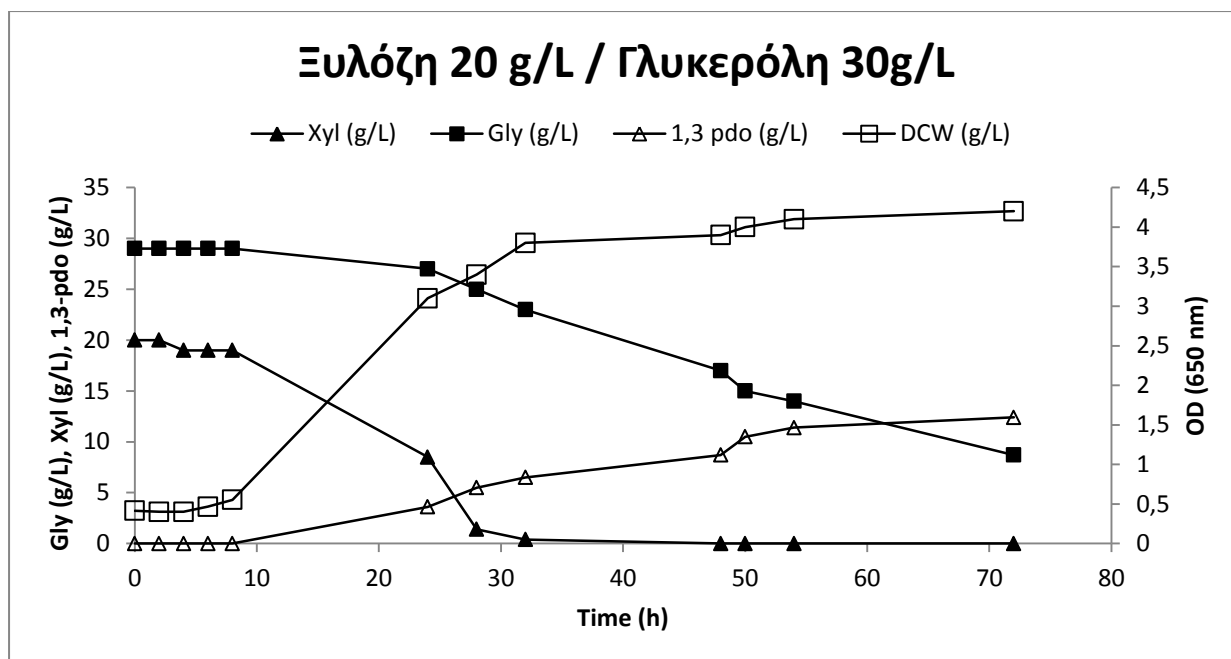


Διάγραμμα III.13: Κινητική της παραγωγής βιομάζας (X), της κατανάλωσης ξυλόζης(Xyl) και της παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης (1,3-pdo), σε υγρή καλλιέργεια συνυπόστρωμα σακχαρόζης/γλυκερόλης με συγκέντρωση 15/25 g/L υπό ανάδευση 180rpm.

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχείς καλλιέργειες σε φιάλες Duran 1-L, πληρωμένες κατά τα 4/5, υπό αναερόβιες συνθήκες, αρχική τιμή pH=5,8-6,3 και θερμοκρασία 30 °C.

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

Όπως προκύπτει από το Διάγραμμα III.13 η κατανάλωση του υποστρώματος ξεκινάει λίγες ώρες μετά τον εμβολιασμό. Στην αρχή ο μικροοργανισμός καταναλώνει κάποια ποσότητα ξυλόζης, παρατηρείται αύξηση της βιομάζας του και στη συνέχεια ξεκινά η κατανάλωση της γλυκερόλης και κατά συνέπεια η παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης. Η παραγωγή προπανοδιόλης ξεκινά στη στάσιμη φάση ανάπτυξης του μικροοργανισμού και η μέγιστη συγκέντρωση της ήταν 1,7 g/L. Ο μικροοργανισμός εμφάνισε μεγάλη κυτταρική αύξηση με μέγιστη τιμή 3,6 g/L.



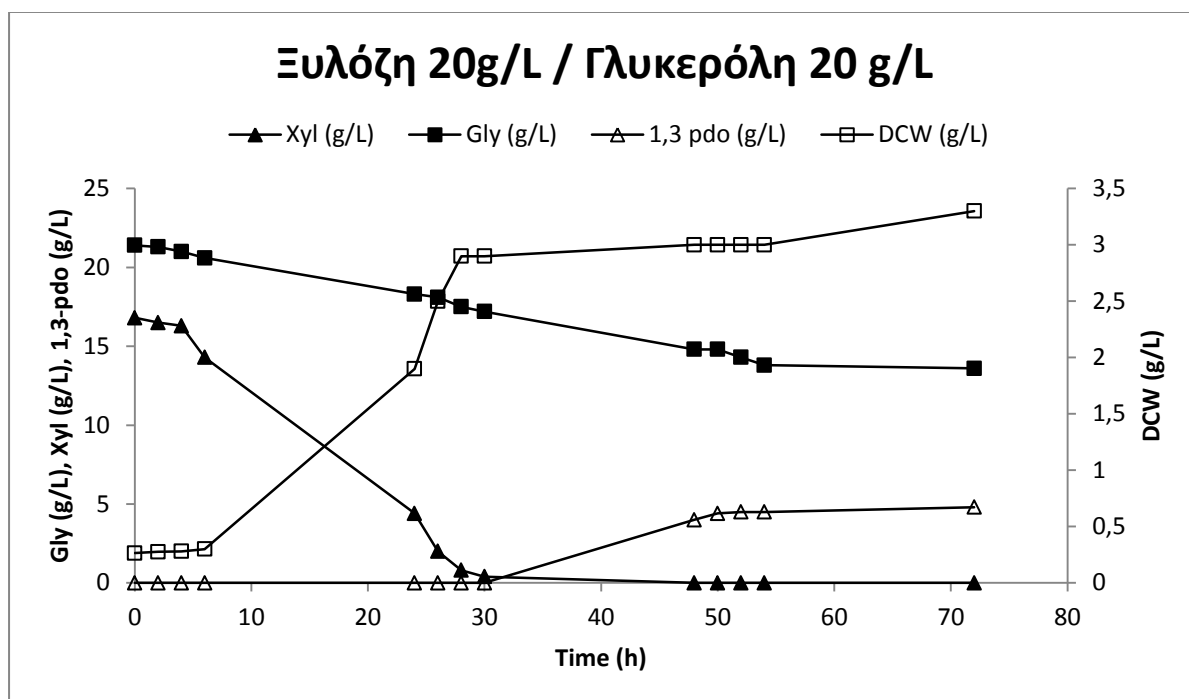
Διάγραμμα III.14: Κινητική της παραγωγής βιομάζας (X), της κατανάλωσης ξυλόζης(Xyl) και της παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης (1,3-pdo), σε υγρή καλλιέργεια συνυπόστρωμα σακχαρόζης/γλυκερόλης με συγκέντρωση 15/25 g/L υπό ανάδευση 180rpm.

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχείς καλλιέργειες σε φιάλες Duran 1-L, πληρωμένες κατά τα 4/5, υπό αναερόβιες συνθήκες, αρχική τιμή pH=5,8-6,3 και θερμοκρασία 30 °C.

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

Όπως προκύπτει από το Διάγραμμα III.14 η κατανάλωση του υποστρώματος ξεκινάει λίγες ώρες μετά τον εμβολιασμό. Στην αρχή ο μικροοργανισμός καταναλώνει κάποια ποσότητα ξυλόζης, παρατηρείται αύξηση της βιομάζας του και στη συνέχεια ξεκινά η κατανάλωση της γλυκερόλης και κατά συνέπεια η παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης. Η παραγωγή προπανοδιόλης ξεκινά στη στάσιμη φάση ανάπτυξης του μικροοργανισμού και η μέγιστη συγκέντρωση της ήταν 12,4 g/L. Ο μικροοργανισμός εμφάνισε μεγάλη κυτταρική αύξηση με μέγιστη τιμή 4,2 g/L.

III.2.3.2 Κλειστή καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα



Διάγραμμα III.15: Κινητική της παραγωγής βιομάζας (X), της κατανάλωσης ξυλόζης(Xyl) και της παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης (1,3-pdo), σε υγρή καλλιέργεια συνυπόστρωμα σακχαρόζης/γλυκερόλης με συγκέντρωση 15/25 g/L υπό ανάδευση 180rpm.

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα 2-L, πληρωμένο κατά το 1/2, υπό αναερόβιες συνθήκες, αρχική τιμή pH=5,8-6,3 και θερμοκρασία 30 °C.

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

Όπως προκύπτει από το Διάγραμμα III.15 η κατανάλωση του υποστρώματος ξεκινάει λίγες ώρες μετά τον εμβολιασμό. Στην αρχή ο μικροοργανισμός καταναλώνει κάποια ποσότητα ξυλόζης, παρατηρείται αύξηση της βιομάζας του και στη συνέχεια ξεκινά η κατανάλωση της γλυκερόλης και κατά συνέπεια η παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης. Η παραγωγή προπανοδιόλης ξεκινά στη στάσιμη φάση ανάπτυξης του μικροοργανισμού και η μέγιστη συγκέντρωση της ήταν 4,8 g/L. Ο μικροοργανισμός εμφάνισε μεγάλη κυτταρική αύξηση με μέγιστη τιμή 3,3 g/L.

III.2.4 Κλειστές καλλιέργειες με τη χρήση λακτόζης ως πηγή άνθρακα

Το στέλεχος *Lactobacillus diolivorans* DSM 14421 αναπτύχθηκε σε μια συγκέντρωση του συνυποστρώματος λακτόζη/γλυκερόλης για την παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης. Η ζύμωση πραγματοποιήθηκε σε φιάλη Duran 1L (Batch-Duran Cultures) με ενεργό όγκο 0.8 L σε θερμοκρασία 30°C και 180rpm με εμφύσηση αζώτου για 20 λεπτά και το pH διορθωνόταν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης για να διατηρείται σε τιμή 5,8-6,5. Επίσης πραγματοποιήθηκε ζύμωση και σε βιοαντιδραστήρα 2L με ενεργό όγκο 1L, η θερμοκρασία, η εμφύσηση αζώτου και η διατήρηση του pH ήταν ίδια. Στο βιοαντιδραστήρα εφαρμόστηκαν 250rpm.

Πίνακας III.5: Κατανάλωση εμπορικής λακτόζης (g/L), γλυκερόλης και παραγωγή προϊόντων κατά την ανάπτυξη του *L.diolivorans* DSM14421 σε αναδεδυόμενες φιάλες Duran (180rpm) και βιοαντιδραστήρα (250rpm)

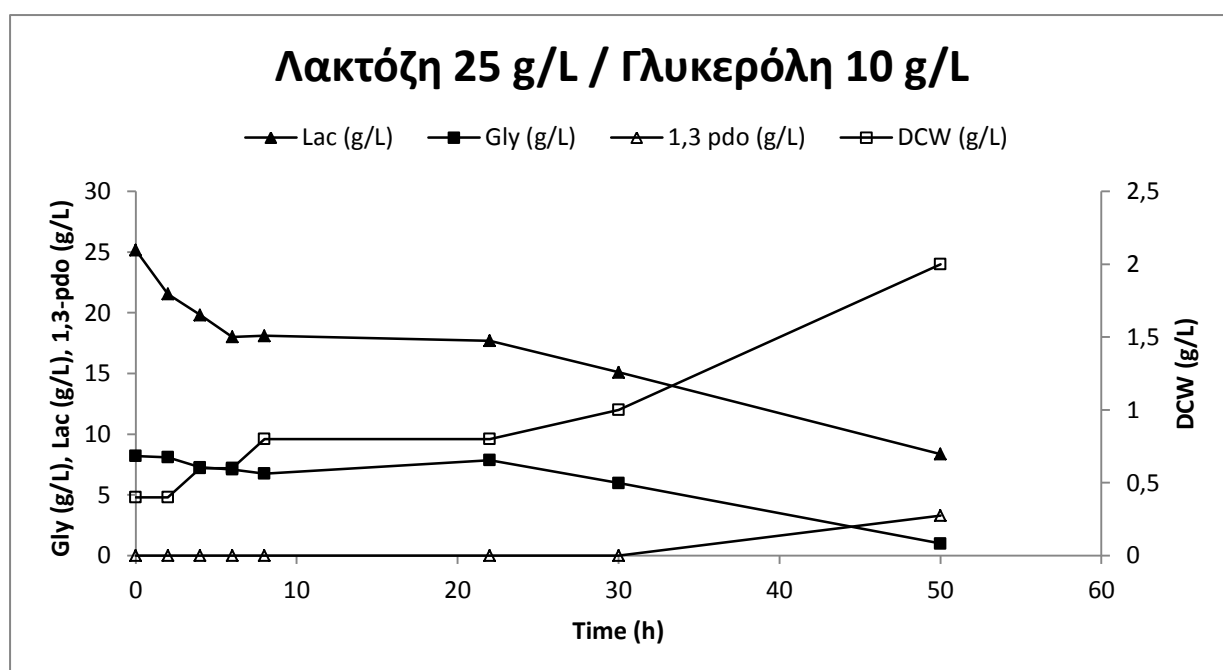
	Time (h)	Lac_{in} (g/L)	Lac_{con} (g/L)	X_{max} (g/g)	Gly_{in} (g/L)	Gly_{con} (g/L)	1,3-PDO (g/L)	Y_{1,3-PDO} (g/g)	P_{1,3-PDO} (g/L/h)	Eth (g/L)	Lac (g/L)	Ace (g/L)
A	50	25,1	16,8	2,0	8,2	7,3	3,3	0,45	0,07	6,5	0	12,0
B	72	15,9	10,4	1,8	22,4	11,3	8,8	0,78	0,12	4,8	0	9,0

A: φιάλες Duran, **B:** βιοαντιδραστήρας, **Time:** η διάρκεια ζύμωσης (h), **Lac_{in}:** η αρχική συγκέντρωση λακτόζης (g/L), **Lac_{con}:** η καταναλωθείσα συγκέντρωση λακτόζης (g/L), **X_{max}:** η μέγιστη βιομάζα (g/L), **Gly_{in}:** η αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης (g/L), **Gly_{con}:** η καταναλωθείσα συγκέντρωση γλυκερόλης (g/L), **1,3-PDO:** η συγκέντρωση της 1,3-προπανοδιόλης (g/L), **Y_{1,3-PDO}:** ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης προς την καταναλωθείσα γλυκερόλη (g/g), **P_{1,3-PDO}:** η παραγωγικότητα της 1,3-προπανοδιόλης ανά ώρα (g/L/h), **Eth:** η συγκέντρωση της αιθανόλης (g/L), **Lac:** η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος (g/L), **Ace:** η συγκέντρωση του οξικού οξέος

Όπως προκύπτει από τον πίνακα III.5 η μέγιστη τιμή 1,3-προπανοδιόλης παρατηρήθηκε στη ζύμωση με αρχική συγκέντρωση λακτόζης 15,9 g/L και αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 22,4 g/L και ήταν 8,8 g/L με συντελεστή απόδοσης 0,78 g/g. Η υψηλότερη συγκέντρωση βιομάζας ήταν 2,0 g/L και η χαμηλότερη 1,8 g/L. Σε καμία από τις ζυμώσεις δεν παρατηρήθηκε παραγωγή γαλακτικού οξέος. Η μέγιστη συγκέντρωση

αιθανόλης ήταν 6,5 g/L και η μέγιστη συγκέντρωση οξικού οξέος ήταν 12,0 g/L και παρατηρήθηκαν στη ζύμωση με αρχική συγκέντρωση λακτόζης 20,0 g/L και αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 29,0 g/L. Στη ζύμωση με αρχική συγκέντρωση λακτόζης 15,9 g/L και αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 22,4 g/L σε διάστημα 72 ωρών παρατηρήθηκε η μέγιστη κατανάλωση γλυκερόλης που έφτασε τα 11,3 g/L, στη συγκεκριμένη ζύμωση παρατηρήθηκε και η μέγιστη ποσότητα 1,3-προπανοδιόλης που ήταν 8,8 g/L, με συντελεστή απόδοσης 0,78 g/g και παραγωγικότητα 0,12 g/L/h.

III.2.4.1 Κλειστές καλλιέργειες σε φιάλες Duran



Διάγραμμα III.16: Κινητική της παραγωγής βιομάζας (X), της κατανάλωσης λακτόζης(Lac) και της παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης (1,3-pdo), σε υγρή καλλιέργεια συνυπόστρωμα σακχαρόζης/γλυκερόλης με συγκέντρωση 15/25 g/L υπό ανάδευση 180rpm.

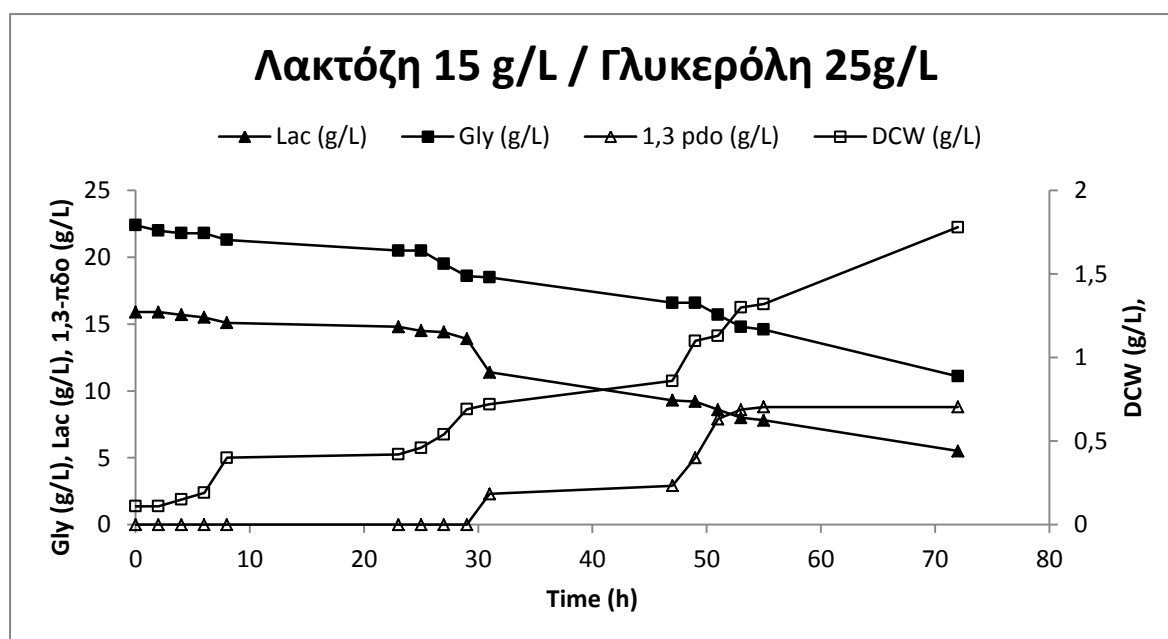
Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχείς καλλιέργειες σε φιάλες Duran 1-L, πληρωμένες κατά τα 4/5, υπό αναερόβιες συνθήκες, αρχική τιμή pH=5,8-6,3 και θερμοκρασία 30 °C.

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

Όπως προκύπτει από το Διάγραμμα III.16 η κατανάλωση του υποστρώματος σε αυτή την περίπτωση ξεκινάει σε λιγότερες ώρες μετά τον εμβολιασμό σε σχέση με τα άλλα υποστρώματα. Στην αρχή ο μικροοργανισμός καταναλώνει κάποια ποσότητα λακτόζης, παρατηρείται αύξηση της βιομάζας του και στη συνέχεια ξεκινά η κατανάλωση της

γλυκερόλης και κατά συνέπεια η παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης. Η παραγωγή προπανοδιόλης ξεκινά στη εκθετική φάση ανάπτυξης του μικροοργανισμού και η μέγιστη συγκέντρωση της ήταν 3,3 g/L. Ο μικροοργανισμός εμφάνισε μεγάλη κυτταρική αύξηση με μέγιστη τιμή 2,0 g/L

III.2.4.2 Κλειστή καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα



Διάγραμμα III.17: Κινητική της παραγωγής βιομάζας (X), της κατανάλωσης λακτόζης(Lac) και της παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης (1,3-pdo), σε υγρή καλλιέργεια συνυπόστρωμα σακχαρόζης/γλυκερόλης με συγκέντρωση 15/25 g/L υπό ανάδευση 180rpm.

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα 2-L, πληρωμένο κατά το 1/2, υπό αναερόβιες συνθήκες, αρχική τιμή pH=5,8-6,3 και θερμοκρασία 30 °C.

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

Όπως προκύπτει από το Διάγραμμα III.17 η κατανάλωση του υποστρώματος σε αυτή την περίπτωση ξεκινάει σε λιγότερες ώρες μετά τον εμβολιασμό σε σχέση με τα άλλα υποστρώματα. Στην αρχή ο μικροοργανισμός καταναλώνει κάποια ποσότητα λακτόζης, παρατηρείται αύξηση της βιομάζας του και στη συνέχεια ξεκινά η κατανάλωση της γλυκερόλης και κατά συνέπεια η παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης. Η παραγωγή προπανοδιόλης ξεκινά στη εκθετική φάση ανάπτυξης του μικροοργανισμού και η μέγιστη συγκέντρωση της ήταν 8,8 g/L. Ο μικροοργανισμός εμφάνισε μεγάλη κυτταρική αύξηση με μέγιστη τιμή 1,8 g/L

III.2.5 Κλειστές καλλιέργειες με τη χρήση τυρογάλακτος ως πηγή άνθρακα

Το στέλεχος *Lactobacillus diolivorans* DSM 14421 αναπτύχθηκε σε διάφορες συγκεντρώσεις του συνυποστρώματος τυρόγαλα/γλυκερόλη για την παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης. Οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε βιοαντιδραστήρα 2L με ενεργό όγκο 1L σε θερμοκρασία 30°C και 250rpm με εμφύσηση αζώτου για 20 λεπτά και το pH διορθωνόταν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης για να διατηρείται σε τιμή 5,8-6,5.

Πίνακας III.6: Κατανάλωση λακτόζης (g/L) από τυρόγαλα, γλυκερόλης και παραγωγή προϊόντων κατά την ανάπτυξη του *L.diolivorans* DSM14421 σε βιοαντιδραστήρα (250rpm)

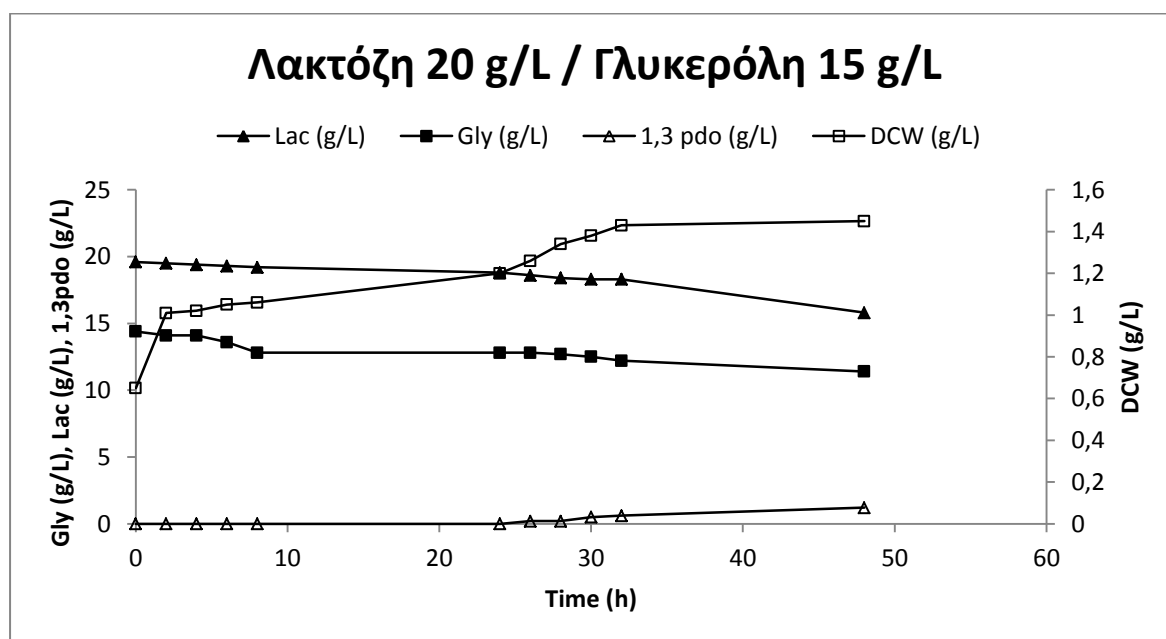
	Time (h)	Lac_{in} (g/L)	Lac_{con} (g/L)	X_{max} (g/g)	Gly_{in} (g/L)	Gly_{con} (g/L)	1,3-PDO (g/L)	Y_{1,3-PDO} (g/g)	P_{1,3-PDO} (g/L/h)	Eth (g/L)	Lac (g/L)	Ace (g/L)
B	48	19,6	3,8	1,4	14,4	3,0	1,2	0,40	0,01	10,4	0,2	7,4
	72	32,0	3,3	3,5	22,7	6,0	2,5	0,42	0,03	8,8	1,2	7,1
	72	19,7	3,0	2,5	12,1	5,6	2,5	0,45	0,03	6,1	0,4	6,6

B: βιοαντιδραστήρας, **Time:** η διάρκεια ζύμωσης (h), **Lac_{in}:** η αρχική συγκέντρωση λακτόζης (g/L), **Lac_{con}:** η καταναλωθείσα συγκέντρωση λακτόζης (g/L), **X_{max}:** η μέγιστη βιομάζα (g/L), **Gly_{in}:** η αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης (g/L), **Gly_{con}:** η καταναλωθείσα συγκέντρωση γλυκερόλης (g/L), **1,3-PDO:** η συγκέντρωση της 1,3-προπανοδιόλης (g/L), **Y_{1,3-PDO}:** ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης προς την καταναλωθείσα γλυκερόλη (g/g), **P_{1,3-PDO}:** η παραγωγικότητα της 1,3-προπανοδιόλης ανά ώρα (g/L/h), **Eth:** η συγκέντρωση της αιθανόλης (g/L), **Lac:** η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος (g/L), **Ace:** η συγκέντρωση του οξικού οξέος

Όπως προκύπτει από τον πίνακα III.6 η μέγιστη τιμή 1,3-προπανοδιόλης παρατηρήθηκε στη ζύμωση με αρχική συγκέντρωση λακτόζης 32,0 g/L και αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 22,7 g/L και ήταν 2,5 g/L με συντελεστή απόδοσης 0,42 g/g. Παρόλο που η τιμή της 1,3-προπανοδιόλης ήταν η μεγαλύτερη που παρατηρήθηκε δεν συμβαίνει το ίδιο και με το συντελεστή απόδοσης. Ο μεγαλύτερος συντελεστής απόδοσης παρατηρήθηκε στη ζύμωση με αρχική συγκέντρωση λακτόζης 19,7 g/L και αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 12,1 g/L και ήταν 0,45 g/g, στη συγκεκριμένη ζύμωση παρατηρήθηκε επίσης η μέγιστη ποσότητα 1,3-προπανοδιόλης. Η υψηλότερη συγκέντρωση βιομάζας ήταν 3,5 g/L και η χαμηλότερη 1,4 g/L. Στις ζυμώσεις αυτές παρατηρήθηκε μια εξαιρετικά υψηλή συγκέντρωση βιομάζας σε σχέση με τη βιομάζα που παρατηρήθηκε στις ζυμώσεις με την εμπορική λακτόζη. Αυτό ενδεχομένως να οφείλεται

στην σύσταση του τυρογάλακτος, καθώς δεν περιέχει μόνο λακτόζη, οπότε πιθανώς ορισμένα συστατικά του να κατακάθονται ως ίζημα και να συνυπολογίζονται στο ξηρό βάρος. Η παραγωγή γαλακτικού οξέος κινήθηκε σε πολύ χαμηλά επίπεδα μεταξύ 0,2 g/L και 1,2 g/L. Η μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης ήταν 10,4 g/L και η μέγιστη συγκέντρωση οξικού οξέος ήταν 7,4 g/L και παρατηρήθηκαν στη ζύμωση με αρχική συγκέντρωση λακτόζης 19,6 g/L και αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 12,8 g/L. Στη ζύμωση με αρχική συγκέντρωση λακτόζης 32,0 g/L και αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 22,7 g/L σε διάστημα 72 ωρών παρατηρήθηκε η μέγιστη κατανάλωση γλυκερόλης που έφτασε τα 6,0 g/L, στη συγκεκριμένη ζύμωση παρατηρήθηκε και η μέγιστη ποσότητα 1,3-προπανοδιόλης που ήταν 2,5 g/L, με συντελεστή απόδοσης 0,42g/g και παραγωγικότητα 0,03 g/L/h. Στις συγκεκριμένες ζυμώσεις παρατηρήθηκε πολύ μικρή κατανάλωση λακτόζης, ενδεχομένως ουσίες που υπάρχουν στο τυρόγαλα να δρουν παρεμποδιστικά με συνέπεια η κατανάλωση λακτόζης από το συγκεκριμένο μικροοργανισμό να γίνεται με πολύ μικρότερο ρυθμό.

III.2.5.1 Κλειστές καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα

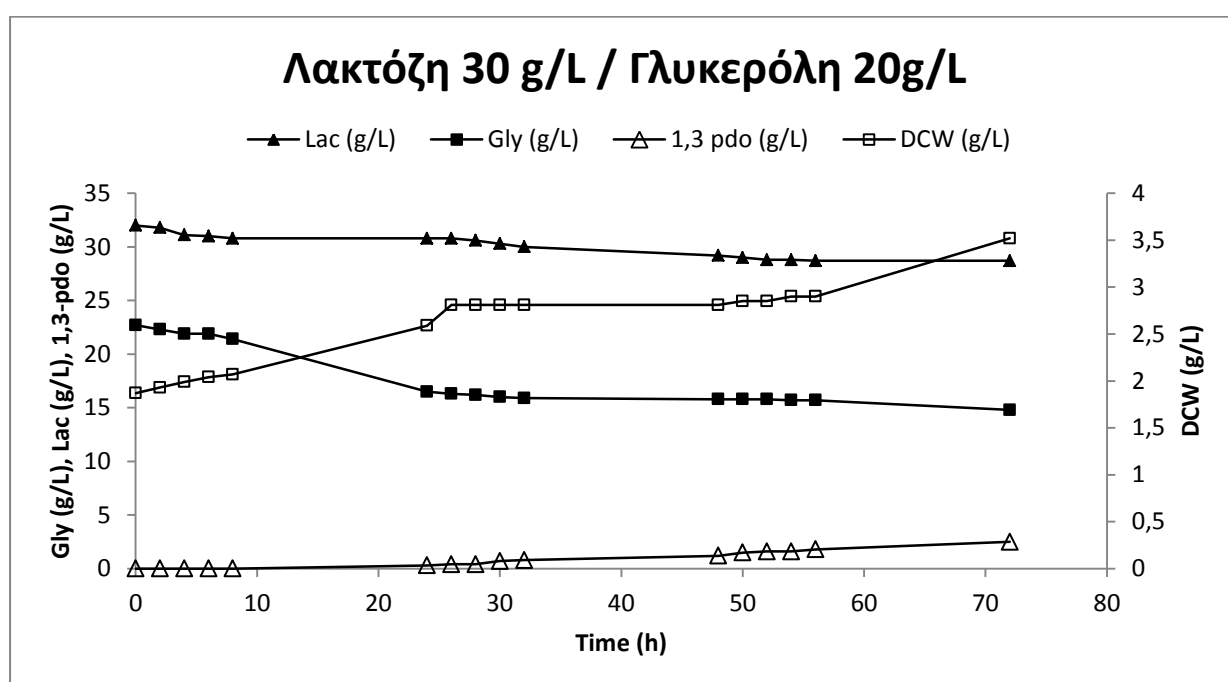


Διάγραμμα III.18: Κινητική της παραγωγής βιομάζας (X), της κατανάλωσης λακτόζης(Lac) και της παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης (1,3-pdo), σε υγρή καλλιέργεια συνυπόστρωμα σακχαρόζης/γλυκερόλης με συγκέντρωση 15/25 g/L υπό ανάδευση 180rpm.

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα 2-L, πληρωμένο κατά το 1/2, υπό αναερόβιες συνθήκες, αρχική τιμή pH=5,8-6,3 και θερμοκρασία 30 °C.

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

Όπως προκύπτει από το Διάγραμμα III.18η κατανάλωση του υποστρώματος σε αυτή την περίπτωση ξεκινάει σε λίγες ώρες μετά τον εμβολιασμό σε σχέση με τα άλλα υποστρώματα. Στην αρχή ο μικροοργανισμός καταναλώνει κάποια ποσότητα λακτόζης, παρατηρείται αύξηση της βιομάζας του και στη συνέχεια ξεκινά η κατανάλωση της γλυκερόλης και κατά συνέπεια η παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης. Η παραγωγή προπανοδιόλης ξεκινά στη εκθετική φάση ανάπτυξης του μικροοργανισμού και η μέγιστη συγκέντρωση της ήταν 1,2 g/L. Ο μικροοργανισμός εμφάνισε μεγάλη κυτταρική αύξηση με μέγιστη τιμή 1,4 g/L



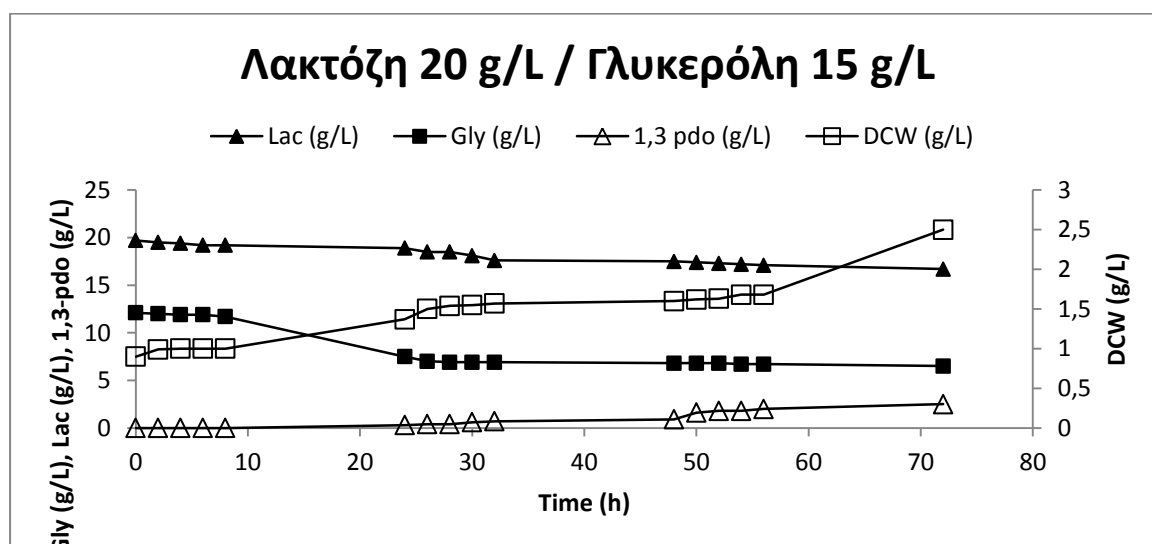
Διάγραμμα III.19: Κινητική της παραγωγής βιομάζας (X), της κατανάλωσης λακτόζης(Lac) και της παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης (1,3-pdo), σε υγρή καλλιέργεια συνυπόστρωμα σακχαρόζης/γλυκερόλης με συγκέντρωση 15/25 g/L υπό ανάδευση 180rpm.

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιραστήρα 2-L, πληρωμένο κατά το 1/2, υπό αναερόβιες συνθήκες, αρχική τιμή pH=5,8-6,3 και θερμοκρασία 30 °C.

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

Όπως προκύπτει από το Διάγραμμα III.19 η κατανάλωση του υποστρώματος σε αυτή την περίπτωση ξεκινάει σε λίγες ώρες μετά τον εμβολιασμό σε σχέση με τα άλλα υποστρώματα. Στην αρχή ο μικροοργανισμός καταναλώνει κάποια ποσότητα λακτόζης, παρατηρείται αύξηση της βιομάζας του και στη συνέχεια ξεκινά η κατανάλωση της γλυκερόλης και κατά συνέπεια η παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης. Η παραγωγή

προπανοδιόλης ξεκινά στη στάσιμη φάση ανάπτυξης του μικροοργανισμού και η μέγιστη συγκέντρωση της ήταν 2,5 g/L. Ο μικροοργανισμός εμφάνισε μεγάλη κυτταρική αύξηση με μέγιστη τιμή 3,3 g/L



Διάγραμμα III.20: Κινητική της παραγωγής βιομάζας (X), της κατανάλωσης λακτόζης(Lac) και της παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης (1,3-pdo), σε υγρή καλλιέργεια συνυπόστρωμα σακχαρόζης/γλυκερόλης με συγκέντρωση 15/25 g/L υπό ανάδευση 180rpm.

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιραστήρα 2-L, πληρωμένο κατά το 1/2, υπό αναερόβιες συνθήκες, τιμή pH=5,8-6,3 και θερμοκρασία 30 °C.

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

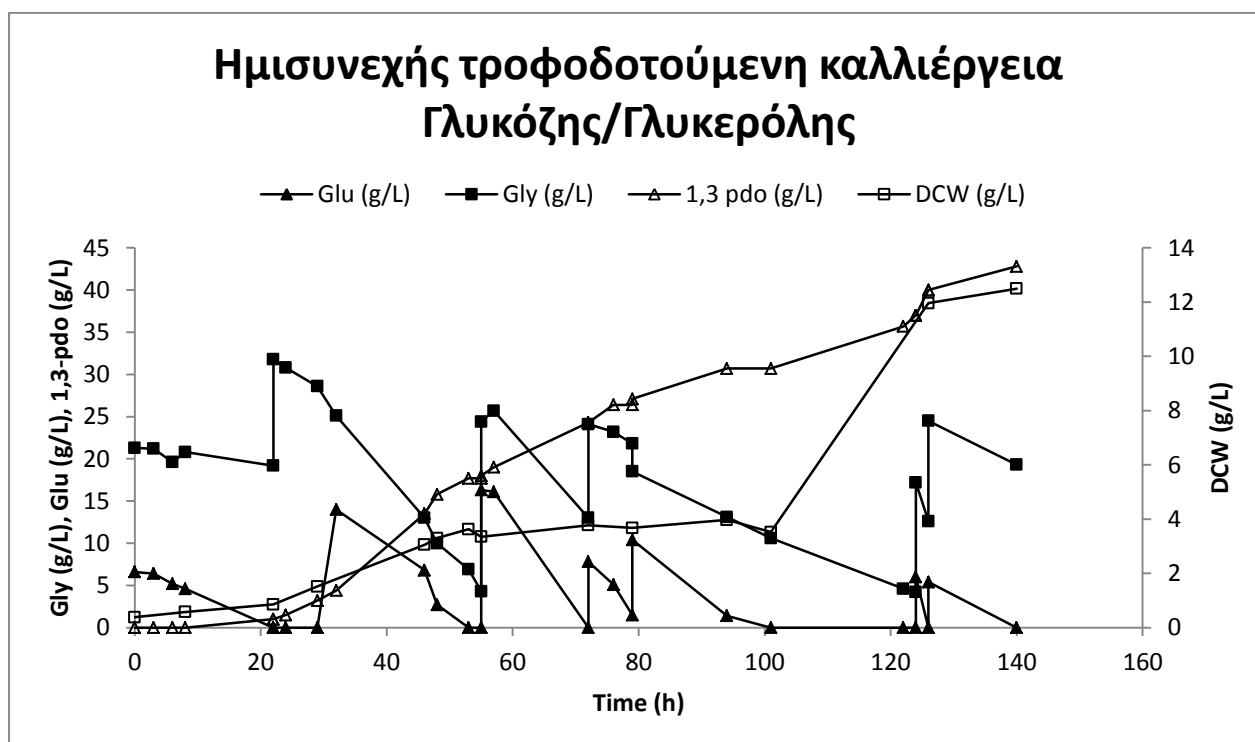
Όπως προκύπτει από το Διάγραμμα III.20 η κατανάλωση του υποστρώματος σε αυτή την περίπτωση ξεκινάει σε λιγότερες ώρες μετά τον εμβολιασμό σε σχέση με τα άλλα υποστρώματα. Στην αρχή ο μικροοργανισμός καταναλώνει κάποια ποσότητα λακτόζης, παρατηρείται αύξηση της βιομάζας του και στη συνέχεια ξεκινά η κατανάλωση της γλυκερόλης και κατά συνέπεια η παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης. Η παραγωγή προπανοδιόλης ξεκινά στη εκθετική φάση ανάπτυξης του μικροοργανισμού και η μέγιστη συγκέντρωση της ήταν 2,5 g/L. Ο μικροοργανισμός εμφάνισε μεγάλη κυτταρική αύξηση με μέγιστη τιμή 3,0 g/L

III.3 Ημισυνεχείς τροφοδοτούμενες καλλιέργειες

Μετά την πραγματοποίηση των ζυμώσεων για την επιλογή των καταλληλότερων πηγών άνθρακα για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού πραγματοποιήθηκαν πείραμα ημισυνεχούς καλλιέργειας με συνυπόστρωμα γλυκόζης/γλυκερόλης.

III.3.1 Ημισυνεχείς τροφοδοτούμενες καλλιέργειες με τη χρήση γλυκόζης ως πηγή άνθρακα

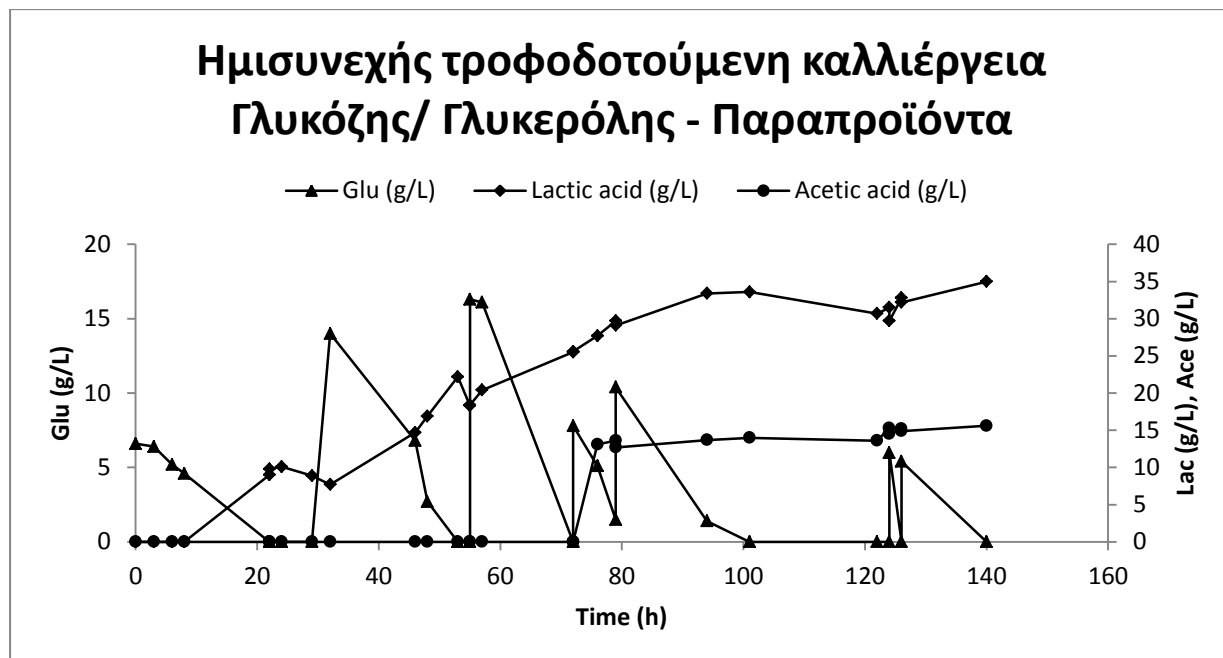
Το στέλεχος *Lactobacillus diolivorans* DSM 14421 αναπτύχθηκε σε συνυπόστρωμα γλυκόζη/γλυκερόλη για την παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης. Οι αρχικές συγκεντρώσεις ήταν 6,5g γλυκόζης και 21g γλυκερόλης. Όταν οι συγκεντρώσεις της γλυκόζης και της γλυκερόλης καταναλώνονταν μερικώς πραγματοποιούνταν προσθήκη πυκνού διαλύματος γλυκόζης/γλυκερόλης 1/10 ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε βιοαντιδραστήρα 1L με ενεργό όγκο 0.8L σε θερμοκρασία 30°C και 180 rpm με εμφύσηση αζώτου για 20 λεπτά και το pH διορθωνόταν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης για να διατηρείται σε τιμή 5,8-6,5.



Διάγραμμα III.21: Κινητική αύξησης της βιομάζας (DCW), κατανάλωσης γλυκόζης (Glu), γλυκερόλης (Gly) και παραγωγής της 1,3-προπανοδιόλης (1,3-pdo), κατά την ημισυνεχή καλλιέργεια του βακτηρίου *Lactobacillus diolivorans* DSM14421 σε βιοαντιδραστήρα 1L, με ενεργό όγκο 0.8 L σε θερμοκρασία 30 °C και υπό ανάδευση 180rpm.

Συνθήκες καλλιέργειας: ημι-συνεχής καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα 1 L, με ενεργό όγκο 0.8 L, υπό αναερόβιες συνθήκες, τιμή pH=5,8-6,3 και θερμοκρασία 30 °C.

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



Διάγραμμα III.22: Κινητική κατανάλωσης γλυκόζης (Glu) και παραγωγής γαλακτικού οξέος (Lac) και οξικού οξέος (Ace), κατά την ημισυνεχή καλλιέργεια του βακτηρίου *Lactobacillus diolivorans* DSM14421 σε βιοαντιδραστήρα 1L, με ενεργό όγκο 0.8 L σε θερμοκρασία 30 °C και υπό ανάδευση 180rpm.

Συνθήκες καλλιέργειας: ημι-συνεχής καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα 1 L, με ενεργό όγκο 0.8 L, υπό αναερόβιες συνθήκες, τιμή pH=5,8-6,3 και θερμοκρασία 30 °C.

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

Πίνακας III.7: Κατανάλωση εμπορικής γλυκόζης (g/L), γλυκερόλης και παραγωγή προϊόντων κατά την ανάπτυξη του *L.diolivorans* DSM14421 σε ημισυνεχή καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα (250rpm)

	Time (h)	Glu_{in} (g/L)	Glu_{con} (g/L)	X_{max} (g/L)	Gly_{in} (g/L)	Gly_{con} (g/L)	1,3-PDO (g/L)	Y_{1,3-PDO} (g/g)	P_{1,3-PDO} (g/L/h)	Lac (g/L)	Ace (g/L)
B	140	6,5	60,5	12,5	21	70	43	0,61	0,3	35	15,6

B: βιοαντιδραστήρας, **Time:** η διάρκεια ζύμωσης (h), **Glu_{in}:** η αρχική συγκέντρωση γλυκόζης (g/L), **Glu_{con}:** η καταναλωθείσα συγκέντρωση γλυκόζης (g/L), **X_{max}:** η μέγιστη βιομάζα (g/L), **Gly_{in}:** η αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης (g/L), **Gly_{con}:** η καταναλωθείσα συγκέντρωση γλυκερόλης (g/L), **1,3-PDO:** η συγκέντρωση της 1,3-προπανοδιόλης (g/L), **Y_{1,3-PDO}:** ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης προς την καταναλωθείσα γλυκερόλη (g/g), **P_{1,3-PDO}:** η παραγωγικότητα της 1,3-προπανοδιόλης ανά ώρα (g/L/h), **Lac:** η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος (g/L), **Ace:** η συγκέντρωση του οξικού οξέος

Όπως παρατηρείται από τον Πίνακα III.7 στην ημισυνεχή τροφοδοτούμενη καλλιέργεια σε διάστημα 140h καταναλώθηκαν συνολικά 60,5 g/L γλυκόζης και 70 g/L γλυκερόλη. Η 1,3-προπανοδιόλη που παρήχθη έφτασε τα 43 g/L με συντελεστή απόδοσης 0,61 g/g και παραγωγικότητα 0,3 g/L/h. Η συνολική παραγωγή του γαλακτικού οξέος έφτασε τα 35 g/L και του οξικού οξέος τα 15,6 g/L.

III.4 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα

Συνοψίζοντας, σε όλες τις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν παρατηρείται πως η πηγή άνθρακα, όποια κι αν είναι αυτή, αρχίζει να καταναλώνεται πριν τη γλυκερόλη. Όταν ο μικροοργανισμός αναπτυχθεί λίγο και υπάρχει αύξηση της βιομάζας, τότε αρχίζει και η κατανάλωση της γλυκερόλης προς την παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης.

Πίνακας III.8: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της παρούσας μελέτης

Είδος καλλιέργειας	T (h)	S _{in} (g/L)	S _{con} (g/L)	X _{max} (g/L)	Gly _{in} (g/L)	Gly _{con} (g/L)	1,3-PDO (g/L)	Y _{1,3-PDO} (g/g)	P _{1,3-PDO} (g/L/h)	Eth (g/g)	Lac (g/L)	Ace (g/g)
Εμπορική γλυκόζη												
A	Ασυνεχής	50	11,3	7,8	1,8	25,8	11,0	6,9	0,63	0,14		
	Ημι-συνεχής	14 0		60,5	12,5		70	43	0,61	0,3	35	15,6
Εμπορική φρουκτόζη												
A	Ασυνεχής	50	18,5	10,0	1,6	8,5	1,5	0,9	0,60	0,02		
Εμπορική σακχαρόζη												
A	Ασυνεχής	50	26,5	10,5	1,0	19,4	7,9	3,8	0,48	0,01	6,8	0,4
A	Ασυνεχής	50	31,0	6,1	1,1	26,5	9,0	4,4	0,48	0,01	4,8	0,6
A	Ασυνεχής	72	29,8	12,6	1,4	40,8	6,2	4,0	0,64	0,01	7,3	0,8
A	Ασυνεχής	72	28,6	10,6	1,1	56,7	16,2	3,3	0,20	0,002	7,4	0,6
B	Ασυνεχής	72	4,0	0,5	0,7	32,0	3,8	1,7	0,45	0,02	2,0	0,6
B	Ασυνεχής	72	15,1	7,0	1,0	22,7	5,8	2,6	0,48	0,02	7,5	5,6
Εμπορική λακτόζη												
A	Ασυνεχής	50	25,1	16,8	2,0	8,2	7,3	3,3	0,45	0,07	6,5	12,0
B	Ασυνεχής	72	15,9	10,4	1,8	22,4	11,3	8,8	0,78	0,12	4,8	9,0
Μελάσα												
A	Ασυνεχής	72	11,6	3,7	1,1	12,4	5,7	2,0	0,45	0,02	1	0,4
Τυρόγαλα												
B	Ασυνεχής	48	19,6	3,8	1,4	14,4	3,0	1,2	0,40	0,01	10,4	0,2
B	Ασυνεχής	72	32,0	3,3	3,5	22,7	6,0	2,5	0,42	0,03	8,8	7,1
B	Ασυνεχής	72	19,7	3,0	2,5	12,1	5,6	2,5	0,45	0,03	6,1	6,6
Εμπορική ξυλόζη												
A	Ασυνεχής	50	25,0	25,0	3,6	7,8	2,6	1,7	0,65	0,003	1,5	3,8
A	Ασυνεχής	72	20,0	20,0	4,2	29,0	20,3	12,4	0,61	0,17	0,6	3,5
B	Ασυνεχής	72	16,8	16,8	3,3	21,4	7,8	4,8	0,61	0,06	1,9	13,7

A: φιάλες Duran, **B:** βιοαντιδραστήρας, **Time:** η διάρκεια ζύμωσης (h), **Lac_{in}:** η αρχική συγκέντρωση λακτόζης (g/L), **Lac_{con}:** η καταναλωθείσα συγκέντρωση λακτόζης (g/L), **X_{max}:** η μέγιστη βιομάζα (g/L), **Gly_{in}:** η αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης (g/L), **Gly_{con}:** η καταναλωθείσα συγκέντρωση γλυκερόλης (g/L), **1,3-PDO:** η συγκέντρωση της 1,3-προπανοδιόλης (g/L), **Y_{1,3-PDO}:** ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης προς την καταναλωθείσα γλυκερόλη (g/g), **P_{1,3-PDO}:** η παραγωγικότητα της 1,3-προπανοδιόλης ανά ώρα (g/L/h), **Eth:** η συγκέντρωση της αιθανόλης (g/L), **Lac:** η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος (g/L), **Ace:** η συγκέντρωση του οξικού οξέος

Στον Πίνακα III.8 παρουσιάζονται τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα από όλες τις ζυμώσεις που έλαβαν χώρα κατά την εκπόνηση της παρούσας μελέτης. Το βακτηριακό στέλεχος *Lactobacillus diolivorans* DSM 14421 δεν δύναται να καταναλώσει τη γλυκερόλη χωρίς κάποια πηγή άνθρακα. Ο σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης ήταν η εξέταση σακχάρων πέραν της γλυκόζης για τη δυνατότητα κατανάλωσης τους από τον μικροοργανισμό. Τα αποτελέσματα ήταν τα παραπάνω. Οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν είτε σε 50 είτε σε 72 ώρες. Η υψηλότερη συγκέντρωση 1,3-προπανοδιόλης παρατηρήθηκε στη συν-ζύμωση ξυλόζης/γλυκερόλης με αρχικές συγκεντρώσεις 20,0 g/L και 29,0g/L αντίστοιχα και έφτασε τα 12,4 g/L με συντελεστή απόδοσης 0,61 g/g και παραγωγικότητα 0,17g/L/h. Ο υψηλότερος συντελεστής απόδοσης παρατηρήθηκε στη συν-ζύμωση λακτόζης/γλυκερόλης με αρχικές συγκεντρώσεις 15,9 g/L και 22,4 g/L αντίστοιχα και έφτασε τα 0,78 g/g. Στη συγκεκριμένη ζύμωση η 1,3-προπανοδιόλη που παρήχθη ήταν 8,8 g/L και η παραγωγικότητα ήταν 0,12 g/L/h. Η υψηλότερη παραγωγικότητα παρατηρήθηκε στην ημισυνεχή τροφοδοτούμενη καλλιέργεια και ήταν 0,3 g/L/h.

IV. Συμπεράσματα-Συζήτηση

Ο μικροοργανισμός *Lactobacillus diolivorans* DSM 14421 έχει μελετηθεί για τις ικανότητες του να θεωρηθεί δυναμικός οργανισμός παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης από γλυκερόλη. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Pflügl et al., 2012) διαφορετικές παράμετροι ανάπτυξης, όπως η παροχή οξυγόνου και η σύσταση του υποστρώματος έχουν μελετηθεί σε κλειστές και ημι-συνεχείς καλλιέργειες. Στις κλειστές καλλιέργειες η παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης έφτασε τα 41,7 g/L και στις ημι-συνεχείς τα 73,7g/L. Επίσης με προσθήκη βιταμίνης B₁₂ στο θρεπτικό μέσο παρατηρήθηκε αύξηση 15% στην παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης, φτάνοντας τα 84,5g/L. Η παραπάνω μελέτη πραγματοποιήθηκε με καθαρή γλυκερόλη. Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν κάτω από αναερόβιες συνθήκες με συνεχή ροή αζώτου (N₂ / 2,00 +- 0,06L/h), οι στροφές που εφαρμόστηκαν ήταν 400 +- 1 rpm, η θερμοκρασία 30oC και το pH ρυθμιζόταν στο 5,7 με καυστικό κάλιο (KOH) 8M. Με βάση τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν η κατανάλωση της γλυκόζης όταν στο υπόστρωμα υπάρχει γλυκερόλη πραγματοποιείται στις 22h . Ο συντελεστής απόδοσης που παρατηρήθηκε ήταν 0,79molC 1,3-pdo/molc glycerol. Στη συγκεκριμένη μελέτη πραγματοποιήθηκε έλεγχος της επίδρασης του οξυγόνου. Όταν εφαρμόστηκαν αναερόβιες συνθήκες (100% N₂) αλλά και μικροαερόφιλες (1% O₂, 99% N₂) υπήρχε πλήρης κατανάλωση της γλυκόζης και της γλυκερόλης. Όσον αφορά τα προϊόντα παρατηρήθηκε ικανοποιητική παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης, γαλακτικού οξέος , οξικού οξέος και αιθανόλης, με τα αποτελέσματα να είναι πλήρως συγκρίσιμα. Μόνη διαφορά αποτέλεσε η παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης, που στην περίπτωση των αναερόβιων συνθηκών ήταν μεγαλύτερη. Στην περίπτωση των αερόβιων συνθηκών ανάπτυξης (21% O₂, με συνεχή παροχή αέρα) παρατηρήθηκαν εντελώς διαφορετικά αποτελέσματα καθώς μόνο ένα μικρό ποσοστό γλυκόζης καταναλώθηκε, κατά συνέπεια υπήρχε πολύ μικρή παραγωγή γαλακτικού οξέος, οξικού οξέος και αιθανόλης και καθόλου παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης (Pflügl et al., 2012).

Ακόμη οι Pflügl et al. (2014) πραγματοποίησαν μελέτη με χρήση βιομηχανικής (ακάθαρτης) γλυκερόλης προερχόμενης από την παραγωγή βιοντήζελ. Στη μελέτη αυτή παρατηρήθηκε πως ο μικροοργανισμός *Lactobacillus diolivorans* DSM 14421 έχει τη δυνατότητα να καταναλώσει και την ακάθαρτη γλυκερόλη χωρίς να παρατηρείται κάποια ιδιαίτερη παρεμπόδιση στην ανάπτυξη ή την παραγωγή. Με τη χρήση ακάθαρτης γλυκερόλης προερχόμενης από την παραγωγή βιοντήζελ από φοινικέλαιο 85g/L 1,3-προπανοδιόλης παρήχθησαν με παραγωγικότητα 0,45g/L h, σε ημι-συνεχή καλλιέργεια.

Τα σάκχαρα που είναι απαραίτητα για την παραγωγή βιομάζας αντικαταστάθηκαν από υδρολύμα λιγνοκυτταρινούχων υλικών, με αποτέλεσμα η παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης να φτάσει τα 75g/L με παραγωγικότητα 0,36g/Lh. Στη συγκεκριμένη μελέτη εξετάστηκαν τα σάκχαρα L-αραβινόζη, D-φρουκτόζη, D-ξυλόζη σε σχέση με την D-γλυκόζη. Τα παραπάνω σάκχαρα είναι τα κύρια σάκχαρα που βρίσκονται στα υδρολύματα λιγνοκυτταρινούχων υλικών. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν κατά τη συνζύμωση των παραπάνω σακχάρων με καθαρή γλυκερόλη ήταν τα εξής: Στην περίπτωση της βιομάζας ήταν 7%, 10%, και 20% χαμηλότερη για την D-φρουκτόζη, τη D-ξυλόζη και την L-αραβινόζη αντίστοιχα σε σύγκριση με την D-γλυκόζη. Στην περίπτωση της 1,3-προπανοδιόλης ήταν 120% και 40% υψηλότερη για την D-φρουκτόζη, τη D-ξυλόζη αντίστοιχα σε σύγκριση με την D-γλυκόζη. Στην περίπτωση της L-αραβινόζης δεν παρατηρήθηκε παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης, παρόλου που η L-αραβινόζη και D-ξυλόζη μεταβολίζονται μέσω του ίδιου μεταβολικού μονοπατιού.

Στην παρούσα μελέτη, τα πειράματα διεξήχθησαν με παροχή αζώτου (N₂) για 20-30 λεπτά πριν τον εμβολιασμό, οι στροφές στις φιάλες Duran ήταν 180 rpm και στους βιοαντιδραστήρες 250rpm, η θερμοκρασία 30°C και το pH ρυθμιζόταν στο 5,8-6,5 στις φιάλες Duran και στο 5,8 στους βιοαντιδραστήρες με καυστικό νάτριο (NaOH) 5M. Ο σκοπός ήταν και στη συγκεκριμένη περίπτωση η χρησιμοποίηση ακάθαρτης γλυκερόλης καθώς επίσης και σακχάρων διαφορετικών από την εμπορική γλυκόζη, που συναντώνται σε γεωργικά απόβλητα. Τα σάκχαρα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η D-φρουκτόζη, η D-ξυλόζη, D-σακχαρόζη και η D-λακτόζη. Σε όλες τις περιπτώσεις ο μικροοργανισμός ξεκινά με την κατανάλωση σακχάρου, αυξάνει τη βιομάζα του και στη συνέχεια ξεκινά η κατανάλωση της γλυκερόλης.

Ο θεωρητικός συντελεστής απόδοσης στη συν-ζύμωση γλυκόζης/γλυκερόλης είναι 0,83 g/g. Στην παρούσα μελέτη οι συντελεστές απόδοσης κυμάνθηκαν από 0,20-0,78 g/g. Ο υψηλός αυτός συντελεστής απόδοσης (0,78g/g) παρατηρήθηκε στη συν-ζύμωση λακτόζης/γλυκερόλης. Στην παρούσα μελέτη σε καμιά ζύμωση δεν παρατηρήθηκαν συγκεντρώσεις 1,3-προπανοδιόλης κοντά στις συγκεντρώσεις που αναφέρονται στη βιβλιογραφία.

Όπως παρατηρήθηκε ο μικροοργανισμός μπορεί να καταναλώσει όλα τα σάκχαρα που του χορηγήθηκαν όχι όμως με την ίδια ικανότητα. Τα σάκχαρα που καταναλώνει πιο

εύκολα είναι η ξυλόζη κι έπειτα η λακτόζη. Η κατανάλωση της σουκρόζης γίνεται με πολύ αργό ρυθμό και φαίνεται να μην προτιμάται από το μικροοργανισμό.

Σε αντίθεση με τη βιβλιογραφία (Pflügl et al., 2014) στην περίπτωση της ξυλόζης παρατηρείται μια σημαντικά μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας σε σχέση με την γλυκόζη. Στη φρουκτόζη και τη λακτόζη η παραγωγή βιομάζας κινείται στα ίδια επίπεδα με τη γλυκόζη και στην περίπτωση της σακχαρόζης είναι σημαντικά χαμηλότερη.

Όσον αφορά την παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έρχονται σε αντίθεση με τη βιβλιογραφία (Pflügl et al., 2014) καθώς ο συντελεστής απόδοσης ως προς τη γλυκερόλη στην περίπτωση της φρουκτόζης και της ξυλόζης είναι στο ίδιο επίπεδο με αυτό της γλυκόζης, μείωση του συντελεστή απόδοσης παρατηρείται μόνο στην περίπτωση της σακχαρόζης.

Σε όλες τις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη ο συντελεστής απόδοσης της 1,3-προπανοδιόλης ως προς τη γλυκερόλη ήταν μικρότερος από τον συντελεστή απόδοσης που αναφέρεται στη βιβλιογραφία. Αυτό ενδεχομένως να οφείλεται στην πραγματοποίηση των ζυμώσεων χωρίς συνεχή παροχή αζώτου. Κατά συνέπεια οι ζυμώσεις με το βακτηριακό στέλεχος *Lactobacillus diolivorans* DSM 14421 θα πρέπει να πραγματοποιούνται κάτω από αναερόβιες συνθήκες για να δίνουν τα μέγιστα δυνατά αποτελέσματα. Επίσης, υπάρχει πιθανότητα ο μειωμένος συντελεστής απόδοσης των ζυμώσεων να οφείλεται στις μειωμένες στροφές που πραγματοποιούνται οι ζυμώσεις στην παρούσα μελέτη.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν όλα τα παραπάνω η χρήση των λιγνοκυτταρινούχων υποστρωμάτων ως πηγή άνθρακα για την ανάπτυξη του στελέχους *Lactobacillus diolivorans* DSM 14421 σε συνζύμωση με την ακάθαρτη γλυκερόλη για παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης συνιστάται και από την παρούσα μελέτη.

Στην περίπτωση της σακχαρόζης, η κατανάλωση της γίνεται με μικρότερο ρυθμό σε σχέση με τη γλυκόζη. Επίσης, παρατηρήθηκε πως ο μικροοργανισμός αρχίζει την κατανάλωση γλυκερόλης χωρίς να έχει καταναλώσει μεγάλη ποσότητα σακχαρόζης. Στις ζυμώσεις αυτές ο συντελεστής απόδοσης ως προς τη γλυκερόλη είναι αρκετά χαμηλός και κυμαίνεται μεταξύ 0,2-0,48 με εξαίρεση μια περίπτωση που φτάνει το 0,62.

Παρατηρώντας τα παραπάνω αποτελέσματα και παρόλο που οι συντελεστές απόδοσης δεν είναι κοντά στο θεωρητικό, κρίθηκε σκόπιμο να χρησιμοποιηθεί ως πηγή

άνθρακα η μελάσα καθώς τα κύρια σάκχαρα που συναντώνται στη μελάσα είναι η σακχαρόζη, η φρουκτόζη και η γλυκόζη. Σε διάστημα 72 ωρών ο μικροοργανισμός είχε καταναλώσει μόλις 3,7 g/L σακχαρόζης, 5,7 g/L γλυκερόλης και είχαν παραχθεί 2,0 g/L 1,3-προπανοδιόλης. Ο συντελεστής απόδοσης ως προς τη γλυκερόλη ήταν 0,45. Με βάση τα παραπάνω ενδεχομένως η μελάσα να περιέχει ουσίες που δρουν παρεμποδιστικά ως προς την αύξηση του μικροοργανισμού, επίσης υπάρχει περίπτωση αν η ζύμωση πραγματοποιηθεί σε αναερόβιες συνθήκες ή σε αυξημένες στροφές να δώσει καλύτερα αποτελέσματα και να υπάρχει δυνατότητα χρησιμοποίησης της μελάσας ως πηγή άνθρακα.

Σημαντικά ήταν και τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από τις ζυμώσεις που σαν πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκε η λακτόζη. Στις συγκεκριμένες ζυμώσεις παρατηρείται ικανοποιητική κατανάλωση της λακτόζης και ο συντελεστής απόδοσης ως προς τη γλυκερόλη κυμαίνεται από 0,45-0,78. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά θεωρήθηκε πως το τυρόγαλα θα μπορούσε να αποτελέσει μια ιδανική πηγή άνθρακα για τις ζυμώσεις. Όμως στις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν κάτι τέτοιο δεν συνέβη καθώς υπήρχε πολύ μικρή κατανάλωση λακτόζης από το τυρόγαλα σε σχέση με την εμπορική λακτόζη. Αξιοσημείωτο είναι επίσης το γεγονός πως παρότι η κατανάλωση της λακτόζης ήταν ελάχιστη, υπήρχε κατανάλωση γλυκερόλης που έφτασε μέχρι και τα 8g. Όμως σε καμιά από τις ζυμώσεις η παραχθείσα 1,3-προπανοδιόλη δεν ξεπέρασε τα 2,5 g/L και ο συντελεστής απόδοσης τα 0,45g/g. Ενδεχομένως, και στην περίπτωση του τυρογάλακτος να υπάρχουν ουσίες που δρουν παρεμποδιστικά ως προς την αύξηση του μικροοργανισμού.

Τα τελευταία χρόνια η βιοτεχνολογική παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς η ραγδαία αύξηση της ζήτησης των βιολογικών καυσίμων έχει σαν συνέπεια την αύξηση των αποθεμάτων γλυκερόλης στο περιβάλλον. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η βιοτεχνολογική παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης τελείται κυρίως με την χρήση διαφόρων προκαρυωτικών μικροοργανισμών, που ανήκουν 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).

Με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία οι υψηλότερες τιμές συγκέντρωσης 1,3-προπανοδιόλης από καθαρή γλυκερόλη κυμαίνονται από 70-100g/L, ενώ από βιομηχανική οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις φτάνουν τα 58-80g/L. Στην περίπτωση της καθαρής γλυκερόλης οι μέγιστες συγκεντρώσεις παρατηρήθηκαν σε καλλιέργειες ανασυνδυασμένων μικροοργανισμών (Μετσοβίτη, 2013). Στην παρούσα μελέτη οι τιμές της συγκέντρωσης της 1,3-προπανοδιόλης κυμάνθηκαν από 0,9-12,4g/L, οι τιμές αυτές απέχουν από τις τιμές που παρουσιάζονται στη διεθνή βιβλιογραφία.

Στη διεθνή βιβλιογραφία επικρατούν διαφορετικές απόψεις σχετικά με την επίδραση της καθαρής και της βιομηχανικής γλυκερόλης στην παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης. Σε αρκετές περιπτώσεις η μέγιστη συγκέντρωση παρατηρήθηκε σε καλλιέργειες καθαρής γλυκερόλης, ενώ σε άλλες έρευνες σε βιομηχανική γλυκερόλη.

Επίσης στη βιβλιογραφία τονίζεται η επίδραση της εμφύσησης του μέσου με άζωτο. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, στην παρούσα μελέτη υπήρξε εμφύσηση αζώτου στο υγρό της ζύμωσης μόνο για 20-30 λεπτά πριν τον εμβολιασμό κι όχι καθ'όλη τη διάρκεια της ζύμωσης. Η ζύμωση της γλυκερόλης προς 1,3-προπανοδιόλη είναι κατά κύριο λόγο αναερόβια, όμως στη βιβλιογραφία υπάρχουν αναφορές πειραμάτων κάτω από αναερόβιες, μικροαερόφιλες ή ακόμα και αερόβιες συνθήκες με σκοπό τη διερεύνηση της επίδρασης του οξυγόνου στα μεταβολικά προϊόντα. Σε ορισμένους μικροοργανισμούς η συνεχής διοχέτευση αζώτου ευνοεί τη μεταβολική οδό γλυκερόλης-αιθανόλης και όχι αυτή της γλυκερόλης-1,3-προπανοδιόλης. Επίσης δεν αντιδρούν με τον ίδιο τρόπο οι μικροοργανισμοί στις συνθήκες αυτοπαραγόμενης αναεροβίωσης, καθώς δεν ευνοείται πάντα η μεταβολική οδός γλυκερόλης-1,3-προπανοδιόλης. Όπως έχει παρατηρηθεί από την Μετσοβίτη Μ. (2013) κατά την καλλιέργεια του στελέχους *K.oxytoca* FMCC-197 παρατηρήθηκε εμφανής διαφορά στο προφίλ των μεταβολιτών, ανάλογα με τις πειραματικές συνθήκες που εφαρμόστηκαν όσον αφορά την εμφύσηση ή μη του μέσου με άζωτο καθ'όλη τη διάρκεια της ζύμωσης.

Κατά τη διάρκεια ασυνεχών καλλιεργειών υπό συνεχή διοχέτευση αζώτου και σταθερό pH το κύριο μεταβολικό προϊόν ήταν η αιθανόλη, ενώ σχηματίστηκαν μικρότερες ποσότητες 1,3-προπανοδιόλης και 2,3-βουτανοδιόλης. Αντίθετα όταν πραγματοποιήθηκε εμφύσηση αζώτου στο μέσο καλλιέργειας μόνο για χρονικό διάστημα είκοσι λεπτών πριν τον εμβολιασμό (αυτοπαραγόμενη αναεροβίωση) η 1,3-προπανοδιόλη έγινε ο κύριος μεταβολίτης. Επίσης κατεστάλη η σύνθεση 2,3-βουτανοδιόλης. Οι Chatzifragiou et

al.,2011 στην μελέτη τους αναφέρουν πως η συνεχής διοχέτευση αζώτου σε καλλιέργεια στελέχους *Cl.Butyricum* VPI 1718 επηρέασε θετικά την βιοσύνθεση της 1,3-προπανοδιόλης. Αντίθετα η αυτοπαραγόμενη αναερόβια, φάνηκε να επιβάλλει μια μικρή παρεμπόδιση στην φωσφοροκλαστική αντίδραση με αποτέλεσμα να ενισχυθεί η παραγωγή γαλακτικού οξέος, ενώ η σύνθεση της διόλης μειώθηκε σημαντικά. Οι Ma et al. (2009) σε αντίστοιχη μελέτη για την παραγωγή 1,3 προπανοδιόλης από το στέλεχος *K.pneumoniae* XJPD-Li υπό διαφορετικές συνθήκες αναερόβιας/αερόβιας, αναφέρουν ότι οι μεγαλύτερες τιμές συγκέντρωσης και παραγωγικότητας της 1,3-προπανοδιόλης πραγματοποιήθηκαν στην καλλιέργεια με ροή αζώτου 0,4nm, ενώ στις συνθήκες αυτόπαραγόμενης αναερόβιας η συγκέντρωση του μεταβολίτη μειώθηκε κατά 2g/L περίπου. Στην ίδια μελέτη σε καλλιέργεια του στελέχους σε αερόβιας συνθήκες ενισχύθηκε η κυτταρική αύξηση, αλλά μειώθηκε σημαντικά η παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης.

Από την άλλη πλευρά, οι Chen et al. (2003) παρατήρησαν ότι στις αερόβιας καλλιέργειες του στελέχους *K.pneumoniae* DSM 2026 η σύνθεση της 1,3-προπανοδιόλης ήταν ελαφρώς βελτιωμένη συγκριτικά με την αναερόβια καλλιέργεια και συγχρόνως ευνοήθηκε η κυτταρική αύξηση και η παραγωγικότητα της 1,3-προπανοδιόλης. Η μελέτη αυτή είναι η πρώτη που αναθεωρεί την μέχρι τώρα άποψη ότι η προπανοδιολική ζύμωση είναι συνδεδεμένη με αυστηρά αναερόβιας συνθήκες καλλιέργειας. Κατά συνέπεια, η επίδραση των συνθηκών καλλιέργειας εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον εκάστοτε μικροοργανισμό.

Συνοψίζοντας, ο μικροοργανισμός *L.diolorans* DSM 14421 μπορεί να αναπτυχθεί σε συνθήκες αυτοπαραγόμενης αναερόβιας με χαμηλές στροφές, σε ρυθμιζόμενο pH στο 5,8 στους 30oC. Η καλλιέργεια αυτή είναι πιο οικονομική σε σχέση με τις συνθήκες συνεχούς εμφύσησης αζώτου και 400 στροφές όμως ο συντελεστής απόδοσης του προϊόντος και η παραγωγικότητα του κυμαίνονται σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Κατά συνέπεια θα πρέπει να διεξαχθεί περαιτέρω μελέτη ώστε να επιτευχθεί ο συνδυασμός ιδανικών συνθηκών καλλιέργειας με υψηλό συντελεστή απόδοσης και παραγωγικότητα σε συνδυασμό με εξασφάλιση του χαμηλού κόστους παραγωγής.

Βιβλιογραφία

- Αγγελής Γ. (2007). Μικροβιολογία και Μικροβιακή Τεχνολογία. 1^η έκδοση. Εκδόσεις Σταμούλης Α.Ε., Αθήνα.
- Bergey (2009). Systematic Bacteriology. Vol 3: The Firmicutes, 2nd Edition, Springer
- Παπανικολάου Σ.: Αρχές Βιοτεχνολογίας Τροφίμων. Πανεπιστημιακές παραδόσεις ΓΠΑ, Αθήνα
- Παπανικολάου Σ.: Βιομηχανικές Ζυμώσεις. Πανεπιστημιακές παραδόσεις ΓΠΑ, Αθήνα
- Παπανικολάου Σ.: Επεξεργασία Αποβλήτων Βιομηχανιών Τροφίμων. Πανεπιστημιακές παραδόσεις ΓΠΑ, Αθήνα
- Μετσοβίτη Μ. (2013) Διδακτορική διατριβή: Βιοτεχνολογική παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης, 2,3-βουτανοδιόλης και αιθανόλης κατά την αύξηση επιλεγμένων προκαρυωτικών στελεχών σε ανανεώσιμες πηγές άνθρακα
- Παρασκευαΐδη Κ. (2013) Μεταπτυχιακή διατριβή: Κινητικές και φυσιολογικές μελέτες παραγωγής της 2,3-βουτανοδιόλης κατά την αύξηση επιλεγμένων βακτηριακών στελεχών σε ανανεώσιμες πηγές άνθρακα
- Χατζηφράγκου Α. (2012) Διδακτορική διατριβή: Μελέτη της βιοτεχνολογικής παραγωγής της 1,3-προπανοδιόλης κατά την αύξηση του βακτηρίου *Clostridium butyricum* σε υπόστρωμα με βάση την βιομηχανική γλυκερόλη.
- Achten WMJ, Mathijs E, Verchot L, Singh VP, Aerts R, Muys B (2007) *Jatropha* biodiesel fueling sustainability? *Biofuels*, *Bioprod Biorefin* 1:283-291.
- Amaral PF, Ferreira TF, Fontes GC, Coelho MAZ (2009) Glycerol valorization: New biotechnological routes. *Food Bioprocess Tech* 87(3):179-186.
- 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.
- Agarwal GP. (1990) Glycerol. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 41:95-127
- 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.

- 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, 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
- 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.
- Berndes G, Hansson j, Egeskog A, Johnsson F. (2010) Advanced biofuels: Future perspectives from an expert elicitation survey. *Biomass and Bioenergy*, 34:227-236
- 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
- Boenigk R, Bowien S, Gottschalk G (1993) Fermentation of glycerol in continuous cultures of *Citrobacter freundii*. *Appl Microbiol Biotechnol* 38:453-457.
- Carr F J, Chill D. & Maida N. (2002) The Lactic acid Bacteria: A Literature Survey. *Critical Reviews in Microbiology* 28(4):281-370
- 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, Mystrioti 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.
- 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.

- Claisse O, Lonvaud-Funel A. (2000) assimilation of glycerol by a strain of *Lactobacillus collinoides* isolated from cider. *Food Microbiology* 17:513-519
- Claude S (1999) Recherche of new outlets for glycerol-recent developments in France. *Fett/Lipid* 101(3):101-104
- Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. (2001) Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology* 71:1-20
- Costa JAV, de Morais MG. (2011) The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. *Bioresource Technology*, 102:2-9
- da Silva GP, Mack M, Contiero J (2008) Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnol Adv* 27:30-39.
- Dorado MP, Ballesteros E, Lopez FJ, Mittelbach M (2004) Optimization of alkali-catalyzed transesterification of Brassica C. arinata oil for biodiesel production. *Energy Fuels* 18:77-83.
- Dobson G, Christie WW (2002) Mass spectrometry of fatty acid derivatives. *Eur J Lipid Sci Technol* 104:36-43.
- 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.
- 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.
- 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.
- Hao J, Liu DH (2005) Desalination of fermented broth containing 1,3-propanediol by electrodialysis. *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.

- Heyndrickx M, De Vos P, Vancanneyt M, De Ley J (1991) The fermentation of glycerol by *Clostridium butyricum* LMG 1212t2 and 1213t1 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Lam MK, Lee KT (2012) Microalga biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward. *Biotechnology Advances*, 30:673-690.
- Lüthi-Peng Q, Dileme FB, Puhán Z (2002) Effect of glucose on glycerol bioconversion by *Lactobacillus reuteri*. *Appl Microbiol Biotechnol* 59:289-296.
- 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.
- 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.
- Lüthi-Peng Q, Dileme FB, Puhán Z (2002) Effect of glucose on glycerol bioconversion by *Lactobacillus reuteri*. *Appl Microbiol Biotechnol* 59:289-296.

- 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.
- 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.
- 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.
- Pagliaro 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.
- 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.
- Pflügl S, Marx H, Mattanovich D, Sauer M (2012) 1,3-propanediol production from glycerol with *Lactobacillus diolivorans*, *Bioresource Technology* 119, 133-140
- Pflügl S, Marx H, Mattanovich D, Sauer M (2014) Heading for an economic industrial upgrading of crude glycerol from *Lactobacillus diolivorans*, *Bioresource Technology* 152, 499-504
- 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.
- Ratledge C, Cohen Z (2008) Microbial and algal lipids: Do they have a future for biodiesel or as commodity oils? *Lipid Technol* 20:155–160.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Tag CG (1990) Mikrobielle Herstellung von 1,3-Propandiol. Dissertation, University of Oldenburg, Germany
- 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.
- Veiga-da-Cunha M, Foster MA (1992) 1,3-Propanediol NAD⁺ oxidoreductases of *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus buchneri*. *Appl Environ Microbiol* 58:2005-2010.
- 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.

- Wang ZX, Zhuge J, Fang H, Prior BA (2001) Glycerol production by microbial fermentation: A review. *Biotechnol Adv* 19:201-223.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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