

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

**ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ
1,3-ΠΡΟΠΑΝΟΔΙΟΛΗΣ, 2,3-ΒΟΥΤΑΝΟΔΙΟΛΗΣ ΚΑΙ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ
ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΥΞΗΣΗ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ
ΠΡΟΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ
ΣΕ ΑΝΑΝΕΩΣΙΜΕΣ ΠΗΓΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΜΑΡΙΑ Δ. ΜΕΤΣΟΒΙΤΗ
Γεωπόνος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων(MSc)

ΑΘΗΝΑ
ΜΑΡΤΙΟΣ 2013

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Θέμα

Βιοτεχνολογική παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης, 2,3-βουτανοδιόλης και αιθανόλης κατά την αύξηση επιλεγμένων προκαρυωτικών στελεχών σε ανανεώσιμες πηγές άνθρακα

Φοιτήτρια

Μαρία Δ. Μετσοβίτη

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Σεραφείμ Παπανικολάου, Επίκουρος καθηγητής, ΓΠΑ (Επιβλέπων καθηγητής)
Ελευθέριος Δροσινός, Αναπληρωτής καθηγητής, ΓΠΑ (μέλος)
Απόστολος Κουτίνας, Λέκτορας ΓΠΑ (μέλος)

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Σεραφείμ Παπανικολάου, Επίκουρος καθηγητής Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών
Ελευθέριος Δροσινός, Αναπληρωτής καθηγητής Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών
Απόστολος Κουτίνας, Λέκτορας Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών
Γεώργιος Αγγελής, Καθηγητής Πανεπιστημίου Πατρών
Γεώργιος-Ιωάννης Νυχάς, Καθηγητής Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών
Δημήτριος Κέκος, Καθηγητής Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου
Δημήτριος Χατζηνικολάου, Επίκουρος καθηγητής Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

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

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Με την συγγραφή της, ολοκληρώνεται για εμένα ένας κύκλος δεκατριών χρόνων ως φοιτήτρια του Πανεπιστημίου. Θα ήθελα λοιπόν, να ευχαριστήσω όλους μαζί και καθένα ξεχωριστά όλους όσους με βοήθησαν, ώστε να γράφω αυτές τις γραμμές και να γίνει και αυτός ο στόχος μου πραγματικότητα.

❖ Ιδιαίτερα θερμά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον εισηγητή μου Επίκουρο καθηγητή κ. Σεραφείμ Παπανικολάου για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου καθ' όλη την συνεργασία μας, την ουσιαστική καθοδήγηση κατά την διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας και την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στο ευρωπαϊκό πρόγραμμα "Integrated bioconversion of glycerine into value-added products and biogas at pilot plant scale" (PROPANEGY).

❖ Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή καθηγητή κ. Ελευθέριο Δροσινό για την ευγενική παραχώρηση των στελεχών της συλλογής του εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και τον Λέκτορα κ. Αποστόλη Κουτίνα για τις σημαντικές παρατηρήσεις του, καθώς και για την συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή.

❖ Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις βαθύτερες ευχαριστίες μου στον Καθηγητή κ. Γεώργιο-Ιωάννη Νυχά για την άμεση και πάντοτε πρόθυμη ανταπόκρισή του στην παραχώρηση βακτηριακών στελεχών της συλλογής του εργαστηρίου και την συμμετοχή του στην εξεταστική επιτροπή.

❖ Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής κ. Γεώργιο Αγγελή, Καθηγητή του Πανεπιστημίου Πατρών, κ. Δημήτρη Κέκο, Καθηγητή του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου και τον κ. Δημήτριο Χατζηνικολάου, Επίκουρο καθηγητή του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών για την τιμή που μου έκαναν να συμμετέχουν στην κρίση του διδακτορικού μου.

❖ Νιώθω ιδιαίτερη την ανάγκη να αναφερθώ σε ένα πρόσωπο που δεν βρίσκεται πια κοντά μας την Καθηγήτρια μου Μαρία Γαλιώτου-Παναγιώτου, υπό την καθοδήγηση της οποίας ξεκίνησα την πρώτη μου μελέτη ως προπτυχιακή φοιτήτρια. Έκτοτε συνεργαστήκαμε σε κάθε μελέτη μου, ενώ αρχικά αποτέλεσε μέλος και αυτής της τριμελούς επιτροπής.

❖ Επιπλέον θα ήθελα να εκφράσω τις βαθύτερες και ειλικρινέστερες ευχαριστίες μου στο μέλος ΕΕΔΠ του εργαστηρίου την κ. Ουρανία Καλαντζή για τη βοήθειά της στο χώρο του εργαστηρίου και τις εύστοχες συμβουλές της εντός και εκτός εργαστηρίου.

❖ Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στο μέλος του εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων, τον κ. Σπύρο Παραμυθιώτη για τις πολύτιμες παρατηρήσεις του στο αρχικό στάδιο των πειραμάτων, τότε που όλα έμοιαζαν βουνό, αλλά και την βοήθεια του στην συγγραφή των δημοσιεύσεων.

❖ Θα ήθελα στο σημείο αυτό να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. An-Ping Zeng και τους συναδέλφους στο Institute of Bioprocess and Biosystems Engineering, of Hamburg University of Technology για την συνεργασία τους, κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων στο Αμβούργο.

❖ Πιο πολύ ευχαριστώ όλους τους φοιτητές και φοιτήτριες του εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων για την συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα που επικράτησε στον χώρο του εργαστηρίου. Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ στην κ. Αγάπη Δουλγεράκη για την βοήθεια της στο χειρισμό των βακτηριακών στελεχών και στους Κλεοπάτρα Παρασκευαΐδη, Νίκο Κάντζα και Νίκο Ανδρουτσόπουλο για την άριστη συνεργασία μας, κατά την εκπόνηση των προπτυχιακών τους μελετών. Πάνω από όλους ευχαριστώ τις καλές μου φίλες Κατερίνα Μπέλκα και Ελένη Ζήκου και τον φίλο μου Jimmy López για όλες τις όμορφες στιγμές που έχω να θυμάμαι μαζί τους, εντός και εκτός εργαστηρίου.

❖ Κρατάω πάντα για το τέλος τους δικούς μου ανθρώπους το σύζυγό μου Βλάσση, τους γονείς μου Λία και Δημήτρη και τον αδελφό μου Νίκο. Υπήρξαν φορές που πίστεψαν πιο πολύ από εμένα σε αυτή την προσπάθεια και με στήριξαν, ο καθένας με τον τρόπο του, σε όλη αυτή την πορεία. Τους ευχαριστώ για όλα και κυρίως για την υπομονή και την κατανόηση όλο αυτό το διάστημα.

Μαρία Μετσοβίτη
Αθήνα
Μάρτιος 2013

Στους γονείς μου,
στο σύζυγό μου
στο γιο μου ...που έρχεται

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Δημοσιεύσεις και ανακοινώσεις που προέκυψαν από την παρούσα διδακτορική διατριβή	i
Περίληψη	iii
Abstract	vi
<hr/>	
I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
<hr/>	
I. 1. Η ένωση "Γλυκερόλη"	1
<hr/>	
I.1.1. Γενικά χαρακτηριστικά γλυκερόλης	1
I.1.2. Κυριότερες βιομηχανικές εφαρμογές της γλυκερόλης	1
I.1.3. Η γλυκερόλη ως παραπροϊόν της παραγωγής βιολογικού πετρελαίου	2
I.1.4. Παραγωγή βιολογικού πετρελαίου πρώτης γενιάς	4
I.1.5. Συμβατική – χημική αξιοποίηση της γλυκερόλης	7
I.1.6. Βιοτεχνολογική αξιοποίηση της γλυκερόλης	7
I.1.6.1. Μεταβολισμός της γλυκερόλης από προκαρυωτικούς μικροοργανισμούς	8
I. 2. Η ένωση "1,3-Προπανοδιόλη"	16
<hr/>	
I.2.1. Γενικά χαρακτηριστικά 1,3-προπανοδιόλης	16
I.2.2. Κυριότερες βιομηχανικές εφαρμογές της 1,3-προπανοδιόλης	16
I.2.3. Χημική σύνθεση της 1,3-προπανοδιόλης	17
I.2.4. Παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης μέσω βιοτεχνολογικής οδού	18
I.2.5. Βελτιστοποίηση της διεργασίας ζύμωσης της 1,3-προπανοδιόλης	22
I.2.5.1. Στρατηγικές για την βελτίωση της προπανοδιολικής ζύμωσης	22
I.2.5.2. Ο ρόλος της μεταβολικής μηχανικής στην προπανοδιολική ζύμωση	24
I. 3. Η ένωση "2,3-Βουτανοδιόλη"	26
<hr/>	
I.3.1. Γενικά χαρακτηριστικά 2,3-βουτανοδιόλης	26
I.3.2. Κυριότερες βιομηχανικές εφαρμογές της 2,3-βουτανοδιόλης	26
I.3.3. Παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης μέσω βιοτεχνολογικής οδού	28
I.3.4. Υποστρώματα για την βιοτεχνολογική παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης	30
I.3.5. Παράγοντες που επηρεάζουν την βιοτεχνολογική παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης	31
I.4. Η ένωση "Αιθανόλη"	35
<hr/>	
I.4.1. Γενικά χαρακτηριστικά αιθανόλης	35
I.4.2. Κυριότερες εφαρμογές της αιθανόλης	36
I.4.2.1. Η βιοαιθανόλη ως καύσιμο	36
I.4.3. Βιοτεχνολογική παραγωγή της αιθανόλης	37
I.4.4. Η αλκοολική ζύμωση	38
I.4.5. Μικροοργανισμοί που βιοσυνθέτουν την αιθανόλη	41

I.5. Μικροοργανισμοί που μελετήθηκαν για την ικανότητά τους να μεταβολίζουν την γλυκερόλη	44
I.5.1. Γενικά χαρακτηριστικά του είδους <i>Clostridium butyricum</i>	44
I.5.2. Γενικά χαρακτηριστικά της οικογένειας Enterobacteriaceae	45
I.5.3. Γενικά χαρακτηριστικά των Γαλακτικών Βακτηρίων	46
I.5.4. Γενικά χαρακτηριστικά του γένους <i>Bacillus</i> sp.	47
I.6. Σκοπός της διδακτορικής διατριβής	48
II. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	50
II.1. Βιολογικό υλικό	50
II.2. Υποστρώματα- Συνθήκες καλλιέργειας	51
II.2.1. Ασυνεχείς καλλιέργειες σε φιάλες σε υποστρώματα καθαρής γλυκερόλης	51
II.2.2. Ασυνεχείς καλλιέργειες σε φιάλες σε υποστρώματα βιομηχανικής γλυκερόλης	52
II.2.3. Ασυνεχείς και ημι-συνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα σε υποστρώματα βιομηχανικής γλυκερόλης	54
II.3. Αναλύσεις	55
II.3.1. Προσδιορισμός pH	55
II.3.2. Προσδιορισμός βιομάζας	55
II.3.3. Προσδιορισμός Διαλυτού οξυγόνου	55
II.3.4. Προσδιορισμός γλυκόζης, γλυκερόλης, 1,3-προπανοδιόλης 2,3-βουτανοδιόλης, αιθανόλης και οργανικών οξέων	55
III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	59
III.1. Επιλογή βακτηριακών στελεχών ικανών να μεταβολίσουν την βιομηχανική γλυκερόλη προς παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης, 2,3-βουτανοδιόλης και αιθανόλης	59
III.1.1. Ασυνεχείς καλλιέργειες σε φιάλες σε υποστρώματα καθαρής γλυκερόλης	59
III.1.2. Ασυνεχείς καλλιέργειες σε φιάλες σε υποστρώματα βιομηχανικής γλυκερόλης	61
III.1.3. Ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα σε υποστρώματα βιομηχανικής γλυκερόλης, υπό αναερόβιες συνθήκες	70
III.2. Βιοτεχνολογική παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης, 2,3-βουτανοδιόλης και αιθανόλης κατά την καλλιέργεια του μικροοργανισμού <i>Klebsiella oxytoca</i> FMCC-197	78
III.2.1. Βιοτεχνολογική παραγωγή μεταβολικών προϊόντων κατά την αύξηση του μικροοργανισμού <i>Klebsiella oxytoca</i> FMCC-197 σε υποστρώματα βιομηχανικής γλυκερόλης διαφορετικής σύστασης	78
III.2.2. Επίδραση των συνθηκών αναεροβίωσης στην σύνθεση μεταβολικών προϊόντων κατά την αύξηση του στελέχους <i>Klebsiella oxytoca</i> FMCC-197 σε υπόστρωμα	80

βιομηχανικής γλυκερόλης	
III.2.3. Επίδραση των συνθηκών pH στην σύνθεση μεταβολικών προϊόντων κατά την αύξηση του στελέχους <i>Klebsiella oxytoca</i> FMCC -197 σε υπόστρωμα με βάση την βιομηχανική γλυκερόλη	82
III.2.3.1. Ασυνεχείς καλλιέργειες σε φιάλες υπό συνθήκες μη-σταθερού pH	82
III.2.3.2. Ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα υπό συνθήκες σταθερού pH	90
III.2.3.3. Ημι-συνεχής καλλιέργεια υπό συνθήκες σταθερού pH	96
III.2.4. Επίδραση μη-ασηπτικών συνθηκών καλλιέργειας στην σύνθεση μεταβολικών προϊόντων κατά την ασυνεχής καλλιέργεια του στελέχους <i>Klebsiella oxytoca</i> FMCC-197 σε υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης	99
III.3. Βιοτεχνολογική παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης και αιθανόλης κατά την καλλιέργεια του μικροοργανισμού <i>Citrobacter freundii</i> FMCC-207	101
III.3.1. Βιοτεχνολογική παραγωγή μεταβολικών προϊόντων κατά την αύξηση του μικροοργανισμού <i>Citrobacter freundii</i> FMCC-207 σε υποστρώματα βιομηχανικής γλυκερόλης διαφορετικής σύστασης	101
III.3.2. Επίδραση των συνθηκών pH στην σύνθεση μεταβολικών προϊόντων κατά την αύξηση του στελέχους <i>Citrobacter freundii</i> FMCC-207 σε υπόστρωμα με βάση την βιομηχανική γλυκερόλη και την εμπορική γλυκόζη	103
III.3.2.1. Ασυνεχείς καλλιέργειες σε φιάλες υπό συνθήκες μη-σταθερού pH	103
III.3.2.2. Ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα υπό συνθήκες σταθερού pH	112
III.3.2.3. Ημι-συνεχείς καλλιέργειες υπό συνθήκες σταθερού pH	118
III.3.4. Επίδραση μη-ασηπτικών συνθηκών καλλιέργειας στην σύνθεση μεταβολικών προϊόντων κατά την αύξηση του στελέχους <i>Citrobacter freundii</i> FMCC-207 σε υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης	122
III.4. Βιοτεχνολογική παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης και αιθανόλης κατά την καλλιέργεια του μικροοργανισμού <i>Enterobacter aerogenes</i> FMCC-10	125
III.4.1. Βιοτεχνολογική παραγωγή μεταβολικών προϊόντων κατά την αύξηση του μικροοργανισμού <i>Enterobacter aerogenes</i> FMCC-10 σε υποστρώματα βιομηχανικής γλυκερόλης διαφορετικής σύστασης	125
III.4.2. Επίδραση των συνθηκών καλλιέργειας στην σύνθεση μεταβολικών προϊόντων κατά την αύξηση του στελέχους <i>Enterobacter aerogenes</i> FMCC-10 σε υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης	127
III.4.3. Επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης υποστρώματος στην σύνθεση μεταβολικών προϊόντων, κατά την αύξηση του στελέχους <i>Enterobacter aerogenes</i> FMCC-10 σε υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης	134

III.4.4. Ημι-συνεχής καλλιέργεια υπό συνθήκες σταθερού pH για την παραγωγή αιθανόλης	136
III.4.5. Ημι-συνεχείς καλλιέργειες υπό συνθήκες μη-σταθερού pH για την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης	139
III.4.6. Επίδραση μη-ασηπτικών συνθηκών καλλιέργειας στην σύνθεση μεταβολικών προϊόντων κατά την αύξηση του στελέχους <i>Enterobacter aerogenes</i> FMCC-10 σε υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης	144
III.5. Βιοτεχνολογική παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης κατά την καλλιέργεια του μικροοργανισμού <i>Citrobacter freundii</i> FMCC-B 294 (VK-19)	148
III.5.1. Βιοτεχνολογική παραγωγή μεταβολικών προϊόντων κατά την αύξηση του μικροοργανισμού <i>Citrobacter freundii</i> FMCC-B 294 (VK-19) σε υποστρώματα βιομηχανικής γλυκερόλης διαφορετικής σύστασης	148
III.5.2. Επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης στην σύνθεση μεταβολικών προϊόντων κατά την αύξηση του μικροοργανισμού <i>Citrobacter freundii</i> FMCC-B 294 (VK-19) σε υποστρώματα βιομηχανικής γλυκερόλης	150
III.5.3. Ημι-συνεχής καλλιέργεια για την παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης	157
III.5.4. Επίδραση μη-ασηπτικών συνθηκών καλλιέργειας στην σύνθεση μεταβολικών προϊόντων κατά την αύξηση του στελέχους <i>Citrobacter freundii</i> FMCC-B 294 (VK-19) σε υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης	159
III.5.5.1. Ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα υπό μη-ασηπτικές συνθήκες	159
III.5.5.2. Ημι-συνεχής καλλιέργεια υπό μη-ασηπτικές συνθήκες	161
IV. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	165
IV.1. Παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης	170
IV.2. Παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης	181
IV.3. Παραγωγή αιθανόλης	187
V. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ-ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ	192
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	195

Δημοσιεύσεις που προέκυψαν από την παρούσα διδακτορική διατριβή

1. **Maria Metsoviti**, Spiros Paramithiotis, Eleftherios H. Drosinos, Maria Galiotou-Panayotou, George-John E. Nychas and Seraphim Papanikolaou (2012). Screening of bacterial strains capable of converting biodiesel-derived raw glycerol into 1,3-propanediol, 2,3-butanediol and ethanol. *Engineering in Life Sciences* 12: 57-68.
2. **Maria Metsoviti**, Kleopatra Paraskevaidi, Apostolis Koutinas, An-Ping Zeng, Seraphim Papanikolaou. Production of 1,3-propanediol, 2,3-butanediol and ethanol by a newly isolated *Klebsiella oxytoca* strain growing on biodiesel-derived glycerol based media. *Process Biochemistry* 47:1872-1882.
3. **Maria Metsoviti**, An-Ping Zeng, Apostolis A. Koutinas, Seraphim Papanikolaou (2013). Enhanced 1,3-propanediol production by a newly isolated *Citrobacter freundii* strain cultivated on biodiesel-derived waste glycerol through sterile and non-sterile bioprocesses. *Journal of Biotechnology* 163:408-418.

Ανακοινώσεις που προέκυψαν από την παρούσα διδακτορική διατριβή

1. **Maria Metsoviti**, Spiros Paramithiotis, Eleftherios H. Drosinos, An-Ping Zeng, Seraphim Papanikolaou (2009). Microbial screening for glycerol assimilation and 1,3-propanediol production. *International Conference for Biosystems Analysis and Engineering, BioSys 2009*, Hamburg Germany, Poster.
2. **Maria Metsoviti**, Nikolaos Kantzas, Michael Komaitis, Maria Galiotou-Panayotou, Seraphim Papanikolaou (2009). Production of 2,3-butanediol and ethanol by a newly isolated *Citrobacter freundii* strain cultivated on mixtures of raw glycerol and commercial glucose. *International Conference for Biosystems Analysis and Engineering, BioSys 2009*, Hamburg Germany, Poster.
3. **Maria Metsoviti**, Kleopatra Paraskevaidi, Maria Galiotou-Panayotou, Seraphim Papanikolaou (2010). Production of 1,3-propanediol and 2,3-butanediol by a newly isolated *Klebsiella oxytoca* strain cultivated on raw glycerol and commercial glucose. 1st *International conference on Advances in Biotechnology – Industrial Microbial Biotechnology (ABIMB 2010)*, Poster.
4. **Maria Metsoviti**, Seraphim Papanikolaou (2011). High production of 1,3-propanediol by a newly isolated *Citrobacter freundii* strain cultivated on biodiesel-derived raw glycerol. 4^o Πανελλήνιο Συνέδριο Greek Lipid Forum, Θεσσαλονίκη Ελλάδα, Poster.
5. **Maria Metsoviti**, S. Paramithiotis, E.H. Drosinos, M. Galiotou-Panayotou, G.-J.E. Nychas, S. Papanikolaou (2011). Study of the conversion of crude glycerol into 1,3-propanediol, 2,3-

butanediol and ethanol by selected bacterial strains. 4^ο Συνέδριο Επιστημονικής εταιρείας ΜικροβιόΚοσμος (MBK 2011), Ιωάννινα Ελλάδα, Poster.

6. **Maria Metsoviti**, N. Androutsopoulos, A. Koutinas, S. Papanikolaou (2012). Enhanced production of 2,3-Butanediol by an *Enterobacter aerogenes* strain cultivated on biodiesel-derived crude glycerol. 8th International Conference on Renewable Resources and Biorefineries. Toulouse France, Poster.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η ικανότητα 84 βακτηριακών στελεχών να μεταβολίσουν τη βιομηχανική γλυκερόλη, κύριο παραπροϊόν της διαδικασίας παραγωγής βιολογικού πετρελαίου (βιοντίζελ), προς παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης (PD), 2,3-βουτανοδιόλης (BD) και αιθανόλης (EtOH), υπό διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας. Τα εξεταζόμενα στελέχη ανήκουν, πλην ενός (*Clostridium butyricum* NRRL B-23495), σε συλλογές του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, είναι φυσικά στελέχη και μελετήθηκαν για πρώτη φορά ως προς τη δυνατότητα μεταβολισμού της γλυκερόλης. Στην πλειοψηφία τους έχουν απομονωθεί από τρόφιμα όπως προϊόντα κρέατος, προζύμι και καρπούς σταφυλής προσβεβλημένους από τον μύκητα *Botrytis* sp..

Η πειραματική διαδικασία χωρίστηκε σε δύο στάδια: Αρχικά διενεργήθηκαν ασυνεχείς καλλιέργειες σε φιάλες, με την καθαρή γλυκερόλη και την γλυκόζη ως συνυποστρώματα σε αναλογία 3:1, είτε υπό αναερόβιες είτε υπό αερόβιες συνθήκες ανάλογα με τις απαιτήσεις σε οξυγόνο του εκάστοτε μικροοργανισμού. Η επιλογή της καθαρής γλυκερόλης έγινε με στόχο την αποφυγή φαινομένων παρεμπόδισης εξαιτίας προσμίξεων που περιέχονται στην βιομηχανική γλυκερόλη, ενώ η προσθήκη γλυκόζης στο μέσο της καλλιέργειας κρίθηκε σκόπιμη, καθώς το υπόστρωμα αυτό δύναται να ενισχύσει τη μικροβιακή αύξηση και ως εκ τούτου, ενδεχομένως, να διευκολύνει τον μεταβολισμό της γλυκερόλης από τα υπό μελέτη στελέχη. Από τα 84 στελέχη, αν και όλα παρουσίασαν κυτταρική αύξηση, μόνο 16 αφομοίωσαν την γλυκερόλη. Σε δεύτερη προσέγγιση τα 16 αυτά στελέχη αναπτύχθηκαν σε ασυνεχείς καλλιέργειες σε φιάλες με πηγή άνθρακα την βιομηχανική γλυκερόλη. Αφού συνεκτιμήθηκε τόσο η κατανάλωση της γλυκερόλης όσο και η παραγωγή των τριών κύριων μεταβολιτών (1,3-προπανοδιόλη, 2,3-βουτανοδιόλη και αιθανόλη), επιλέχθηκαν για περαιτέρω μελέτη τα ακόλουθα τέσσερα στελέχη: *Citrobacter freundii* FMCC-B 294 (VK-19), *C. freundii* FMCC-207, *Klebsiella oxytoca* FMCC-197 και *Enterobacter aerogenes* FMCC-10. Σημειώνεται ότι παρά την ικανοποιητική παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης από το στέλεχος *Cl. butyricum* NRLL B-23495 στο αρχικό στάδιο της πειραματικής διαδικασίας (μέγιστη συγκέντρωση 1,3-προπανοδιόλης 32,2 g/L και συντελεστής απόδοσης παραγόμενης 1,3-προπανοδιόλης ανα καταναλωθείσα γλυκερόλη 0,58 g/g), δεν διενεργήθηκαν περαιτέρω μελέτες με τον εν λόγω μικροοργανισμό, δεδομένου ότι τα αποτελέσματα αυτών των καλλιεργειών αποτέλεσαν τη βάση σύγκρισης για την κατανάλωση γλυκερόλης και παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης με τα υπόλοιπα στελέχη.

Στο δεύτερο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας διερευνήθηκαν καλλιέργειες των τεσσάρων στελεχών, σε υποστρώματα με βάση την βιομηχανική γλυκερόλη. Μελετήθηκε η επίδραση διαφορετικών τύπων ακατέργαστης γλυκερόλης, η επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης

του υποστρώματος, καθώς και των συνθηκών καλλιέργειας (συνθήκες pH, αεροβίωση/αναερόβωση, τρόπος επίτευξης αναερόβωσης), στην αύξηση και την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων. Και τα τέσσερα στελέχη μεταβόλισαν σημαντικές ποσότητες γλυκερόλης, με μέγιστη συγκέντρωση καταναλωθέντος υποστρώματος ~217,0 g/L, στην ημι-συνεχή καλλιέργεια του στελέχους *E. aerogenes* FMCC-10, υπό αερόβιες συνθήκες. Η μέγιστη συγκέντρωση 1,3-προπανοδιόλης (PD_{max}) 68,1 g/L, σημειώθηκε σε αναερόβια ημι-συνεχή καλλιέργεια του στελέχους *C. freundii* FMCC-B 294 (VK-19), με τον αντίστοιχο συντελεστή απόδοσης παραγόμενης 1,3-προπανοδιόλης ανά καταταλωθείσα γλυκερόλη ($Y_{PD/Gly}$) να λαμβάνει τιμή $Y_{PD/Gly}=0,40$ g/g και η παραγωγικότητα 0,79 g/L/h. Παράλληλα σημαντική ποσότητα της διόλης (50,1 g/L) σχηματίστηκε κατά την ημι-συνεχή τροφοδοτούμενη καλλιέργεια του στελέχους *K. oxytoca* FMCC-197, υπό συνθήκες αυτό-παραγόμενης αναερόβωσης. Και οι δύο τιμές αποτελούν τις μέγιστες συγκεντρώσεις της διεθνούς βιβλιογραφίας για παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης από φυσικά στελέχη για τα συγκεκριμένα είδη και συγκαταλέγονται στις υψηλότερες τιμές παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης από βιομηχανική γλυκερόλη. Με βάση τα όσα είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε, είναι η πρώτη φορά που πραγματοποιείται αύξηση του είδους *K. oxytoca* σε ακατέργαστη γλυκερόλη.

Αναφορικά με την μέγιστη συγκέντρωση 2,3-βουτανοδιόλης (BD_{max}) σε υπόστρωμα ακατέργαστης γλυκερόλης, που ήταν 78,2 g/L, καταγράφηκε κατά την αύξηση του στελέχους *E. aerogenes* FMCC-10 σε ημι-συνεχή τροφοδοτούμενη καλλιέργεια υπό αερόβιες συνθήκες. Στην εν λόγω καλλιέργεια εφαρμόστηκε η τεχνική του διακυμαινόμενου pH, σύμφωνα με την οποία μετά από κάθε ανατροφοδότηση, το pH αυξάνονταν στην τιμή 7,0 και στη συνέχεια έμενε μη σταθερό, συνδυάζοντας έτσι δύο παραμέτρους που βρέθηκε ότι επηρεάζουν την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης. Αφενός μεν ήταν μη-ελεγχόμενο σε ελαφρώς όξινο εύρος pH, γεγονός απαραίτητο για την σύνθεση της διόλης, αφετέρου δε, δεν ξεπέρασε μια κατώτατη τιμή pH που είναι παρεμποδιστική για τον μεταβολισμό της γλυκερόλης. Σημειώνεται ότι είναι η πρώτη φορά που μελετήθηκε η παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης ως το κύριο προϊόν ζύμωσης από ακατέργαστη γλυκερόλη, καθώς το υπόστρωμα αυτό έχει συνδεθεί στενά με την προπανοδιολική ζύμωση, κατά την οποία η 2,3-βουτανοδιόλη αποτελεί παραπροϊόν της ζύμωσης και παράγεται σε αρκετά μικρότερες ποσότητες. Ως εκ τούτου, η τιμή αυτή αποτελεί την μέγιστη της διεθνούς βιβλιογραφίας που έχει αναφερθεί τόσο σε υπόστρωμα καθαρής όσο και βιομηχανικής γλυκερόλης. Συγχρόνως, αποτελεί ενδιαφέρον εύρημα η σύνθεση του μεταβολίτη από γλυκερόλη υπό αερόβιες συνθήκες, δεδομένου ότι ο μεταβολισμός της γλυκερόλης τελείται, κατά κύριο λόγο, υπό αναερόβιες συνθήκες.

Ιδιαίτερα υψηλή ήταν και η μέγιστη παραγόμενη ποσότητα αιθανόλης ($EtOH_{max}$) από βιομηχανική γλυκερόλη, που ήταν 33,4 g/L και σημειώθηκε στην καλλιέργεια του στελέχους *C.*

freundii FMCC-207, κατά την αύξηση του σε αναερόβια ημι-συνεχή τροφοδοτούμενη καλλιέργεια. Η συγκέντρωση αυτή αποτελεί, μέχρι στιγμής, την υψηλότερη τιμή της διεθνούς βιβλιογραφίας τόσο από φυσικά όσο και από ανασυνδυασμένα στελέχη, κατά την καλλιέργεια τους σε υποστρώματα με βάση την βιομηχανική γλυκερόλη. Εξίσου υψηλές ποσότητες σχηματίστηκαν και στις ημι-συνεχείς καλλιέργειες των στελεχών *K. oxytoca* FMCC-197 και *E. aerogenes* FMCC-10 (25,2 και 20,9 g/L, αντίστοιχα).

Τέλος, μια ακόμη παράμετρος που εξετάστηκε ήταν η εφαρμογή των μη-ασηπτικών συνθηκών καλλιέργειας στην αφομοίωση της γλυκερόλης και στην σύνθεση μεταβολικών προϊόντων, κατά την διενέργεια ασυνεχών και ημι-συνεχών τροφοδοτούμενων καλλιεργειών. Σε όλες τις περιπτώσεις, η απουσία στειρών συνθηκών αποδείχθηκε ότι δεν έχει σημαντική επίδραση στον μεταβολισμό της γλυκερόλης και από τα τέσσερα εξεταζόμενα στελέχη, ωστόσο σημειώθηκε μικρή μείωση στην τελική συγκέντρωση των παραγόμενων μεταβολικών προϊόντων, συγκριτικά με τις αντίστοιχες καλλιέργειες σε στείρες συνθήκες. Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν ότι η απουσία ασηπτικών συνθηκών καλλιέργειας μπορεί να αποτελέσει μια ενδιαφέρουσα παράμετρο για την αξιοποίηση της ακάθαρτης γλυκερόλης προς προϊόντα υψηλότερη αξίας σε βιομηχανικό επίπεδο, καθώς η εφαρμογή των μη-ασηπτικών συνθηκών ελαχιστοποιεί το κόστος ενέργειας για την αποστείρωση, αλλά και το συνολικό κόστος για τον εξοπλισμό. Μαζί με την αξιοποίηση της χαμηλού κόστους ακατέργαστης γλυκερόλης ως υπόστρωμα, αυτή η εφαρμογή θα βοηθήσει την μικροβιακή μετατροπή της ακατέργαστης γλυκερόλης προς 1,3-προπανοδιόλη, 2,3-βουτανοδιόλη και αιθανόλη ώστε να γίνει μια οικονομικά ανταγωνιστική βιολογική διεργασία.

Επιστημονικό πεδίο: Γεωργικές Επιστήμες/Γεωργική Βιοτεχνολογία

Λέξεις κλειδιά: βιομηχανική γλυκερόλη, βιοντίζελ, 1,3-προπανοδιόλη, 2,3-βουτανοδιόλη, αιθανόλη, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter aerogenes*.

Abstract

Title: Biotechnological production of 1,3-propanediol, 2,3-butanediol and ethanol by selected prokaryotic strains cultivated on renewable carbon sources.

The ability of bacterial strains to assimilate glycerol, the main by-product of biodiesel production facilities, in order to generate higher value compounds of significance for the food and chemical industry, namely 1,3-propanediol (PD), 2,3-butanediol (BD) and ethanol (EtOH), was assessed during the current thesis. Under this view, 84 bacterial strains were screened for their ability to metabolise crude glycerol, under different fermentation conditions. All but one of the tested strains (*Clostridium butyricum* NRRL B-23495), were obtained from various collections of the Department of Food Science and Technology of the Agricultural University of Athens and were tested for the first time for their ability to assimilate glycerol. All of these strains were natural ones and were mostly isolated from foodstuffs, such as meat products, fermented sourdoughs and infected grapes.

The experimental procedure was divided in two parts: First, a preliminary assessment of glycerol assimilation for all 84 strains was performed in batch-flask cultures using pure glycerol and glucose as co-substrates, at a 3:1 ratio. Pure glycerol was selected as substrate in order to avoid inhibition phenomena caused by the impurities, potentially found in crude glycerol feedstock. Glucose was added with the intention of facilitating microbial growth and consequently glycerol assimilation, by the tested strains. All 84 tested strains were able to grow in the mixture of glycerol and glucose, but only 16, amongst the screened strains, were capable of assimilating glycerol. These 16 strains were further cultivated in batch-flask cultures using crude glycerol as substrate.

On completion of the first part of the study, four strains, namely *Citrobacter freundii* FMCC-B 294 (VK-19), *C. freundii* FMCC-207, *Klebsiella oxytoca* FMCC-197 and *Enterobacter aerogenes* FMCC-10, were chosen for further testing. Selection was based on glycerol consumption and product formation of three main metabolites (1,3-propanediol, 2,3-butanediol and ethanol). *Cl. butyricum* NRLL B-23495, the strain obtained from the NRLL collection, was also found to have satisfactory production of 1,3-propanediol (maximum 1,3-propanediol concentration 32.2 g/l and yield of 1,3-propanediol produced per glycerol consumed 0.58 g/g). However, this strain was used primarily as a basis for comparison of glycerol consumption and 1,3-propanediol production and thus was not studied further.

During the second part of the experimental procedure, the production of 1,3-propanediol, 2,3-butanediol and ethanol was studied, during cultivations of the four selected strains on biodiesel-derived glycerol-based media. Feedstock origin, initial glycerol concentration and experimental conditions (pH conditions, anaerobic/aerobic culture conditions, strategy of imposed anaerobiosis,

etc) were found to have an important impact on the distribution of metabolic products. All four strains were able to assimilate elevated amounts of crude glycerol and a maximum consumption of ~217.0 g/L was observed during fed-batch fermentation of *E. aerogenes* FMCC-10 strain, under aerobic conditions.

The maximum 1,3-propanediol concentration (PD_{max}), 68.1 g/L, was achieved during anaerobic fed-batch fermentation of *C. freundii* FMCC-B 294 (VK-19), with yield of 1,3-propanediol produced per glycerol consumed $Y_{PD/Gly}=0.40$ g/g and volumetric productivity 0.79 g/L/h. Meanwhile, 50.1 g/ of 1,3-propanediol were produced through a fed-batch fermentation of *K. oxytoca* FMCC-197 strain, under self-generated anaerobiosis conditions. These are the highest PD concentrations achieved by natural *C. freundii* and *K. oxytoca* strains so far and, in general, amongst the highest ones using crude glycerol as substrate, reported in the international literature. To the best of our knowledge, this is the first study dealing with the growth of *K. oxytoca* strain on raw glycerol.

Concerning 2,3-butanediol, a maximum concentration (BD_{max}) of 78.2 g/L was obtained during an aerobic fed-batch fermentation of *E. aerogenes* FMCC-10. Aiming to maintain pH uncontrolled in slightly acetic conditions, but not below a critical value inhibitory for glycerol consumption, the technique of pH-fluctuations was employed. According to this technique, after every feed during the fed-batch fermentation, the pH was increased to value 7.0 and remained uncontrolled. This allowed a natural acidification, necessary for 2,3-butanediol synthesis, and at the same time in a pH area suitable for glycerol assimilation. To the best of our knowledge, it is the first time that 2,3-butanediol was synthesized as the principal metabolic product from crude glycerol; so far it has been a by-product of the propanediolic fermentation. Thus, the concentration achieved is the highest reported in literature so far. It is also remarkable that this concentration was obtained under aerobic conditions, while glycerol metabolism is mainly conducted under anaerobic conditions. Another interesting result achieved in the current thesis was the conversion of biodiesel-derived crude glycerol into ethanol in significant quantities ($EtOH_{max}=33.4$ g/L), during anaerobic fed-batch fermentations by *C. freundii* FMCC-207 strain. This value is, so far, the highest one reported in the international literature, by taking into consideration both natural and mutant strains growing on glycerol. Equally high amounts were formed during fed-batch cultures by *K. oxytoca* FMCC-197 and *E. aerogenes* FMCC-10 strains (25.2 and 20.9 g/L, respectively).

Finally, the feasibility of batch and fed-batch cultures under non-sterile conditions was also examined and the absence of sterile cultivation conditions proved to have no considerable effect upon the efficiency of the fermentation in all cases. Compared to the results achieved under sterile conditions, trivial differences were detected on final product concentrations. The achieved results from all studies indicated that absence of sterile cultivation conditions may prove to be an

interesting parameter for the industrial application of glycerol conversions by prokaryotic microbial strains. The implementation of non-sterile conditions minimizes the energy cost for sterilization, as well as the overall equipment cost. Together with the utilization of low-cost biodiesel-derived crude glycerol as substrate, this implementation could make the microbial conversion of crude glycerol to 1,3-propanediol, 2,3-butanediol and ethanol an economically competitive bioprocess.

Scientific field: Agricultural Sciences/Agricultural Biotechnology

Keywords: crude glycerol, biodiesel, 1,3-propanediol, 2,3-butanediol, ethanol, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter aerogenes*.

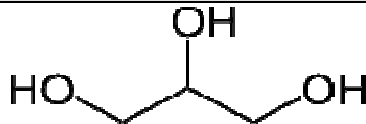
I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

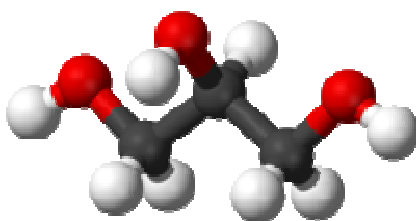
I.1. Η ένωση "Γλυκερόλη"

I.1.1. Γενικά χαρακτηριστικά γλυκερόλης

Η γλυκερόλη ή γλυκερίνη ή 1,2,3-προπανοτριόλη είναι μία τρισθενής αλκοόλη με χημικό τύπο $\text{CH}_2\text{OH}-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$. Ο όρος γλυκερίνη αναφέρεται κυρίως στα εμπορικά σκευάσματα της γλυκερόλης με νερό. Είναι ημίρρευστη σε κανονικές συνθήκες θερμοκρασίας, διαυγής, άχρωμη, σχεδόν άοσμη, με γλυκιά γεύση, από όπου και έλαβε την ονομασία της. Έχει ειδικό βάρος περίπου 1,26 g/mL, σημείο τήξης τους 17,8 °C και σημείο βρασμού τους 290 °C, ενώ σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των 17 °C, βρίσκεται σε κατάσταση ιξώδους μορφής (πυκνόρρευστη) (Πίνακας I-1). Είναι διαλυτή στο νερό και τις αλκοόλες, αναμιγνύεται με τους περισσότερους κοινούς οργανικούς διαλύτες όπως ο αιθέρας, πλην όμως είναι αδιάλυτη στους υδρογονάνθρακες (Agarwal, 1990; Gupta & Kumar, 2012).

Πίνακας I-1: Φυσικοχημικές ιδιότητες της γλυκερόλης

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	Ημίρρευστη
Τρισδιάστατη απεικόνιση μορίου γλυκερόλης		



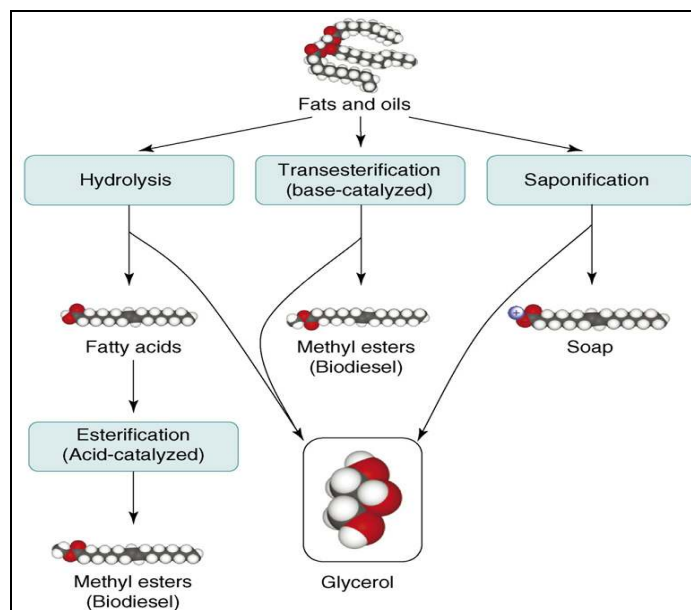
I.1.2. Κυριότερες βιομηχανικές εφαρμογές της γλυκερόλης

Χάρη στον συνδυασμό των φυσικοχημικών της ιδιοτήτων, κατέχει πληθώρα βιομηχανικών εφαρμογών, είτε άμεσα ως πρόσθετο είτε έμμεσα ως πρώτη ύλη. Η σημαντικότερη ιδιότητά της

είναι ότι απορροφά νερό από το περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται, είναι δηλαδή υγροσκοπική, με αποτέλεσμα να αποτελεί σημαντικό ενυδατικό παράγοντα στα προϊόντα που προστίθεται. Στη βιομηχανία καλλυντικών χρησιμοποιείται ως μαλακτικός ή ενυδατικός παράγοντας σε ευρύ φάσμα προϊόντων όπως οδοντόπαστες, σαπούνια, αφρούς ξυρίσματος και προϊόντα περιποίησης μαλλιών. Επιπλέον η προσθήκη της στις κόλλες βοηθά σε μεγάλο βαθμό ώστε να αποφεύγεται το γρήγορο στέγνωμα, ενώ βρίσκει εφαρμογή και στην βιομηχανία λιπαντικών. Η γλυκερόλη είναι μη τοξική και έτσι βρίσκει εφαρμογή στη βιομηχανία τροφίμων ως πρόσθετο με τον κωδικό E422. Σαν γλυκαντικό είναι 60% πιο γλυκιά συγκριτικά με την σουκρόζη, και δεν αυξάνει τα επίπεδα σακχάρου στο αίμα. Χάρη στην υδροσκοπικότητά της βοηθάει στην διατήρηση της υγρασίας στα ψημένα προϊόντα, ώστε να μην αφυδατώνονται κατά την αποθήκευσή τους, επιμηκύνοντας έτσι το χρόνο ζωής τους. Επιπλέον βρίσκει εφαρμογές στην βιομηχανία φαρμάκων, καπνού, καθώς επίσης στην παρασκευή βερνικιών, μελανιών, λιπαντικών, πλαστικών και εκρηκτικών υλών (νιτρογλυκερίνη). Αποτελεί ακόμη μία από τις σημαντικότερες πρώτες ύλες στην παραγωγή πολυολών και πολουρεθάνης, ενώ χρησιμοποιείται ως μαλακτικό μέσο στις ρητίνες, αλλά και ως πλαστικοποιητής για να προσδώσει ευελιξία, ευκαμψία και αντοχή στις βαφές (Claude, 1999; Pagliaro et al., 2007; Pagliaro & Rossi, 2010).

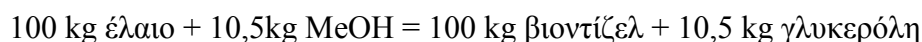
I.1.3. Η γλυκερόλη ως παραπροϊόν της παραγωγής βιολογικού πετρελαίου

Η παραγωγή της γλυκερόλης μπορεί να πραγματοποιηθεί κυρίως σύμφωνα με τρεις μεθόδους: α) μέσω μικροβιακών ζυμώσεων από πληθώρα μικροοργανισμών, όπως βακτήρια, ζύμες, μύκητες και άλγη (Vijaikishore & Karanth, 1986; Rehm, 1996; Wang et al., 2001; Taherzadeh et al., 2002), β) μέσω χημικής σύνθεσης από την βιομηχανία πετροχημικών και γ) μπορεί να ανακτηθεί ως παραπροϊόν της υδρόλυσης λιπών και ελαίων κατά την παραγωγή σαπώνων ή λιπαρών οξέων (Wang et al., 2001; Taherzadeh et al., 2002; Peters, 2007; Behr et al., 2008). Επιπλέον, τις τελευταίες δεκαετίες έχει παρατηρηθεί σε παγκόσμιο επίπεδο ραγδαία αύξηση των διαθέσιμων ποσοτήτων ακάθαρτης γλυκερόλης, διότι αποτελεί το κύριο παραπροϊόν της παραγωγής του βιολογικού πετρελαίου (βιοντίζελ), όπως δίνεται και στο Σχήμα I-1 (Johnson & Taconi, 2007; Yazdani & Gonzalez, 2007; da Silva et al., 2009; Wolfson et al., 2009; Gupta & Kumar, 2012; Leoneti et al., 2012).

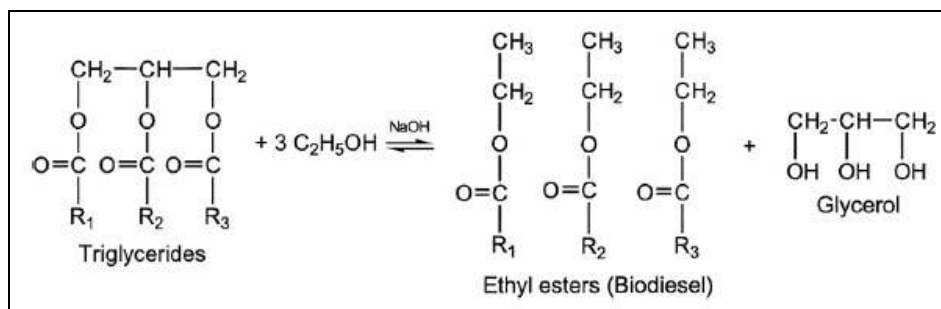


Σχήμα I-1: Σχηματισμός γλυκερόλης ως το κύριο παραπροϊόν της παραγωγής βιοντίζελ (Yazdani & Gonzalez, 2007).

Η σχετική μέθοδος παραγωγής βιοντίζελ, που εφαρμόζεται παγκοσμίως σε βιομηχανικό επίπεδο, περιλαμβάνει την μετεστεροποίηση των τριγλυκεριδίων των ελαίων με μεθανόλη ή, σε μικρότερο βαθμό, με αιθανόλη, που καταλύεται με NaOH ή KOH (Σχήμα I-2), σύμφωνα με την αντίδραση:



Οι παραγόμενοι μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων συνιστούν το βιοντίζελ.



Σχήμα I-2: Χημική αντίδραση μετεστεροποίησης της γλυκερόλης με αιθανόλη (da Silva et al., 2009).

Οι πρώτες ύλες από τις οποίες παράγεται το βιοντίζελ είναι ο ηλιάνθος και η ελαιοκράμβη, διάφορα σπορέλαια όπως βαμβακέλαιο, σογιέλαιο, φοινικέλαιο, αλλά και χρησιμοποιημένα έλαια (used-waste cooking oils) από εργοστάσια τροφίμων, εστιατόρια κτλ. Στην Ευρώπη για την διεργασία αυτή χρησιμοποιείται κυρίως κραμβέλαιο, ενώ στη Βραζιλία έλαια από σπέρματα σόγιας και ηλιάνθου, καθώς και φοινικέλαιο (da Silva et al., 2009).

Τα επιμέρους στάδια της διαδικασίας παραγωγής περιγράφονται στη συνέχεια. Αρχικά 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 μίγμα αφήνεται σε ηρεμία. Το μίγμα μεθανόλης – γλυκερόλης είναι βαρύτερο, με συνέπεια να καθιζάνει στον πυθμένα, από όπου και απομακρύνεται. Το υπόλοιπο μίγμα υφίσταται αρχικά απόσταξη για να απομακρυνθεί η μεθανόλη, η οποία, λόγω υψηλού κόστους, επαναχρησιμοποιείται στην αντίδραση, ενώ ακολουθεί φυγοκέντριση κατά την οποία συλλέγεται η ακάθαρτη γλυκερόλη. Το τελικό μίγμα αποτελείται από βιοντίζελ και νερό, οπότε και 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 (κατάλοιπα του εκάστοτε διαλύτη), 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 παρασκευής χαρακτηρίζονται ως βιοκαύσιμα πρώτης γενιάς ή τυπικά βιοκαύσιμα. Τα τελευταία χρόνια η έρευνα και η τεχνολογία των βιοκαυσίμων έχει δημιουργήσει τα πρωτοποριακά βιο-καύσιμα ή βιοκαύσιμα δεύτερης γενεάς, τα οποία παράγονται με πρωτοποριακές διεργασίες και από περισσότερους τύπους βιομάζας όπως λιγνοκυτταρινούχα υποστρώματα, ξυλώδη φυτά, γεωργικά υπολείμματα 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 γεωργο-βιομηχανικά απόβλητα όπως πολτός φρούτων (Berndes et al., 2010; Naik et al., 2010; Sims et al., 2010; Damartzis & Zabaniotou, 2011; Verdugo et al., 2012; Fiorese et al., 2013). Τέλος, στα βιοκαύσιμα τρίτης γενιάς η χρησιμοποιούμενη πρώτη ύλη για την παραγωγή τους είναι τα άλγη, δηλαδή μικροφύκη και μακροφύκη, τα οποία καλλιεργούνται σε νερό και επομένως δεν απαιτούν αρώσιμες εκτάσεις, ενώ ταυτόχρονα έχουν υψηλές αποδόσεις (Costa & de Morais, 2011; Lam & Lee, 2012).

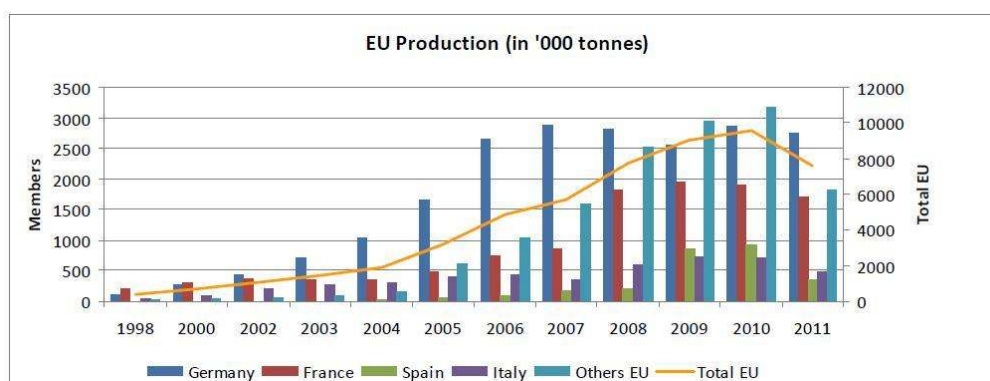
I.1.4. Παραγωγή βιολογικού πετρελαίου πρώτης γενιάς

Τις τελευταίες δεκαετίες η αυξημένη ζήτηση πετρελαίου από τις αναπτυσσόμενες χώρες, η σταδιακή μείωση των αποθεμάτων του και η συνεπακόλουθη αύξηση των τιμών του, οδήγησαν στην ανάγκη εξεύρεσης εναλλακτικών καυσίμων όπως το βιοντίζελ, η βιοαιθανόλη και το βιοαέριο. Το βιοντίζελ θεωρείται ανανεώσιμη πηγή ενέργειας λόγω της ανανεώσιμης προέλευσης των πρώτων υλών που συμμετέχουν στην παραγωγή του και η χρήση του παρουσιάζει σημαντικά περιβαλλοντικά και ενεργειακά οφέλη. Στον τομέα των μεταφορών το βιοντίζελ 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). Η Οδηγία 2003/30/EK της Ευρωπαϊκής Ένωσης, όριζε τη χρήση βιοκαυσίμων στον τομέα

των μεταφορών, σε ποσοστό 2% για το 2005, με σκοπό να φτάσει το 5,75% μέχρι το 2010. Πρόσφατα σύμφωνα με την Οδηγία 2009/28/EK της Ευρωπαϊκής Ένωσης, έως το 2020 τα κράτη μέλη υποχρεούνται να καλύπτουν τουλάχιστον το 10% της κατανάλωσης ενέργειας στον τομέα των μεταφορών με ανανεώσιμες πηγές ενέργειας. Ως εκ τούτου, η παραγωγή βιοντίζελ, τόσο σε ευρωπαϊκό (Σχήμα I-3), όσο και σε παγκόσμιο επίπεδο, αυξήθηκε σημαντικά για να καλύψει τις ανάγκες της αγοράς. Το 2003 η παραγωγή βιοντίζελ στην Ευρωπαϊκή Ένωση αποτελούσε το 82% της παγκόσμιας αγοράς (da Silva et al., 2009). Σήμερα στην Ευρώπη, σύμφωνα με τα επίσημα στοιχεία του Ευρωπαϊκού Συμβουλίου Βιοντίζελ (European Biodiesel Board, EBB), λειτουργούν περίπου 250 μονάδες παραγωγής βιοντίζελ και η συνολική ετήσια παραγωγή για το 2010 ανήλθε στα 9,57 εκατομμύρια μετρικούς τόνους. Κυριότερες χώρες παραγωγής σε ευρωπαϊκό επίπεδο, όπως φαίνεται και στο Σχήμα I-3, είναι η Γερμανία και η Γαλλία και ακολουθούν η Ισπανία και η Ιταλία, ενώ παγκοσμίως παράγεται στις ΗΠΑ, Αργεντινή, Βραζιλία, Μαλαισία και Ινδονησία (Amaral et al., 2009). Στη Βραζιλία η χρήση καυσίμου που περιέχει 2% βιοντίζελ (B2) είναι υποχρεωτική από τον Ιανουάριο του 2008 και θα αυξηθεί στο 5% (B5) το 2013 (da Silva et al., 2009; Leoneti et al., 2012).

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 Δεκέμβριο του 2005. Σύμφωνα με τον Νόμο 3423/05 ορίζονται οι διάφοροι τύποι βιοκαυσίμων και τίθεται ως στόχος για το 2010 η κατανάλωση 5,75% βιοκαυσίμων ως ποσοστό στα καύσιμα μεταφορών. Η παραγωγή βιοντίζελ στην Ελλάδα ξεκίνησε πριν από μερικά χρόνια και δραστηριοποιούνται στο χώρο αυτό 16 εταιρείες

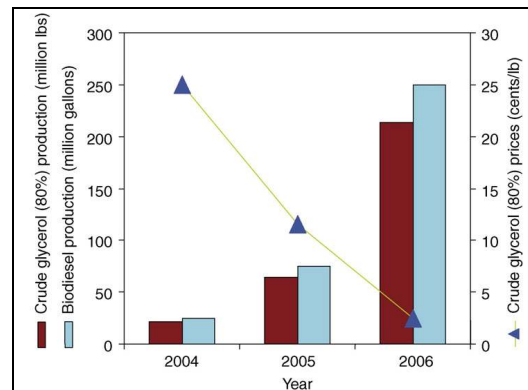
(<http://www.energypress.gr/news/biokaysima/Ston-aera-h-paragwgh-ellhnikoy-biontizel>).



Σχήμα I-3: Ετήσια παραγωγή βιοντίζελ στην Ευρώπη (European Biodiesel Board, 2011).

Άμεση συνέπεια της αυξημένης παραγωγής βιοντίζελ είναι η συσσώρευση αντίστοιχα μεγάλων ποσοτήτων ακάθαρτης γλυκερόλης, δεδομένου ότι παράγεται περίπου 1 kg ακάθαρτης γλυκερόλης ανά 10 kg παραγόμενου βιοντίζελ.

Οι ποσότητες αυτές υπερβαίνουν τη ζήτηση σε γλυκερόλη με αποτέλεσμα αφενός μεν την δραματική μείωση της τιμής της γλυκερόλης, αφετέρου δε την αδυναμία διάθεσης των παραγόμενων ποσοτήτων που συχνά οδηγεί στη δαπανηρή λύση της απόρριψής της. Στις Η.Π.Α η τιμή της ακάθαρτης γλυκερόλης υποδεκαπλασιάστηκε την διετία 2004-2006, όπως φαίνεται και στο Σχήμα I-4, με άμεση συνέπεια τη μείωση της επιχειρηματικής δραστηριότητας ή ακόμα και το κλείσιμο εργοστασίων χημικής παραγωγής γλυκερόλης (McCoy 2005; Yazdani & Gonzalez, 2007).



Σχήμα I-4: Παραγωγή και τιμή πώλησης ακάθαρτης γλυκερόλης στις ΗΠΑ κατά την διετία 2004-2006 (Yazdani & Gonzalez, 2007).

Επιπλέον σοβαρά προβλήματα αντιμετωπίζουν πλέον και ορισμένες εταιρείες παραγωγής βιοντίζελ. Ενώ κατά το παρελθόν η ακάθαρτη γλυκερόλη αποτελούσε ένα επιθυμητό παραπροϊόν που μπορούσε να συμβάλει στην οικονομική βιωσιμότητα των εργοστασίων, τα τελευταία χρόνια θεωρείται απόβλητο με μηδενική ή/και αρνητική αξία. Το 2007, η αξία της ακάθαρτης γλυκερόλης ήταν 0 \$/kg, δηλαδή ένα απόβλητο, χρησιμοποιούμενο μόνο για την παραγωγή βιοαερίου (Papanikolaou & Aggelis, 2009). Εξαιτίας των προσμίξεων που περιέχει η ακάθαρτη γλυκερόλη έχει περιορισμένες χρήσεις, σε αντίθεση με το ευρύ φάσμα εφαρμογών της καθαρής γλυκερόλης. Ως εκ τούτου αρκετά συχνά οι μονάδες παραγωγής επιβαρύνονται είτε με το κόστος καθαρισμού, ή με το κόστος μεταφοράς και απόρριψης, με αποτέλεσμα η συνολική αξία της επεξεργασίας να φτάνει ή/και να ξεπερνά την αξία της γλυκερόλης (Dasari, 2007; Johnson & Taconi, 2007; Yazdani & Gonzalez, 2007). Η σημαντική μείωση της τιμής της γλυκερόλης έχει άμεσο αντίκτυπο και στο κόστος παραγωγής του βιοντίζελ, καθώς εκτιμάται ότι το 75-95% του τελικού κόστους του βιοντίζελ προκύπτει από το οικονομικό αποτέλεσμα της διάθεσης ή επεξεργασίας των παραπροϊόντων (Yuste & Dorado, 2006; Vlysidis et al., 2011a).

Για να ενισχυθεί ουσιαστικά η παραγωγή βιοντίζελ, κυρίως από μικρές και μεσαίες μονάδες παραγωγής, είναι επιτακτική πλέον η ανάγκη εξεύρεσης προηγμένων και καινοτόμων διεργασιών μετατροπής της ακάθαρτης γλυκερόλης σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας. Οι τεχνολογίες αυτές θα μπορούσαν εύκολα να ενσωματωθούν στις υπάρχουσες εγκαταστάσεις βιοντίζελ,

βοηθώντας έτσι τόσο στην αύξηση των εσόδων όσο και στην επέκταση της αγοράς των προϊόντων τους. Ο συνδυασμός των μέχρι τώρα συμβατικών χημικών τεχνικών, αλλά και νέων βιοτεχνολογικών διεργασιών σε βιομηχανικό επίπεδο, ενδέχεται να ενισχύσει την βιωσιμότητα και την κερδοφορία των μονάδων. Ήδη τα τελευταία χρόνια υπάρχει μεγάλος αριθμός δημοσιεύσεων και άρθρων ανασκόπησης σχετικά με τις μεθόδους αξιοποίησης της γλυκερόλης (Johnson & Taconi, 2007; Amaral et al., 2009; Papanikolaou, 2009).

I.1.5. Συμβατική – χημική αξιοποίηση της γλυκερόλης

Οι παραδοσιακές χημικές διεργασίες αξιοποίησης της γλυκερόλης μπορούν σε 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 κυριότερες ενώσεις που παράγονται με τις μεθόδους αυτές είναι 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). Οι ενώσεις αυτές έχουν υψηλή τιμή πώλησης, συγκριτικά με το κόστος της ακάθαρτης γλυκερόλης και ικανοποιητική δυνατότητα απορρόφησης από την αγορά, με αποτέλεσμα η παραγωγή τους να είναι οικονομικά συμφέρουσα. Ωστόσο θα πρέπει να σημειωθεί ότι στο σύνολό τους οι χημικές διεργασίες τελούνται σε υψηλές συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης, ενώ απαιτείται η κατανάλωση μεγάλων ποσοτήτων ενέργειας, καθώς και η χρήση κατάλληλων καταλυτών για την πραγματοποίησή τους. Σε αρκετές περιπτώσεις τα ενδιάμεσα ή/και τα παραπροϊόντα των αντιδράσεων αυτών είναι είτε επιβλαβή για τη δημοσία υγεία ή αποτελούν σημαντικό ρυπογόνο παράγοντα για το περιβάλλον. Από την άλλη πλευρά οι βιοτεχνολογικές διεργασίες, αν και έχουν συγκριτικά χαμηλότερες αποδόσεις και τελικές συγκεντρώσεις, πραγματοποιούνται σε ηπιότερες συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης, ενώ τα προϊόντα αλλά και τα αντιδρώντα είναι ως επί το πλείστον βιοδιασπώμενα. Πρόκειται επομένως για αντιδράσεις πολύ πιο φιλικές προς το περιβάλλον, αλλά και με χαμηλότερο ενεργειακό κόστος (Willke 2004; Koutinas et al., 2007; Dobson et al., 2011; Leoneti et al., 2012). Οι λόγοι αυτοί οδήγησαν τα τελευταία χρόνια τη χημική βιομηχανία στην εξεύρεση νέων βιοτεχνολογικών μεθόδων για την αξιοποίηση των μεγάλων διαθέσιμων ποσοτήτων ακάθαρτης γλυκερόλης.

I.1.6. Βιοτεχνολογική αξιοποίηση της γλυκερόλης

Μία από τις πλέον ελπιδοφόρες εφαρμογές της γλυκερόλης είναι η μετατροπή της σε προϊόντα (υψηλής) προστιθέμενης αξίας, μέσω των μικροβιακών ζυμώσεων (Willke & Vorlop, 2008; Amaral et al., 2009; da Silva et al., 2009; Fountoulakis & Manios, 2009; Fan et al., 2010; Abad & Turon, 2012; Mangayil et al., 2012).

Αρκετοί προκαρυωτικοί μικροοργανισμοί, όπως δίνεται και στον Πίνακα I-2, έχουν έως σήμερα μελετηθεί για την ικανότητα τους να μεταβολίζουν τη γλυκερόλη, δίνοντας πληθώρα μεταβολικών προϊόντων. Ο πιο προφανής τρόπος αξιοποίησης της γλυκερόλης αναφέρεται στην μικροβιακή παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης.

Πίνακας I-2: Παρουσίαση ποσοτικών στοιχείων που αφορούν τον μεταβολισμό της γλυκερόλης από προκαρυωτικούς μικροοργανισμούς.

Μικροοργανισμός	Προϊόν	Συγκέντρωση	Αναφορά
		(g/L)	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> LDH56	1,3-Προπανοδιόλη	102,1	Xu et al. (2009)
<i>K. pneumoniae</i> DSM 4799		80,2	Jun et al. (2010)
<i>K. pneumoniae</i> DSM 2026		61,9	Mu et al. (2006)
<i>K. oxytoca</i> LDH3		83,5	Yang et al. (2007)
<i>K. oxytoca</i> ZG36		27,2	Zhang et al. (2012)
<i>K. oxytoca</i> Lin		18,2	Homan et al. (1990)
<i>Clostridium butyricum</i> AKR 102a		93,7	Wilkens et al. (2012)
<i>Cl. butyricum</i> VPI 1718		67,9	Chatzifragkou et al. (2011a)
<i>Cl. butyricum</i> F2b		43,5	Papanikolaou et al. (2000)
<i>Citrobacter freundii</i> Zu		28,1	Homan et al. (1990)
<i>Enterobacter agglomerans</i>		22,0	Barbirato et al. (1997)
<i>K. pneumoniae</i> G31	2,3-Βουτανοδιόλη	70,0	Petrov et al. (2010)
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	Αιθανόλη	27,0	Choi et al. (2011)
<i>K. pneumoniae</i> GEM 167/pBR-pdc-adh		25,0	Choi et al. (2011)
<i>K. oxytoca</i> LDH3		15,9	Oh et al. (2011)
<i>E. coli</i> AC-521	Γαλακτικό οξύ	63,5	Hong et al. (2009); Dobson et al. (2012)
<i>Anaerobiospirillum succiniciproducens</i>	Ηλεκτρικό οξύ	29,6	Lee et al. (2001); da Silva et al. (2009)
<i>Actinobacillus succinogenes</i>		29,3	Vlysidis et al. (2011b)
<i>Propionibacterium acidipropionic</i>	Προπιονικό οξύ	42,0	Barbirato et al. (1997); da Silva et al. (2009)
<i>Serratia marcescens</i>	Προδιογονσίνη	538,0 mg/L	Tao et al. (2005); da Silva et al. (2009)

I.1.6.1. Μεταβολισμός της γλυκερόλης από προκαρυωτικούς μικροοργανισμούς

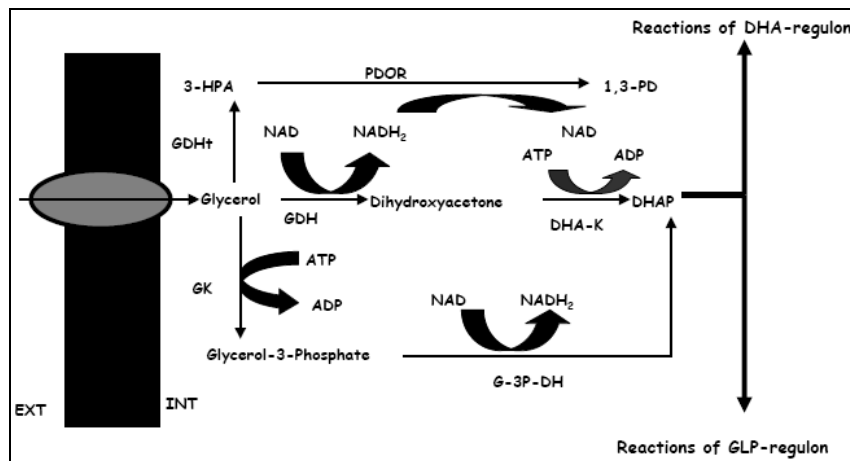
Η γλυκερόλη, όπως και άλλες μη ιονισμένες ενώσεις, εισέρχεται στο κύτταρο των προκαρυωτικών μικροοργανισμών μέσω των μηχανισμών της παθητικής διάχυσης ή της διευκολυνόμενης μεταφοράς. Ο τελευταίος μηχανισμός συχνά τελείται υπό την παρουσία μιας

διαμεμβρανικής πρωτεΐνης, της GlpF (Heller et al., 1980; Voegelé et al., 1993; Darbon et al., 1999; Wang et al., 2001; da Silva et al., 2009).

Μετά την είσοδο στο βακτηριακό κύτταρο, η γλυκερόλη μεταβολίζεται μέσω διαφορετικών οδών, ανάλογα με την παρουσία ή την απουσία οξυγόνου στο μέσο της καλλιέργειας. Τα στελέχη της οικογένειας Enterobacteriaceae, ως προαιρετικά αναερόβια, μπορούν να αποικοδομήσουν τη γλυκερόλη, υπό αναερόβιες ή/και μικρο-αερόφιλες συνθήκες. Αντίθετα, τα στελέχη της οικογένειας Clostridiaceae, ως υποχρεωτικά αναερόβια μεταβολίζουν την γλυκερόλη υπό αυστηρά αναερόβιες συνθήκες.

Όταν η ζύμωση τελείται υπό μικρο-αερόφιλες ή αερόβιες συνθήκες [ενδεικτικά στην περίπτωση των στελεχών *Pseudomonas aeruginosa* (McCowen et al., 1981), *Bacillus subtilis* (Beijer & Rutberg, 1992), *Bacillus stearothermophilus* (Burke & Tempest, 1990) καθώς και των εντεροβακτηρίων (Papanikolaou, 2009)], τότε η γλυκερόλη μέσω του ενζύμου κινάση της γλυκερόλης (glycerol kinase, GK) φωσφορυλιώνεται σε 3-φωσφο-γλυκερόλη (glycerol-3-phosphate, G3P). Η τελευταία οξειδώνεται σε σύμπλοκο φωσφόρου με δι-υδροξυακετόνη (dihydroxyacetone phosphate, DHA-P), σε μία αντίδραση που καταλύεται από μια αφυδρογονάση που δρα υπό αερόβιες συνθήκες. Το μεταβολικό αυτό μονοπάτι γλυκερόλη → 3-φωσφο-γλυκερόλη είναι δυνατόν να παρατηρηθεί και σε αναερόβιες καλλιέργειες των εντεροβακτηρίων, υπό την προϋπόθεση της ύπαρξης εξωτερικού δέκτη ηλεκτρονίων, όπως νιτρικά ιόντα. Στη συνέχεια, ομοίως με την περίπτωση παρουσίας οξυγόνου, η 3-φωσφο-γλυκερόλη μετατρέπεται σε δι-υδροξυακετόνη, με την διαφορά ότι η αντίδραση καταλύεται από μια αφυδρογονάση που δρα υπό αναερόβιες συνθήκες. Και στις δύο συνθήκες αεροβίωσης τα γονίδια που κωδικοποιούν την σύνθεση των ενζύμων αυτών, αποτελούν το σύμπλεγμα-*glp* (*glp*-regulon) (Σχήμα I-5) (Papanikolaou, 2009).

Από την άλλη πλευρά, όταν η καλλιέργεια τελείται υπό αναερόβιες συνθήκες, υπό την απουσία διαθέσιμου εξωτερικού δέκτη ηλεκτρονίων, τότε ο καταβολισμός της γλυκερόλης, γίνεται μέσω ενός διαφορετικού μηχανισμού από του συμπλέγματος-*glp*, και οδηγεί τελικά στη βιοσύνθεση της 1,3-προπανοδιόλης. Πιο συγκεκριμένα, ο μεταβολισμός της γλυκερόλης γίνεται μέσω δύο μεταβολικών μονοπατιών, ενός αναγωγικού και ενός οξειδωτικού. Τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την κωδικοποίηση των τεσσάρων κύριων ενζύμων στις αναερόβιες συνθήκες, αποτελούν το σύμπλεγμα-*dha* (*dha*-regulon) (Σχήμα I-5) (Daniel et al., 1995; Malaoui & Marczak, 2000; Sun et al., 2003; Zheng et al., 2006; Zhang et al., 2009; Celinska et al., 2010).

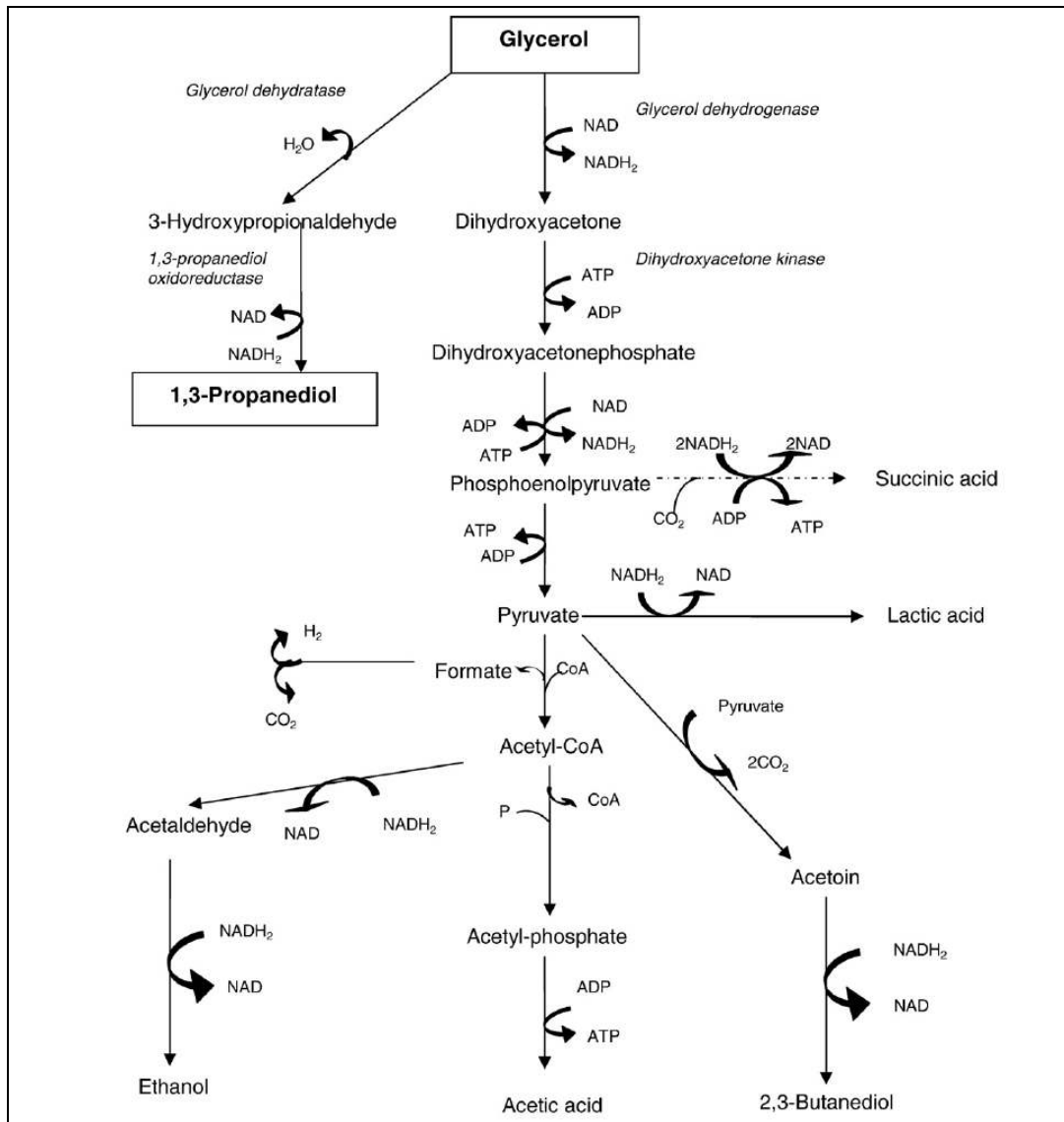


Σχήμα I-5: Αντιδράσεις των συμπλεγμάτων *glp* και *dha*. Σύμπλεγμα *dha*: ένζυμα: NAD^+ -εξαρτημένη αφυδρογονάση της γλυκερόλης (GDH), B_{12} -εξαρτημένη αφυδατάση της γλυκερόλης (GDHt), NAD^+ -εξαρτημένη οξειδοοδουκτάση της 1,3-προπανοδιόλης (PDOR) και κινάση της δι-υδροξυ-ακετόνης (DHA-K). Σύμπλεγμα *glp*: ένζυμα: κινάση της γλυκερόλης (GK) και αφυδρογονάση της 3-φωσφο-γλυκερόλης (G-3P-DH) (Papanikolaou, 2009).

Στο πρώτο στάδιο της αναγωγικής οδού, η αφυδατάση της γλυκερόλης (glycerol dehydratase), κωδικοποιούμενη από το γονίδιο *dhaB*, καταλύει την μετατροπή της γλυκερόλης σε 3-υδροξυ-προπιοναλδεΰδη (3- hydroxypropionaldehyde, 3-HPA), η οποία αποτελεί πρακτικά και των δέκτη ηλεκτρονίων (Papanikolaou, 2009). Η παρουσία του συνενζύμου B-12 είναι για τους περισσότερους μικροοργανισμούς απαραίτητη για την δράση του ενζύμου (Celinska et al., 2010). Στη συνέχεια η 3-υδροξυ-προπιοναλδεΰδη ανάγεται σε 1,3-προπανοδιόλη υπό την επίδραση της οξειδοαναγωγής της 1,3-προπανοδιόλης (1,3 PD-DH) κωδικοποιούμενη από το γονίδιο *dhaT*. Ο σχηματισμός της 1,3-προπανοδιόλης, γίνεται με σκοπό την αναγέννηση παραγόντων NAD^+ εντός του μικροβιακού κυττάρου, καθώς αυτή η μεταβολική οδός διατηρεί την οξειδοαναγωγική ισορροπία του κυττάρου και είναι απολύτως απαραίτητη για τους μικροοργανισμούς που χρησιμοποιούν την γλυκερόλη ως αποκλειστική πηγή άνθρακα και ενέργειας υπό αναερόβιες συνθήκες (Papanikolaou, 2009). Το τελικό προϊόν είναι το χαρακτηριστικό προϊόν της ζύμωσης της γλυκερόλης και δεν μπορεί να παραχθεί μέσω άλλης αναερόβιας βιο-μετατροπής, καθώς μέχρι σήμερα δεν έχει βρεθεί κανένας μικροοργανισμός που να μπορεί να μεταβολίσει τα σάκχαρα απευθείας σε 1,3-προπανοδιόλη (Homann et al., 1990; Deckwer, 1995; Cameron et al., 1998; Saxena et al., 2009). Στο δεύτερο μονοπάτι το οξειδωτικό, η αφυδρογονάση της γλυκερόλης (DHA-D) κωδικοποιούμενη από το γονίδιο *dhaD*, καταλύει τη μετατροπή της γλυκερόλης σε διυδροξυακετόνη. Η τελευταία αφού φωσφορυλιωθεί με τη βοήθεια της κινάσης της δι-υδροξυ-ακετόνης (DHA-K) που κωδικοποιείται από το γονίδιο *dhaK*, μετατρέπεται σε σύμπλοκο φωσφόρου με διυδροξυακετόνη (DHA-P) και εισέρχεται στον κύκλο της γλυκόλυσης, με αποτέλεσμα την σύνθεση ίδιων μεταβολικών προϊόντων με αυτών της ζύμωσης των σακχάρων.

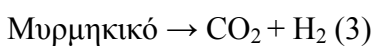
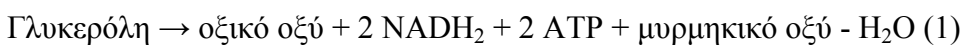
Έτσι το σύμπλοκο DHA-P ισομερίζεται σε 3-φωσφο-γλυκερυναλδεΐδη και στη συνέχεια σε πυροσταφυλικό οξύ.

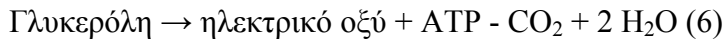
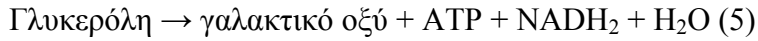
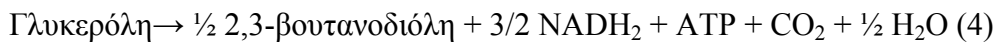
Ο καταβολισμός της γλυκερόλης μέχρι το σημείο σχηματισμού του πυροσταφυλικού οξέος, ανεξάρτητα από την τέλεση των αντιδράσεων που συνδέονται με τα συμπλέγματα *glp* και *dha*, είναι όμοιος για τους προκαρυωτικούς μικροοργανισμούς. Η τύχη του πυροσταφυλικού οξέος είναι διαφορετική για κάθε μικροοργανισμό και η σύνθεση των τελικών μεταβολικών προϊόντων εξαρτάται από το εκάστοτε στέλεχος, καθώς και από τις συνθήκες καλλιέργειας. Αναλυτικότερα στην περίπτωση των στελεχών της οικογένειας *Enterobacteriaceae* (Σχήμα I-6) μετατρέπεται σε ακέτυλο-συνένζυμο A (acetyl-CoA) και μυρμηκικό οξύ (formate), μέσω μιας αντίδρασης που καταλύεται από την λυάση πυροσταφυλικού-μυρμηκικού (pyruvate formate - lyase). Το μυρμηκικό οξύ με τη σειρά του συνήθως διασπάται σε διοξείδιο του άνθρακα και μόρια υδρογόνου. Από το ακέτυλο-συνένζυμο A προκύπτει οξικό οξύ (acetic acid), παρέχοντας επιπλέον μόριο ATP, καθώς και αιθανόλη (ethanol) με ενδιάμεσο προϊόν την ακεταλδεΐδη. Το πυροσταφυλικό οξύ μπορεί επίσης, αφού συμπυκνωθεί σε α -ακετυλογαλακτικό (α -acetolactate), να δώσει ακετοΐνη και στη συνέχεια 2,3-βουτανοδιόλη (2,3-butanediol). Το στάδιο αυτό δεν απαντάται στα στελέχη της οικογένειας *Clostridiaceae*. Τέλος το γαλακτικό οξύ (lactic acid) και το ηλεκτρικό οξύ (succinic acid), το οποίο προέρχεται από το φωσφοενολοπυροσταφυλικό (phospho-enol-pyruvate), συγκαταλέγονται μεταξύ των τελικών προϊόντων της ζύμωσης των Εντεροβακτηρίων. Είναι επομένως φανερό ότι κατά την προπανοδιολική ζύμωση τελούμενη από τα εντεροβακτηρία, η σύνθεση της 1,3-προπανοδιόλης συνοδεύεται από τον σχηματισμό πληθώρας μεταβολικών προϊόντων.



Σχήμα I-6: Μεταβολισμός της γλυκερόλης από στελέχη της οικογένειας Enterobacteriaceae. Στο σχήμα εμφανίζονται επίσης τα κυριότερα ένζυμα του μεταβολισμού (Saxena et.al, 2009).

Οι Zeng et al. (1993) μελετώντας το μεταβολικό μονοπάτι της γλυκερόλης από τον μικροοργανισμό *Klebsiella pneumoniae* DSM 2026, αναφέρουν ότι ο ρόλος της σύνθεσης 1,3-προπανοδιόλης θεωρείται η αναγέννηση αναγωγικών ισοδυνάμων NADH₂. Ανάλογα με τις συνθήκες καλλιέργειας, ο σχηματισμός της 1,3-προπανοδιόλης συνοδεύεται από την παραγωγή κι άλλων μεταβολικών προϊόντων, όπως 2,3-βουτανοδιόλη, αιθανόλη, οξικό, γαλακτικό και ηλεκτρικό οξύ. Σύμφωνα με την ίδια μελέτη, οι αντιδράσεις που οδηγούν στο σχηματισμό των διαφόρων μεταβολικών προϊόντων κατά την ζύμωση της γλυκερόλης από το εν λόγω στέλεχος, έχουν ως εξής:

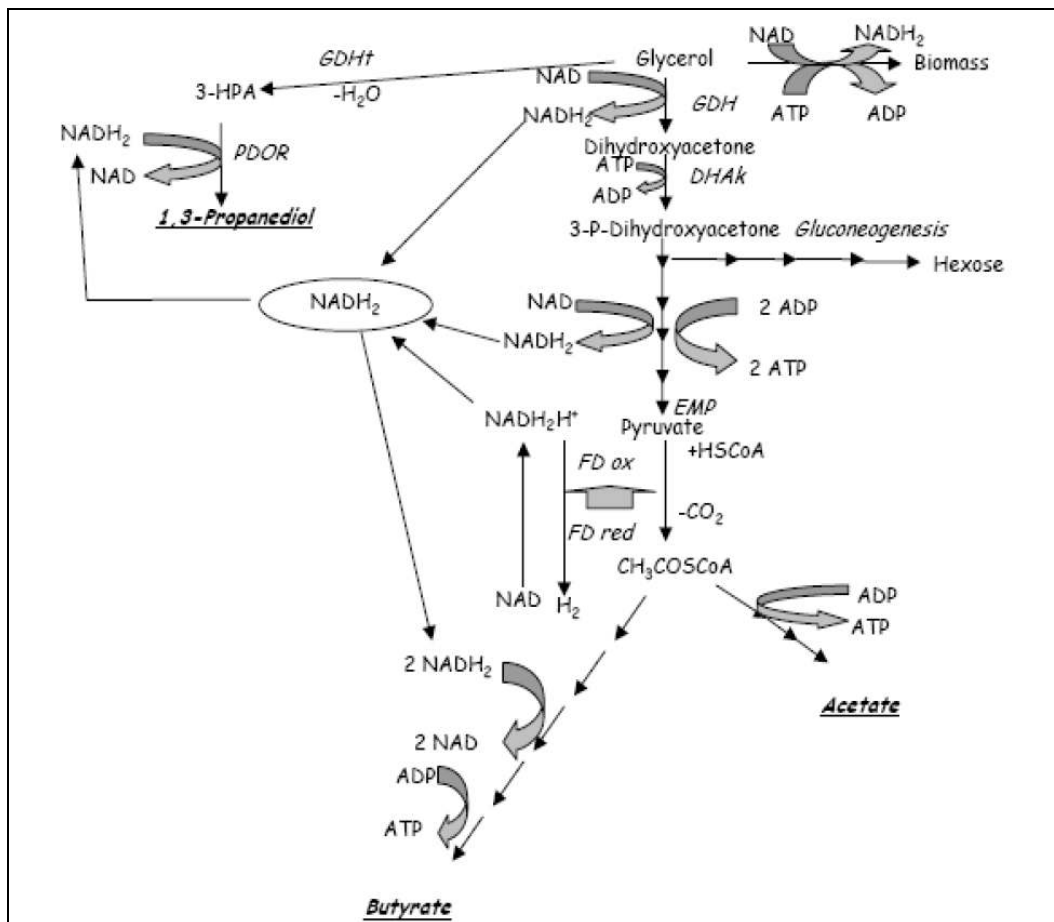




Στην ίδια μελέτη αναφέρεται ότι σύμφωνα με τις αντιδράσεις (1) και (2), η σύνθεση του οξικού οξέος ή/και της αιθανόλης είναι αναγκαία για την παραγωγή ενέργειας υπό τη μορφή μορίων ATP, ενώ παράλληλα το μεταβολικό μονοπάτι πυροσταφυλικό οξύ \rightarrow οξικό οξύ παρέχει τα αναγκαία αναγωγικά ισοδύναμα NADH_2 . Στην υποθετική περίπτωση που εκτός από 1,3-προπανοδιόλη, το μοναδικό μεταβολικό προϊόν είναι το οξικό οξύ τότε, ο μέγιστος θεωρητικός συντελεστής 1,3-προπανοδιόλης προς αναλωθείσα γλυκερόλη έχει τιμή $Y_{\text{PD/Gly}} = 0,67 \text{ mol/mol}$ ή $0,55 \text{ g/g}$, ενώ λαμβάνοντας υπόψη και τη παραγόμενη βιομάζα η τιμή μειώνεται στα $0,64 \text{ mol/mol}$ ή $0,53 \text{ g/g}$ (Zeng et al., 1993). Στην υποθετική περίπτωση που, το δεύτερο μεταβολικό προϊόν είναι η αιθανόλη τότε, η αντίστοιχη τιμή του μέγιστου θεωρητικού συντελεστή 1,3-προπανοδιόλης μειώνεται στην τιμή $Y_{\text{PD/Gly}} = 0,11 \text{ mol/mol}$ ή $0,09 \text{ g/g}$, ενώ ο μέγιστος θεωρητικός συντελεστής αιθανόλης προς αναλωθείσα γλυκερόλη λαμβάνει την τιμή $Y_{\text{EtOH/Gly}} = 0,79 \text{ mol/mol}$ ή $0,39 \text{ g/g}$. Στις πραγματικές συνθήκες ζύμωσης ο σχηματισμός των διαφόρων προϊόντων έχει σαν συνέπεια την μείωση των θεωρητικών τιμών των συντελεστών απόδοσης (Zeng et al., 1993).

Στην περίπτωση των στελεχών της οικογένειας Clostridiaceae, εκτός από οξικό οξύ και αιθανόλη, από το ακέτυλο-συνένζυμο A σχηματίζεται βουτυρικό οξύ (butyrate) και από ορισμένα στελέχη μπορεί να σχηματιστεί και βουτανόλη (butanol) (Biebl et al., 1999). Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων η σύνθεση της 1,3-προπανοδιόλης συνοδεύεται κυρίως από την παραγωγή βουτυρικού και οξικού οξέος, ενώ η αιθανόλη σχηματίζεται σε πολύ μικρότερες ποσότητες (Biebl et al., 1999). Σπανιότερα έχει αναφερθεί και η παραγωγή γαλακτικού οξέος (Gonzalez-Pajuelo et al., 2006). Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι κατά την ζύμωση της γλυκερόλης από στελέχη του γένους *Clostridium* sp. πραγματοποιείται μια εξειδικευμένη αντίδραση, γνωστή ως φωσφοροκλαστική αντίδραση (phosphoroclastic reaction), σύμφωνα με την οποία από την διάσπαση ενός mol πυροσταφυλικού οξέος παράγεται ένα mol ακέτυλο-συνενζύμου A και συγχρόνως απελευθερώνονται ένα mol διοξείδιο του άνθρακα και ένα mol υδρογόνου (Petitdemange et al., 1976; Papanikolaou, 2009). Το σύμπλεγμα των ενζύμων που καταλύουν την αντίδραση είναι γνωστά ως οξειδοαναγωγάση της φερρεδοξίνης (ferredoxin oxidoreductase). Ως εκ τούτου, η συμπληρωματική παραγωγή αναγωγικών ισοδυνάμων (NADH_2) κατά την οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού οξέος, μόνο από τα στελέχη του γένους *Clostridium* sp., έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της απόδοσης της παραγόμενης 1,3-προπανοδιόλης συγκριτικά με

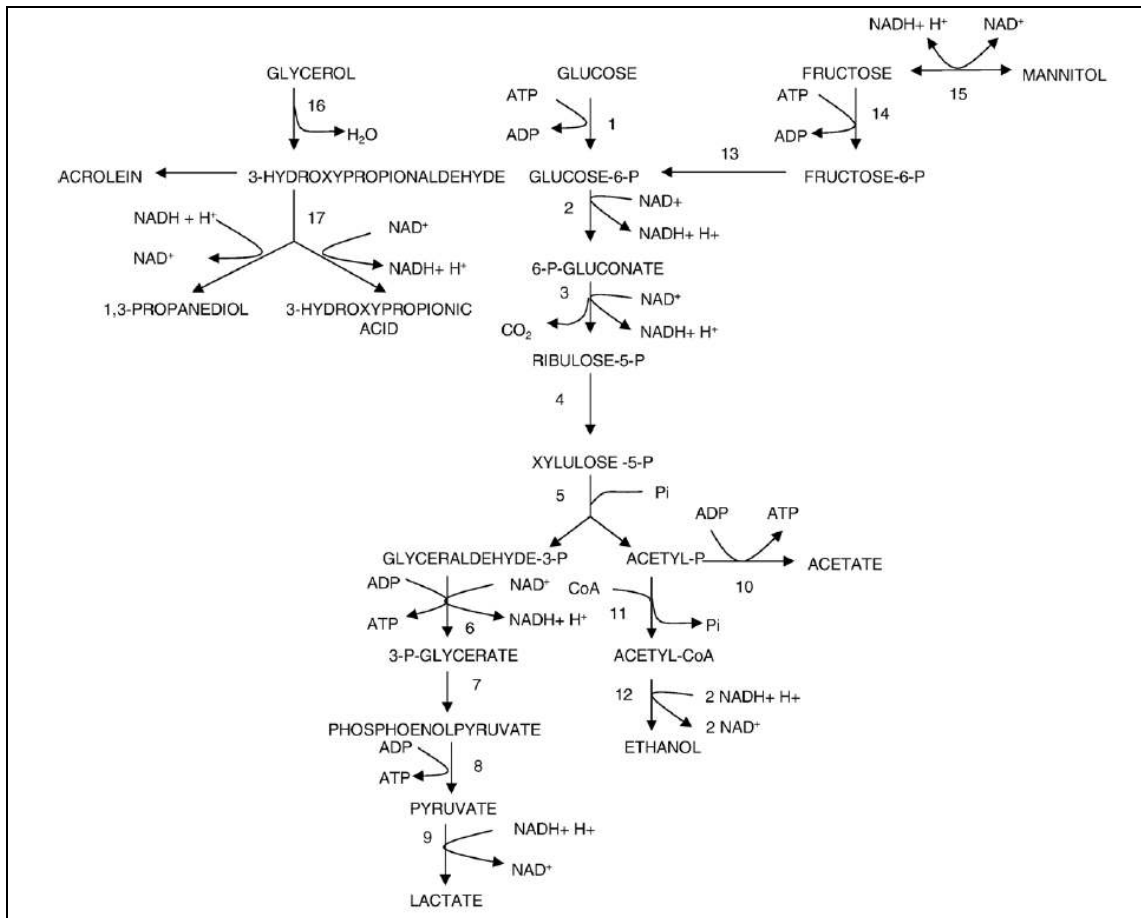
τα Εντεροβακτήρια (Papanikolaou, 2009). Ο μεταβολισμός της γλυκερόλης από τα στελέχη της οικογένειας Clostridiaceae φαίνεται στο ακόλουθο Σχήμα I-7.



Σχήμα I-7: Μεταβολισμός της γλυκερόλης από στελέχη της οικογένειας Clostridiaceae (Papanikolaou, 2009).

Ιδιαίτερα χαρακτηριστική είναι και η αναερόβια ζύμωση της γλυκερόλης από τα γαλακτικά βακτήρια (Σχήμα I-8). Στην πλειοψηφία τους τα στελέχη αυτής της ομάδας, δεν μπορούν να μεταβολίσουν την γλυκερόλη ως μοναδική πηγή άνθρακα και μια επιπλέον πηγή όπως γλυκόζη ή φρουκτόζη, απαιτείται συνήθως για την σύνθεση βιομάζας και τη δημιουργία μορίων ATP (Biebl et al., 1999). Στην περίπτωση αυτή η γλυκερόλη χρησιμοποιείται ως τελικός δέκτης ηλεκτρονίων. Έτσι 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 & Lonvaud-Funel, 2000; Garai-Ibabe et al., 2000; Papanikolaou 2009). Σε μελέτες τους οι ερευνητές Pasteris & Strasser de Saad (2005), αναφέρουν την αύξηση του στελέχους *Pediococcus pentosaceus* N₅p, σε θρεπτικό μέσο με μοναδική πηγή άνθρακα την γλυκερόλη, υπό μικρο-αερόφιλες συνθήκες. Στην μελέτη αυτή εξετάζεται η ενεργότητα της κίνησης της γλυκερόλης (GK) και της αφυδρογονάσης της γλυκερόλης, και στις δεδομένες

πειραματικές συνθήκες αποδεικνύεται ότι ο μεταβολισμός της γλυκερόλης έγινε μέσω της οδού της κίνασης της γλυκερόλης. Επιπλέον η συνζύμωση της γλυκερόλης με κάποιο σάκχαρο, έχει χρησιμοποιηθεί με στόχο την ενίσχυση του ρυθμού αύξησης των γαλακτικών βακτηρίων και την τροποποίηση του προφίλ των μεταβολικών προϊόντων, καθώς καταστέλλεται η παραγωγή αιθανόλης και γαλακτικού οξέος (Schutz & Radler, 1984; Talarico et al. 1990 ; Veiga de Cuncha & Foster, 1992; El-Ziney et al., 1998; Luthi-Peng et al., 2002; Vizoso Pinto et al., 2004). Ο μεταβολισμός της γλυκερόλης από τα γαλακτικά βακτήρια φαίνεται στο Σχήμα I-8.




Σχήμα I-8: Ταυτόχρονος μεταβολισμός της γλυκόζης και της γλυκερόλης από το στέλεχος *Lactobacillus collinoides* 17. Στο σχήμα εμφανίζονται επίσης τα κυριότερα ένζυμα του μεταβολισμού: (1) glucokinase, (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 & alcohol dehydrogenase, (13) glucose phosphate isomerase, (14) fructokinase, (15) mannitol dehydrogenase, (16) glycerol dehydratase και (17) 1,3-propanediol dehydrogenase (Garai-Ibabe et al., 2008).

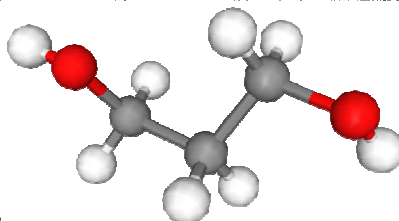
I. 2. Η ένωση "1,3-Προπανοδιόλη"

I.2.1. Γενικά χαρακτηριστικά 1,3-προπανοδιόλης

Η 1,3-προπανοδιόλη (ή τριμέθυλο γλυκόλη ή 1,3-διυδροξυπροπάνιο) είναι 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 $-28\text{ }^\circ\text{C}$, ενώ το σημείο βρασμού κυμαίνεται από 210 έως 212 $^\circ\text{C}$. Πρόκειται για ένα άχρωμο, με ελαφρώς γλυκεία γεύση, παχύρευστο υγρό, το οποίο αναμιγνύεται εύκολα με το νερό και την αιθανόλη (Willke & Vorlorp, 2008; Liu et al., 2010). Οι κυριότερες φυσικοχημικές ιδιότητες παρουσιάζονται στον Πίνακα I-3. Ανακαλύφθηκε το 1881 από τον August Freund, κατά την ζύμωση της γλυκερόλης από μικτή καλλιέργεια, με κυρίαρχο μικροοργανισμό το *Clostridium pasteurianum* (Saxena et al., 2009). Χάρη στην παρουσία δύο υδροξυλομάδων στις θέσεις 1 και 3, κατέχει ευρύ φάσμα εφαρμογών, με κυριότερη την παραγωγή πολυμερών, όπως πολεστέρες και πολυουρεθάνες (Biebl et al., 1999; Saxena et al., 2009).

Πίνακας I-3: Φυσικοχημικές ιδιότητες της 1,3-προπανοδιόλης

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:	$-26,7\text{ }^\circ\text{C}$	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		



I.2.2. Κυριότερες βιομηχανικές εφαρμογές της 1,3-προπανοδιόλης

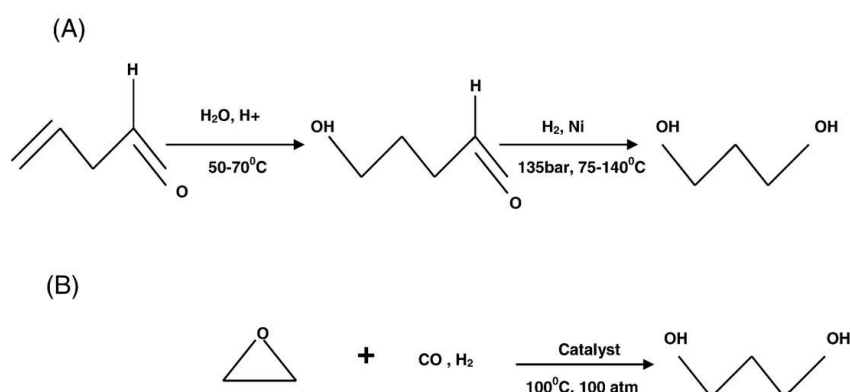
Κατά το παρελθόν, η χρήση της 1,3-προπανοδιόλης ήταν περιορισμένη, εξαιτίας του απαγορευτικά υψηλού κόστους, της περιορισμένης παραγωγής και της χαμηλής ποιότητας του παραγόμενου προϊόντος. Έτσι, για μεγάλο χρονικό διάστημα, έβρισκε μόνο εξειδικευμένες εφαρμογές ως διαλύτης, καθώς και στην παραγωγή διοξινών και ειδικών πολυμερών με

περιορισμένη ζήτηση (Zeng & Biebl, 2002). Η κατάσταση αυτή άρχισε να αλλάζει ριζικά την δεκαετία του 1990, όταν το 1995 οι δύο κορυφαίες εταιρείες χημικών Shell και DuPont, ανακοίνωσαν την εμπορευματοποίηση ενός νέου πολυεστέρα, με βάση την 1,3-προπανοδιόλη και το τερεφθαλικό οξύ. Πρόκειται για τον πολυ-τριμεθυλο τερεφθαλικό εστέρα (polytrimethylene terephthalate), με την ονομασία PTT (Shell) ή 3GT (DuPont). Παράγεται κατά την συμπύκνωση της 1,3-PD με τερεφθαλικό οξύ και έχει εξαιρετικές ιδιότητες όπως καλή ανθεκτικότητα, αντοχή στις κηλίδες, και είναι ιδιαίτερα κατάλληλο για την παραγωγή ινών και ευρύτερα κλωστοϋφαντουργικών υλικών (Zeng & Biebl, 2002). Είναι επίσης ένα πολλά υποσχόμενο βιομηχανικό πλαστικό που ενδεχομένως αντικαταστήσει το παραδοσιακό τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο (PET) και το τερεφθαλικό πολυβουτυλένιο (PBT). Επιπλέον μπορεί να παραχθεί με περιβαλλοντικά φιλικότερο τρόπο και σε πολύ πιο ανταγωνιστική τιμή σε σχέση τα PET και PBT. Χάρη στην νέα αυτή εφαρμογή η 1,3-προπανοδιόλη μετεξελίχθηκε σε χημικό ευρείας κλίμακας (bulk chemical). Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μονομερές ενός νέου βιοδιασπώμενου πολυεστέρα για την παραγωγή πλαστικών. Οι φυσικές ιδιότητες του πολυεστέρα μπορούν εύκολα να τροποποιηθούν ώστε να πληρούν τις προδιαγραφές κατασκευής του τελικού προϊόντος από πλαστικό (BioMat Net Item, 2000; Saxena et al., 2009). Επιπλέον η 1,3-προπανοδιόλη σε συνδυασμό με 2,2,4,4-τετραμεθυλο-1,3-κυκλο-βουτανοδιόλη και διμεθυλο τερεφθαλικό 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 αντινοβολία 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 πολυμέρη 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). Η 1,3-προπανοδιόλη έχει επίσης μια σειρά από άλλες ενδιαφέρουσες εφαρμογές, εκτός από συστατικό διάφορων πολυμερών. Μπορεί να βελτιώσει τις ιδιότητες σε διαλύτες, κόλλες, πολυστρωματικά υλικά, ρητίνες, απορρυπαντικά και καλλυντικά. Μπορεί ακόμη να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή βιοκτόνων για βιομηχανική απολύμανση και την επεξεργασία σε βιομηχανικές διεργασίες (Zeng & Biebl, 2002).

1.2.3. Χημική σύνθεση της 1,3-προπανοδιόλης

Οι συμβατικές μέθοδοι παρασκευής της 1,3-προπανοδιόλης ξεκινούν με την παρασκευή 3-υδροξυ-προπιοναλδεΐδης (3-HPA) ως ενδιάμεσου προϊόντος. Στο στάδιο αυτό μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφοροι συνδυασμοί πρώτης ύλης, διαλύτη και καταλύτη. Σε δεύτερο στάδιο η 3-HPA, μετατρέπεται σε 1,3-προπανοδιόλη, μέσω χημικής κατάλυσης. Το στάδιο θεωρείται

ευκολότερο συγκριτικά με την σύνθεση της 3-HPA. Σε βιομηχανικό επίπεδο εφαρμόζονται δύο βασικές μέθοδοι: η πρώτη της εταιρείας Degussa, χρησιμοποιεί ως πρώτη ύλη το προπυλένιο, το οποίο μετατρέπεται σε ακρολεΐνη και στη συνέχεια σε 3-HPA και η δεύτερη μέθοδος της εταιρείας Shell, χρησιμοποιεί ως πρώτη ύλη το αιθυλενοξείδιο (Σχήμα I-9) (Liu et al., 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).



Σχήμα I-9: Χημική σύνθεση της 1,3-προπανοδιόλης (A) Μέθοδος Degussa από ακρολεΐνη και (B) μέθοδος Shell από αιθυλενοξείδιο (πηγή Saxena et al., 2009).

I.2.4. Παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης μέσω βιοτεχνολογικής οδού

Στις αρχές του 20^{ου} αιώνα, μετά την ανακάλυψη του πετρελαίου και τη ραγδαία ανάπτυξη της βιομηχανίας πετρελαιοειδών, πολλές από τις μέχρι τότε βιοτεχνολογικές διεργασίες για την παραγωγή χημικών προϊόντων ευρείας κλίμακας (platform chemicals), όπως καύσιμα, οργανικά οξέα και βασικά χημικά, αντικαταστάθηκαν από τη χημική σύνθεση με βάση το πετρέλαιο. Ωστόσο, η ολοένα αυξανόμενη ζήτηση, όπως ήταν αναπόφευκτο, οδήγησε στην μείωση των πετρελαϊκών αποθεμάτων παγκοσμίως και κατά συνέπεια στην αύξηση των αντίστοιχων τιμών. Έτσι η βιομηχανία χημικών αναζητά εναλλακτικές βιοτεχνολογικές λύσεις για την αύξηση της χρήσης των ανανεώσιμων πόρων (Willke & Vorlop, 2004). Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι το ποσοστό παραγωγής διαφόρων χημικών προϊόντων μεγάλης κλίμακας, μέσω βιοτεχνολογικών μεθόδων, θα αυξηθεί από το 3% το 2004, στο 15% έως τα τέλη του 2015 (Festel Capital, 2007; Saxena et al., 2009). Ανάμεσα στα χημικά αυτά συγκαταλέγεται και η 1,3-προπανοδιόλη.

Παρόλο που η σύνθεση της 1,3-προπανοδιόλης μέσω μικροβιακών ζυμώσεων είναι γνωστή για πάνω από 120 χρόνια (Freund, 1881), μόλις την δεκαετία του 1990 η διαδικασία βιοσύνθεσης προσέλευσε την προσοχή των ερευνητών και στη συνέχεια της βιομηχανίας, λόγω του σχετικά

χαμηλού κόστους, των ήπιων αντιδράσεων και της φιλικότητας προς το περιβάλλον (Zeng & Biebl, 2002; Liu et al., 2010). Με την ανάπτυξη νέων βιοτεχνολογικών διεργασιών και την εύρεση νέων μικροβιακών στελεχών, η βιολογικά παραγόμενη 1,3-προπανοδιόλη, μπορεί πλέον να ανταγωνιστεί την χημικά συντιθέμενη.

Η ζύμωση της γλυκερόλης προς παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης (Παράγραφος I.1.6.1) 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 τη γλυκερόλη σε 1,3-προπανοδιόλη. Ένας περιορισμένος αριθμός βακτηριακών στελεχών έχουν την ικανότητα να μεταβολίσουν την γλυκερόλη ή/και μίγματα γλυκερόλης και σακχάρων 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). Ιδιαίτερες εξαιρέσεις αποτελούν τα ανασυνδυασμένα στελέχη του είδους *Escherisia coli*, τα οποία είναι σε θέση να χρησιμοποιήσουν ως υπόστρωμα για την παραγωγή της διόλης, την γλυκόζη (Nakamura & Whited, 2003; Jin & Lee, 2008; Liang et al., 2011; Zeng & Sabra, 2011).

Στον Πίνακα I-4 παρουσιάζονται οι κυριότεροι προκαρυωτικοί μικροοργανισμοί που έχουν μέχρι σήμερα μελετηθεί για την ικανότητα τους να συνθέτουν 1,3-προπανοδιόλη. Τα φυσικά στελέχη παραγωγής ανήκουν στα γένη *Klebsiella*, *Clostridium*, *Citrobacter*, *Enterobacter* και *Lactobacillus*. Μεταξύ αυτών, η μεγαλύτερη προσοχή έχει δοθεί στα είδη *K. pneumoniae* και *C. butyricum*, καθώς εμφανίζουν τις υψηλότερες τιμές συγκέντρωσης και παραγωγικότητας (Saxena et al., 2009).

Πίνακας I-4: Σύνθεση 1,3-προπανοδιόλης από προκαρυωτικούς μικροοργανισμούς.

Μικροοργανισμός			Αναφορά
Γένος	Είδος	Στέλεχος	
Enterobacteriaceae			
<i>Citrobacter</i>	<i>freundii</i>	-	Anand & Saxena (2011)
		ATCC 8090	Barbirato et al. (1998)
		DSM 30040	Boeningk et al. (1993)
		DSM 30040	Daniel et al. (1995)
		NCIB 3735	Forage & Foster (1979)
		DSM 30039/ Go/ Zu	Homann et al. (1990)
		DSM 30040	Pflugmacher & Gottschalk (1994)
		<i>werkmanii</i>	DSM 17579
<i>Enterobacter</i>	<i>agglomerans</i>	CNCM 1210	Barbirato et al. (1995)/ (1996)/ (1997)
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	K-12*	Dharmadi et al. (2006)
		K-12 ER 2925*	Tang et al. (2009)
			Tong & Cameron (1992)

		JM 109*	Zhang et al. (2006a)
		Lin 61/ K10*	Zhu et al. (2002)
<i>Klebsiella</i>	<i>oxytoca</i>	Lin / NRCC 3006	Homann et al. (1990)
		M5al/ LDH3	Yang et al. (2007)
		M5al/ ZG36	Zhang et al. (2011)
	<i>planticola</i>		Homann et al. (1990)
	<i>pneumoniae</i>	ATCC 25955	Barbirato et al. (1998)
		DSM 2026/ GT1	Biebl et al. (1998)
		DSM 2026	Chen et al. (2003a)/(2003b)
		M5al	Cheng et al. (2004)/ (2006)/ (2007)
		YMU1	Du et al. (2007)
		ATCC 25955	Forage & Foster (1982)
		TUAC01	Hao et al. (2008)
		ATCC 15380	Hiremath et al. (2011)
		DSM 2026	Homann et al. (1990)
		ATCC 25955	Huang et al. (2002)
		DSM 4799	Jun et al. (2010)
		ME-308	Ji et al. (2009)
			Lin et al. (2005)
		DSM 2026	Liu et al. (2007)
		XJPD-Li	Ma et al. (2009)
			Xu et al. (2009a)
		DSM 2026	Menzel et al. (1997)
<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	DSM 2026	Mu et al. (2006)/ (2008)
		DSM 2026	Nemeth et al. (2003)/ (2008)
		ATCC 70072111	Oh et al. (2008)
		G31	Petrov & Stoyanov (2011)
		BLh-1	Rossi et al. (2011)
		SU6	Sattayasamitsathit (2011)
		DSM 2026	Sun et al. (2010a)
		CGMCC 2028	Wang et al. (2011)
		DSM 2026	Xiu et al. (2004)/ (2007)
		T 1.9131*/	Xu et al. (2011)
		CGMCC 1.9131*	
		HR 526/ LDH 56*	Xu et al. (2009b)
		LX3	Xue et al. (2010)
		DSM 2026	Zeng et al. (1993)/(1994b)
		YMU2	Zhang et al. (2006b)
		XJ-Li	Zhang et al. (2007)
		ZJU 5205	Zhao et al. (2006)
		DSM 2026 (pKM13)/	Zheng et al. (2006)
		DSM 2026 (pKM15)*	

		AC 15	Zheng et al. (2008a)
		CGMCC 1.6366*	Zheng et al. (2008b)
Clostridiaceae			
<i>Clostridium</i>	<i>acetobutylicum</i>	ATCC 824	Andrade & Vasconcelos (2003)
		ATCC 824/ NRRL B527	Forsberg et al. (1987)
		DG1 (pSPD5)	Gonzalez-Pajuelo et al. (2005)
	<i>beijerinckii</i>	ATCC 11914/ ATCC 14949	Forsberg et al. (1987)
		NRRL B593	Gungormusler et al. (2011a)/(2011b)
	<i>butyricum</i>	DSM 5431	Abbad-Andaloussi et al. (1995)/ (1996)/ (1998)
		DSM 5431	Biebl (1991)
			Biebl et al. (1992)
		VPI 1718	Chatzifragkou et al. (2011a)/(2011b)
		CNCM 1211	Colin et al. (2000)/(2001)
		VPI 3266	Gonzalez-Pajuelo et al. (2004)/(2006)
		DSM 5431	Gunzel et al. (1991)
		CNCM 1211	Himmi et al. (1999)
		E5	Malaoui & Marczak (2000)/ (2001)
		F2b	Papanikolaou & Aggelis (2003)
			Papanikolaou et al. (2000)/ (2004)/ (2008)
<i>Clostridium</i>	<i>butyricum</i>	E5	Petitdemange et al. (1995)
		DSM 5431	Rehman et al. (2008a)/ (2008b)
		DSM 5431	Reimann & Biebl (1996)
			Reimann et al. (1998)
		AKR 91b/AKR 92a /AKR 102a	Ringel et al. (2012)
		VPI 3266	Saint-Amans et al. (1994)
		AKR 102a	Wilkens et al. (2011)
	<i>Diolis</i>	DSM 15410	Otte et al. (2009)
			Kaur et al. (2012a)/(2012b)/(2012c)
	<i>formicoaceticum</i>	Z8	Tang et al. (1989)
	<i>pasterianum</i>	DSM 525	Biebl et al. (2001)
		DSM 525	Luers et al. (1997)
	<i>saccharobutylicum</i>	NRRL B-643	Gungormusler et al. (2010)
	sp.	IK 124	Hirschmann et al. (2005)
Halanobacteriaceae			
<i>Halanaerobium</i>	<i>saccharolyticum</i>		Kivistö et al. (2012)

Lactobacillaceae			
<i>Lactobacillus</i>	<i>Brevis</i>	B22	Veiga da Cunha & Foster (1992) Schutz & Radler (1984)
	<i>buchneri</i>	B190	Veiga da Cunha & Foster (1992)
	<i>Reuteri</i>		Luthi-Peng et al. (2002) Talarico & Dobrogosz (1990) Talarico et al. (1988)/(1990) Ragout et al. (1996) Schutz & Radler (1984)

*: ανασυνδυσασμένο στέλεχος

I.2.5. Βελτιστοποίηση της διεργασίας ζύμωσης της 1,3-προπανοδιόλης

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

I.2.5.1. Στρατηγικές για την βελτίωση της προπανοδιολικής ζύμωσης

Τα εφαρμοζόμενα συστήματα καλλιέργειας για την προπανοδιολική ζύμωση είναι η ασυνεχής (κλειστή) καλλιέργεια (batch culture), η ημι-συνεχής τροφοδοτούμενη καλλιέργεια (fed-batch culture), επαναλαμβανόμενη ημι-συνεχής καλλιέργεια (repeated fed-batch) (Jun et al., 2010) και η συνεχής καλλιέργεια (continuous culture) (Papanikolaou et al., 2000; 2004; 2008; Saxena et al., 2009). Αξίζει να σημειωθεί ότι στην πρώτη περίπτωση οι καλλιέργειες θεωρούνται οι απλούστερες, χαρακτηρίζονται τις περισσότερες φορές από χαμηλότερες τελικές συγκεντρώσεις του προϊόντος και συνήθως χρησιμοποιούνται στα προκαταρκτικά στάδια της πειραματικής διαδικασίας (Himmi et al., 1999; Saxena et al., 2009). Τα συνεχή συστήματα καλλιέργειας συμβάλλουν στην καλύτερη μελέτη των παραμέτρων της μικροβιακής αύξησης και στην συνεχή παραγωγή των μεταβολικών προϊόντων. Ωστόσο, στην περίπτωση της προπανοδιολικής ζύμωσης σύμφωνα με τις μελέτες οι συνεχείς καλλιέργειες αν και παρουσιάζουν μεγάλη παραγωγικότητα, μειονεκτούν έναντι των ημι-συνεχών καλλιεργειών εξαιτίας της χαμηλότερης τελικής

συγκέντρωσης της 1,3-προπανοδιόλης (Saxena et al., 2009). Αναφορικά με τα ημι-συνεχή συστήματα καλλιέργειας, συνδυάζουν τα πλεονεκτήματα της υψηλής παραγωγικότητας καθώς και υψηλής συγκέντρωσης 1,3-προπανοδιόλης. Στο πρώτο στάδιο της βιο-διεργασίας η καλλιέργεια ξεκινάει ως ασυνεχής και συνεχίζεται με την προσθήκη υποστρώματος, μόλις αρχίζει να εξαντλείται. Η ζύμωση τελείται υπό έναν ορισμένο ρυθμό αύξησης έως ότου κάποιος πρακτικός περιορισμός αναστείλει την κυτταρική αύξηση. Στην αποτελεσματικότητα του συστήματος σημαντικό ρόλο διαδραματίζει η σταδιακή προσθήκη της γλυκερόλης, ώστε να αποφευχθούν φαινόμενα παρεμπόδισης εκ του υποστρώματος (Biebl et al., 1999; Mu et al., 2008; Jun et al., 2010).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει και η εφαρμογή της τεχνικής των ακινητοποιημένων κυττάρων (immobilized cells), καθώς και της τεχνική της ανακύκλωσης κυττάρων (cell recycle) σε συστήματα ημι-συνεχούς και συνεχούς καλλιέργειας, με στόχο της περαιτέρω βελτίωση της παραγωγικότητας της 1,3-προπανοδιόλης (Zhao et al., 2006; Saxena et al., 2009; Jun et al., 2010). Επιπλέον ένας περιορισμένος αριθμός μελετών στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρεται στην εφαρμογή διβάθμιδων συστημάτων (two-stage fermentation) ημι-συνεχούς και ασυνεχούς καλλιέργειας. Η ζύμωση πραγματοποιείται σε δύο στάδια με άμεση συνέπεια τον καλύτερο έλεγχο των συνθηκών καλλιέργειας για τα επιμέρους στάδια, ενώ παράλληλα δίνεται η δυνατότητα συνδυασμού διαφορετικών υποστρωμάτων και παραγωγής διαφορετικών μεταβολιτών (Boenigk et al., 1993; Papanikolaou et al., 2000; 2008; Zheng et al., 2007; Saxena et al., 2009;).

Αναφορικά με τις συνθήκες καλλιέργειας η προπανοδιολική ζύμωση πραγματοποιείται ως επί το πλείστον κάτω από αναερόβιες συνθήκες, δεδομένου ότι η πλειοψηφία των μικροοργανισμών που τελούν τη ζύμωση είναι αναερόβιοι ή προαιρετικά αναερόβιοι. Σύμφωνα με τους Sliniger & Bothast (1985) η παρουσία του οξυγόνου στο μέσο της καλλιέργειας ευνοεί την παραγωγή 3-υδρόξυ-προπιοναλδεϋδης, της οποίας η αυξημένη συγκέντρωση ενδέχεται να είναι τοξική για το μικροοργανισμό. Εντούτοις, μελέτες των τελευταίων ετών έρχονται να ανατρέψουν την θεωρία αυτή, υποστηρίζοντας ότι οι αυστηρά αναερόβιες συνθήκες δεν είναι απαραίτητες για την παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης (Huang et al., 2002; Chen et al., 2003a; 2003b; Cheng et al., 2004; Yang et al., 2007; Hao et al., 2008; Ma et al., 2009; Wang et al., 2010). Σημειώνεται ότι οι εν λόγω έρευνες αφορούν στελέχη του προαιρετικά αναερόβιου γένους *Klebsiella*, και πραγματοποιήθηκαν υπό μικρο-αερόφιλες και αερόβιες συνθήκες (η παροχή του αέρα κυμαινόταν από 0,1 έως 1,6 nvm). Η συγκέντρωση της παραγόμενης 1,3-προπανοδιόλης είτε βελτιώθηκε σε μικρό βαθμό είτε παρέμεινε πρακτικά ίδια συγκριτικά με τις αναερόβιες καλλιέργειες. Όμως όπως υποστηρίζουν οι μελετητές η παρουσία του οξυγόνου ευνόησε την παραγωγή βιομάζας και μείωσε την διάρκεια της καλλιέργειας με αποτέλεσμα να αυξηθεί σημαντικά η παραγωγικότητα.

Παράλληλα η χρησιμοποίηση αέρα έναντι αζώτου που απαιτείται στις αναερόβιες συνθήκες μειώνει και το κόστος της βιοδιεργασίας (Hao et al., 2008).

Τέλος μια στρατηγική που έχει εφαρμοστεί σε περιορισμένο βαθμό με στόχο την αύξηση της συγκέντρωσης της 1,3-προπανοδιόλης είναι η συνζύμωση της γλυκερόλης με σάκχαρα, όπως γλυκόζη, φρουκτόζη ή ξυλόζη (Veiga-da-Cunha & Foster, 1992; Biebl & Marten, 1995; Abbad-Andalousii et al., 1998; Luthi-Peng et al., 2002; Xiu et al., 2007; Sun et al., 2010; Jin et al., 2011). Στις εν λόγω μελέτες χρησιμοποιήθηκαν στελέχη της ομάδας των γαλακτικών βακτηρίων, ενετροβακτήρια καθώς και στελέχη του γένους *Clostridium*. Η παρουσία του σακχάρου συμβάλλει στην παραγωγή ενέργειας από το κύτταρο, ενώ η γλυκερόλη χρησιμοποιείται ως τελικός δέκτης ηλεκτρονίων. Ως εκ τούτου στις έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σημειώθηκε αύξηση της συγκέντρωσης της παραγόμενης βιομάζας και του συντελεστή απόδοσης παραχθείσας γλυκερόλης, συγκριτικά με τις καλλιέργειες με μοναδική πηγή άνθρακα την γλυκερόλη.

I.2.5.2. Ο ρόλος της μεταβολικής μηχανικής στην προπανοδιολική ζύμωση

Η μεταβολική μηχανική (metabolic engineering) αποτελεί έναν σύγχρονο επιστημονικό κλάδο που αφορά την κατευθυνόμενη βελτίωση των κυτταρικών λειτουργιών ή της παραγωγής προϊόντων μέσω της τροποποίησης εξειδικευμένων βιοχημικών αντιδράσεων ή της εισαγωγής νέων, με τη χρήση της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA (Stephanopoulos et al., 1998; Celinska, 2010). Στην μικροβιακή παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης η μεταβολική μηχανική χρησιμοποιεί ως στελέχη τόσο φυσικούς παραγωγούς της διόλης όσο και μικροοργανισμούς με επίκτητη ικανότητα να παράγουν την διόλη μέσω γενετικών χειρισμών. Οι στρατηγικές που έχουν εφαρμοστεί για την βελτιστοποίηση της παραγωγής του τελικού προϊόντος αφορούν την αφαίρεση ή απενεργοποίηση των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για τον σχηματισμό παρα-προϊόντων, τη μεταφορά και διαγονιδιακή υπερέκφραση από τα γονίδια που συμμετέχουν άμεσα στην μεταβολική οδό, καθώς και την τροποποίηση του βιοχημικών αντιδράσεων του μεταβολισμού (Zhang et al., 2006a; 2006b; 2009; 2012; Celinska, 2010; Xu et al., 2010; Zeng & Sabra, 2011).

Ο πλέον μελετημένος μικροοργανισμός για την παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης μέσω της μεταβολικής μηχανικής είναι το είδος *K. pneumoniae*. Οι στρατηγικές που έχουν κυρίως εφαρμοστεί αφορούν την υπερ-έκφραση (overexpression) των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή της διόλης ή την απενεργοποίηση (inactivation) των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για τον σχηματισμό παραπροϊόντων ανταγωνιστικών προς τη σύνθεση της διόλης (Celinska, 2010). Ωστόσο, οι Zheng et al. (2006), εφαρμόζοντας την τεχνική της υπερ-έκφρασης των γονιδίων *dhaB*, *dhaT* και *dhaR* στο στέλεχος *K. pneumoniae* DSM 2026, αναφέρουν ότι η εκτεταμένη υπερ-έκφραση του γονιδίου *dhaT* δεν είναι επιθυμητή, λόγω της συσσώρευσης της τοξικής για το κύτταρο 3-υδροξυ-προπιοναλδεϋδης. Αναφορικά με την μείωση της σύνθεσης παραπροϊόντων,

αξίζει να σημειωθεί ότι κατά τον μεταβολισμό της γλυκερόλης ο σχηματισμός τους τελείται μέσω της οξειδωτικής οδού, παρέχοντας την απαιτούμενη ενέργεια για την σύνθεση της 1,3-προπανοδιόλης μέσω της αναγωγικής οδού. Επομένως, η εξάλειψη όλων των παραπροϊόντων δεν είναι δυνατόν να επιτευχθεί. Στις περισσότερες μελέτες έχει επιλεγεί η αφαίρεση του γονιδίου *ldhA* που είναι υπεύθυνο για την κωδικοποίηση της γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH) και κατ' επέκταση για την παραγωγή του γαλακτικού οξέος (Zheng et al., 2004; Zheng et al., 2006; Yang et al., 2007; Zheng et al., 2008b; Seo et al., 2009; Celinska, 2010; Xu et al., 2010; Zeng & Sabra, 2011). Οι Yang et al. (2007) δημιούργησαν το στέλεχος *K. oxytoca* LDH3 αφαιρώντας από το μητρικό στέλεχος *K. oxytoca* M5a1 το γονίδιο *ldhA*. Συγκρίνοντας την σύνθεση 1,3-προπανοδιόλης από τα δύο στελέχη, σε ημι-συνεχείς καλλιέργειες υπό αναερόβιες συνθήκες, παρατήρησαν αύξηση στην συγκέντρωση της διόλης από τα 39,1 g/L στην καλλιέργεια του μητρικού στελέχους σε 56,7 g/L στην καλλιέργεια του γενετικά τροποποιημένου στελέχους. Από την άλλη πλευρά οι Xu et al. (2009b) σε αντίστοιχα πειράματα με το ανασυνδυασμένο στέλεχος *K. pneumoniae* HR 526, που του είχε αφαιρεθεί η ικανότητα παραγωγής γαλακτικής αφυδρογονάσης (lactate deficient mutant), κατέγραψαν μικρή αύξηση της παραγόμενης διόλης, κατά μόλις ~7,0 g/L, συγκριτικά με το μητρικό στέλεχος, παρά την σημαντική μείωση στην παραγωγή του γαλακτικού οξέος από τα ~42,0 g/L σε ~2,5 g/L.

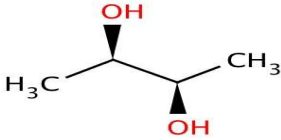
Αναφορικά με την ετερόλογη έκφραση γονιδίων, μέχρι σήμερα θεωρείται πρωτοποριακή η έρευνα της εταιρείας DuPont & Genencor International Inc., που κατάφεραν επιτυχώς να δημιουργήσουν το ανασυνδυασμένο (recombinant) στέλεχος *E. coli* K-12, το οποίο δύναται να παράξει 1,3-προπανοδιόλη σε συγκέντρωση που φτάνει τα 135 g/L και παραγωγικότητα 3,5g/L/h, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα τη γλυκόζη (Nakamura & Whited, 2003). Το στέλεχος αυτό περιέχει γονίδια από τον μικροοργανισμό *Saccharomyces cerevisiae* για την παραγωγή γλυκερόλης από γλυκόζη και γονίδια από τον μικροοργανισμό *Klebsiella pneumoniae* για την παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης από γλυκερόλη, αντίστοιχα. Ωστόσο λόγω του διπλώματος ευρεσιτεχνίας που κατέχει η εταιρεία, λίγα επιστημονικά στοιχεία έχουν δημοσιευθεί (Zeng & Sabra, 2011). Ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις 1,3-προπανοδιόλης έχουν επίσης καταγραφεί σε έρευνα των Emptage et al. (2003; 2006), με τις μέγιστες τιμές της διόλης να φτάνουν τα 129 g/L και 112 g/L, κατά την διάρκεια ημισυνεχών καλλιεργειών των στελεχών *E. coli* RJ8/pAH48/pKP3229 και *E. coli* KLP23/pAH48/pDT29, σε υπόστρωμα γλυκόζης. Οι Jin & Lee (2008) επίσης αναφέρουν την παραγωγή της διόλης από γλυκόζη με την χρήση του γενετικά τροποποιημένου στελέχους *E. coli* Delta6, σε συγκεντρώσεις που φτάνουν μόλις τα 43 g/L, ενώ οι Liang et al. (2011) κατάφεραν με την χρήση ενός γενετικά τροποποιημένου στελέχους *E. coli* να παράξουν μόνο 12 g/L διόλης, μέσω ενός επαγόμενου από στρες (stress-induced) μεταβολικού μονοπατιού της γλυκόζης (Jin & Lee, 2008; Liang et al., 2011; Zeng & Sabra, 2011). 0,24 g/g.

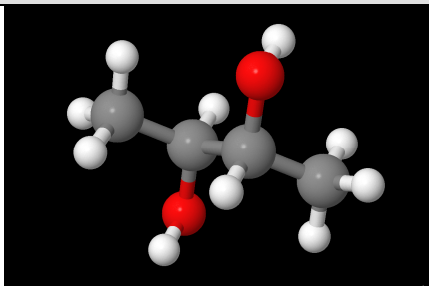
I. 3. Η ένωση "2,3-Βουτανοδιόλη"

I.3.1. Γενικά χαρακτηριστικά 2,3-βουτανοδιόλης

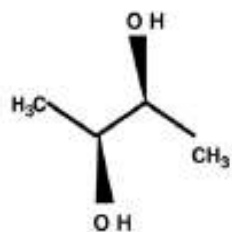
Η 2,3-βουτανοδιόλη, γνωστή αλλιώς και ως διμέθυλο γλυκόλη, είναι οργανική ένωση με χημικό τύπο $C_4H_{10}O_2$. Πρόκειται για ένα άχρωμο και άοσμο υγρό. Έχει μοριακή μάζα 90,121 g/mol, πολύ χαμηλό σημείο τήξης $-60\text{ }^\circ\text{C}$, ενώ το σημείο βρασμού κυμαίνεται από 180 έως $184\text{ }^\circ\text{C}$ (Garg & Jain, 1995). Στη φύση δύναται να απαντηθεί υπό την μορφή τριών ισομερών D(-)-, L-(+)- και μέσο- μορφή, όπως φαίνονται στον Πίνακα I-5.

Πίνακας I-5: Φυσικοχημικές ιδιότητες της 2,3-βουτανοδιόλης

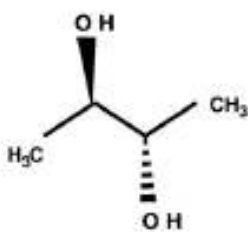
Γενικά χαρακτηριστικά		Συντακτικός τύπος
Χημική ονομασία:	2,3-βουτανοδιόλη	
Μοριακός τύπος:	$C_4H_{10}O_2$	
Μοριακή μάζα:	90,121 g/mol	
Χημικές Ιδιότητες		Φυσικές Ιδιότητες
Σημείο τήξης:	$-60\text{ }^\circ\text{C}$	Άχρωμη
Σημείο βρασμού:	$180-184\text{ }^\circ\text{C}$	Άοσμη
Πυκνότητα:	0,987 g/mL	
Τρισδιάστατη απεικόνιση μορίου 2,3-βουτανοδιόλης		



Στερεοϊσομερή

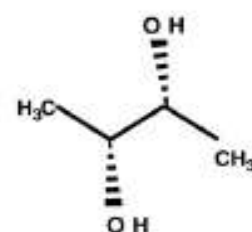


L(+)-2,3-βουτανοδιόλη



2,3-βουτανοδιόλη

(οπτικά ανενεργή μορφή)



D(-)-2,3-βουτανοδιόλη

I.3.2. Κυριότερες βιομηχανικές εφαρμογές της 2,3-βουτανοδιόλης

Μια από τις σημαντικότερες εφαρμογές της 2,3-βουτανοδιόλης είναι η μετατροπή της σε 1,3-βουταδιένη, η οποία αποτελεί ενδιάμεση ένωση για την παραγωγή συνθετικού καουτσούκ. Η

σύνθεση αυτή ήταν ιδιαίτερα σημαντική κατά την διάρκεια του 2^{ου} Παγκοσμίου Πολέμου, καθώς οι ανάγκες σε συνθετικό καουτσούκ ήταν υψηλές (Celińska & Grajek, 2009). Επίσης, η αφυδρογόνωση της 2,3-βουτανοδιόλης οδηγεί στην παραγωγή διακετυλίου, το οποίο χρησιμοποιείται από την βιομηχανία τροφίμων ως αρωματικό πρόσθετο, προσδίδοντας χαρακτηριστική βουτυρώδη οσμή. Επιπλέον το διακετύλιο σύμφωνα με έρευνες παρουσιάζει βακτηριοστατική δράση, παρεμποδίζοντας την αύξηση του μικροοργανισμού *Mycobacterium tuberculosis* (Underkofler & Hickey, 1954; Garg & Jain, 1995). Μία άλλη χρήση της είναι η μετατροπή της με αφυδάτωση σε μεθυλ-αιθυλ-κετόνη (MEK), η οποία χρησιμοποιείται ως υγρό πρόσθετο στα καύσιμα, αλλά και ως διαλύτης στην σύνθεση ρητίνων (Celińska & Grajek, 2009). Η εστεροποίηση της 2,3-βουτανοδιόλης με μαλεϊκό οξύ οδηγεί στην σύνθεση πολυουρεθαν-μελαμιδίων (PUMAs), τα οποία ενδέχεται να είναι χρήσιμα σε καρδιαγγειακές εφαρμογές (Petrini et al., 1999; Celińska & Grajek, 2009). Ακόμη τα προϊόντα εστεροποίησης χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο από την βιομηχανία φαρμάκων και καλλυντικών (Syu, 2001). Πολύ σημαντική είναι η θερμαντική αξία της 2,3-βουτανοδιόλης (27198 J/g) σε σύγκριση με άλλα υγρά καύσιμα όπως η μεθανόλη (22081 J/g) και η αιθανόλη (29055 J/g) (Flickinger, 1980). Ισομοριακές ποσότητες αιθανόλης και 2,3-βουτανοδιόλης αποδίδουν θερμαντική αξία 27660 J/g, και συνεπώς η παρουσία της αιθανόλης δεν επηρεάζει την ιδιότητες της 2,3-βουτανοδιόλης στην εφαρμογή της αυτή. Επιπροσθέτως λόγω του υψηλού αριθμού οκτανίων μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ενισχυτής οκτανίων στην βενζίνη, ενώ χάρη στο χαμηλό σημείο πήξης (-60°C), μπορεί να βρει εφαρμογή ως αντιψυκτικό (Celińska & Grajek, 2009). Τέλος τόσο η 2,3-βουτανοδιόλη όσο και τα παράγωγά της βρίσκουν εφαρμογές στην σύνθεση πολυμερών και στα πλαστικών, ενώ πιθανές εφαρμογές είναι η παραγωγή εκτυπωτικών μελανιών και καπνογόνων (Garg & Jain, 1995; Xiu 2008; Ji et al., 2011). Γίνεται λοιπόν σαφές ότι η πληθώρα των εφαρμογών, καθιστούν την 2,3-βουτανοδιόλη ένα χημικό πρόσθετο μεγάλης αξίας.

1.3.3. Παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης μέσω βιοτεχνολογικής οδού

Η άνοδος της τιμής του πετρελαίου που σημειώθηκε τα τελευταία χρόνια σε συνδυασμό με την μείωση των ορυκτών κοιτασμάτων κάνουν την ιδέα εφαρμογής των βιοτεχνολογικά παραγόμενων χημικών ουσιών (bio-based chemical compounds) περισσότερο ελκυστική από ποτέ. Η παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης μέσω μικροβιακών ζυμώσεων είναι γνωστή για περισσότερο από 100 χρόνια. Μελετήθηκε για πρώτη φορά το 1906 από τους Harden και Walpote σε καλλιέργεια του μικροοργανισμού *Klebsiella pneumoniae* με προηγούμενη ονομασία *Aerobacter aerogenes* (Magee & Kosaric, 1984; Ji et al., 2011). Είκοσι χρόνια αργότερα ο ερευνητής Donker μελέτησε την σύνθεση 2,3-βουτανοδιόλης σε καλλιέργεια του μικροοργανισμού *Bacillus polymyxa* (Garg & Jain, 1995). Βιομηχανικής κλίμακας παραγωγή της ένωσης πιστεύεται ότι προτάθηκε το 1933 από

τους Fulmer και τους συνεργάτες του (Garg & Jain, 1995; Ji et al., 2011). Όπως και στην περίπτωση των περισσότερων χημικών ενώσεων, η παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης τη δεκαετία του 1970 γινόταν μέσω χημικών μεθόδων. Όμως το υψηλό κόστος της χημικής σύνθεσης περιόρισε την παραγωγή σε μεγάλη κλίμακα, καθώς και το εύρος των εφαρμογών (Ge et al., 2011). Παρόλο που η μικροβιακή σύνθεση της δεν πραγματοποιείται σε βιομηχανική κλίμακα, εντούτοις έχει μελετηθεί αρκετά, και κερδίζει ολοένα και περισσότερο το ενδιαφέρον σε παγκόσμιο επίπεδο, καθώς οι ανανεώσιμοι πόροι αποτελούν ένα ελκυστικό πεδίο για την παραγωγή χημικών ενώσεων (Zeng et al., 1994a; Byun et al., 1994; Ghosh & Swaminathan 2003; Saha 2003; Xiu et al., 2008; Ji et al., 2011; Ge et al., 2011).

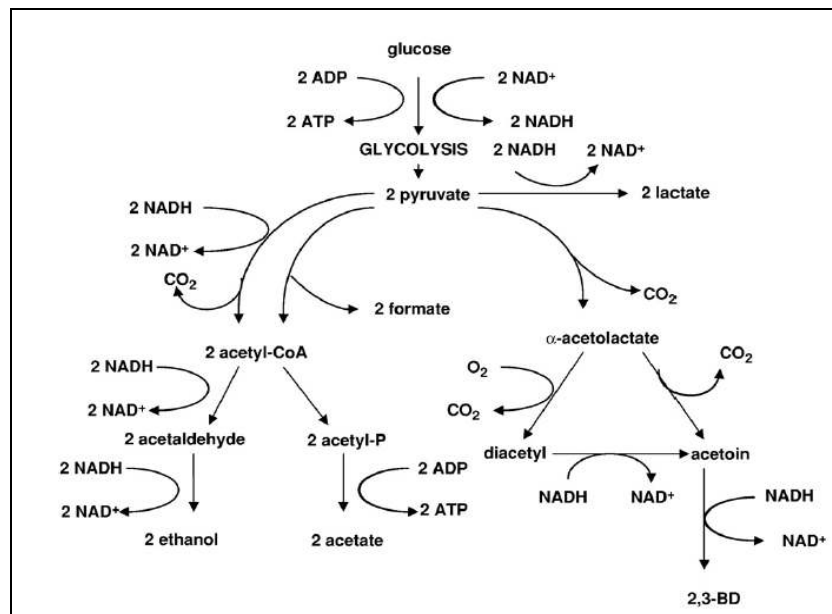
Αρκετοί προκαρυωτικοί μικροοργανισμοί που έχουν μέχρι σήμερα μελετηθεί για την ικανότητα τους να συνθέτουν 2,3-βουτανοδιόλη. Τα στελέχη με τις ικανοποιητικότερες αποδόσεις ανήκουν στα είδη *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca* *Paenibacillus polymyxa* (προηγούμενη ονομασία *Bacillus polymyxa*), ενώ και τα στελέχη του είδους *Enterobacter aerogenes* παρουσιάζουν ενδιαφέρον για αυτή την εφαρμογή. Στον Πίνακα I-6 παρουσιάζονται τα πιο χαρακτηριστικά βακτηριακά στελέχη που έχουν μελετηθεί για την βιοσύνθεση της διόλης. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα στελέχη του είδους *K. pneumoniae* ανήκουν στην κατηγορία των προαιρετικά παθογόνων μικροοργανισμών (class 2), με συνέπια η ενδεχόμενη εφαρμογή τους σε βιομηχανικό επίπεδο να είναι απαγορευτική. Για το σκοπό αυτό είναι απαραίτητο να βρεθούν μη-παθογόνα στελέχη με σημαντικές παραγωγικότητες, ώστε να χρησιμοποιηθούν σε βιομηχανική κλίμακα (Celińska & Grajek, 2009).

Πίνακας I-6: Σύνθεση 2,3-βουτανοδιόλης από προκαρυωτικούς μικροοργανισμούς.

Μικροοργανισμός			Αναφορά
Γένος	Είδος	Στέλεχος	
Bacilliaceae			
<i>Bacillus</i>	<i>amyloliquefaciens</i>	ATCC 23350	Alam et al. (1990)
	<i>licheniformis</i>	-	Nilegaonkar et al. (1992)
	<i>subtilis</i>		Moes et al. (1985)
<i>Paenibacillus</i>	<i>polymyxa</i>	ZJ-9	Gao et al. (2010)
		ATCC 12321	De Mas et al. (1988)
		ATCC 842	
		ATCC 12321	Fages et al. (1986)
		NRCC 9035	Nakashimada et al. (2000) Groleau et al. (1985)
Enterobacteriaceae			
<i>Enterobacter</i>	<i>aerogenes</i>	VTT-E-87292	Blomqvist et al. (1993)
		IAM 1133	Chua et al. (1980)
		NCIMB 10102	Converti et al. (2002)/(2003)

			Perego et al. (2000)
		P 14-43	Johansen et al. (1975)
		DSM 30053	Zeng et al. (1990a)/(1990b)/(1994a)
	<i>cloacae</i>	NRRL B-23289	Saha & Bothast. (1999)
<i>Klebsiella</i>	<i>oxytoca</i>	-	Afschar et al. (1991)
		ATCC 13882	Beronio et al. (1993a)/(1993b)
		NRRL-B199	Champluvier et al. (1989a)/ (1989b)
		ACCC10370	Cheng et al. (2010)
		NRRL B-199	Gupta et al. (2005)
		ATCC 8724	Jansen et al. (1983)/(1984)
		ME-303	Ji et al. (2008)/ (2009b)
		ME-UD-3	Ji et al. (2009a)/(2009c)/(2010)/(2011)
		ME-XJ-8	Ji et al. (2009a)
		NRRL B-199	Qureshi & Cheryan (1989a)/(1989b)
	<i>pneumoniae</i>	DSM 2026/ GT1	Biebl et al. (1998)
		-	Li et al. (2010a)/(2010b)
		SDM	Ma et al. (2009)
		CICC 10011	Qin et al. (2006)
		G31	Petrov & Petrova (2009)/(2010)
		ATCC 8724	Ramachandran et al. (1987)/(1988)/(1990)
		NRRL B199	Silviera et al. (1993)
			Sun et al. (2009a)/(2009b)
		ATCC 8724	Yu et al. (1982)/(1983)
	sp.	HE 1	Wu et al. (2008)
		KG 1	Zheng et al. (2008)
<i>Serratia</i>	<i>marcescens</i>	H30 ^a	Zhang et al. (2010a)/(2010b)

Ανάλογα με το είδος του μικροοργανισμού οι ζυμώσεις πραγματοποιούνται είτε υπό αναερόβιες, είτε υπό μικρο-αερόφιλες είτε υπό αερόβιες συνθήκες. Το κυριότερο υπόστρωμα που έχει μελετηθεί για την παραγωγή της 2,3-βουτανодиόλης είναι η γλυκόζη και το μεταβολικό μονοπάτι της παρουσιάζεται στο Σχήμα 1-10:



Σχήμα I-10: Μεταβολισμός γλυκόζης από τον μικροοργανισμό *Lactococcus lactis*, προς παραγωγή αιθανόλης, 2,3-βουτανοδιόλης, οξικού, γαλακτικού και μυρμηκικού οξέος (Celińska & Grajek, 2009).

Αρχικά, το πυροσταφυλικό οξύ μπορεί να μετατραπεί είτε σε γαλακτικό οξύ (αντίδραση που απαιτεί NADH) ή μετά από αποκαρβοξυλίωση σε α -ακετυλογαλακτικό (α -acetolactate) υπό την δράση του ενζύμου συνθάσης του α -ακετογαλακτικού (α -acetolactate synthase). Στη συνέχεια, το τελευταίο κάτω από αναερόβιες συνθήκες μπορεί να μετατραπεί σε ακετοΐνη, ενώ υπό την παρουσία οξυγόνου υφίσταται αυθόρμητη αποκαρβοξυλίωση και παράγεται διακετυλίιο. Υπό την επίδραση του ενζύμου αφυδρογονάση της ακετοΐνης, το διακετύλιο μετατρέπεται σε ακετοΐνη. Τέλος, η αφυδρογονάση της 2,3-βουτανοδιόλης (BDH) μετατρέπει την ακετοΐνη σε 2,3-βουτανοδιόλη (Celińska & Grajek, 2009). Σύμφωνα με τους Bryn et al. (1973) και Stormer et al. (1968), σε χαμηλές τιμές pH, το οξικό οξύ είναι επάγει την έκκριση των των τριων βασικών ενζύμων που εμπλέκονται στον σχηματισμό της 2,3-βουτανοδιόλης (Celińska & Grajek, 2009). Το γονίδιο που κωδικοποιεί την σύνθεση του ενζύμου BDH είναι το *bdhA*, το οποίο ταυτοποιήθηκε από τον Nicholson, 2008 (Celińska & Grajek, 2009).

Ο μέγιστος θεωρητικός συντελεστής $Y_{BD/Glu}$ παραχθείσας 2,3-βουτανοδιόλης ανά καταναλωθείσα γλυκόζη είναι 0,5 g/g (Nilegaonkar et., 1992). Η ακριβής μεταβολική λειτουργία της 2,3-βουτανοδιόλης δεν έχει αποσαφηνιστεί. Σύμφωνα με τους Nakashimada et al. (2000) η σύνθεση της διόλης επάγεται σε όξινο pH, υποδηλώνοντας έτσι ότι πρόκειται για έναν ουδέτερο μεταβολίτη που εξουδετερώνει το όξινο pH (Celińska & Grajek, 2009).

I.3.4. Υποστρώματα για την βιοτεχνολογική παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης

Για την σύνθεση 2,3-βουτανοδιόλης, μέσω μικροβιακών ζυμώσεων, έχουν ως επί το πλείστον χρησιμοποιηθεί μονοσακχαρίτες με κυριότερο την γλυκόζη, αλλά και φρουκτόζη,

μαννόζη, ξυλόζη, γαλακτόζη, καθώς και ολιγοσακχαρίτες όπως σουκρόζη, μαλτόζη και λακτόζη (Syu, 2001). Όπως έχει ήδη αναφερθεί και στην περίπτωση της 1,3-προπανοδιόλης, κατά την βιοτεχνολογική παραγωγή χημικών προϊόντων σε ευρεία κλίμακα, το κόστος του τελικού προϊόντος εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το κόστος των πρώτων υλών (Willke & Vorlop, 2008). Έτσι η διαθεσιμότητα μίας φθηνής πρώτης ύλης είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη μιας οικονομικής μεθόδου βιοσύνθεσης 2,3-βουτανοδιόλης. Σύμφωνα με τους Ji et al. (2011) τα υποστρώματα που θα αποτελούσαν μια φθηνή οικονομική λύση μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες: τα μη-κυτταρινούχα και τα λιγνοκυτταρινούχα υποστρώματα.

Στα λιγνοκυτταρινούχα υποστρώματα περιλαμβάνονται η λιγνίνη, η κυτταρίνη και η ημι-κυτταρίνη, ενώ στα μη-κυτταρινούχα συγκαταλέγονται:

1) Υγρά απόβλητα της βιομηχανίας τροφίμων πλούσια σε σάκχαρα, όπως υδρόλυμα αμύλου από την επεξεργασία καλαμποκιού, ακατέργαστη μελάσα και ορός γάλακτος από την τυροκόμιση.

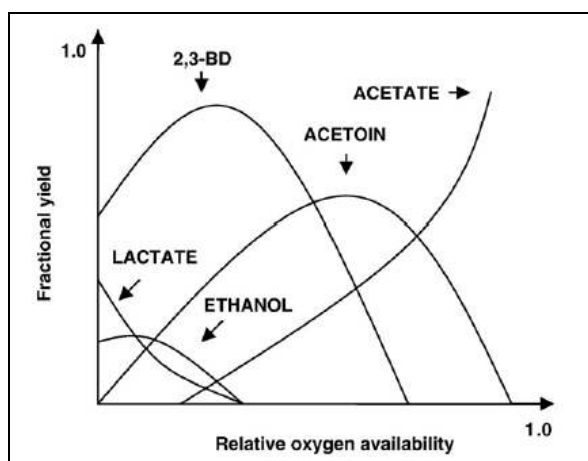
2) Εξόζες από το φυτό αγκινάρα της Ιερουσαλήμ (*Helianthus tuberosus*). Ο κόνδυλος του φυτού είναι πλούσιος σε ινουλίνη και σουκρόζη, καθιστώντας έτσι το φυτό μια εξαιρετική πηγή ζυμώσιμων σακχάρων που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως ένα εναλλακτικό φθινό υπόστρωμα για την ζύμωση της 2,3-βουτανοδιόλης.

3) Βιομηχανική γλυκερόλη προερχόμενη από εργοστάσια παραγωγής βιοντίζελ. Αν και το υπόστρωμα αυτό χρησιμοποιείται κυρίως για την σύνθεση 1,3-προπανοδιόλης, ανάλογα με τις συνθήκες καλλιέργειας και τα κατάλληλα βακτηριακά στελέχη θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί και για την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης. Ήδη καθαρή γλυκερόλη έχει αξιοποιηθεί για τον σχηματισμό της διόλης από τους Petrov & Petrova (2009; 2010).

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

Οι κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης είναι η διαθεσιμότητα του οξυγόνου, το pH, η θερμοκρασία και η συγκέντρωση του υποστρώματος. Η 2,3-βουτανοδιόλη παράγεται γενικά σε χαμηλή διαθεσιμότητα οξυγόνου και αποτελεί ένα κλασικό παράδειγμα αναερόβιας ζύμωσης, καθώς διατηρείται η οξειδοαναγωγική ισορροπία κατά την διάρκεια της γλυκόλυσης και της βιοσύνθεσης (Converti et al., 2003). Πρέπει να σημειωθεί, ότι οι περισσότερες μελέτες για την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης αφορούν προαιρετικά αναερόβιους μικροοργανισμούς, όπως *Klebsiella* sp. ή *B. polymyxa*. Η απόδοση της παραγωγής της 2,3-βουτανοδιόλης μπορεί να μεγιστοποιηθεί με την ελαχιστοποίηση του εφοδιασμού της ζύμωσης με οξυγόνο, διότι με αυτόν τον τρόπο περιορίζεται η διαδικασία της αναπνοής. Ωστόσο, με τη μείωση της διαθεσιμότητας του οξυγόνου η βιομάζα μειώνεται επίσης, και ως εκ τούτου η απόδοση σε 2,3-βουτανοδιόλη είναι μειωμένη. Επομένως, η αύξηση της συγκέντρωσης του οξυγόνου οδηγεί σε υψηλότερη πυκνότητα κυττάρων και (κατά κάποιο τρόπο) σε υψηλότερες αποδόσεις (Celińska &

Grajek, 2009). Ο λόγος της ζήτησης και της προσφοράς οξυγόνου μπορεί να ελέγξει τις αναλογίες των μεταβολικών προϊόντων, όπως φαίνεται και στο Σχήμα I-11 (de Mas et al., 1988). Σε γενικές γραμμές, η υψηλή συγκέντρωση οξυγόνου ευνοεί την κυτταρική ανάπτυξη, δηλαδή την αύξηση της βιομάζας και των εκπομπών διοξειδίου του άνθρακα, σε βάρος της παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης. Η διαθεσιμότητα σε οξυγόνο είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τη ταχύτητα ανάδευσης (agitation speed). Η ανάδευση είναι ιδιαίτερα σημαντική σε διεργασίες ζύμωσης, δεδομένου ότι αυξάνει την απόδοση της ζύμωσης με τη συνεχή έκθεση νέου υποστρώματος στην καλλιέργεια και τη διάδοση των μεταβολικών προϊόντων σε όλο τον όγκο του μέσου (Long & Patrick, 1963; Garg & Jain, 1995). Η ανάδευση γενικά αυξάνει σημαντικά την απόδοση σε 2,3-βουτανοδιόλη. Σε καλλιέργειες με *E. aerogenes* και *K. pneumoniae* με γλυκόζη ή λακτόζη ως υπόστρωμα σε ανάδευση 220 rpm, η παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης αυξήθηκε έως και 5 φορές στη ζύμωση γλυκόζης και μέχρι 15 φορές στη ζύμωση λακτόζης (Barret et al., 1983) σε σύγκριση με καλλιέργειες με μηδενική ανάδευση.



Σχήμα I-11: Επίδραση της διαθεσιμότητας σε οξυγόνο στην παραγωγή των μεταβολικών προϊόντων (de Mas et al., 1988).

Μεγάλη επιρροή στη διεργασία παραγωγής της 2,3-βουτανοδιόλης έχει και το pH. Οι αλκαλικές συνθήκες ευνοούν το σχηματισμό οργανικών οξέων με ταυτόχρονη μείωση της απόδοσης σε 2,3-βουτανοδιόλη (Garg & Jain, 1995). Αντιθέτως, υπό όξινες συνθήκες, η σύνθεση οργανικών οξέων είναι μειωμένη (πάνω από 10 φορές) και η σύνθεση της διόλης είναι αυξημένη (3 με 7 φορές). Ωστόσο, το βέλτιστο pH για την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το μικροοργανισμό και το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται. Στις περισσότερες αναερόβιες ζυμώσεις η ανάπτυξη του μικροοργανισμού γίνεται σε συνδυασμό με το σχηματισμό οργανικών οξέων. Έτσι, κατά τη διάρκεια της ζύμωσης το υπόστρωμα σταδιακά καταναλώνεται και η τάση που τελικά διαμορφώνεται είναι η αδρανοποίηση του μικροοργανισμού από τα δικά του τοξικά προϊόντα (Biebl et al., 1998). Ορισμένοι μικροοργανισμοί έχουν εξελίξει αμυντικές στρατηγικές, όπως η αλλαγή του μεταβολισμού τους ώστε να παράγουν λιγότερο τοξικές ενώσεις,

όπως αλκοόλες ή γλυκόλες (Van Houdt et al., 2007). Σε μια μελέτη (Maddox, 1996) για την εξήγηση του παραπάνω φαινομένου, θεωρήθηκε ότι η πιθανολογούμενη αιτία επαγωγής της 2,3-βουτανοδιόλης είναι η συσσώρευση των όξινων προϊόντων στο μέσο και όχι η τροποποίηση του pH. Σε καλλιέργειες του γένους *Klebsiella*, όταν το pH ήταν ουδέτερο παρατηρήθηκε σύνθεση οξικού οξέως και αιθανόλης και σε pH μικρότερο του 6 σύνθεση 2,3-βουτανοδιόλης και αιθανόλης (Biebl et al., 1998). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ίδιας μελέτης εάν το pH του μέσου είναι σταθερό (συγκεκριμένα στην τιμή 5,0 ή 7,0), τότε στο χαμηλότερο pH η τελική συγκέντρωση της 2,3-βουτανοδιόλης είναι υψηλότερη. Ωστόσο, η μέγιστη συγκέντρωση 2,3-βουτανοδιόλης επιτεύχθηκε όταν το pH δεν ελέγχονταν καθόλου (μειωνόταν συνεχώς με την αρχική τιμή του pH στο 7,0 και με την τελική τιμή του pH στο 5,5). Αυτό που είναι εξαιρετικά σημαντικό σύμφωνα με τους ερευνητές της μελέτης είναι ότι η σύνθεση της 2,3-βουτανοδιόλης δεν οφείλεται τόσο στην τιμή του pH, όσο στη παρουσία του οξικού οξέος. Ωστόσο, υποστηρίζουν πως η συσσώρευση οξέος δεν είναι ο μοναδικός παράγοντας που καθορίζει το σχηματισμό 2,3-βουτανοδιόλης, καθώς η βουτανοδιόλη παράγεται, επίσης, σε ουδέτερο pH με τη γλυκερόλη ως πηγή άνθρακα (Biebl et al., 1998).

Η αποτελεσματικότητα των βιοδιεργασιών είναι αυστηρά εξαρτημένη, εκτός από το pH, και από τη θερμοκρασία, καθώς η τελευταία επηρεάζει την ενζυμική δραστηριότητα και γενικότερα το μεταβολισμό των μικροοργανισμών (Garg & Jain, 1995). Ένα εύρος θερμοκρασιών από 30 έως 37 °C θεωρείται το βέλτιστο για βακτηριακή ζύμωση, δεδομένου ότι οι τιμές αυτές ευνοούν την μέγιστη παραγωγή βιομάζας. Εκατέρωθεν των τιμών αυτών η κυτταρική ανάπτυξη μειώνεται αισθητά. Σε θερμοκρασίες εντός του παραπάνω εύρους παρατηρείται αλλαγή του μεταβολισμού των βακτηρίων που έχει ως συνέπεια την σύνθεση διαφορετικών μεταβολικών προϊόντων ή το σχηματισμό των ίδιων προϊόντων αλλά σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Η τιμή της βέλτιστης θερμοκρασίας για την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης εξαρτάται άμεσα από το στέλεχος. Σύμφωνα με μελέτη (Biebl et al., 1998) σε καλλιέργειες με το είδος *K. pneumoniae* η μείωση της θερμοκρασίας από 35 °C στους 30 °C είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της σύνθεσης αιθανόλης και την αύξηση της σύνθεσης της 2,3-βουτανοδιόλης. Ως εκ τούτου, οι καλύτερες συνθήκες για τη μέγιστη παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης από καλλιέργειες με το είδος *K. pneumoniae* θεωρούνται: α) μη ελεγχόμενη αύξηση της οξύτητας με αρχικό pH όχι μικρότερο της τιμής 7,0 και β) θερμοκρασία που δεν υπερβαίνει τους 30 °C.

Όσον αφορά την επίδραση του υποστρώματος στην παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης εξαρτάται από την καθαρότητα της πηγής άνθρακα. Έτσι όταν το μέσο της καλλιέργειας αποτελείται από απόβλητα γεωργο-βιομηχανιών, πλούσια σε σάκχαρα, τότε η αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα είναι της τάξεως του 5-10% (Garg & Jain, 1995). Οι συγκεντρώσεις αυτές είναι σχετικά χαμηλές κυρίως λόγω των προσμίξεων που περιέχονται στα ακατέργαστα προς ζύμωση

υλικά. Η συγκέντρωση, μάλιστα, των προσμίξεων αυξάνει παράλληλα με την αύξηση της συγκέντρωσης της πηγής άνθρακα. Αντιθέτως στα συνθετικά μέσα που αποτελούνται από καθαρά σάκχαρα, όπως η γλυκόζη, η αυξημένη αρχική συγκέντρωση δεν θεωρείται παρεμποδιστική για την σύνθεση της διόλης. Έτσι ακόμη και σε αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 200 g/L, είναι εφικτή η παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης, ωστόσο, έχει παρατηρηθεί ότι η αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης των σακχάρων άνω των 20 g/L, έχει σαν συνέπεια την μείωση του ειδικού ρυθμού αύξησης, εξαιτίας της μειωμένης ενεργότητας νερού (a_w) (Celińska & Grajek, 2009). Πρέπει, βέβαια, να σημειωθεί ότι η μείωση της ενεργότητας του νερού είναι συνάρτηση της μοριακότητας του υποστρώματος. Επομένως, στη λακτόζη (δισακχαρίτης) η μείωση είναι μικρότερη από ότι στη γλυκόζη (μονοσακχαρίτης). Η παραγωγικότητα της 2,3-βουτανοδιόλης, όμως, ελάχιστα επηρεάζεται από την αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης του άνθρακα. Σε καλλιέργειες με το είδος *E. aerogenes*, η αρχική συγκέντρωση γλυκόζης από 9 έως 72 g/L αποδείχτηκε ότι δεν επηρέαζε την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης (Converti & Perego, 2002). Μέγιστες τιμές παραγωγικότητας εμφανίζονται σε αρχική συγκέντρωση περίπου 100 g/L (Celińska & Grajek, 2009), ενώ σε καλλιέργειες με το είδος *B. polymyxa* παρατηρήθηκε αναστολή της αύξησης σε συγκεντρώσεις πηγής άνθρακα άνω των 150 g/L (de Mas et al., 1988). Επίσης, σε συνεχείς καλλιέργειες το στέλεχος *K. pneumoniae* DSM 2026 σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 60 g/L ήταν σε θέση να καταναλώσει 9,2 g/L γλυκερόλη σε χρονικό διάστημα 12 ωρών. Μετά την πάροδο των 12 ωρών η ανάπτυξη του μικροοργανισμού σταματούσε (Biebl et al., 1998). Σε γενικές γραμμές, λοιπόν, διαπιστώνεται ότι το είδος και η συγκέντρωση του υποστρώματος επηρεάζουν την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης, ανάλογα με το είδος του μικροοργανισμού. Τέλος, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η προσθήκη οξικού οξέος σε συγκεντρώσεις έως 200 mM στο θρεπτικό μέσο βελτιώνουν την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης (Nakashimada et al., 2000).

I.4. Η ένωση "Αιθανόλη"

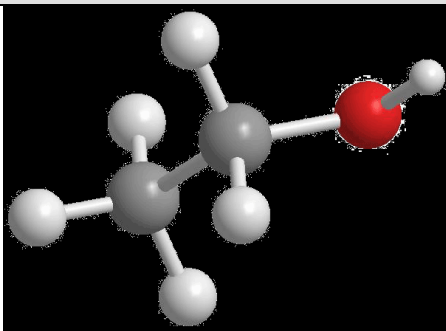
I.4.1. Γενικά χαρακτηριστικά αιθανόλης

Η αιθανόλη ή αιθυλική αλκοόλη, γνωστή και με την εμπειρική ονομασία οινόπνευμα, είναι μία οργανική ένωση με χημικό τύπο C_2H_5OH . Πρόκειται για ένα άχρωμο και εύφλεκτο υγρό, ευδιάλυτο στο νερό. Έχει ευχάριστη γεύση και σχετικά ευχάριστη, αν και δριμεία, οσμή. Η αιθανόλη αναμιγνύεται με το νερό σε κάθε αναλογία και κατά την ανάμειξη παρατηρείται ελάττωση όγκου, ενώ εκλύεται θερμότητα. Έχει μοριακή μάζα 46,07 g/mol, πολύ χαμηλό σημείο τήξης $-114\text{ }^\circ\text{C}$ και σημείο βρασμού περίπου $78\text{ }^\circ\text{C}$. Οι κυριότερες φυσικοχημικές ιδιότητες δίνονται στον Πίνακα I-7.

Η παραγωγή της αιθανόλης μπορεί να πραγματοποιηθεί χημικά μέσω του αιθενίου ή βιοτεχνολογικά μέσω της αλκοολικής ζύμωσης. Στην πρώτη περίπτωση η παραγόμενη αιθανόλη χαρακτηρίζεται ως συνθετική και προορίζεται κυρίως για βιομηχανική χρήση. Η βιοτεχνολογικά παραγόμενη αιθανόλη ονομάζεται βιοαιθανόλη και προέρχονται από την ζύμωση βιομάζας, κυρίως, φυτικής προέλευσης

Πίνακας I-7 : Φυσικοχημικές ιδιότητες της αιθανόλης

Γενικά χαρακτηριστικά		Συντακτικός τύπος
Χημική ονομασία:	αιθανόλη	$ \begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\ \quad \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{O}-\text{H} \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{H} \end{array} $
Μοριακός τύπος:	C_2H_6O	
Μοριακή μάζα:	46,07 g/mol	
Χημικές Ιδιότητες		Φυσικές Ιδιότητες
Σημείο τήξης:	$-114\text{ }^\circ\text{C}$	Άχρωμο
Σημείο βρασμού:	$78,37\text{ }^\circ\text{C}$	Πτητικό
Πυκνότητα:	0,789 g/mL	Εύφλεκτο
Τρισδιάστατη απεικόνιση μορίου		



I.4.2. Κυριότερες εφαρμογές της αιθανόλης

Μια από τις πλέον διαδεδομένες χρήσεις της αιθανόλης, γνωστή από την αρχαιότητα, είναι η παρασκευή οινοπνευματωδών ποτών. Όταν καταναλωθεί σε μικρές ποσότητες, προκαλεί αίσθημα ευφορίας, ωστόσο σε μεγαλύτερες ποσότητες διαταράσσει την ομαλή λειτουργία του εγκεφάλου, προκαλώντας την κατάσταση που χαρακτηρίζεται ως μέθη, ενώ σε ακόμη μεγαλύτερες ποσότητες προκαλεί απώλεια αισθήσεων και, σε σπάνιες περιπτώσεις, θάνατο.

Σε βιομηχανική κλίμακα χρησιμοποιείται ως διαλύτης διαφόρων ουσιών και ως συστατικό για την παραγωγή προϊόντων που προορίζονται για ανθρώπινη επαφή ή κατανάλωση, συμπεριλαμβανομένων αρωμάτων, αρωματικών και χρωστικών ουσιών. Επιπλέον βρίσκει εφαρμογή ως πρώτη ύλη για τη σύνθεση άλλων προϊόντων όπως μεθανόλης, διαιθυλαιθέρα, καρβοξυλικών εστέρων και άλλων. Χρησιμοποιείται, επίσης, ευρύτατα στην ιατρική ως απολυμαντικό (www.rsc.org).

I.4.2.1. Η βιοαιθανόλη ως καύσιμο

Η βιοτεχνολογικά παραγόμενη αιθανόλη, γνωστή ως βιοαιθανόλη, μπορεί να αξιοποιηθεί κατά κύριο λόγο ως καύσιμο μεταφορών σε κινητήρες εσωτερικής καύσης είτε αυτούσια είτε σε πρόσμιξη με την βενζίνη. Σε σύγκριση με τη βενζίνη έχει μεγαλύτερο αριθμό οκτανίων, μεγαλύτερη αναφλεξιμότητα, υψηλότερο σημείο βρασμού και δίδει καυσαέρια λιγότερο ρυπογόνα. Ωστόσο, υπολείπεται της βενζίνης όσον αφορά την εσωτερική ενέργεια (η βιοαιθανόλη παράγει το 66% της ενέργειας που παράγει η βενζίνη) και την τάση ατμών, με αποτέλεσμα να δυσχεραίνεται η ανάφλεξη ενός κρύου κινητήρα.

Η χρήση της βιοαιθανόλης ως καύσιμο προσφέρει σημαντικά οφέλη τόσο στο περιβάλλον όσο και σε κοινωνικό-οικονομικό επίπεδο. Το σημαντικότερο πλεονέκτημα της είναι το γεγονός ότι, σε αντίθεση με τα ορυκτά καύσιμα, αποτελεί μια ανεξάντλητη φυσική πηγή ενέργειας καθώς οποιοδήποτε υλικό περιέχει σάκχαρα μπορεί να αποτελέσει πηγή παραγωγής της. Επιπλέον, η χρήση της σαν καύσιμο συνεισφέρει σημαντικά στη μείωση των εκπεμπόμενων αερίων που συνδέονται με το φαινόμενο του θερμοκηπίου, δεδομένου ότι το διοξείδιο του άνθρακα που παράγεται κατά την καύση της, αφομοιώνεται από τα φυτά κατά τη φωτοσύνθεση, αποτελώντας μέρος του κύκλου του άνθρακα. Τα υψηλής συγκέντρωσης μίγματα αιθανόλης μειώνουν σε σημαντικό βαθμό τις εκπομπές σε μονοξείδιο του αζώτου, υδρογονανθράκων, βουταδιενίου και βενζονίου, πτητικών οργανικών ουσιών και μονοξειδίου του άνθρακα (Fukuda et al., 2009; & Cardona, 2010). Παράλληλα, η αιθανόλη αποικοδομείται εύκολα και λόγω της υψηλής διαλυτότητας της στο νερό και της χαμηλής τοξικότητάς της, ενώ δεν προκαλεί αρνητικές επιπτώσεις στο περιβάλλον σε περίπτωση διαρροής. Ταυτόχρονα σαν ενισχυτής οκτανίου αντικαθιστά αλλά επιβλαβή πρόσθετα. Η παραγωγή σε βιομηχανική κλίμακα από τοπικές

παραγωγικές μονάδες μπορεί να μειώσει την εξάρτηση από τις εισαγωγές πετρελαίου, δημιουργώντας παράλληλα νέες αναπτυξιακές προοπτικές (Hansen et al., 2005; Gray et al., 2006; Lin & Tanaka, 2006; Balat et al., 2008; Posada & Cardona, 2010; Sarkar et al., 2012).

Ωστόσο, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, υπολείπεται της βενζίνης όσον αφορά την εσωτερική ενέργεια (η βιοαιθανόλη παράγει το 66% της ενέργειας που παράγει η βενζίνη) και την τάση ατμών, με αποτέλεσμα να δυσχεραίνεται η ανάφλεξη ενός κρύου κινητήρα. Σε ζεστές καιρικές συνθήκες μπορεί ακόμη και να καταστρέψει τμήματα του συστήματος καυσίμων σε ορισμένους τύπους οχημάτων, σταματώντας τη ροή του μίγματος καυσίμου. Επίσης, μειονεκτήματα της βιοαιθανόλης αποτελούν η διαβρωτικότητα και η τοξικότητα της, καθώς και η χαμηλή φωτεινότητα της παραγόμενης φλόγας.

I.4.3. Βιοτεχνολογική παραγωγή της αιθανόλης

Η αλκοολική ζύμωση είναι η βιοδιεργασία παραγωγής αιθανόλης κατά την ζύμωση οργανικής ύλης από τους μικροοργανισμούς και οι εφαρμογές της είναι γνωστές από τα χρόνια της αρχαιότητας. Η διαδικασία παραγωγής περιλαμβάνει τρία στάδια. Στο πρώτο παραλαμβάνονται τα ζυμώσιμα σάκχαρα από τις πρώτες ύλες, με την βοήθεια φυσικών, χημικών ή ενζυμικών μεθόδων, στο δεύτερο μέσω της αλκοολικής ζύμωσης μετατρέπονται τα σάκχαρα σε αιθανόλη και τέλος με απόσταξη ανακτάται η παραγόμενη αιθανόλη. Οι μικροοργανισμοί που τελούν την αλκοολική ζύμωση είτε χρησιμοποιούνται άμεσα για τη μετατροπή των ζυμούμενων σακχάρων σε αιθανόλη, ή χρησιμοποιούνται έμμεσα για την παραγωγή μικροβιακών ενζύμων που λειτουργούν ως καταλύτες στις χημικές αντιδράσεις υδρόλυσης πιο σύνθετων υποστρωμάτων σε απλούστερα συστατικά, προκειμένου να πραγματοποιηθεί στη συνέχεια η αλκοολική ζύμωση (Lin & Tanaka, 2006).

Σε βιομηχανικό επίπεδο, η παραγωγή της αιθανόλης που προορίζεται για καύσιμο υλικό πραγματοποιείται με τη ζύμωση φυτικής ύλης που περιέχει σάκχαρα ή μπορεί να μετατραπεί σε σάκχαρα, καθώς και με τη ζύμωση βιομηχανικών και αστικών αποβλήτων, γεγονός που δίνει λύση στο πρόβλημα της απομάκρυνσης αυτών από το περιβάλλον. Τα υποστρώματα φυτικής προέλευσης που χρησιμοποιούνται για την βιοδιεργασία χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: τα σακχαρούχα, τα αμυλούχα και λιγνοκυτταρινούχα (Lin & Tanaka, 2006; Balat et al., 2008; Sankar et al., 2012). Στην κατηγορία των σακχαρούχων πρώτων υλών κατατάσσονται κάποια φρούτα πλούσια σε φρουκτόζη και σακχαρόζη, το σακχαροκάλαμο, τα σακχαρότευτλα, το γλυκό σόργο καθώς και τα προϊόντα επεξεργασίας αυτών, όπως είναι ο χυμός του σακχαροκάλαμου και η μελάσα. Οι αμυλούχες πρώτες ύλες περιλαμβάνουν πλήθος δημητριακών με κυριότερο τον αραβόσιτο και φυτά πλούσια σε άμυλο όπως η πατάτες και οι αγκινάρες. Το άμυλο πρέπει αρχικά να διασπαστεί σε απλά σάκχαρα και στη συνέχεια να μεταβολιστεί από τους μικροοργανισμούς. Στις λιγνοκυτταρινούχες πρώτες ύλες ανήκουν τα παραπροϊόντα από την επεξεργασία ξύλου, καλάμια,

και άχυρα (Lin & Tanaka, 2006; Balat et al., 2008). Η χρήση των υλών αυτών δεν είναι πάντοτε εφικτή κυρίως λόγω της εποχιακής διαθεσιμότητάς τους, του υψηλού κόστους μεταφοράς και αποθήκευσης, αλλά και λόγω των δυσκολιών που προκύπτουν κατά την κατεργασία της λιγνοκυτταρίνης. Τέλος η χρήση των αποβλήτων των βιομηχανιών χαρτιού και τροφίμων σαν πρώτες ύλες στη βιομηχανική παραγωγή της αιθανόλης αποτελεί μια λύση στο πρόβλημα της απομάκρυνσης των υλικών αυτών. Ωστόσο, η χαμηλή τους συγκέντρωση σε υδατάνθρακες αποτελεί περιοριστικό παράγοντα για τη χρήση τους (Mamma et al., 1996; Lin & Tanaka, 2006; Balat et al., 2008; Foteinis et al., 2011; Sarkar et al., 2012).

Σε ποσοστό της τάξης του 80% η αιθανόλη παράγεται σε παγκόσμιο επίπεδο μέσω μικροβιακών ζυμώσεων, με την ετήσια παραγωγή να ξεπερνά τα 51 δισεκατομμύρια λίτρα. Τις δύο πρώτες θέσεις στην παραγωγή αιθανόλης κατέχουν οι Η.Π.Α. και η Βραζιλία. Ακολουθούν η Κίνα, η Ινδία, η Ανατολική Ευρώπη και τέλος, με το μικρότερο ποσοστό παραγωγής καύσιμης αιθανόλης, η Δυτική Ευρώπη (Renewable Fuels Association, 2007; Fukuda et al., 2009). Κατά μέσο όρο, το 73% της παραγόμενης αιθανόλης σε παγκόσμια επίπεδο αντιστοιχεί σε καύσιμη αιθανόλη, 17% σε αιθανόλη ποτοποιίας και 10% σε αιθανόλη που προορίζεται για βιομηχανική χρήση (βιομηχανική αιθανόλη) (Sanchez & Cardona, 2008; Fukuda et al., 2009).

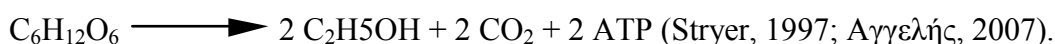
Στις Η.Π.Α. η παραγωγή πραγματοποιείται κυρίως από άμυλο αραβόσιτου και η αιθανόλη διατίθεται σαν καύσιμο στα αυτοκίνητα, αναμεμιγμένη με βενζίνη σε διάφορες αναλογίες. Σε ποσοστό 10% το μίγμα καυσίμου ονομάζεται E10 και είναι κατάλληλο για όλα σχεδόν τα αυτοκίνητα, ενώ σε καινούργια, κατάλληλης τεχνολογίας αυτοκίνητα (flex-fuel) χρησιμοποιείται μίγμα με 85% αιθανόλη (E85) ή και καθαρή αιθανόλη (E100). Στη Βραζιλία, όπου η αιθανόλη χρησιμοποιείται σαν καύσιμο στα αυτοκίνητα εδώ και δεκαετίες, η παραγωγή βασίζεται σχεδόν αποκλειστικά στο ζαχαροκάλαμο. Προσφέρεται σαν καύσιμο είτε αυτούσια (E100) σε αυτοκίνητα κατάλληλης τεχνολογίας (flex-fuel) ή αναμεμιγμένη με βενζίνη σε διάφορα ποσοστά. Το ελάχιστο ποσοστό αιθανόλης καθορίζεται από το κράτος, είναι συνήθως 20 έως 25% και πλέον δεν διατίθεται στη Βραζιλία βενζίνη χωρίς αιθανόλη. Στην Ευρώπη η παραγωγή αιθανόλης βασίζεται κυρίως στην επεξεργασία ζαχαρότευτλων. Στην Ελλάδα οι περισσότερες οινοπνευματοποιίες που λειτουργούσαν τις τελευταίες δεκαετίες είτε έχουν κλείσει ή έχουν σταματήσει να δραστηριοποιούνται στην παραγωγή αιθανόλης (Χατζηδήμας, Κονιόρδος, Ερκίς, Βότρυς, Κρόνος, Φαιστός και άλλοι). Μόνο η Β. Γ. Σπηλιόπουλος ABEE δραστηριοποιείται πλέον στην παραγωγή γεωργικής και οινικής αλκοόλης στο εργοστάσιό της στην Πάτρα.

I.4.4. Η αλκοολική ζύμωση

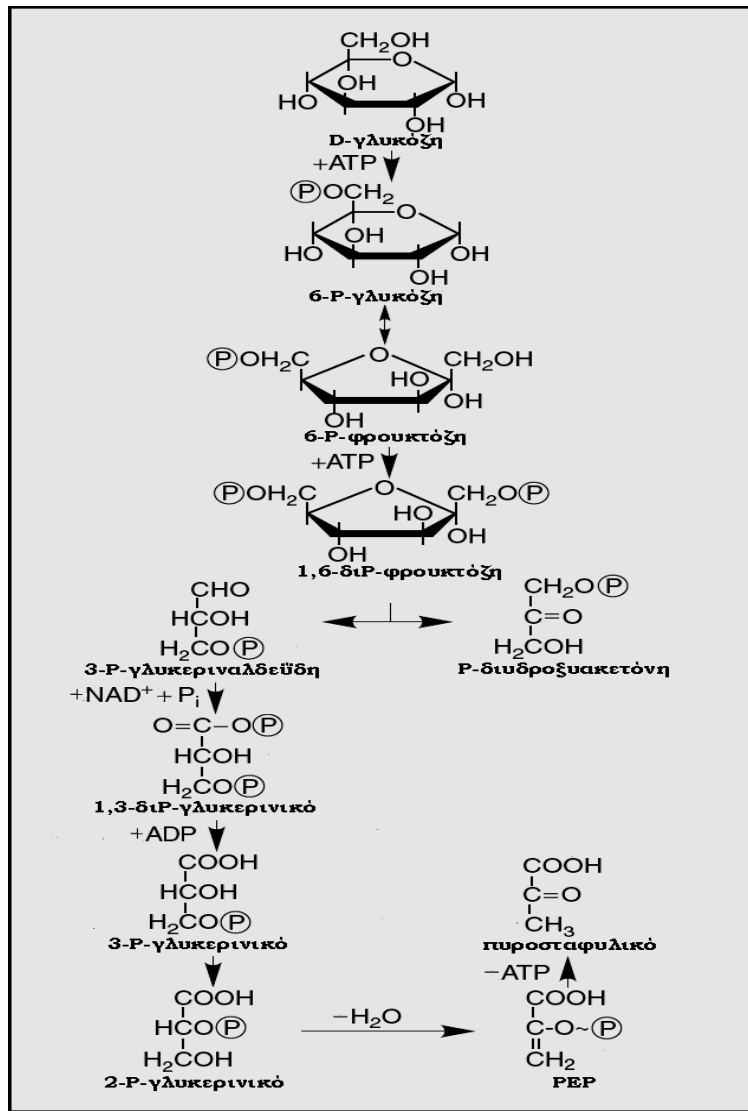
Αρκετοί μικροοργανισμοί (ζύμες και βακτήρια) έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν τα σάκχαρα προς σχηματισμό αιθανόλης, μέσω μιας αλληλουχίας αντιδράσεων που στο πρώτο στάδιο

περιλαμβάνει την γλυκόλυση, δηλαδή την μετατροπή της γλυκόζης σε πυροσταφυλικό οξύ μέσω δύο μεταβολικών οδών. Στην συνέχεια το πυροσταφυλικό οξύ μεταβολίζεται σε αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα.

Ο κύκλος της γλυκόλυσης ή το μεταβολικό μονοπάτι Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) απεικονίζεται στο (Σχήμα I-12). Η γλυκόζη μετά από μια σειρά αντιδράσεων φωσφορυλιώνεται και μετατρέπεται σε 1,6-διφωσφορική φρουκτόζη. Στο επόμενο στάδιο ένα μόριο της 1,6-διφωσφορικής φρουκτόζης διασπάται σε 3-φωσφορική-γλυκεριναλδεΐδη και φωσφορική διϋδροξυκετόνη, σε μια αντίδραση που καταλύεται από την αλδολάση. Η 3-φωσφορική-γλυκεριναλδεΐδη μπορεί να μετατρέπεται σε φωσφορική διϋδροξυκετόνη και αντίστροφα, σε μία αντιστρεπτή αντίδραση, καταλύεται από την ισομεράση της φωσφορικής τριόζης. Επειδή όμως καταναλώνεται μόνο η 3-φωσφορική-γλυκεριναλδεΐδη, πρακτικά από ένα μόριο 1,6-διφωσφορική φρουκτόζης προκύπτουν δύο μόρια 3-φωσφορικής-γλυκεριναλδεΐδης. Στις επόμενες αντιδράσεις η 3-φωσφορική-γλυκεριναλδεΐδη οξειδώνεται σε 1,3-διφωσφογλυκερινικό οξύ, μέσω την δράσης της αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής-γλυκεριναλδεΐδης. Στη συνέχεια η κινάση του φωσφορογλυκερικού καταλύει την μεταφορά μιας φωσφορικής ομάδας από το 1,3-διφωσφογλυκερινικό στο ADP κι έτσι σχηματίζεται το 3-φωσφορογλυκερινικό. Στο επόμενο στάδιο με την απομάκρυνση μιας ακόμη φωσφορικής ομάδας σχηματίζεται το 2-φωσφορογλυκερινικό. Το τελευταίο μετατρέπεται σε φωσφοενολοπυροσταφυλικό (PEP), σε μια αντίδραση που καταλύεται από την ενολάση. Στην τελευταία αντίδραση της γλυκόλυσης που καταλύεται από την κινάση του φωσφοενολοπυροσταφυλικού, το φωσφοενολοπυροσταφυλικό μετετρέπεται σε πυροσταφυλικό. Το καθαρό ενεργειακό κέρδος της αντίδρασης είναι δύο μόρια ATP για κάθε μόριο καταβολιζόμενης γλυκόζης, η δε συνολική αντίδραση του τυπικού γλυκολυτικού σχήματος και της συνακόλουθης παραγωγής αλκοόλης έχει ως εξής:

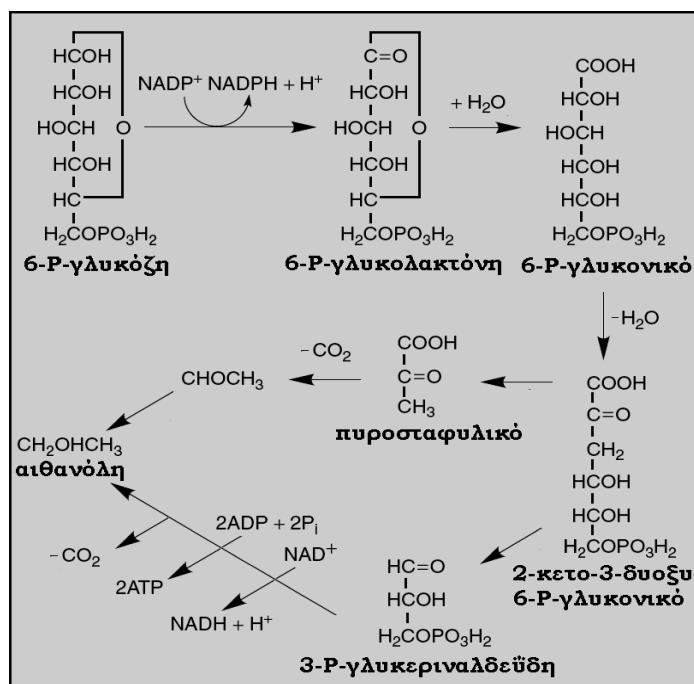
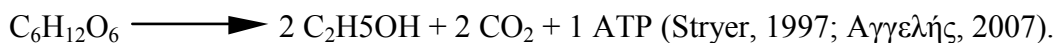


Από τους μικροοργανισμούς που παράγουν βιοαιθανόλη χρησιμοποιώντας σακχαρούχα υποστρώματα ως υλικά εκκίνησης, οι ζύμες (π.χ. *Saccharomyces cerevisia*, *Candida oleophila* κτλ) καταβολίζουν τα σάκχαρα μέσω του EMP σχήματος.



Σχήμα I-12: Ο κύκλος της γλυκόλυσης ή μονοπάτι Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) (Αγγελής, 2007).

Σε πολλά αναερόβια ή αερόβια βακτήρια ο καταβολισμός της γλυκόζης, πέραν του μονοπατιού της γλυκόλυσης (EMP), τελείται μέσω της γλυκολυτικής μεταβολικής οδού Entner-Dudoroff (E-D) (Σχήμα I-13). Στο μονοπάτι αυτό η 6-φωσφορική γλυκόζη μετατρέπεται σε 6-φωσφογλυκονικό οξύ, σε μια αντίδραση που καταλύεται από την αφυδρογονάση του 6-φωσφογλυκονικού οξέος. Στη συνέχεια το 6-φωσφογλυκονικό οξύ μετατρέπεται σε 2-κετο-3-δεοξυ-6-φωσφογλυκονικό οξύ, από την δράση της αφυδατάσης του 6-φωσφογλυκονικού. Το προϊόν αυτής της αντίδρασης μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό οξύ και 3-φωσφορική-γλυκεριναλδεΐδη, υπό την δράση της αλδολάσης του 2-κετο-3-δεοξυ-6-φωσφογλυκονικού. Από την 3-φωσφορική-γλυκεριναλδεΐδη παράγονται σάκχαρα με 4 και 5 άτομα άνθρακα, με τη μεσολάβηση των ενζύμων που συναντώνται στον κύκλο των φωσφορικών-πεντοζών. Το καθαρό ενεργειακό κέρδος της αντίδρασης είναι ένα μόριο ATP για κάθε μόριο καταβολιζόμενη γλυκόζη, το δε συνολικό τελικό αποτέλεσμα της παραγωγής αιθανόλης μέσω του ανωτέρω σχήματος (E-D) είναι:



Σχήμα I-13: Το μεταβολικό μονοπάτι Entner-Doudoroff (Αγγελής, 2007),

Κατά την αλκοολική ζύμωση, το πυροσταφυλικό οξύ αρχικά αποκαρβοξυλιώνεται και μετατρέπεται σε ακεταλδεΐδη με ταυτόχρονη απομάκρυνση ενός μορίου διοξειδίου του άνθρακα, σε μία αντίδραση που καταλύεται από την αποκαρβοξυλάση του πυροσταφυλικού οξέος. Σε δεύτερο στάδιο η ακεταλδεΐδη ανάγεται σε αιθανόλη, σε μία αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο αλκοολική αφυδρογονάση. Κατά την αλκοολική ζύμωση παράγονται μέσω του σχήματος EMP δύο μόρια ATP, για κάθε μόριο γλυκόζης που αποικοδομείται, ενώ από το σχήμα E-D παράγεται μόνο ένα μόριο ATP (Stryer, 1997; Αγγελής, 2007). Ο χαρακτηριστικός μικροοργανισμός που παράγει βιοαιθανόλη καταβολίζοντας σακχαρούχα υποστρώματα μέσω του μεταβολικού μονοπατιού E-D, είναι το βακτήριο *Zygomonas mobilis*.

I.4.5. Μικροοργανισμοί που βιοσυνθέτουν την αιθανόλη

Η βιοτεχνολογική παραγωγή της αιθανόλης μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη χρήση ενός μεγάλου αριθμού ζυμών και βακτηρίων (Lin & Tanaka, 2006). Ο πιο διαδεδομένος και ευρύτερα χρησιμοποιούμενος μικροοργανισμός σε εργαστηριακό και βιομηχανικό επίπεδο για βιοσύνθεση αιθανόλης είναι η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*, που χαρακτηρίζεται από την ιδιότητα παραγωγής αιθανόλης σε υψηλές συγκεντρώσεις που φτάνουν τα ~100-120 g/L (Sarris et al., 2009). Διακρίνεται για την υψηλή ζυμωτική ικανότητα, την ανθεκτικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης και την ιδιότητά να μπορεί να μεταβολίζει ένα μεγάλο αριθμό τόσο απλών σακχάρων όπως η γλυκόζη και η φρουκτόζη, αλλά και δισακχαριτών όπως η σακχαρόζη. Η ζύμη

Schizosachharomyces pombe έχει το πρόσθετο πλεονέκτημα της υψηλής ωσμωτικής ανοχής. Επιπλέον, μεταξύ των βακτηρίων το είδος *Zymomonas mobilis* χαρακτηρίζεται ως ένας μικροοργανισμός με υψηλή παραγωγή αιθανόλης που ανέρχεται σε ποσοστό 97% της μέγιστης θεωρητικής απόδοσης. Οι μέγιστες συγκεντρώσεις με βάση την διεθνή βιβλιογραφία κυμαίνονται μεταξύ ~60-75 g/L (Tao et al., 2005; Davis et al., 2006; Sarris et al., 2009). Η μέγιστη τιμή του συντελεστή απόδοσης παραγόμενης αιθανόλης είναι 0,51 g ανά g σακχάρου (Sarris et al., 2009).

Ωστόσο, το φάσμα των ζυμώσιμων υποστρωμάτων του παραπάνω βακτηρίου είναι πολύ στενό (γλυκόζη, φρουκτόζη και σακχαρόζη), γεγονός που περιορίζει τη χρήση του στις βιομηχανίες παραγωγής αιθανόλης (Lin & Tanaka, 2006). Το βακτήριο *Escherichia coli* έχει την ικανότητα του να ζυμώνει ένα ευρύ φάσμα σακχάρων, ενώ ταυτόχρονα οι απαιτήσεις του σε αυξητικούς παράγοντες είναι μικρές. Ωστόσο η αδυναμία ανάπτυξης σε ευρύ φάσμα pH πέραν του ουδέτερου (6.0-8.0), η μικρή ανθεκτικότητα του σε αιθανόλη, καθώς και οι επιφυλάξεις ως προς την ασφάλεια των στελεχών του, περιορίζουν την αξιοποίηση του στον τομέα της παραγωγής βιοενέργειας (Ohta et al., 1991; Lin & Tanaka, 2006).

Τα τελευταία χρόνια σε εργαστηριακή κλίμακα έχει χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα για την σύνθεση βιοαιθανόλης η γλυκερόλη. Με βάση την διεθνή βιβλιογραφία οι μικροοργανισμοί που έχουν μελετηθεί για την ικανότητα τους να μεταβολίζουν την γλυκερόλη προς παραγωγή αιθανόλης είναι στην πλειοψηφία τους βακτήρια, και σε μεμονωμένες περιπτώσεις ζύμες (Πίνακας I-8). Σε αρκετές περιπτώσεις τα χρησιμοποιούμενα στελέχη έχουν γενετικά τροποποιηθεί ώστε να βελτιωθεί η ικανότητα σύνθεσης αιθανόλης.

Πίνακας I-8: Σύνθεση αιθανόλης από προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς, κατά τον μεταβολισμό γλυκερόλης

Μικροοργανισμός			Αναφορά
Γένος	Είδος	Στέλεχος	
Ζύμες			
<i>Pachysolen</i>	<i>tannophilus</i>	CBS 4044	Liu et al. (2012)
<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	YPH 499 ^a	Yu et al. (2010a)/(2010b)
Βακτήρια			
<i>Enterobacter</i>		HU-101	Ito et al. (2005)
		NBRC 2010	Sakai & Yagishita (2007)
		ATCC 29007	Lee et al. (2012)
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	K-12 ^a	Dharmadi et al. (2006)
			Murarka et al. (2008)
		YD01	Yazdani & Gonzalez (2008)
<i>Klebsiella</i>	<i>oxytoca</i>	LDH3 ^a	Yang et al. (2007)
		M5al	Yang et al. (2007)
		DR3	Jarvis et al. (1997)
	<i>planticola</i>		

	<i>pneumoniae</i>	GEM 167/pBR-pdc-adh ^α	Oh et al. (2011)
		_{-β}	Oh et al. (2011)
		DSM 2026	Mu et al. (2011)
		BLH-1	Rossi et al. (2011)
	sp.	HE1	Wu et al. (2011)
<i>Kluyvera</i>	<i>cryocrescens</i>	S26	Choi et al. (2011)

α: ανασυνδυασμένο στελέχος

β: δεν αναφέρεται στην αντίστοιχη βιβλιογραφική αναφορά

Μολονότι η γλυκερόλη χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα κυρίως για την παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης, αρκετά ενθαρρυντικά είναι τα αποτελέσματα των ερευνών για την χρήση της και στην βιοσύνθεση αιθανόλης, με τις μέγιστες τιμές στη διεθνή βιβλιογραφία να ανέρχονται στα 21-27 g/L (Yazdani & Gonzalez, (2008); Choi et al., 2011; Oh et al., 2011). Η μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης (27 g/L) σημειώθηκε σε ασυνεχή καλλιέργεια του στελέχους *Kluyvera cryocrescens* S26, υπό μικροαερόφιλες συνθήκες (Choi et al., 2011). Αρκετά υψηλή παραγωγή αιθανόλης (15,9 g/L) επιτεύχθηκε σε ημι-συνεχή καλλιέργεια του γενετικά τροποποιημένου στελέχους *Klebsiella oxytoca* LDH3, από το οποίο είχε προηγουμένως είχε αφαιρεθεί το γονίδιο *ldhA* που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή της γαλακτικής αφυδρογονάσης. Η παραγόμενη αιθανόλη έλαβε μεγαλύτερη τιμή συγκριτικά με την αντίστοιχη καλλιέργεια του μητρικού στελέχους *Klebsiella oxytoca* M5al (Yang et al., 2007). Πιλοτική ζύμωση γλυκερόλης της τάξης των 5000L, πραγματοποιήθηκε από τους Cheng et al. (2007), κατά την οποία η μέγιστη τιμή αιθανόλης ανήλθε στα 18 g/L και η αντίστοιχη παραγωγικότητα στα 0,28 g/L/h.

Αν και οι παραγόμενες ποσότητες βιοαιθανόλης από γλυκερόλη είναι αρκετά χαμηλότερες, συγκριτικά με τις αντίστοιχες τιμές που λαμβάνονται από την ζύμωση σακχάρων, αξίζει να σημειωθεί ότι κόστος παραγωγής από γλυκερόλη είναι έως και 40% χαμηλότερο (Oh et al., 2011). Έτσι, ενώ η ανάπτυξη βιοδιεργασιών για την παραγωγή αιθανόλης έχει σχεδόν κορεστεί, θα μπορούσε να υπάρξει μια εξειδικευμένη αγορά για την βιοσύνθεση της από γλυκερόλη, λαμβάνοντας υπόψη το παγκόσμιο πλεόνασμα της ακατέργαστης γλυκερόλης και την συνεπακόλουθη μείωση της τιμής της (Choi et al., 2011). Με την ανάπτυξη νέων τεχνολογιών και την βοήθεια της γενετικής μηχανικής για την δημιουργία βελτιωμένων στελεχών, η παραγωγή αιθανόλης από γλυκερόλη είναι μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική διεργασία για την προμήθεια του βιοκαυσίμου.

I.5. Μικροοργανισμοί που μελετήθηκαν για την ικανότητά τους να μεταβολίζουν την γλυκερόλη

Τα μικροβιακά στελέχη που μελετήθηκαν στην παρούσα πτυχιακή μελέτη ανήκουν στην πλειοψηφία τους σε συλλογές του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και δίνονται στον Πίνακα I-9

Πίνακας I-9: Μικροοργανισμοί που μελετήθηκαν στην παρούσα πτυχιακή μελέτη

Γένος	Είδος	Αριθμός στελεχών
Clostridiaceae		
<i>Clostridium</i>	<i>butyricum</i>	1
Enterobacteriaceae		
<i>Citrobacter</i>	<i>freundii</i>	3
	<i>farmerii</i>	2
<i>Enterobacter</i>	<i>aerogenes</i>	2
	<i>ludwigii</i>	1
	sp.	1
<i>Klebsiella</i>	<i>oxytoca</i>	1
<i>Pantonea</i>	<i>dispersa</i>	1
Lactobacillaceae		
<i>Lactobacillus</i>	<i>brevis</i>	15
<i>Pentococcus</i>	<i>pentosaceus</i>	34
Leuconostocaceae		
<i>Leuconostoc</i>	<i>mesenteroides</i>	9
Bacillaceae		
<i>Bacillus</i>	<i>lincheniformis</i>	3
	<i>altitudinis</i>	1
	<i>subtilis</i>	1
	sp.	9

I.5.1. Γενικά χαρακτηριστικά του είδους *Clostridium butyricum*

Το είδος *Clostridium butyricum* ανήκει στην οικογένεια Clostridiaceae, της τάξης Clostridiales της κλάσης Clostridia του φύλου Firmicutes. Πρόκειται για ένα σποριογόνο, θετικό κατά Gram, αυστηρά αναερόβιο βακτήριο, και τα μεμονωμένα κύτταρα έχουν σχήμα ραβδίου (Collins et al., 1994). Στελέχη του είδους χρησιμοποιούνται για την παραγωγή βουτυρικού οξέος

και 1,3-προπανοδιόλης, μέσω της ζύμωσης της γλυκερόλης (Biebl et al., 1992; Petitdemange et al., 1995; Himmi et al., 1999; Papanikolaou et al., 2000; Biebl & Spröer., 2002)

I.5.2. Γενικά χαρακτηριστικά της οικογένειας Enterobacteriaceae

Τα βακτήρια της οικογένειας Enterobacteriaceae κατέχουν σημαντική θέση στην σύγχρονη Μικροβιολογία, χάρη στο πλήθος των ιδιοτήτων που κατέχουν. Ιδιαίτερα το είδος *Escherichia coli* και το γένος *Salmonella* sp. είναι τα πλέον πιο μελετημένα ως προς την διευκρίνιση των μεταβολικών μονοπατιών και την αλληλουχία των γονιδίων (P&ey et al., 1999). Σύμφωνα με το εγχειρίδιο Συστηματικής Βακτηριολογίας του Bergey's (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology) η οικογένεια είναι η μεγαλύτερη από τις τρεις της πέμπτης Ομάδας των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Είναι ο μοναδικός εκπρόσωπος της τάξης Enterobacteriales, της κλάσης Gammaproteobacteria του φύλου Proteobacteria (Πίνακας I-10). Περιλαμβάνει τριάντα γένη αρκετά από τα οποία απαντούν στο εντερικό σύστημα τόσο του ανθρώπου όσο και των ζώων και διαφέρουν ως προς την σοβαρότητα και την ένταση των ασθενειών που προκαλούν (P&ey et al., 1999).

Πίνακας I-10: Ταξινόμηση Οικογένειας Enterobacteriaceae

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

Τα στελέχη της οικογένειας είναι Gram-αρνητικά βακτήρια, προαιρετικά αναερόβια, μη σποριογόνα, σχήματος ράβδου και μεγέθους συνήθως 1-5 μm. Ζυμώνουν τα σάκχαρα μέσω του μεταβολικού μονοπατιού Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), προς παραγωγή γαλακτικού, οξικού, ηλεκτρικού και μυρμηκικού οξέος, καθώς και αιθανόλης και άλλων τελικών προϊόντων όπως 2,3-βουτανοδιόλη. Υφίσταται μεγάλη ποικιλομορφία στην σύνθεση των τελικών προϊόντων μεταξύ των διαφόρων στελεχών, αλλά και σημαντικές διαφοροποιήσεις ανάλογα με τις συνθήκες καλλιέργειας (Pandey et al., 1999). Τα περισσότερα είδη ανάγουν τα νιτρικά σε νιτρώδη. Σε αντίθεση με τα περισσότερα παρόμοια βακτήρια, στερούνται της οξειδάσης του κυτοχρώματος C, αν και υπάρχουν

εξαιρέσεις. Τα περισσότερα φέρουν μαστίγια (flangella) που χρησιμοποιούνται για την μετακίνηση τους, αν και μερικά γένη είναι μη κινητά (non-motile). Πολλά μέλη της οικογενείας αποτελούν μέρος της χλωρίδας του εντέρου ανθρώπων και ζώων, ενώ άλλα απαντώνται στο νερό ή στο έδαφος, ή είναι παράσιτα ζώων και φυτών.

Ορισμένα στελέχη είναι προαιρετικά παθογόνα και ευθύνονται για τροφιμογενείς και ενδο-νοσοκομειακές μολύνσεις. Οι τελευταίες μεταδίδονται στους ασθενείς μέσω των χειρουργικών εργαλείων, αναπνευστήρων, των κλινοσκεπασμάτων ακόμη και του προσωπικού των νοσοκομείων, συμπεριλαμβανομένων και των ιατρών. Χαρακτηριστικές περιπτώσεις είναι λοιμώξεις του κατώτερου αναπνευστικού από στελέχη του γένους *Klebsiella pneumoniae*, γαστρεντερίτιδες από στελέχη του είδους *E. coli* και του γένους *Salmonella* και *Shigella*, σηψαιμία(μόλυνση γνωστή και ως ενδοτοξικό σοκ) από στελέχη του είδους *E. coli* και λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος από στελέχη του είδους *E. coli* και *Enterobacter aerogenes*. Για την βιομηχανία και την ασφάλεια των τροφίμων κατέχουν σημαντική θέση εξαιτίας των λοιμώξεων που δύναται να προκαλέσουν. Για το λόγο αυτό θα πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στην τήρηση των κανόνων ορθής βιομηχανικής πρακτικής, ορθής υγιεινής πρακτικής και να λαμβάνονται μέτρα για την αποφυγή επιμολύνσεων σε όλα τα στάδια της επεξεργασίας των προϊόντων.

I.5.3. Γενικά χαρακτηριστικά των Γαλακτικών Βακτηρίων

Τα γαλακτικά βακτήρια αναφέρονται σε μία ομάδα βακτηρίων, τα οποία κατά τον μεταβολισμό των υδατανθράκων παράγουν ως κύριο μεταβολικό προϊόν γαλακτικό οξύ. Είναι θετικά κατά Gram, αρνητικά στην καταλάση και στην οξειδάση, μη σποριογόνα, μικροαερόφιλα βακτήρια και περιλαμβάνουν κόκκους και βάκιλλους. 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 και διοξείδιο του άνθρακα, καθώς και ακεταλδεΐδη και διακετύλιο (Carr et al., 2002).

Στην 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 στην συντήρησή τους με την *in situ* παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών, ενώ στελέχη γαλακτικών βακτηρίων χρησιμοποιούνται ως προβιοτικές καλλιέργειες και επιδρούν ευεργετικά στην υγεία βελτιώνοντας την ισορροπία της εντερικής χλωρίδας. Πιο συγκεκριμένα η παραγωγή του γαλακτικού οξέος στο γάλα κατά την ζύμωση της λακτόζης μειώνει το pH προκαλώντας έτσι αλλοδότηση των πρωτεϊνών με αποτέλεσμα να αλλάζει

η υφή του προϊόντος, ενώ ταυτοχρόνως 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; Vandenberg, 1993; De Vuyst & Vandamme, 1994; Stiles, 1994; Cleveland et al., 2001; Degan et al., 2006; Metsoviti et al., 2011).

Τα γαλακτικά βακτήρια περιλαμβάνουν τα γένη *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Aerococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*, *Kocuria*, *Propionibacterium* *Brevibacterium*, *Carnobacterium* και *Bifidobacterium* (Limsowtin et al., 2002). Για την 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).

I.5.4. Γενικά χαρακτηριστικά του γένους *Bacillus* sp.

Το γένος *Bacillus* ανήκει στην οικογένεια Bacillaceae της τάξης Bacillales της κλάσης Bacilli του φύλου Firmicutes. Περιλαμβάνει θετικά κατά Gram, ραβδοειδούς σχήματος, υποχρεωτικά αερόβια ή προαιρετικά αναερόβια βακτήρια (Claus & Berkeley, 1986; Nilegaonkar et al., 1992). Υπό δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες, τα κύτταρα παράγουν ενδοσπόρια που μπορούν να παραμείνουν αδρανή για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Πολλά είδη είναι σε θέση να εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες ενζύμων (de Mas et al., 1988). Το είδος *B. amyloliquefaciens* είναι η πηγή του ενζύμου άλφα αμυλάση που χρησιμοποιείται στην υδρόλυση του αμύλου, της πρωτεάσης σουμπτιλίσινης (subtilisin) που χρησιμοποιείται στα απορρυπαντικά και του ενζύμου BamH1 που χρησιμοποιείται στην έρευνα DNA (Alam et al., 1999).

I.6 Σκοπός της διδακτορικής διατριβής

Τις τελευταίες δεκαετίες η αυξημένη ζήτηση πετρελαίου από τις αναπτυσσόμενες χώρες, η σταδιακή μείωση των αποθεμάτων του και η συνεπακόλουθη αύξηση των τιμών του, οδήγησαν στην ανάγκη εξεύρεσης εναλλακτικών καυσίμων όπως το βιολογικό πετρέλαιο (βιοντίζελ), η βιοαιθανόλη και το βιοαέριο. Άμεση συνέπεια της αυξημένης παραγωγής βιοντίζελ είναι η συσσώρευση αντίστοιχα μεγάλων ποσοτήτων ακατέργαστης/βιομηχανικής γλυκερόλης, δεδομένου ότι παράγεται περίπου 1 kg γλυκερόλης ανά 10 kg παραγόμενου βιοντίζελ. Οι ποσότητες αυτές υπερβαίνουν τη ζήτηση σε γλυκερόλη με αποτέλεσμα αφενός μεν την δραματική μείωση της τιμής της, αφετέρου δε την αδυναμία διάθεσης των παραγόμενων ποσοτήτων που συχνά οδηγεί στη δαπανηρή λύση της απόρριψής της. Αν και η καθαρή γλυκερόλη έχει πολλές βιομηχανικές εφαρμογές, η χρησιμοποίηση της ακατέργαστης γλυκερόλης εμφανίζει διάφορα προβλήματα λόγω των ποικίλης φύσεως προσμίξεων που περιέχει. Έτσι, ενώ κατά το παρελθόν αποτελούσε ένα επιθυμητό παραπροϊόν που μπορούσε να συμβάλλει στην οικονομική βιωσιμότητα των εργοστασίων, πλέον θεωρείται απόβλητο με μηδενική ή/και αρνητική αξία. Για το λόγο αυτό η βιομηχανία αναζητά εναλλακτικές βιοτεχνολογικές λύσεις για την αύξηση της χρήσης των αποθεμάτων της γλυκερόλης. Η μετατροπή της βιομηχανικής γλυκερόλης προς προϊόντα υψηλότερης αξίας θα μπορούσε να είναι μια οικονομική, όσο και οικολογική λύση για τις βιομηχανίες βιοντίζελ, δεδομένου ότι το κόστος του υποστρώματος για μικροβιακή παραγωγή χημικών ενώσεων μπορεί να φτάσει έως και το ήμισυ του συνολικού κόστους παραγωγής. Μέχρι σήμερα σε ερευνητικό κυρίως επίπεδο η κυριότερη και πιο ελπιδοφόρα μετατροπή της γλυκερόλης σχετίζεται με την προπανοδιολική ζύμωση, υπό αναερόβιες συνθήκες. Οι κυριότεροι προκαρυωτικοί μικροοργανισμοί-φυσικά στελέχη παραγωγής ανήκουν στα γένη *Klebsiella*, *Clostridium*, *Citrobacter*, *Enterobacter* και *Lactobacillus*. Μεταξύ αυτών, η μεγαλύτερη προσοχή έχει δοθεί στα είδη *K. pneumoniae* και *Cl. butyricum*, καθώς εμφανίζουν τις υψηλότερες τιμές συγκέντρωσης και παραγωγικότητας. Προσφάτως ένας περιορισμένος αριθμός μελετών σχετίζεται με την βιο-σύνθεση 2,3-βουτανοδιόλης και αιθανόλης, ως τα κύρια προϊόντα του μικροβιακού μεταβολισμού της γλυκερόλης.

Στα πλαίσια του ανωτέρω περιγράμματος κινείται η παρούσα διδακτορική διατριβή. Αρχικά διερευνήθηκε η ικανότητα αφομοίωσης της βιομηχανικής γλυκερόλης από φυσικά και όχι προηγουμένως μελετημένα στελέχη των συλλογών του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, προς παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης, 2,3-βουτανοδιόλης και αιθανόλης. Έτσι, πραγματοποιήθηκε μια εκτενής επιλογή (screening) προκαρυωτικών μικροβιακών στελεχών σχετικά με την δυνατότητά τους να χρησιμοποιούν την γλυκερόλη ως υπόστρωμα αύξησης. Κατόπιν, μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του υποστρώματος και των συνθηκών καλλιέργειας, στην αύξηση των πιο υποσχόμενων από τα προηγουμένως επιλεχθέντα στελέχη, σε

υποστρώματα με βάση την βιομηχανική γλυκερόλη και στην παραγωγή των μεταβολικών προϊόντων.

II. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

II.1. Βιολογικό υλικό

Τα μικροβιακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή ανήκουν στην πλειοψηφία τους σε συλλογές του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και δίνονται στον Πίνακα II-1. Τα στελέχη της οικογένειας Enterobacteriaceae απομονώθηκαν από καρπούς σταφυλής προσβεβλημένους από τον μύκητα *Botrytis* sp., καθώς και από προϊόντα κρέατος συσκευασμένα σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας, ενώ τα στελέχη που ανήκουν στην ομάδα των γαλακτικών βακτηρίων έχουν απομονωθεί από προζύμι (Drosinos et al., 2007; Paramothiotis et al., 2010; Doulgeraki et al., 2011). Το στέλεχος *Clostridium butyricum* NRRL B-23495 παραχωρήθηκε από την συλλογή NRRL (Peoria, ΗΠΑ). Μακροχρόνια αποθήκευση πραγματοποιήθηκε στους -80 ° C σε Tryptic Soy Broth (TSB), συμπληρωμένο με γλυκερίνη 20% (Sigma Chemical Co, St Louis, Missouri, ΗΠΑ). Τα στελέχη κατόπιν ανανέωσης τους επωάζονται σε θερμοστατούμενο κλίβανο στις άριστες συνθήκες θερμοκρασίας για κάθε στέλεχος, σε σωλήνες με υπόστρωμα προκαλλιέργειας (Πίνακας II-2) και διατηρούνται σε θερμοκρασία 4±1 °C. Επίσης, προκειμένου να διατηρηθεί η ζωτικότητα των στελεχών, πραγματοποιούνταν ανανεώσεις κάθε ένα μήνα.

Πίνακας II-1: Μικροοργανισμοί που μελετήθηκαν στην παρούσα πτυχιακή μελέτη.

Οικογένεια	Γένος	Είδος	Στέλεχος		Συλλογή
			Πλήθος	Αριθμός συλλογής	
Clostridiaceae	<i>Clostridium</i>	<i>butyricum</i>	1	NRRL-B23495	NRRL
Enterobacteriaceae	<i>Citrobacter</i>	<i>freundii</i>	3	FMCC-B 294 (VK-19), FMCC-8, FMCC-207	EMBT
		<i>farmeri</i>	2	FMCC-5, FMCC-7	EMBT
	<i>Enterobacter</i>	<i>aerogenes</i>	2	FMCC-9, FMCC-10	EMBT
		<i>ludwigii</i>	1	FMCC-204	EMBT
		sp.	1	FMCC-208	EMBT
	<i>Klebsiella</i>	<i>oxytoca</i>	1	FMCC-197	EMBT
	<i>Pantonea</i>	<i>dispersa</i>	1	FMCC-200	EMBT
Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>	<i>brevis</i>	15		ΕΠΕΥΤ
	<i>Pentiococcus</i>	<i>pentosaceus</i>	34		ΕΠΕΥΤ
Leuconostocaceae	<i>Leuconostoc</i>	<i>mesenteroides</i>	9		ΕΠΕΥΤ
Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	<i>lincheniformis</i>	3	FMCC-91, FMCC-92, FMCC- 98	EMBT
		<i>altitudinis</i>	1	FMCC-102	EMBT
		<i>subtilis</i>	1	FMCC-206	EMBT
		sp.	9		ΕΠΕΥΤ

EMBT: Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων
 ΕΠΕΥΤ: Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων

II.2. Υποστρώματα - Συνθήκες καλλιέργειας

Πριν από κάθε εμβολιασμό, όλα τα στελέχη ανανεώνονταν δύο φορές και επωάζονταν στη βέλτιστη θερμοκρασία για 24 ώρες (πρώτη ανανέωση) και 16-20 ώρες (δεύτερη ανανέωση). Το υπόστρωμα της προκαλλιέργειας διέφερε ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο στέλεχος (Πίνακας II-2).

II.2.1. Ασυνεχείς καλλιέργειες σε φιάλες σε υποστρώματα καθαρής γλυκερόλης

Το πρώτο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας είχε ως στόχο να διερευνηθεί η δυνατότητα όλων των βακτηριακών στελεχών να αφομοιώσουν την καθαρή γλυκερόλη. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν ασυνεχείς καλλιέργειες με την γλυκερόλη είτε ως μοναδική πηγή άνθρακα, είτε ως συνυπόστρωμα γλυκόζης σε αναλογία 3:1.

Το θρεπτικό υπόστρωμα A (ΘΥ-A) που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια του στελέχους *Cl. butyricum*, περιείχε ανά λίτρο (L): γλυκερόλη 20 g, NH₄Cl 2 g, KCl 0,75 g, NaH₂PO₄ 1,38 g, Na₂SO₄ 0,28 g, citric acid 0,42 g, yeast extract 1,0 g, MgCl₂ 6H₂O 0,26 g, CaCl₂ H₂O 2,9 mg, 1,0 mL διάλυμα Fe, 2,0 mL διάλυμα ιχνοστοιχείων. Η σύσταση του διαλύματος Fe ανά L ήταν: FeSO₄ 7H₂O 5 g, HCl (37%) 4 mL, ενώ το διάλυμα ιχνοστοιχείων περιείχε ανά L: ZnCl₂ 70 mg, MnCl₂ 4H₂O 0,1 g, H₃BO₃ 60 mg, CoCl₂ 2H₂O 0,2 g, CuCl₂ 2H₂O 20 mg, NiCl₂ 6H₂O 25 mg, Na₂MoO₄ 2H₂O 35 mg, HCl (37%) 0,9 mL.

Το θρεπτικό υπόστρωμα B (ΘΥ-B) που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια των στελεχών των οικογενειών Enterobacteriaceae, Lactobacillaceae, Leuconostocaceae και Bacillaceae περιείχε ανά λίτρο: γλυκόζη (καθαρότητα 99%) 5 g, γλυκερόλη 15 g, πεπτόνη 5 g, εκχύλισμα κρέατος (meat extract) 5 g, εκχύλισμα ζύμης (yeast extract) 2,5 g, K₂HPO₄ 2 g, CH₃COONa 5 g, MgSO₄ 0,41 g και MnSO₄ 0,05 g.

Πίνακας II-2: Υποστρώματα και συνθήκες καλλιέργειας κατά την αύξηση όλων των εξεταζόμενων βακτηριακών στελεχών σε υγρές καλλιέργειες σε υποστρώματα καθαρής γλυκερόλης.

Οικογένεια	Υπόστρωμα		Είδος φιάλης	Συνθήκες καλλιέργειας			Συνθήκες αεροβίωσης – αναερόβιωσης
	Προκαλλιέργειας	Αρχικής Καλλιέργειας		θ (°C)	pH	Ανάδευση (rpm)	
Clostridiaceae	RCM	ΘΥ-A	Φιάλες αναερόβιωσης (50 mL)	37	6,8	80 ± 5	Αναερόβιες
Eterobacteriaceae	TSB	ΘΥ-B	Φιάλες αναερόβιωσης (50 mL)	30	7,0	80 ± 5	Αναερόβιες

Οικογένεια	Υπόστρωμα		Είδος φιάλης	Συνθήκες καλλιέργειας			Συνθήκες αεροβίωσης – αναεροβίωσης
	Προκαλλιέργειας	Αρχικής Καλλιέργειας		θ (°C)	pH	Ανάδευση (rpm)	
Lactobacillaceae	MRS	ΘΥ-B	Κωνικές φιάλες (50 mL)	30	7,0	150 ± 5	Αερόβιες
Leuconostocaceae	MRS	ΘΥ-B	Κωνικές φιάλες (50 mL)	30	7,0	150 ± 5	Αερόβιες
Bacillaceae	MRS	ΘΥ-B	Κωνικές φιάλες (50 mL)	30	7,0	150 ± 5	Αερόβιες

RCM: Reinforced Clostridium medium

TSB: Tryptic Soy Broth

II.2.2. Ασυνεχείς καλλιέργειες σε φιάλες σε υποστρώματα βιομηχανικής γλυκερόλης

Τα στελέχη τα οποία στο πρώτο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας αφομοίωσαν την καθαρή γλυκερόλη, αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα με βιομηχανική γλυκερόλη ως μοναδική πηγή άνθρακα. Η σύσταση του θρεπτικού υποστρώματος Γ (ΘΥ-Γ) ήταν ανά λίτρο: βιομηχανική γλυκερόλη 20 g, πεπτόνη 5 g, εκχύλισμα κρέατος (meat extract) 5 g, εκχύλισμα ζύμης (yeast extract) 2,5 g, K₂HPO₄ 2 g, CH₃COONa 5 g, MgSO₄ 0,41 g και MnSO₄ 0,05 g. Η χρησιμοποιούμενη βιομηχανική γλυκερόλη προήλθε από την γερμανική βιομηχανία παραγωγής βιοντίζελ "Archer Daniels Midland (ADM) Industries" (Αμβούργο, Γερμανία) και την πρώτη ύλη για την παραγωγή του βιοντίζελ αποτέλεσαν φυτικά έλαια, προερχόμενα από καρπό ελαιοκράμβης. Η καθαρότητα σε γλυκερόλη ήταν 81% w/w, ενώ οι προσμίξεις που περιείχε ήταν: νερό 11-12% w/w, άλατα του καλίου 5-6% w/w, ελεύθερα λιπαρά οξέα 1% w/w και μεθανόλη σε ποσοστό λιγότερο από 0,2% w/w. Επιπλέον για τα στελέχη που εμφάνισαν ικανοποιητική αύξηση στην συγκεκριμένη ακάθαρτη γλυκερόλη, μελετήθηκε η αύξηση τους σε δύο ακόμη τύπους βιομηχανικής γλυκερόλης προερχόμενες από τις ελληνικές βιομηχανίες παραγωγής βιοκαυσίμων τις "ΕΛΙΝ Βιοκαύσιμα Α.Ε." (Αττική) και "GF Energy Α.Ε.Β.Ε." (Κόρινθος). Η πρώτη εταιρεία χρησιμοποιεί ως υλικό εκκίνησης για την παραγωγή του βιοκαυσίμου ζωικά λίπη και χρησιμοποιούμενα μαγειρικά έλαια, όπως τηγανέλαια, ενώ η δεύτερη εταιρεία φυτικά έλαια. Η περιεκτικότητα σε γλυκερόλη και οι λοιπές προσμίξεις για τις βιομηχανικές γλυκερόλες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη δίνονται στον Πίνακα II-3.

Πίνακας II-3: Σύσταση βιομηχανικών γλυκερολών.

	ADM Industries	"ΕΛΙΝ Βιοκαύσιμα Α.Ε."	"GF Energy A.E.B.E."
Πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοκαυσίμου	Φυτικά έλαια	Χρησιμοποιούμενα μαγειρικά έλαια	Φυτικά έλαια
Γλυκερόλη (% κ.β.)	81,0	90,0	85,5
Νερό (% κ.β.)	11,0-12,0	5,0	10,0
Ελεύθερα λιπαρά οξέα (% κ.β.)	1,0	4,8	0,7
Άλατα (% κ.β.)	5,0-6,0	-	4,0-5,0
Μεθανόλη (% κ.β.)	<0,2	<0,2	-

Ανάλογα με τις απαιτήσεις των μικροοργανισμών σε οξυγόνο διενεργήθηκαν καλλιέργειες είτε υπό αναερόβιες είτε υπό ανερόβιες συνθήκες. Συγκεκριμένα οι αναερόβιες καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε φιάλες τύπου Duran 1-L (Εικόνα II-1), πληρωμένες κατά τα 4/5 τους (800±10 ml) από το ΘΥ-Γ (Εικόνα II-1). Για την επίτευξη αναερόβιων συνθηκών οι φιάλες υφίσταντο σπαργή με άζωτο για 30 λεπτά, πριν την αποστείρωση. Στη συνέχεια οι φιάλες τοποθετήθηκαν σε αυτόκλειστο όπου και αποστειρώθηκαν (115 °C, 20 min). Το pH του θρεπτικού υποστρώματος μετά την αποστείρωση είχε τιμή 7,0±0,2 και ήταν μη-ελεγχόμενο κατά την διάρκεια της ζύμωσης. Οι φιάλες εμβολιάζονταν υπό ασηπτικές συνθήκες με 5% εμβόλιο και επωάζονταν σε ανακινούμενη επωαστική τράπεζα τύπου Libline incubator shaker (80 rpm) σε θερμοκρασία 30°C τα εντεροβακτήρια και 37°C το στέλεχος *Cl. butyricum*.

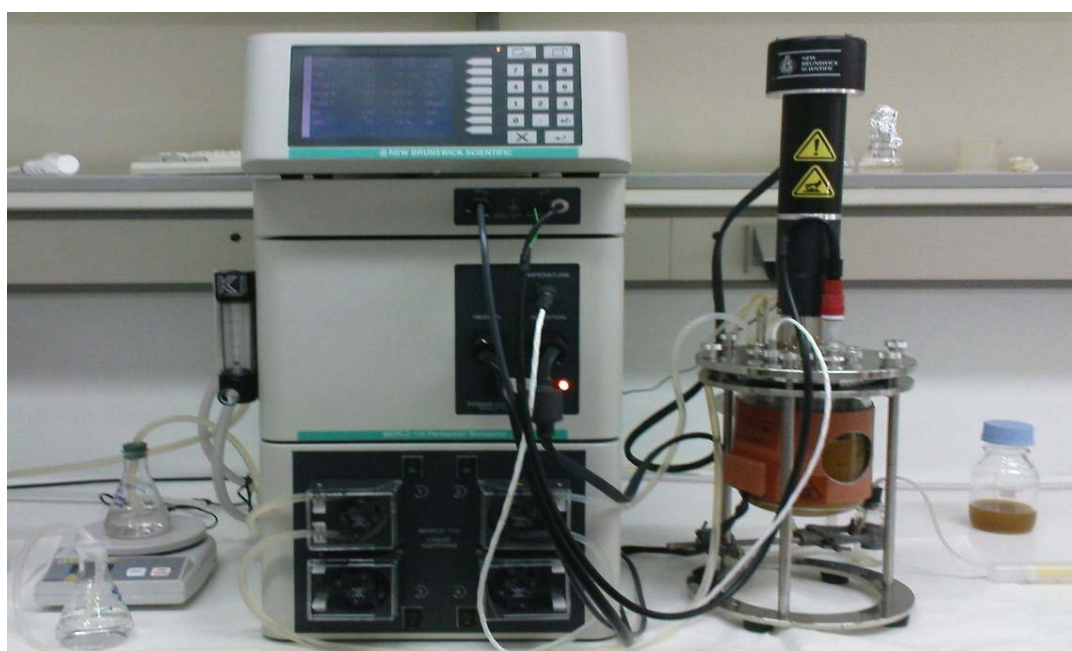


Εικόνα II-1: Φιάλες τύπου Duran 1-L, πληρωμένες κατά τα 4/5 τους.

Οι αερόβιες καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες των 250 mL, πληρωμένες κατά το 1/5 τους (50±1 mL) από το ΘΥ-Γ. Οι φιάλες τοποθετήθηκαν σε αυτόκλειστο όπου και αποστειρώθηκαν (115 °C, 20 min). Το pH του θρεπτικού υποστρώματος μετά την αποστείρωση είχε τιμή 7,0±0,2 και ήταν μη-ελεγχόμενο κατά την διάρκεια της ζύμωσης. Οι φιάλες εμβολιάζονταν υπό ασηπτικές συνθήκες με 1% εμβόλιο και επωάζονταν σε ανακινούμενη επωαστική τράπεζα τύπου Libline incubator shaker (150 rpm, 30 °C).

II.2.3. Ασυνεχείς και ημι-συνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα σε υποστρώματα βιομηχανικής γλυκερόλης

Προκειμένου να αξιολογηθεί περαιτέρω η δυνατότητα ανάπτυξης των στελεχών *Cl. butyricum* NRRL B-23495, *C. freundii* FMCC-B 294 (VK-19), *C. freundii* FMCC-207, *K. oxytoca* FMCC-197 και *E. aerogenes* FMCC-10 στην ακάθαρτη γλυκερόλη, πραγματοποιήθηκαν ασυνεχείς και ημισυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα 1,2-L (New Brunswick Scientific, ΗΠΑ), με ενεργό όγκο 0,9 L (Εικόνα II-2). Η σύσταση του θρεπτικού μέσου για την καλλιέργεια του στελέχους *Cl. butyricum* ήταν όμοια με το ΘΥ-A, ενώ στις καλλιέργειες των υπολοίπων στελεχών χρησιμοποιήθηκε το ΘΥ-Γ. Στις ημι-συνεχείς καλλιέργειες πριν την εξάντληση της πηγής άνθρακα γινόταν προσθήκη πυκνού διαλύματος υπό ασηπτικές συνθήκες. Στα πειράματα υπό ασηπτικές συνθήκες προστέθηκε ποσότητα εμβολίου 5% v/v, ενώ στις περιπτώσεις των μη ασηπτικών συνθηκών η ποσότητα του εμβολίου ανήλθε στα 10% v/v. Η ανάδευση διατηρήθηκε στις 150 ± 5 rpm, εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά στις συνθήκες της εκάστοτε καλλιέργειας. Η τιμή του pH παρέμεινε σταθερή σε όλη την διάρκεια της ζύμωσης (εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά στις συνθήκες της εκάστοτε καλλιέργειας) με την προσθήκη NaOH 5M, και είχε τιμή 7,0 στις καλλιέργειες των εντεροβακτηριδίων και 6,8 στην καλλιέργεια του στελέχους *Cl. butyricum*. Οι συνθήκες θερμοκρασίας ήταν όμοιες με τις υγρές καλλιέργειες. Τέλος για την διατήρηση αναερόβιων συνθηκών γινόταν εμφύσηση αζώτου καθόλη την διάρκεια της ζύμωσης με ροή 0,1 LPM, ενώ στην περίπτωση αερόβιων συνθηκών γινόταν εμφύσηση αέρα καθόλη την διάρκεια της ζύμωσης με σταθερή ροή.



Εικόνα II-2: Βιοαντιδραστήρας συνολικού όγκου 1,2-L (New Brunswick Scientific, ΗΠΑ) κατά την διάρκεια ασυνεχούς καλλιέργειας στο χώρο του εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων.

II.3 Αναλύσεις

II.3.1. Προσδιορισμός pH

Το pH της καλλιέργειας μετρήθηκε με pH-μετρο τύπου Jenway 3020 pHmeter.

II.3.2. Προσδιορισμός βιομάζας

Ο προσδιορισμός της βιομάζας έγινε με μέτρηση του ξηρού βάρους. Αρχικά οι καλλιέργειες φυγοκεντρήθηκαν σε φυγόκεντρο τύπου Heraeus Sepatech Suprafufe 22 (1000 rpm, 15min, 9°C). Ακολουθούσε έκπλυση με απιονισμένο νερό και τα κύτταρα φυγοκεντρούνταν για δεύτερη φορά. Μετά τη στράγγιση η βιομάζα μεταφερόταν σε προζυγισμένα φιαλίδια και στη συνέχεια σε φούρνο προς ξήρανση (85° C) μέχρι σταθεροποίησης του βάρους. Το ξηρό υπόλειμμα ζυγίζόταν σε ζυγό ακριβείας τύπου Sartorius basic (4 δεκαδικών ψηφίων) και εκφραζόταν σε g/l.

II.3.3. Προσδιορισμός Διαλυτού οξυγόνου

Το διαλυμένο O₂ μετρήθηκε με φορητό οξυγονόμετρο τύπου Lovibond Oxi200 Sensodirect. Κατά την διαδικασία της μέτρησης, το ηλεκτρόδιο τοποθετείται εντός της κωνικής φιάλης και η τελευταία εντός του ανακινούμενου επωαστικού κλιβάνου. Κατόπιν σταματά η ανάδευση και λαμβάνονται μετρήσεις διαλυμένου οξυγόνου % κάθε 5 sec, μέχρι το χρονικό σημείο των 20 sec.

II.3.4. Προσδιορισμός γλυκόζης, γλυκερόλης, 1,3-προπανοδιόλης 2,3-βουτανοδιόλης, αιθανόλης και οργανικών οξέων

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης γλυκόζης, γλυκερόλης, 1,3-προπανοδιόλης, 2,3-βουτανοδιόλης, αιθανόλης και των οργανικών οξέων έγινε με την χρήση της υγρής χρωματογραφίας υψηλής αποδόσεως (HPLC) σε σύστημα Waters 600E. Η ανίχνευση της γλυκόζης, γλυκερόλης, 1,3-προπανοδιόλης, 2,3-βουτανοδιόλης και αιθανόλης έγινε με ανιχνευτή UV, ενώ των οργανικών οξέων έγινε σε σύστημα RI (Waters 486), εφοδιασμένο με διαφορικό διαθλασίμετρο (Metsovit et al., 2012).

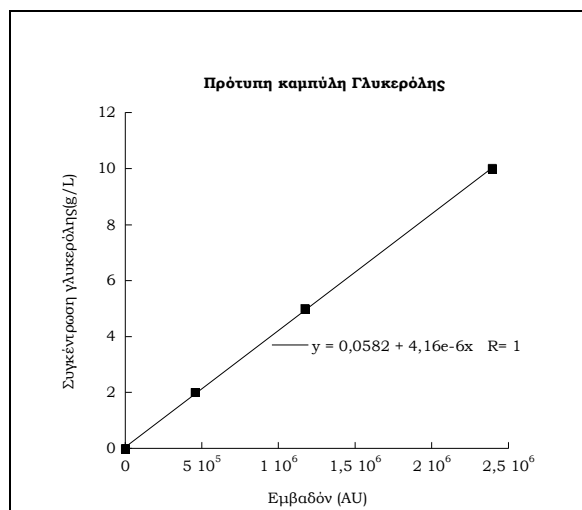
Η ταυτοποίηση των μεταβολικών προϊόντων βασίστηκε στον χρόνο κατακράτησης, ο οποίος συγκρίθηκε με γνωστά δείγματα οργανικών οξέων και αιθανόλης. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε αραιό διάλυμα H₂SO₄ (0.002M) και η ροή της ρυθμίστηκε στα 0.6 ml/min. Η στήλη με την οποία έγινε ο διαχωρισμός του μίγματος ήταν τύπου Aminex HPX-87H (BIO-Rad) και θερμοκρασίας 57 °C. Από τη στήλη περνούσαν 20 μl δείγματος και η διάρκεια της ανάλυσης ήταν 20 min.

Με τη χρήση προτύπων διαλυμάτων προέκυψαν οι εξισώσεις που παρουσιάζονται στον Πίνακα II-4 με τη βοήθεια των οποίων υπολογίστηκε η συγκέντρωση των συστατικών του

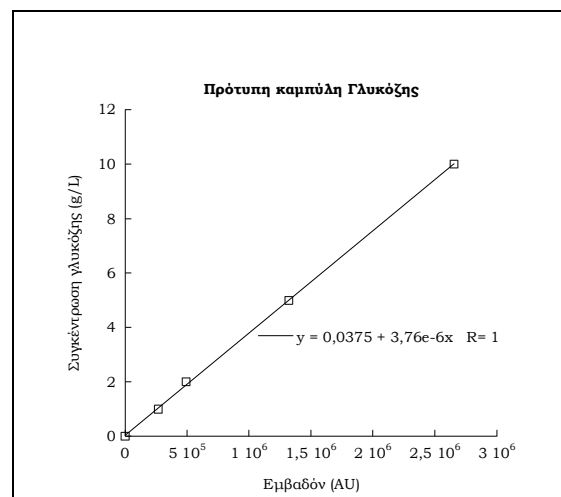
υποστρώματος και των προϊόντων της ζύμωσης. Στις εξισώσεις με C συμβολίζεται η συγκέντρωση σε g/L και με E συμβολίζεται το εμβαδό (area) σε αυθαίρετες μονάδες (A.U).

Πίνακας II-4: Εξισώσεις HPLC κατά τον ποσοτικό προσδιορισμό των διαφόρων ενώσεων.

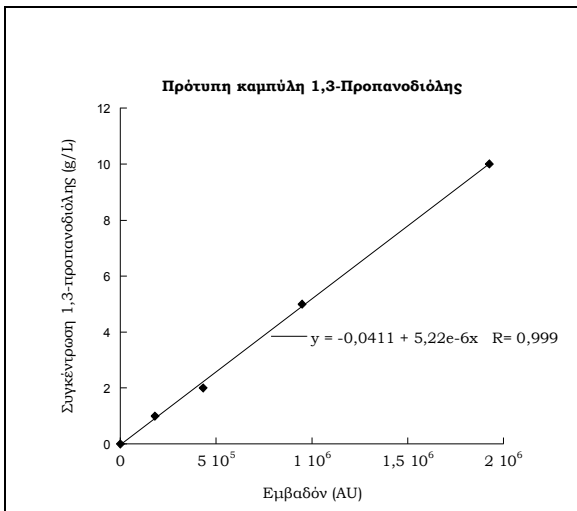
Ένωση	Εξίσωση
Γλυκερόλη (Gly)	$C = 4 * e^{-6} E + 0,0375$
Γλυκόζη (Glu)	$C = 4 * e^{-6} E + 0,0582$
1,3-Προπανοδιόλη (1,3-PD)	$C = 5 * e^{-6} E - 0,0411$
2,3-Βουτανοδιόλη (2,3-BD)	$C = 6 * e^{-6} E + 0,146$
Αιθανόλη (EtOH)	$C = 9 * e^{-6} E - 0,0072$
Βουτυρικό Οξύ (But)	$C = 8 * e^{-7} E - 0,0854$
Γαλακτικό οξύ (Lac)	$C = 7 * e^{-7} E + 0,0221$
Ηλεκτρικό οξύ (Suc)	$C = 4 * e^{-7} E - 0,134$
Μυρμηκικό οξύ (For)	$C = 4 * e^{-7} E - 0,0228$
Οξικό οξύ (Ace)	$C = 4 * e^{-7} E - 0,0247$



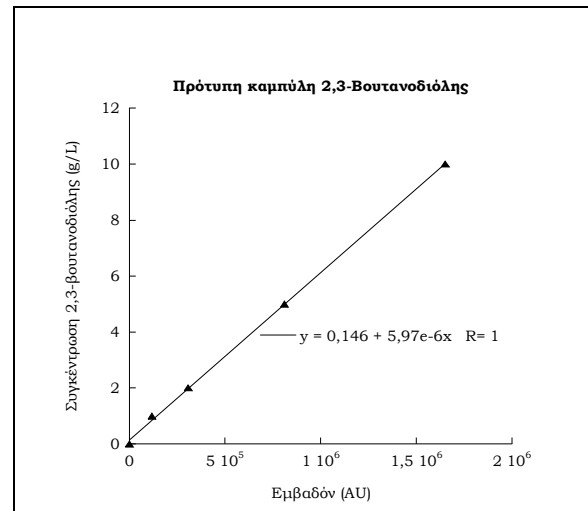
Γράφημα II-1: Πρότυπη καμπύλη προσδιορισμού γλυκερόλης με την μέθοδο HPLC.



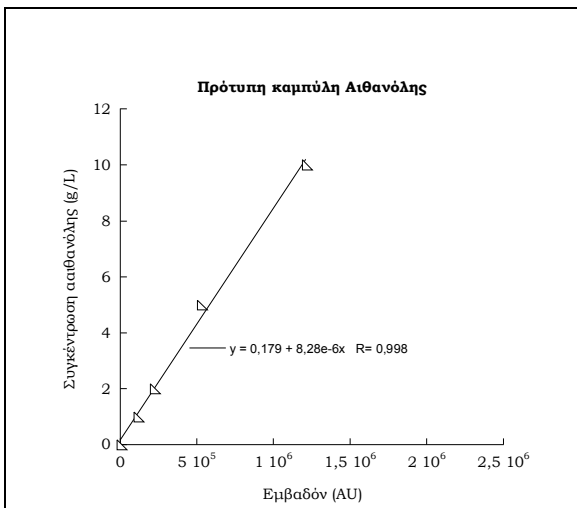
Γράφημα II-2: Πρότυπη καμπύλη προσδιορισμού γλυκόζης με την μέθοδο HPLC.



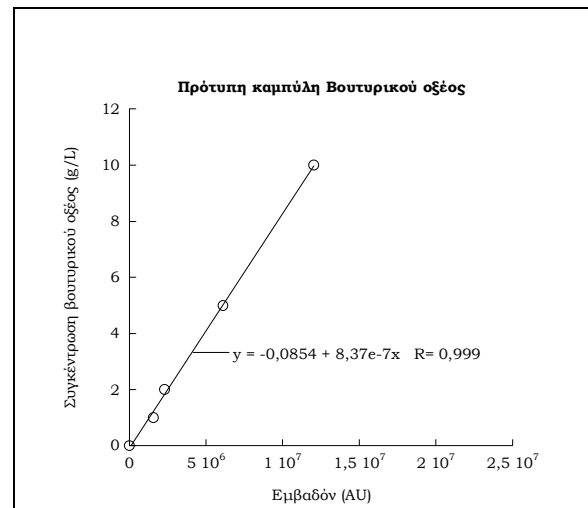
Γράφημα II-3: Πρότυπη καμπύλη προσδιορισμού 1,3-προπανοδιόλης με την μέθοδο HPLC.



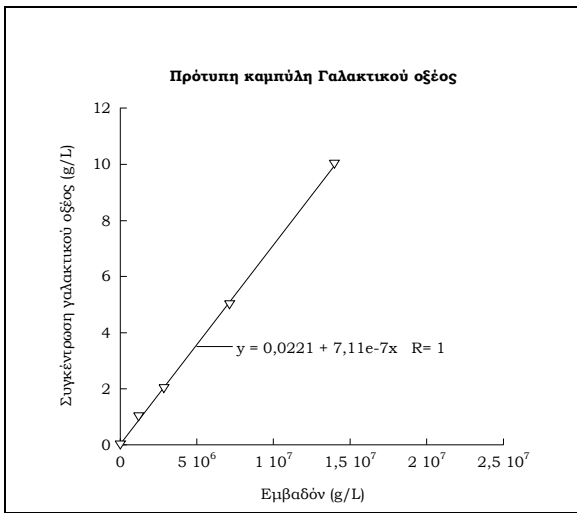
Γράφημα II-4: Πρότυπη καμπύλη προσδιορισμού 2,3-βουτανοδιόλης με την μέθοδο HPLC.



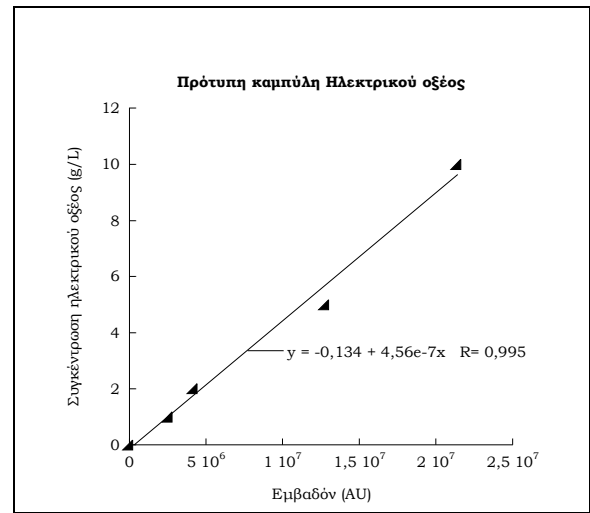
Γράφημα II-5: Πρότυπη καμπύλη προσδιορισμού αιθανόλης με την μέθοδο HPLC.



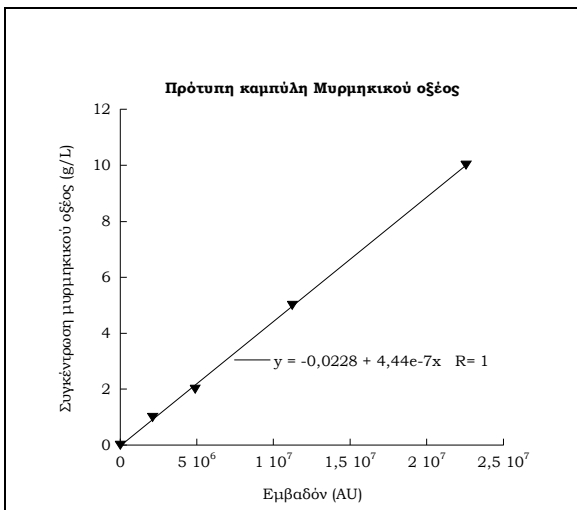
Γράφημα II-6: Πρότυπη καμπύλη προσδιορισμού βουτυρικού οξέος με την μέθοδο HPLC.



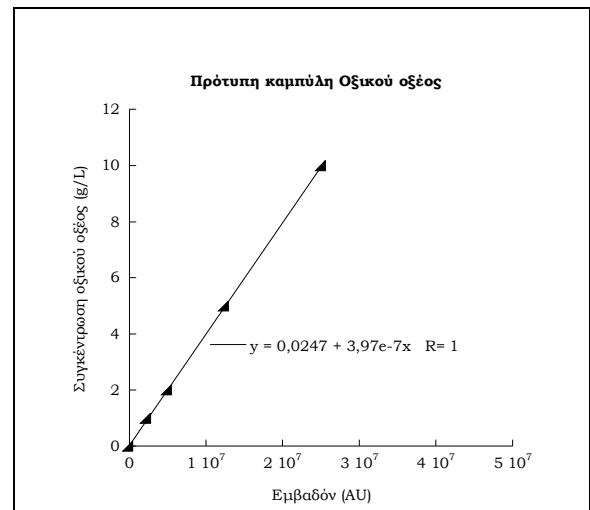
Γράφημα II-7: Πρότυπη καμπύλη προσδιορισμού γαλακτικού οξέος με την μέθοδο HPLC.



Γράφημα II-8: Πρότυπη καμπύλη προσδιορισμού ηλεκτρικού οξέος με την μέθοδο HPLC.



Γράφημα II-9: Πρότυπη καμπύλη προσδιορισμού μυρμηκικού οξέος με την μέθοδο HPLC.



Γράφημα II-10: Πρότυπη καμπύλη προσδιορισμού οξικού οξέος με την μέθοδο HPLC.

III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

III.1 Επιλογή βακτηριακών στελεχών ικανών να μεταβολίσουν την βιομηχανική γλυκερόλη προς παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης, 2,3-βουτανοδιόλης και αιθανόλης

III.1.1. Ασυνεχείς καλλιέργειες σε φιάλες σε υποστρώματα καθαρής γλυκερόλης

Το πρώτο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας είχε ως στόχο να διερευνηθεί η δυνατότητα βακτηριακών στελεχών να μεταβολίσουν τη γλυκερόλη. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν ασυνεχείς καλλιέργειες σε φιάλες με τη γλυκόζη ως συνυπόστρωμα σε αναλογία γλυκόζης προς καθαρή γλυκερόλη 1:3, είτε υπό αναερόβιες είτε υπό αερόβιες συνθήκες ανάλογα με τις απαιτήσεις σε οξυγόνο του εκάστοτε μικροοργανισμού. Για την επίτευξη των αναερόβιων συνθηκών οι ζυμώσεις έλαβαν μέρος σε φιάλες αναεροβίωσης όγκου 50 mL υπό ανάδευση 80 rpm, ενώ για τις αερόβιες συνθήκες χρησιμοποιήθηκαν κωνικές φιάλες των 50 mL και ανάδευση 150 rpm. Σε όλες τις περιπτώσεις η θερμοκρασία διατηρήθηκε σταθερή και ήταν η βέλτιστη, με βάση τη βιοβιβλιογραφία, για τον μεταβολισμό της γλυκερόλης από τα εξεταζόμενα στελέχη, ενώ το pH ήταν μη ελεγχόμενο, με την αρχική τιμή να είναι η άριστη για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, επίσης με βάση τη βιβλιογραφία. Η επιλογή της καθαρής γλυκερόλης έγινε με στόχο την αποφυγή φαινομένων παρεμπόδισης εξαιτίας προσμίξεων που περιέχονται στην βιομηχανική γλυκερόλη. Η προσθήκη της γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο ήταν αναγκαία στην περίπτωση των γαλακτικών βακτηρίων, τα οποία, σύμφωνα με την βιβλιογραφία, αδυνατούν στην πλειοψηφία τους να μεταβολίσουν την γλυκερόλη χωρίς την παρουσία σακχάρου (Garai-Ibabe et al., 2008; Papanikolaou et al., 2009). Στην ανωτέρω περίπτωση η γλυκερόλη χρησιμοποιείται ως αποδέκτης ηλεκτρονίων. Επιπλέον, κρίθηκε σκόπιμη η προσθήκη γλυκόζης στο μέσο της καλλιέργειας των υπολοίπων μικροοργανισμών, καθώς το υπόστρωμα αυτό δύναται να ενισχύσει τη μικροβιακή αύξηση και ως εκ τούτου ενδεχομένως να διευκολύνει τον μεταβολισμό της γλυκερόλης.

Όπως δίνεται στον Πίνακα III-1, μετά από 24 ώρες καλλιέργειας και τα 84 εξεταζόμενα στελέχη παρουσίασαν αύξηση, όμως κανένα από τα γαλακτικά βακτήρια, τα εννέα στελέχη του γένους *Bacillus* sp. καθώς και το στέλεχος *B. lincheniformis* FMCC-91 δεν μεταβόλισαν την γλυκερόλη. Στις υπόλοιπες καλλιέργειες η κυτταρική αύξηση συνοδεύτηκε από την αφομοίωση της γλυκερόλης σε ικανοποιητικό βαθμό.

Σε δεύτερη προσέγγιση τα στελέχη που μεταβόλισαν την γλυκερόλη αναπτύχθηκαν σε καλλιέργειες σε φιάλες με την γλυκερόλη ως μοναδική πηγή άνθρακα. Από τα εξεταζόμενα 16 στελέχη, μόνο τα *Enterobacter ludwigii* FMCC-204 και *Pantonea dispersa* FMCC-200

παρουσίασαν κατανάλωση γλυκερόλης μικρότερη από 2 g/L, η οποία κρίθηκε αμελητέα. Η παραγωγή των τριών κύριων μεταβολικών προϊόντων (PD, BD και EtOH) εμφάνισε διαφοροποιήσεις ανάλογα με το εξεταζόμενο στέλεχος, όπως φαίνεται και στον Πίνακα III-1. Συγκεκριμένα μετά από 24 ώρες καλλιέργειας, παρατηρήθηκε παραγωγή PD από 6 στελέχη [*Clostridium butyricum* NRRL B-23495, *Klebsiella oxytoca* FMCC-197, *Citrobacter freundii* FMCC-207, *C. freundii* FMCC-8, *C. freundii* FMCC-B 294 (VK-19) και *Enterobacter* sp. FMCC-208], BD από 6 στελέχη (*K. oxytoca* FMCC-197, *C. freundii* FMCC-207, *Enterobacter aerogenes* FMCC-9, *E. aerogenes* FMCC-10, *Enterobacter* sp. και *B. altitudinis* FMCC-102) και EtOH από 5 στελέχη (*K. oxytoca* FMCC-197, *C. freundii* FMCC-207, *E. aerogenes* FMCC-9, *E.aerogenes* FMCC-10 και *Enterobacter* sp.). Τα εν λόγω στελέχη που εμφάνισαν κυτταρική αύξηση και παραγωγή των εξεταζόμενων μεταβολιτών σε υπόστρωμα καθαρής γλυκερόλης μελετήθηκαν στη συνέχεια σε ασυνεχείς καλλιέργειες σε φιάλες με πηγή άνθρακα την βιομηχανική γλυκερόλη.

Πίνακας III-1: Αύξηση προκαρυωτικών μικροοργανισμών σε ασυνεχείς καλλιέργειες σε φιάλες, σε συνθετικά υποστρώματα γλυκερόλης, υπό αναερόβιες και αερόβιες συνθήκες καλλιέργειας.

Στέλεχος	Συνυπόστρωμα γλυκόζης-γλυκερόλης		Γλυκερόλη ως μοναδική πηγή άνθρακα			
	Αύξηση	Αφομοίωση γλυκερόλης	Αφομοίωση γλυκερόλης	Παραγωγή PD	Παραγωγή BD	Παραγωγή EtOH
<i>Αναερόβιες συνθήκες</i>						
<i>Clostridium butyricum</i> NRRL B-23495	+	+	+	+	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i> FMCC-197	+	+	+	+	+	+
<i>Citrobacter freundii</i> FMCC-207	+	+	+	A _π	+	+
<i>Citrobacter freundii</i> FMCC-8	+	+	+	+	-	-
<i>Citrobacter freundii</i> FMCC-B 294 (VK-19)	+	+	+	+	-	-
<i>Citrobacter farmeri</i> FMCC-5	+	+	+	-	-	-
<i>Citrobacter farmeri</i> FMCC-7	+	+	+	-	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> FMCC-9	+	+	+	-	+	+
<i>Enterobacter aerogenes</i> FMCC-10	+	+	+	-	+	+
<i>Enterobacter ludwigii</i> FMCC-204	+	+	A	-	-	-

Στέλεχος	Συνυπόστρωμα γλυκόζης-γλυκερόλης		Γλυκερόλη ως μοναδική πηγή άνθρακα			
	Αύξηση	Αφομοίωση γλυκερόλης	Αφομοίωση γλυκερόλης	Παραγωγή PD	Παραγωγή BD	Παραγωγή EtOH
<i>Αναερόβιες συνθήκες</i>						
<i>Enterobacter</i> sp. FMCC-208	+	+	+	+	+	+
<i>Pantonea dispersa</i> FMCC-200	+	+	A	-	-	-
<i>Lactobacillus brevis</i> (15 στελέχη)	+	-	/	/	/	/
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (9 στελέχη)	+	-	/	/	/	/
<i>Pediococcus pentosaceus</i> (34 στελέχη)	+	-	/	/	/	/
<i>Αερόβιες συνθήκες</i>						
<i>Bacillus licheniformis</i> FMCC-91	+	-	/	/	/	/
<i>Bacillus licheniformis</i> FMCC-92	+	+	+	-	-	-
<i>Bacillus licheniformis</i> FMCC-98	+	+	+	-	-	-
<i>Bacillus altitudinis</i> FMCC-102	+	+	+	-	A _π	-
<i>Bacillus subtilis</i> FMCC-206	+	+	+	-	-	-
<i>Bacillus</i> sp. (9 στελέχη)	+	-	/	/	/	/

Συνθήκες καλλιέργειας: α) αναερόβιες ασυνεχείς καλλιέργειες σε φιάλες αναεροβίωσης 50 mL και β) αερόβιες ασυνεχείς καλλιέργειες σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες 50 mL.

+: θετικό αποτέλεσμα, -: αρνητικό αποτέλεσμα, A: αμελητέα αφομοίωση (αφομοίωση <2.0 g/L), A_π: αμελητέα παραγωγή (παραγωγή <0.5 g/L), /: δεν μελετήθηκαν.

III.1.2. Ασυνεχείς καλλιέργειες σε φιάλες σε υποστρώματα βιομηχανικής γλυκερόλης

Δεκατρία προκαρυωτικά στελέχη καλλιεργήθηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο με μόνη πηγή άνθρακα τη βιομηχανική γλυκερόλη προερχόμενη από την γερμανική εταιρεία βιοκαυσίμων "Archer Daniels Midland Industries" με αρχική συγκέντρωση 20 g/L προκειμένου να μελετηθούν οι κινητικές παράμετροι των μικροοργανισμών. Στις ασυνεχείς καλλιέργειες σε φιάλες (batch-flask cultures) που διενεργήθηκαν μετρήθηκαν οι εξής παράμετροι της μικροβιακής αύξησης:

- το pH της καλλιέργειας,
- η παραγωγή βιομάζας (ξηράς ουσίας, X, g/L),
- η κατανάλωση του υποστρώματος (Gly, g/L),

- η παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης (PD, g/L), 2,3-βουτανοδιόλης (BD, g/L), αιθανόλης (EtOH, g/L) και οξικού οξέος (Ace acid, g/L) και
- η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου (Dissolved oxygen, D.O., % v/v), στην περίπτωση των αερόβιων καλλιέργειών.

Για την επίτευξη αναερόβιων συνθηκών οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε φιάλες τύπου Duran 1-L και υποβλήθηκαν σε σπαργή με άζωτο για 30 λεπτά, πριν την αποστείρωση, ενώ οι αερόβιες καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες των 250 mL. Και στις δύο συνθήκες το pH της καλλιέργειας ήταν μη-ελεγχόμενο κατά την διάρκεια της ζύμωσης.

Κατά τη διεργασία των ζυμώσεων υπολογίστηκαν οι εξής παράμετροι της μικροβιακής αύξησης:

- ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης προς αναλωθέν υπόστρωμα $Y_{PD/Gly}$ (g 1,3-προπανοδιόλης /g αναλωθείσα γλυκερόλη),
- ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης προς αναλωθέν υπόστρωμα $Y_{BD/Gly}$ (g 2,3-βουτανοδιόλης /g αναλωθείσα γλυκερόλη),
- ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής αιθανόλης προς αναλωθέν υπόστρωμα $Y_{EtOH/Gly}$ (g αιθανόλης/g αναλωθείσα γλυκερόλη) και
- ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής οξικού οξέος προς αναλωθέν υπόστρωμα $Y_{Ace/Gly}$ (g οξικού οξέος/g αναλωθείσα γλυκερόλη).

Στον πίνακα III-2 δίνονται συνοπτικά τα τελικά σημεία της καλλιέργειας με την μέγιστη παραγωγή μεταβολικών προϊόντων και την μέγιστη τιμή παραγόμενης βιομάζας.

Πίνακας III-2: Παράμετροι αύξησης, τελικές συγκεντρώσεις μεταβολικών προϊόντων και συντελεστές απόδοσης κατά την αύξηση επιλεγμένων βακτηριακών στελεχών σε υγρές καλλιέργειες με πηγή άνθρακα την βιομηχανική γλυκερόλη, υπό συνθήκες μη-ρυθμιζόμενου pH (αρχική τιμή pH=7,0).

Στέλεχος	Διάρκεια (h)	Κατανάλωση γλυκερόλης (g/L)	X (g/L)	pH _f	PD	BD	EtOH		Ace			
					Συγκέντρωση (g/L)	Συν/τής (g/g)	Συγκέντρωση (g/L)	Συν/τής (g/g)	Συγκέντρωση (g/L)	Συν/τής (g/g)		
Αναερόβιες συνθήκες, καλλιέργειες σε ανακινούμενες φιάλες τύπου Duran 1-L												
<i>Cl. butyricum</i>												
NRRL B- 23495	24	17,0	0,6	6,5	9,1	0,54	-	-	-	-	0,5	0,03
<i>K. oxytoca</i>												
FMCC-197	24	15,5	1,3	5,8	1,6	0,10	4,2	0,27	4,8	0,30	-	-
<i>C. freundii</i>												
FMCC-207	48	17,9	1,1	6,0	-	-	4,3	0,24	5,9	0,30	-	-
<i>C. freundii</i>												
FMCC-8	32	14,9	0,5	6,5	3,9	0,26	-	-	-	-	0,4	0,08
<i>C. freundii</i>												
FMCC-B 294 (VK-19)	32	16,1	0,5	6,4	5,8	0,36	-	-	-	-	0,5	0,08
<i>C. farmeri</i>												
FMCC-5	48	4,1	0,8	6,7	-	-	-	-	-	-	0,9	0,22
<i>C. farmeri</i>												
FMCC-7	48	3,9	0,8	6,7	-	-	-	-	-	-	1,0	0,25
<i>E. aerogenes</i>												
FMCC-9	24	12,1	1,2	6,6	A _π	-	1,5	0,12	1,2	0,10	-	-
<i>E. aerogenes</i>												
FMCC-10	24	14,2	1,6	6,5	A _π	-	2,0	0,14	1,6	0,11	-	-

<i>E. ludwigii</i> FMCC-204	48	2,2	0,4	6,7	-	-	-	-	-	-	0,6	0,27
<i>Enterobacter</i> sp. FMCC-208	48	16,7	1,2	6,2	A _π	-	3,0	0,18	6,6	0,40	-	-
<i>P. dispersa</i> FMCC-200	48	2,1	0,4	6,7	-	-	-	-	-	-	0,6	0,27
Αερόβιες συνθήκες, καλλιέργειες σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες 250-mL												
<i>E. aerogenes</i> FMCC-10	24	21,9	2,1	6,4	1,2	-	5,0	0,23	1,0	0,05	-	-
<i>B. altitudinis</i> FMCC-102	48	9,1	3,6	6,4	-	-	0,7	0,08	-	-	-	-

Συνθήκες καλλιέργειας: α) αναερόβιες ασυνεχείς καλλιέργειες σε ανακινούμενες φιάλες τύπου Duran 1-L, αρχικό pH 6,8±0,2 για το στέλεχος *Cl. butyricum* και 7,0±0,2 για τα εντεροβακτήρια, θερμοκρασία 30 °C τα εντεροβακτήρια και 37 °C το στέλεχος *Cl. butyricum*. και ανάδευση 80 rpm. β) αερόβιες ασυνεχείς καλλιέργειες σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες 250 mL, pH_{in}=7,0±0,2, θερμοκρασία 30 °C ανάδευση 150 rpm.

Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν με διαφορετικά αρχικά εμβόλια, ενώ το κάθε σημείο της ζύμωσης είναι ο μέσος όρος δυο ανεξαρτήτων πειραμάτων. X: Η μέγιστη βιομάζα (g/L), A_π: αμελητέα παραγωγή (παραγωγή <0.5 g/L), pH_f: τελικό pH του υποστρώματος.

Αναερόβιες συνθήκες

Από τα δεδομένα του πίνακα III-2 προκύπτει ότι η διάρκεια της ζύμωσης, η καταναλωθείσα γλυκερόλη, το τελικό pH της ζύμωσης, καθώς και η παραγωγή των μεταβολικών προϊόντων, ποικίλουν ανάλογα με το γένος των μικροοργανισμών, ενώ διαφοροποιήσεις παρατηρήθηκαν ακόμη και μεταξύ στελεχών του ίδιου είδους. Η κυτταρική αύξηση, εκφρασμένη σε g/L, κυμάνθηκε από 0,4 έως 1,6. Δεν παρατηρήθηκε άμεση συσχέτιση της κατανάλωσης γλυκερόλης και της συγκέντρωσης μεταβολικών προϊόντων με την παραγόμενη βιομάζα. Για παράδειγμα στην καλλιέργεια του στελέχους *Cl. butyricum* NRRL B-23495, παρόλο που παρατηρήθηκε σχετικά χαμηλή κυτταρική αύξηση (0,6 g/L), παράχθηκε η μέγιστη ποσότητα 1,3-προπανοδιόλης. Αντίθετα, στην καλλιέργεια του στελέχους *E. aerogenes* FMCC-10, αν και ήταν αυτή με την μεγαλύτερη παραγόμενη βιομάζα (1,6 g/L), δεν σημειώθηκαν αντίστοιχα υψηλές συγκεντρώσεις μεταβολικών προϊόντων. Περαιτέρω κατανάλωση της γλυκερόλης στις περισσότερες περιπτώσεις κυμάνθηκε από 12,1 έως 17,0 g/L, ενώ μόλις τέσσερα στελέχη (*C. farmeri* FMCC-5, *C. farmeri* FMCC-7, *E. ludwigii* FMCC-204 και *P. dispersa* FMCC-200) αφομοίωσαν λιγότερο από 5,0 g/L. Η μέγιστη κατανάλωση ήταν 17,9 g/L και σημειώθηκε κατά την καλλιέργεια του στελέχους *C. freundii* FMCC-207. Σημειώνεται ότι όλες οι καλλιέργειες συνεχίστηκαν μέχρι να ολοκληρωθεί η αφομοίωση της γλυκερόλης, γεγονός που επιτεύχθηκε σε 24 έως 48 ώρες.

Αναφορικά με το σχηματισμό μεταβολιτών, παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές σε σχέση με τα εξεταζόμενα στελέχη. Σε όλες τις περιπτώσεις, εκτός από μία, παράχθηκε 1,3-προπανοδιόλη, έστω και σε αμελητέες ποσότητες, ενώ στις καλλιέργειες τριών στελεχών [*Cl. butyricum* NRRL B-23495, *C. freundii* FMCC-8, *C. freundii* FMCC-B 294 (VK-19)] η διόλη αυτή ήταν ο κυρίαρχος μεταβολίτης. Η μέγιστη παραγωγή της διόλης ανήλθε στα 9,1 g/L, μετά από 24 ώρες ζύμωσης του στελέχους *Cl. butyricum* NRRL B-23495, ενώ στην ίδια καλλιέργεια παρατηρήθηκε και ο μεγαλύτερος συντελεστής απόδοσης $Y_{PD/Gly}$ με τιμή 0,54 g/g. Από την άλλη πλευρά τα στελέχη της οικογένειας των εντεροβακτηρίων παρουσίασαν διαφορετικό προφίλ τελικών προϊόντων συγκριτικά με το στέλεχος *Cl. butyricum*, αλλά και σε σχέση με στελέχη του ίδιου γένους. Πιο αναλυτικά, μόνο σε δύο καλλιέργειες από τα τρία στελέχη του είδους *C. freundii*, συγκεκριμένα τα στελέχη FMCC-8 και FMCC B-294 (VK-19), η 1,3-προπανοδιόλη ήταν το κύριο προϊόν, ενώ μικρές ποσότητες οξικού οξέος και γαλακτικού οξέος εκκρίθηκαν στο μέσο καλλιέργειας. Επιπλέον, οι αντίστοιχες τιμές $Y_{PD/Gly}$ ήταν 0,26 και 0,36 g/g, οι οποίες ήταν χαμηλότερες, σε σύγκριση με την μέγιστη τιμή κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Cl. butyricum* NRRL B-23495, ενώ κρίνεται ικανοποιητική και η συγκέντρωση των 5,6 g/L, που επιτεύχθηκε στην καλλιέργεια του στελέχους *C. freundii* FMCC-B 294 (VK-19). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε η καλλιέργεια του στελέχους *C. freundii* FMCC-207 κατά την οποία παραδόξως δεν ανιχνεύθηκε 1,3-προπανοδιόλη στο υγρό της ζύμωσης. Το εύρημα αυτό είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον δεδομένου ότι υποδεικνύει την

εμπλοκή του συμπλόκου-*glp* (*glp*-regulon) στην αναερόβια αφομοίωση γλυκερόλης, χωρίς την παρουσία εξωγενούς αποδέκτη ηλεκτρονίων. Τα κύρια μεταβολικά προϊόντα ήταν η αιθανόλη και η 2,3-βουτανοδιόλη και μετά από 48 ώρες ζύμωσης παράχθηκαν 5,9 και 4,3 g/L, αντίστοιχα. Αξίζει να σημειωθεί ότι η συγκέντρωση της 2,3-βουτανοδιόλης ήταν η μέγιστη και της αιθανόλης η δεύτερη υψηλότερη που επιτεύχθηκαν στις δεδομένες πειραματικές συνθήκες.

Χαρακτηριστική είναι και η περίπτωση του στελέχους *K. oxytoca* FMCC-197 καθώς ήταν η μοναδική ζύμωση στην οποία παράχθηκε μίγμα και των τριών κύριων μεταβολικών προϊόντων. Οι συγκεντρώσεις τόσο της αιθανόλης όσο και της 2,3-βουτανοδιόλης, 4,8 και 4,2 g/L αντίστοιχα, ήταν ανάμεσα στις υψηλότερες που παρατηρήθηκαν σε αυτό το στάδιο της πειραματικής διαδικασίας. Επιπλέον το pH της καλλιέργειας σημείωσε τη μεγαλύτερη μείωση, 1,2 μονάδες, συγκριτικά με τις υπόλοιπες αναερόβιες καλλιέργειες. Όσον αφορά τέλος στις καλλιέργειες των στελεχών του γένους *Enterobacter*, τα μεταβολικά προϊόντα που σχηματίστηκαν ήταν κυρίως αιθανόλη και 2,3-βουτανοδιόλη, ενώ παράχθηκαν και μικρές ποσότητες 1,3-προπανοδιόλης. Η μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης σε όλες τις αναερόβιες καλλιέργειες επιτεύχθηκε κατά τη ζύμωση του στελέχους *Enterobacter* sp. FMCC-208 που αντιστοιχεί και στον μεγαλύτερο συντελεστή απόδοσης $Y_{EIOH/Gly}$ με τιμή 0,40 g/g. Η παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης κυμάνθηκε από 1,5 έως 3,0 g/L και ο αντίστοιχος συντελεστής απόδοσης $Y_{BD/Gly}$ έλαβε τιμές μεταξύ 0,12 και 0,27 g/g. Αξίζει να αναφερθεί ότι στην περίπτωση των καλλιεργειών του είδους *E. aerogenes*, οι παραγόμενες ποσότητες 2,3-βουτανοδιόλης και αιθανόλης ήταν περίπου σε αναλογία 1:1.

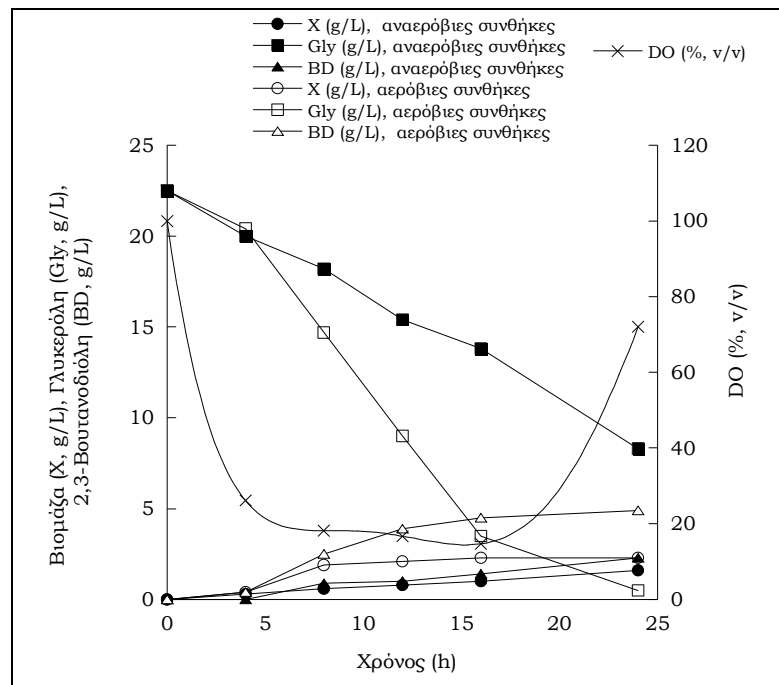
Αερόβιες συνθήκες

Η μελέτη της κατανάλωσης βιομηχανικής γλυκερόλης πραγματοποιήθηκε και σε αερόβιες συνθήκες κατά την καλλιέργεια των στελεχών *E. aerogenes* FMCC-10 και *B. altitudinis* FMCC-102. Η επιλογή αυτή βασίστηκε στο γεγονός ότι το στέλεχος *B. altitudinis* είναι υποχρεωτικά αερόβιο και κατά την αρχική καλλιέργεια σε γλυκερόλη είχε παραχθεί μικρή ποσότητα 2,3-βουτανοδιόλης (βλ. Πίνακα III-1). Όσον αφορά το στέλεχος *E. aerogenes* FMCC-10 κρίθηκε σκόπιμο να διερευνηθεί η δυνατότητα βελτίωσης τόσο της κατανάλωσης γλυκερόλης όσο και της παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης υπό αερόβιες συνθήκες, καθώς, σύμφωνα με την βιβλιογραφία, η σύνθεση του εν λόγω μεταβολίτη από στέλεχη του είδους έχει παρατηρηθεί και υπό αερόβιες συνθήκες αύξησης (Zeng et al., 1990b, Zeng et al., 1994a, Converti et al., 2002).

Όπως παρουσιάζεται και στον Πίνακα III-2, κατά την καλλιέργεια του στελέχους *B. altitudinis* FMCC-102 μετά από 48 ώρες ζύμωσης, αν και καταναλώθηκαν περίπου 9,0 g/L γλυκερόλης, παράχθηκαν μόλις 0,7 g/L 2,3-βουτανοδιόλης. Ο συντελεστής $Y_{BD/Gly}$ έλαβε την χαμηλότερη τιμή 0,08 g/g, συγκριτικά με τις καλλιέργειες σε φιάλες που πραγματοποιήθηκαν τόσο σε αερόβιες, αλλά και σε αναερόβιες συνθήκες. Είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον το γεγονός ότι, υπό τις

δεδομένες πειραματικές συνθήκες, η ροή του άνθρακα διοχετεύεται κυρίως προς σχηματισμό βιομάζας, η τελική συγκέντρωση της οποίας ήταν η υψηλότερη ($X_{\max}=3,6$ g/L) συγκριτικά με την αερόβια καλλιέργεια του στελέχους *E. aerogenes* FMCC-10 ($X_{\max}=2,1$ g/L), ενώ και ο συντελεστής απόδοσης παραγόμενης βιομάζας ανά καταναλωθείσα γλυκερόλη ($Y_{X/Gly}$) έλαβε την μέγιστη τιμή $\sim 0,40$ g/g.

Αξιοσημείωτες είναι και οι διαφοροποιήσεις που παρατηρήθηκαν κατά την αερόβια ζύμωση του στελέχους *E. aerogenes* FMCC-10 συγκριτικά με την αναερόβια καλλιέργεια (βλ. Πίνακα III-2). Η κατανάλωση υποστρώματος, η παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες, καθώς και η εξέλιξη του διαλυτού (D.O., % v/v) για την αερόβια διεργασία σε συνάρτηση με το χρόνο ζύμωσης από το στέλεχος *E. aerogenes* FMCC-10 παρουσιάζονται στο Γράφημα III-1.



Γράφημα III-1: Γραφική παράσταση της παραγωγής βιομάζας (X–g/L) και 2,3-βουτανοδιόλης (BD–g/L), καθώς και κατανάλωσης υποστρώματος και του % διαλυμένου οξυγόνου κατά την αύξηση του στελέχους *Enterobacter aerogenes* FMCC-10 σε ασυνεχή καλλιέργεια σε φιάλες με μοναδική πηγή άνθρακα την βιομηχανική γλυκερόλη με αρχική συγκέντρωση 20 g/L.

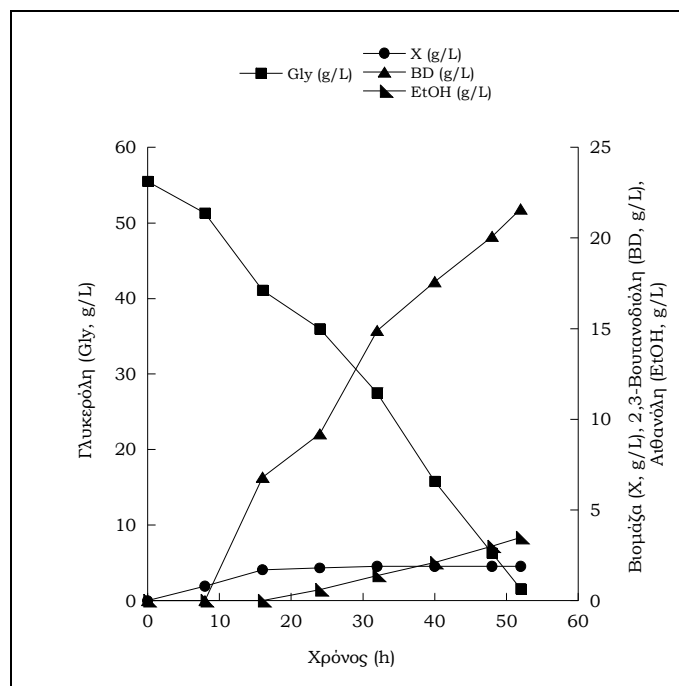
Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής καλλιέργεια σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες 250 mL, pH_{in}=7,0±0,2, θερμοκρασία 30 °C και ανάδευση 150 rpm.

Όπως φαίνεται στο Γράφημα III-1, υπό αερόβιες συνθήκες τόσο η αφομοίωση του υποστρώματος όσο και η παραγωγή μεταβολικών προϊόντων βελτιώθηκαν σημαντικά. Η κατανάλωση της γλυκερόλης ξεκινάει περίπου τέσσερις ώρες μετά τον εμβολιασμό χωρίς να παρατηρείται ιδιαίτερη φάση προσαρμογής (lag phase) στον αυξητικό κύκλο. Σε αντίθεση με την

αναερόβια καλλιέργεια, η κατανάλωση του υποστρώματος ήταν πλήρης και ταχεία. Η ζύμωση ολοκληρώθηκε 24 ώρες μετά τον εμβολιασμό και ο κύριος μεταβολίτης παρέμεινε η 2,3-βουτανοδιόλη, η συγκέντρωση της οποίας αυξήθηκε από τα 2,0 σε 5,0 g/L, δηλαδή σε ποσοστό 150% (κ.β.). Ο συντελεστής απόδοσης $Y_{BD/Gly}$ έλαβε την τιμή 0,25 g/g. Ενδιαφέρουσα ήταν και η αύξηση της τελικής συγκέντρωσης 1,3-προπανοδιόλης, η τιμή της οποίας επίσης αυξήθηκε κατά περίπου 140%, σε σύγκριση με την αναερόβια καλλιέργεια. Αξίζει να σημειωθεί το γεγονός ότι η αερόβια παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης είναι σπάνια, με βάση την διεθνή βιβλιογραφία (Chen et al., 2003a; 2004; Yang et al., 2007; Hao et al., 2008; Ma et al., 2009; Wang et al., 2010). Αντίθετα η παραγωγή της αιθανόλης φαίνεται να μην επηρεάστηκε σε μεγάλο βαθμό από τις συνθήκες αεροβίωσης, και μια μικρή μείωση της τάξης των 0,5 g/L παρατηρήθηκε στην ζύμωση υπό αεροβίωση. Όπως και στην αναερόβια καλλιέργεια, η τιμή του pH μειώθηκε (αρχική τιμή 7,0 και τελική 6,4) λόγω της έκκρισης οργανικών οξέων στο μέσο της καλλιέργειας. Τα κύρια οργανικά οξέα τα οποία παράχθηκαν ήταν το γαλακτικό και το φορμικό οξύ με τελικές συγκεντρώσεις 2,7 g/L και 1,1 g/L αντίστοιχα.

Κατά τα τυπικά από τη βιοχημική μηχανική, από τα δεδομένα του γραφήματος προκύπτει ότι ο επί τοις εκατό (% v/v) κορεσμός σε οξυγόνο του περιβάλλοντος αύξησης του μικροοργανισμού μειώνεται σταδιακά κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Ήδη από την αρχή της φάσης προσαρμογής, ο κορεσμός σε οξυγόνο μειώνεται σημαντικά και μόλις 4 ώρες μετά τον εμβολιασμό φτάνει στο 20% v/v. Καθόλη την διάρκεια της εκθετικής φάσης κυμαίνεται σε ποσοστό 15-20% v/v. Κατά την επιβραδυνόμενη και τη στάσιμη φάση του αυξητικού κύκλου, κατά τα τυπικά ο κορεσμός σε οξυγόνο αρχίζει παροδικά να αυξάνεται και να διατηρείται σε υψηλά επίπεδα. Σημειώνεται ότι παρά τη σχετική μείωση του κορεσμού του οξυγόνου, η ζύμωση πραγματοποιήθηκε σε αερόβιες συνθήκες (θεωρείται ότι μη-επαρκώς αερόβιες συνθήκες εμφανίζονται όταν ο κορεσμός σε οξυγόνο είναι χαμηλότερος από 10% v/v – Αγγελής, 2007).

Δεδομένης της αξιόλογης αύξησης της παραγόμενης συγκέντρωσης της 2,3-βουτανοδιόλης κατά τις αερόβιες ζυμώσεις του στελέχους *E. aerogenes* FMCC-10 συγκριτικά με την αναερόβια καλλιέργεια, πραγματοποιήθηκε μια επιπλέον αερόβια καλλιέργεια με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης ~55,0 g/L. Στόχος του νέου πειράματος ήταν να μελετηθεί η προοπτική παραγωγής μεταβολικών προϊόντων σε υψηλότερες συγκεντρώσεις υποστρώματος. Η κατανάλωση του υποστρώματος, η παραγωγή βιομάζας, 2,3-βουτανοδιόλης και αιθανόλης σε συνάρτηση με το χρόνο ζύμωσης παρουσιάζονται στο Γράφημα III-2.



Γράφημα III-2: Γραφική παράσταση της παραγωγής βιομάζας (X-g/L), 2,3-βουτανοδιόλης (BD-g/L) και αιθανόλης (EtOH-g/L) και της κατανάλωσης υποστρώματος (Gly-g/L) κατά την αύξηση του στελέχους *Enterobacter aerogenes* FMCC-10 σε ασυνεχή καλλιέργεια σε φιάλες με μοναδική πηγή άνθρακα την βιομηχανική γλυκερόλη με αρχική συγκέντρωση 55 g/L.

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής καλλιέργεια σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες 250 mL, $pH_{in}=7,0\pm 0,2$, θερμοκρασία 30 °C και ανάδευση 150 rpm.

Όπως δίνεται και στο Γράφημα II-2, η κατανάλωση της ακάθαρτης γλυκερόλης ξεκινάει λίγες ώρες μετά τον εμβολιασμό χωρίς να παρατηρείται ιδιαίτερη φάση προσαρμογής στον αυξητικό κύκλο. Ο ρυθμός κατανάλωσης του υποστρώματος αυξάνεται προοδευτικά και η ζύμωση ολοκληρώνεται 52 ώρες μετά τον εμβολιασμό. Στο χρονικό αυτό διάστημα, 53,9 g/L γλυκερόλης μεταβολίστηκαν πλήρως και 21,6 g/L 2,3-βουτανοδιόλης παράχθηκαν. Ο συντελεστής απόδοσης $Y_{BD/Gly}$ έλαβε την τιμή 0,40 g/g. Η παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης συνοδεύτηκε από τη σύνθεση αιθανόλης και 1,3-προπανοδιόλης, η τελική συγκέντρωση των οποίων ήταν αρκετά χαμηλότερη συγκριτικά με τον κύριο μεταβολίτη και έφτασε μόλις τα 3,5 και 0,6 g/L, αντίστοιχα. Το pH της καλλιέργειας, όπως και στην περίπτωση της ζύμωσης με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 20 g/L, μειώθηκε από την αρχική τιμή 7,0 σε τελική τιμή 5,4. Η πτώση αυτή του pH οφείλεται στην έκκριση κυρίως γαλακτικού οξέος και σε μικρότερο βαθμό φορμικού οξέος στο μέσο της καλλιέργειας. Οι συγκεντρώσεις των οργανικών οξέων στο τέλος της ζύμωσης ήταν 8,4 και 0,3 g/L αντίστοιχα.

Αξίζει να σημειωθεί ότι, όπως και στην καλλιέργεια του μικροοργανισμού με αρχική συγκέντρωση υποστρώματος 20 g/L, η ζύμωση πραγματοποιήθηκε υπό αερόβιες συνθήκες, καθώς ο επί τοις εκατό (% v/v) κορεσμός σε οξυγόνο του περιβάλλοντος αύξησης παρέμεινε μεγαλύτερος από 15 % v/v σε όλα τα στάδια του αυξητικού κύκλου.

III.1.3. Ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα σε υποστρώματα βιομηχανικής γλυκερόλης, υπό αναερόβιες συνθήκες

Με βάση τα αποτελέσματα στις ασυνεχείς καλλιέργειες σε φιάλες προέκυψαν οκτώ στελέχη ικανά να μεταβολίσουν την ακάθαρτη γλυκερόλη προς παραγωγή μεταβολικών προϊόντων υψηλότερης προστιθέμενης αξίας, όπως 1,3-προπανοδιόλη, 2,3-βουτανοδιόλη και αιθανόλη. Αφού συνεκτιμήθηκε τόσο η κατανάλωση της γλυκερόλης όσο και η παραγωγή των τριών κύριων μεταβολικών προϊόντων, επιλέχθηκαν για περαιτέρω μελέτη σε ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα υπό σταθερό pH, τα ακόλουθα πέντε στελέχη: *Cl. butyricum* NRRL B-23495, *C. freundii* FMCC-B 294 (VK-19), *C. freundii* FMCC-207, *K. oxytoca* FMCC-197 και *E. aerogenes* FMCC-10. Επιπροσθέτως, το είδος του μικροοργανισμού αποτέλεσε κριτήριο, ώστε να αποφευχθεί η μελέτη στελεχών του ίδιου είδους που εμφάνισαν ομοιότητες στην τελική συγκέντρωση μεταβολιτών, όπως στις περιπτώσεις των *C. freundii* FMCC-B 294 (VK-19) και *C. freundii* FMCC-8, καθώς και των *E. aerogenes* FMCC-9 και *E. aerogenes* FMCC-10. Είναι γνωστή από την βιβλιογραφία η δυνατότητα των στελεχών του είδους *Cl. butyricum* να μεταβολίζουν υπό αναερόβιες συνθήκες τη γλυκερόλη προς παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης (Petitdemange et al., 1995; da Silva et al., 2009; Saxena et al., 2009). Για το λόγο αυτό το στέλεχος *Cl. butyricum* NRRL B-23495 αποτέλεσε το σημείο αναφοράς για την σύγκριση με τα αποτελέσματα των στελεχών της οικογένειας Enterobacteriaceae.

Τα εξεταζόμενα στελέχη αναπτύχθηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο με τη βιομηχανική γλυκερόλη ως πηγή άνθρακα, με αρχική συγκέντρωση υποστρώματος] 20 g/L. Οι αναερόβιες ασυνεχείς καλλιέργειες (batch-bioreactor cultures) πραγματοποιήθηκαν σε βιοαντιδραστήρα 1,2-L υπό σταθερό pH (τιμή 7,0 για τα στελέχη της οικογένειας Enterobacteriaceae και 6,8 για το στέλεχος *Cl. butyricum*). Για τη διατήρηση των αναερόβιων συνθηκών γινόταν συνεχής εμφύσηση αζώτου καθ' όλη την διάρκεια της ζύμωσης με ροή 0,1 LPM. Στον Πίνακα III-3 δίνονται συνοπτικά η διάρκεια κάθε καλλιέργειας, η καταναλισκόμενη γλυκερόλη και η μέγιστη παραγωγή βιομάζας και των τριών κύριων μεταβολικών προϊόντων.

Η μέγιστη παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης μεταξύ όλων των εξεταζόμενων στελεχών παρατηρήθηκε στην καλλιέργεια του στελέχους *Cl. butyricum* NRRL B-23495. Η ζύμωση ολοκληρώθηκε 17 ώρες μετά τον εμβολιασμό και η μέγιστη συγκέντρωση 1,3-προπανοδιόλης έφτασε τα 11,3 g/L, η οποία αντιστοιχεί σε συντελεστή απόδοσης $Y_{PD/Gly}$ 0,58 g/g και παραγωγικότητα 0,66 g/L/h. Αξίζει να σημειωθεί ότι παρά την PD_{max} , ο μικροοργανισμός εμφάνισε την μικρότερη κυτταρική ανάπτυξη, η οποία έλαβε την τιμή 0,7 g/L. Επιπλέον σχηματίστηκαν μικρότερες ποσότητες οξικού, γαλακτικού και βουτυρικού οξέος (0,5 g/L, 1,7 g/L και 3,1 g/L αντίστοιχα).

Πίνακας III-3: Αύξηση επιλεγμένων βακτηριακών στελεχών σε ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα με την βιομηχανική γλυκερόλη ως πηγή άνθρακα, με αρχική συγκέντρωση 20 g/L.

Παράμετροι		<i>Cl. butyricum</i> NRRL B- 23495	<i>C. freundii</i> FMCC-B 294 (VK-19)	<i>C. freundii</i> FMCC-207	<i>K. oxytoca</i> FMCC-197	<i>E. aerogenes</i> FMCC-10
Διάρκεια (h)		17	10	12	12	14
Κατανάλωση γλυκερόλης (g/L)		19,6	21,1	17,9	18,3	20,7
X (g/L)		0,7	1,9	2,7	2,2	2,8
PD	Συγκέντρωση (g/L)	11,3	10,1	-	3,8	-
	Συντελεστής (g/g)	0,58	0,48	-	0,21	-
	Παραγωγικότητα (g/L/h)	0,66	1,01	-	0,32	-
BD	Συγκέντρωση (g/L)	-	-	-	1,1	0,8
	Συντελεστής (g/g)	-	-	-	0,06	0,04
	Παραγωγικότητα (g/L/h)	-	-	-	0,09	0,04
EtOH	Συγκέντρωση (g/L)	-	-	8,0	4,6	4,6
	Συντελεστής (g/g)	-	-	0,45	0,30	0,22
	Παραγωγικότητα (g/L/h)	-	-	0,67	0,38	0,33

Συνθήκες καλλιέργειας : αναερόβιες ασυνεχείς καλλιέργειες (εμφύσηση N₂ με ροή 0,1 LPM) σε βιοαντιδραστήρα 1,2-L, pH σταθερό (τιμή 6,8 για το στέλεχος *Cl. butyricum* και 7,0 για τα ενετροβακτήρια), θερμοκρασία 30 °C και ανάδευση 150 rpm.

Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν με διαφορετικά αρχικά εμβόλια, ενώ το κάθε σημείο της ζύμωσης είναι ο μέσος όρος δυο ανεξαρτήτων πειραμάτων.

X: Η μέγιστη βιομάζα (g/L)

Αναφορικά με τα αποτελέσματα των στελεχών της οικογένειας Enterobacteriaceae στις ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα υπό συνθήκες σταθερού pH, παρουσιάστηκαν διαφοροποιήσεις στην σύνθεση μεταβολικών προϊόντων, συγκριτικά με τις καλλιέργειες στις φιάλες. Στις δεδομένες πειραματικές συνθήκες, όπως αναμενόταν, μειώθηκε σημαντικά η διάρκεια όλων των καλλιεργειών, βελτιώνοντας έτσι την παραγωγικότητα των μεταβολιτών, ενώ παράλληλα ενισχύθηκε και η κυτταρική ανάπτυξη (σύγκρινε Πίνακες III-2 και III-3). Η μεγαλύτερη παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης παρατηρήθηκε στην καλλιέργεια του στελέχους *C. freundii* FMCC-B 294 (VK-19). Ο μικροοργανισμός αφομοίωσε ταχύτερα από όλα τα εξεταζόμενα στελέχη την ακάθαρτη γλυκερόλη προς παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης, με συνέπεια να σημειωθεί η μεγαλύτερη παραγωγικότητα, 1,01 g/L/h. Μόλις 10 ώρες μετά τον εμβολιασμό, 21,1 g/L γλυκερόλης μεταβολίστηκαν πλήρως και σχηματίστηκαν 10,1 g/L 1,3-προπανοδιόλης, που αντιστοιχούν σε συντελεστή απόδοσης $Y_{PD/Gly}=0,47$ g/g. Η παραγωγή συνοδεύτηκε από την έκκριση μικρών ποσοτήτων οξικού, γαλακτικού και φορμικού οξέος στο μέσο της καλλιέργειας, με τελικές συγκεντρώσεις 1,8, 1,8 και 0,9 g/L, αντίστοιχα. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε συνθήκες μη σταθερού

pH στις καλλιέργειες σε φιάλες Duran παράχθηκαν 5,8 g/L 1,3-προπανοδιόλης από το συγκεκριμένο στέλεχος.

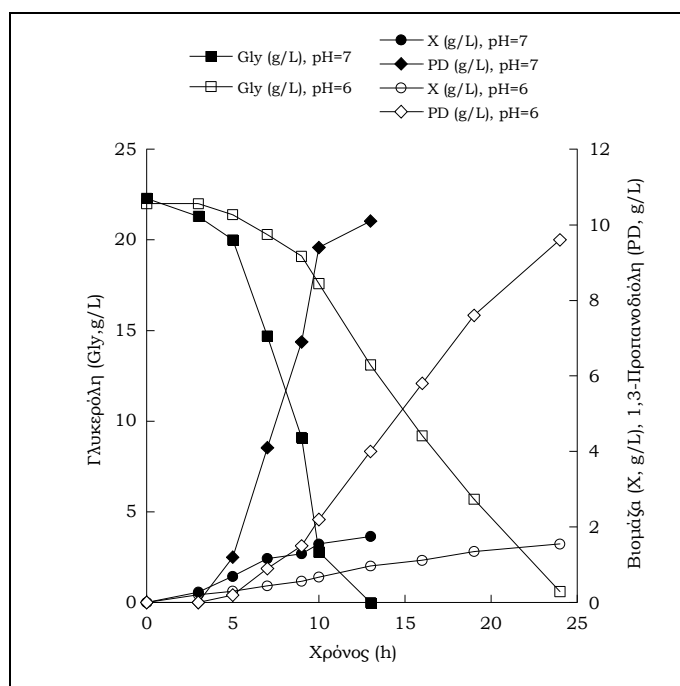
Από την άλλη πλευρά, στην ασυνεχή καλλιέργεια του στελέχους *C. freundii* FMCC-207, όπως και στις καλλιέργειες σε φιάλες (Πίνακας III-2) δεν σχηματίστηκε 1,3-προπανοδιόλη. Επιπλέον, σε συνθήκες σταθερού pH εξαλείφθηκε η σύνθεση της 2,3-βουτανοδιόλης και ο μεταβολισμός στράφηκε προς την παραγωγή βιομάζας και αιθανόλης. Πιο αναλυτικά η βιομάζα αυξήθηκε από 1,1 σε 2,7 g/L, συγκριτικά με την καλλιέργεια μη ελεγχόμενου pH. Παράλληλα, η γλυκερόλη καταναλώθηκε πλήρως 12 ώρες μετά τον εμβολιασμό, όποτε και παράχθηκαν 8,0 g/L αιθανόλης, που αντιστοιχούν σε συντελεστή απόδοσης $Y_{EtOH/Gly}=0,45$ g/g και παραγωγικότητα 0,67 g/L/h. Αξίζει να σημειωθεί ότι η συγκέντρωση και η παραγωγικότητα αυτή ήταν η υψηλότερη που επιτεύχθηκε μεταξύ των εξεταζόμενων στελεχών, τόσο στις δεδομένες πειραματικές συνθήκες, όσο και στις καλλιέργειες σε φιάλες. Οι συνθήκες σταθερού pH περιόρισαν το σχηματισμό 2,3-βουτανοδιόλης και στην καλλιέργεια του στελέχους *E. aerogenes* FMCC-10. Το κύριο μεταβολικό προϊόν ήταν η αιθανόλη με τελική συγκέντρωση 4,6 g/L, ενώ μόλις 0,8 g/L 2,3-βουτανοδιόλης σχηματίστηκαν. Αντίθετα, στις αναερόβιες και αερόβιες καλλιέργειες σε φιάλες ο κύριος μεταβολίτης ήταν η 2,3-βουτανοδιόλη, ενώ είχαν παραχθεί 2,0 και 5,0 g/L, αντίστοιχα.

Χαρακτηριστική ήταν η επίδραση του σταθερού pH και στην περίπτωση της ασυνεχούς καλλιέργειας σε βιοαντιδραστήρα του στελέχους *K. oxytoca* FMCC-197. Όπως και στις καλλιέργειες σε φιάλες, σχηματίστηκε μίγμα 1,3-προπανοδιόλης, 2,3-βουτανοδιόλης και αιθανόλης, με διαφοροποίηση στην τελική συγκέντρωση των μεταβολιτών. Πιο συγκεκριμένα, η αιθανόλη αποδείχθηκε και πάλι το κύριο μεταβολικό προϊόν και η παραγωγή δεν επηρεάστηκε από την μεταβολή των συνθηκών pH. Αντίθετα, μειώθηκε ιδιαίτερα η παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης από 4,2 σε 1,1 g/L, ενώ βελτιώθηκε η παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης από 1,1 σε 3,8 g/L.

Είναι επομένως φανερό ότι σε όλες τις περιπτώσεις σχηματισμού 2,3-βουτανοδιόλης, οι συνθήκες σταθερού pH και η συνεχής εμφύσηση αζώτου στο μέσο της καλλιέργειας περιόρισαν ή ακόμη και εξάλειψαν τη σύνθεσή της και η ροή του άνθρακα κατευθύνθηκε προς την παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης και αιθανόλης.

Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι οι κυριότεροι παράγοντες που επηρεάζουν την ζύμωση της γλυκερόλης προς παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης είναι η σύσταση του θρεπτικού μέσου, οι συνθήκες αεροβίωσης (π.χ. εφαρμογή αυτό-παραγόμενης αναεροβίωσης και/ή εμφύσηση αζώτου) και το pH του μέσου καλλιέργειας (Petrov & Stoyanov, 2011; Chatzifragkou et al., 2012b). Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων στις ασυνεχείς καλλιέργειες σε φιάλες, υπό συνθήκες μη σταθερού pH, παρατηρήθηκε μείωση της αρχικής τιμής pH 7,0 σε 6,0-6,5 για τα στελέχη του είδους *C. freundii* (Πίνακας III-2). Δεδομένης της υψηλής παραγωγικότητας σε 1,3-προπανοδιόλη

από το στελέχος *C. freundii* FMCC-B 294 (VK-19), καθώς και της επίδρασης του pH στον μεταβολισμό της γλυκερόλης, πραγματοποιήθηκε μια επιπλέον αναερόβια καλλιέργεια κατά την οποία το pH διατηρήθηκε στην τιμή 6,0.



Γράφημα III-3: Σύγκριση της παραγωγής βιομάζας (X–g/L), 1,3-προπανοδιόλης (PD–g/L) και της κατανάλωσης υποστρώματος κατά την αύξηση του στελέχους *Citrobacter freundii* FMCC-B 294 (VK-19) σε αναερόβιες ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα με μοναδική πηγή άνθρακα την βιομηχανική γλυκερόλη με αρχική συγκέντρωση 20 g/L.

Συνθήκες καλλιέργειας: αναερόβια ασυνεχής καλλιέργεια (εμφύσηση N₂ με ροή 0,1 LPM) σε βιοαντιδραστήρα 1,2-L, pH=7,0±0,2 (συμπαγή σύμβολα) και pH=6,0±0,2 (κενά σύμβολα), θερμοκρασία 30 °C και ανάδευση 150 rpm.

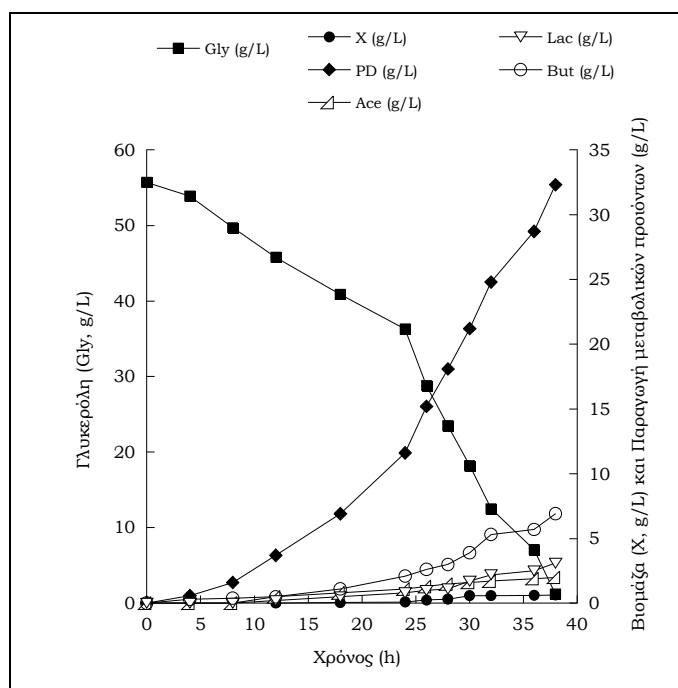
Όπως απεικονίζεται και στο Γράφημα III-3, ο μικροοργανισμός εμφάνισε ικανοποιητική κυτταρική αύξηση και στις δύο καλλιέργειες. Η μείωση του pH στην τιμή 6,0 επηρέασε σε μικρό βαθμό την τελική συγκέντρωση της παραγόμενης βιομάζας, καθώς μία μικρή μείωση από την τιμή 1,75 σε 1,55 g/L, σημειώθηκε συγκριτικά με την καλλιέργεια με pH=7,0. Εντούτοις, η μεταβολή αυτή του pH επέδρασε σημαντικά στην τιμή του μέγιστου ειδικού ρυθμού αύξησης (μ_{\max}), ο οποίος υπολογίστηκε από την προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων στην ευθεία με

$$\ln\left(\frac{X}{X_0}\right) = \mu_{\max} \times \Delta t$$
 για την εκθετική φάση αύξησης του μικροοργανισμού. Ο μ_{\max} περίπου υπο-

τριπλασιάστηκε στην καλλιέργεια με pH=6,0 και εμφάνισε τιμή 0,14 h⁻¹, συγκριτικά με την τιμή 0,43 h⁻¹ στην καλλιέργεια με pH=7,0. Ως εκ τούτου η ελάττωση του ρυθμού αύξησης είχε ως άμεση συνέπεια τον σχεδόν διπλασιασμό της διάρκειας της καλλιέργειας από τις 10 σε 24 ώρες, ενώ παράλληλα οδήγησε σε μείωση ρυθμού κατανάλωσης του υποστρώματος και του ρυθμού σύνθεσης

της 1,3-προπανοδιόλης κατά τις 12 πρώτες ώρες της καλλιέργειας. Αξίζει ωστόσο να σημειωθεί το γεγονός ότι στο τέλος της καλλιέργειας με pH=6,0, τόσο η συγκέντρωση της 1,3-προπανοδιόλης, όσο και ο συντελεστής απόδοσης $Y_{PD/Gly}$ εμφάνισαν μικρές διαφοροποιήσεις συγκριτικά με την καλλιέργεια με pH=7,0. Πιο συγκεκριμένα σχηματίστηκαν 9,6 g/L 1,3-προπανοδιόλης (έναντι 10,1 g/L στην καλλιέργεια με pH=7,0), που αντιστοιχούν σε $Y_{PD/Gly}=0,44$ g/g. Φαίνεται λοιπόν ότι στις δεδομένες πειραματικές συνθήκες η αλλαγή του pH από την βέλτιστη τιμή 7,0 σε χαμηλότερη 6,0, επέδρασε σημαντικά στον ρυθμό κυτταρικής αύξησης και την παραγωγικότητα της 1,3-προπανοδιόλης, σε αντίθεση με τον συντελεστή απόδοσης ο οποίος πρακτικά παρέμεινε αμετάβλητος. Έτσι αποδεικνύεται η δυνατότητα του στελέχους για παραγωγή υψηλών συγκεντρώσεων 1,3-προπανοδιόλης, ακόμη και σε μη βέλτιστες συνθήκες pH για την αύξηση του.

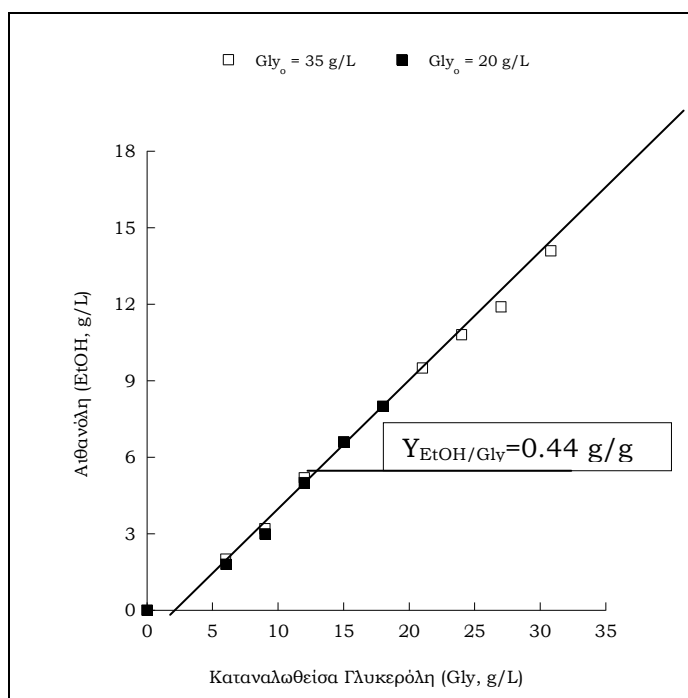
Λαμβάνοντας υπόψη ότι ο μικροοργανισμός *Cl. butyricum* NRRL B-23495 βρέθηκε ο καταλληλότερος μεταξύ των υπολοίπων στελεχών όσον αφορά την δυνατότητα σύνθεσης 1,3-προπανοδιόλης, προκειμένου να ενισχυθεί η παραγωγή από βιομηχανική γλυκερόλη, πραγματοποιήθηκε μια επιπρόσθετη καλλιέργεια με αρχική συγκέντρωση υποστρώματος 55,0 g/L.



Γράφημα III-4: Γραφική παράσταση της κατανάλωσης γλυκερόλης και παραγωγής βιομάζας (X-g/L), 1,3-προπανοδιόλης (PD-g/L), οξικού οξέος (Ace-g/L), γαλακτικού οξέος (Lac-g/L), και βουτυρικού οξέος (But-g/L), κατά την αύξηση του στελέχους *Clostridium butyricum* NRRL B-23495 σε ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα με μοναδική πηγή άνθρακα την βιομηχανική γλυκερόλη με αρχική συγκέντρωση 55,0 g/L.

Συνθήκες καλλιέργειας: αναερόβια ασυνεχής καλλιέργεια (εμφύσηση N_2 με ροή 0,1 LPM) σε βιοαντιδραστήρα 1,2-L, pH=6,8±0,2, θερμοκρασία 37 °C και ανάδευση 150 rpm.

Όπως απεικονίζεται και στο Γράφημα III-4, η ποσότητα της γλυκερόλης καταναλώθηκε πλήρως 38 ώρες μετά τον εμβολιασμό, παρά την αρχική υψηλή συγκέντρωση του υποστρώματος. Πιο συγκεκριμένα, τις πρώτες 24 ώρες της καλλιέργειας ο ρυθμός κατανάλωσης είναι σχετικά αργός, 0,4 g/L/h, και αυξήθηκε στην τιμή 3,2 g/L/h στο διάστημα από 24 έως 38 ώρες. Κατ' αντιστοιχία, η παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης, παρά το γεγονός ότι ξεκίνησε με σχετικά χαμηλό ρυθμό, στο τέλος της ζύμωσης έφτασε τα 32,2 g/L. Πιθανότατα ο μικροοργανισμός χρειάστηκε περισσότερο χρόνο να προσαρμοστεί στην αρχικά αυξημένη συγκέντρωση υποστρώματος, όσο και στις προσμίξεις της βιομηχανικής γλυκερόλης, με συνέπεια την επιβράδυνση της κατανάλωσης γλυκερόλης καθώς και της σύνθεσης 1,3-προπανοδιόλης συγκριτικά με την καλλιέργεια με $Gly_0=20$ g/L. Παρόλα αυτά και στις δύο καλλιέργειες ο συντελεστής απόδοσης $Y_{PD/Gly}$ έλαβε την ίδια τιμή, 0,58 g/g, αποδεικνύοντας την ικανοποιητική δυνατότητα του στελέχους για παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης από ακάθαρτη γλυκερόλη.



Γράφημα III-5: Παραγωγή αιθανόλης (EtOH-g/L) προς κατανάλωση γλυκερόλης (Gly-g/L) από το στέλεχος *Citrobacter freundii* FMCC-207, κατά την διάρκεια ασυνεχών καλλιεργειών σε βιοαντιδραστήρα.

Συνθήκες καλλιέργειας: αναερόβιες ασυνεχείς καλλιέργειες (εμφύσηση N_2 με ροή 0,1 LPM) σε βιοαντιδραστήρα 1,2-L, αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 20 και 35 g/L, θερμοκρασία 30 °C, pH=7,0±0,2 και ανάδευση 150 rpm.

Παράλληλα, δεδομένου ότι ο μικροοργανισμός *C. freundii* FMCC-207 βρέθηκε ο καταλληλότερος μεταξύ των υπολοίπων στελεχών όσον αφορά την δυνατότητα σύνθεσης αιθανόλης, πραγματοποιήθηκε μια επιπρόσθετη καλλιέργεια με αρχική συγκέντρωση υποστρώματος 35,0 g/L, προκειμένου να ενισχυθεί η παραγωγή από βιομηχανική γλυκερόλη. Μετά από 22 ώρες ζύμωσης σχηματίστηκαν 14,5 g/L αιθανόλης, που αντιστοιχούν σε συντελεστή

απόδοσης $Y_{\text{EtOH/Gly}}=0,45$ g/g και παραγωγικότητα 0,69 g/L/h. Ο συνολικός συντελεστής απόδοσης (global yield) παραγόμενης αιθανόλης προς καταναλωθείσα γλυκερόλη και για τις δύο καλλιέργειες (αρχική συγκέντρωση υποστρώματος 20,0 και 35,0 g/L) έλαβε τιμή 0,44 g/g, όπως απεικονίζεται στο Γράφημα III-5. Αποδεικνύεται επομένως η σταθερότητα της παραπάνω βιοδιεργασίας από το στέλεχος *C. freundii* FMCC-207, μέσα στο εύρος των αρχικών συγκεντρώσεων γλυκερόλης που εξετάστηκαν.

Με βάση τα αποτελέσματα των πειραμάτων, τόσο στις ασυνεχείς καλλιέργειες σε φιάλες, όσο και στις ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα, από το αρχικό σύνολο των 84 βακτηριακών στελεχών επιλέχθηκαν τέσσερα για περαιτέρω μελέτη. Τα κριτήρια για την επιλογή αποτέλεσαν ο ρυθμός κατανάλωσης της γλυκερόλης, η κυτταρική αύξηση και ασφαλώς η παραγωγικότητα και η τελική συγκέντρωση των τριών κύριων μεταβολικών προϊόντων. Στον Πίνακα III-4 παρουσιάζονται τα τέσσερα αυτά βακτηριακά στελέχη και τα αντίστοιχα μεταβολικά προϊόντα.

Πίνακας III-4: Επιλογή βακτηριακών στελεχών ως προς την παραγωγή των τριών κύριων μεταβολικών προϊόντων.

Στέλεχος	<i>C. freundii</i> FMCC-B 294 (VK-19)	<i>K. oxytoca</i> FMCC- 197	<i>E. aerogenes</i> FMCC- 10	<i>C. freundii</i> FMCC- 207
Παραγόμενα μεταβολικά προϊόντα, υπό αναερόβιες συνθήκες	1,3-προπανοδιόλη	1,3-προπανοδιόλη 2,3-βουτανοδιόλη αιθανόλη	2,3-βουτανοδιόλη Αιθανόλη	Αιθανόλη
Παραγόμενα μεταβολικά προϊόντα, υπό αερόβιες συνθήκες	-	-	2,3-βουτανοδιόλη Αιθανόλη	-

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα αποτελέσματα των καλλιεργειών του στελέχους *Cl. butyricum* NRRL B-23495 αποτέλεσαν τη βάση σύγκρισης για την κατανάλωση γλυκερόλης και παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να αξιοποιηθούν προσφάτως απομονωμένα και όχι προηγουμένως μελετημένα στελέχη των συλλογών του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων και όχι ήδη κατατεθειμένοι σε συλλογές μικροοργανισμοί. Για τους λόγους αυτούς το στέλεχος *Cl. butyricum* NRRL B-23495 δεν μελετήθηκε πιο αναλυτικά.

Το στέλεχος *C. freundii* FMCC-B 294 (VK-19) στις ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα εμφάνισε την υψηλότερη παραγωγικότητα από όλα τα εξεταζόμενα στελέχη, ενώ παράλληλα η ζύμωση ολοκληρώθηκε ταχύτερα από τις υπόλοιπες καλλιέργειες. Δεδομένων των βιομηχανικών απαιτήσεων όχι μόνο για υψηλές τελικές συγκεντρώσεις, αλλά και υψηλές παραγωγικότητες κρίθηκε σκόπιμη η συνέχιση της μελέτης των πειραμάτων αυτό με το στέλεχος.

Επίσης, είναι πολύ περιορισμένος ο αριθμός των αναφορών στη βιβλιογραφία σχετικά με την παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης από βακτήρια του γένους *Citrobacter*.

Μέχρι σήμερα είναι λίγες οι μελέτες που σχετίζονται με τον μεταβολισμό γλυκερόλης από στελέχη του είδους *K. oxytoca* (Yang et al., 2007), ενώ δεν υπάρχουν αναφορές για την χρήση βιομηχανικής γλυκερόλης από στελέχη του είδους. Στην παρούσα μελέτη το στέλεχος FMCC-197, ανεξάρτητα από τις πειραματικές συνθήκες που εφαρμόστηκαν, αναπτύχθηκε σε υποστρώματα βιομηχανικής γλυκερόλης και παρήγαγε μίγμα και των τριών κύριων μεταβολικών προϊόντων. Παρόλα αυτά, η αναλογία των μεταβολιτών επηρεάστηκε από τις διαφορετικές παραμέτρους στις ασυνεχείς καλλιέργειες σε φιάλες και σε βιοαντιδραστήρα. Έτσι κρίθηκε αναγκαία η περαιτέρω μελέτη με στόχο την παραγωγή του εκάστοτε επιθυμητού προϊόντος, ανάλογα με τις πειραματικές συνθήκες.

Ιδιαίτερα σημαντική είναι η παραγωγή αιθανόλης υπό αναερόβιες συνθήκες από τα στελέχη *E. aerogenes* FMCC-10 και *C. freundii* FMCC-207, καθώς και η παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης ως το κύριο μεταβολικό προϊόν κατά την ζύμωση της βιομηχανικής γλυκερόλης από στελέχη του είδους *E. aerogenes*, με δεδομένο ότι υπάρχουν ελάχιστες σχετικές αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία. Οι παραγόμενες ποσότητες, τόσο σε απόλυτη τιμή (g/L), όσο και σε σχετικές τιμές (g ανά g καταναλωθείσας γλυκερόλης), είναι συγκρίσιμες με τις αντίστοιχες στην διεθνή βιβλιογραφία. Ως εκ τούτου, η συνέχιση της μελέτης των στελεχών αυτών κρίνεται ενδιαφέρουσα και θα παρουσιαστεί στα επόμενα κεφάλαια.

Το παρόν κεφάλαιο έχει δημοσιευθεί:

Maria Metsoviti, Spiros Paramithiotis, Eleftherios H. Drosinos, Maria Galiotou-Panayotou, George-John E. Nychas and Seraphim Papanikolaou (2012). Screening of bacterial strains capable of converting biodiesel-derived raw glycerol into 1,3-propanediol, 2,3-butanedio and ethanol, *Engineering in. Life Sciences* 12(1): 57–68.

III.2 Βιοτεχνολογική παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης, 2,3-βουτανοδιόλης και αιθανόλης κατά την καλλιέργεια του μικροοργανισμού

Klebsiella oxytoca FMCC-197

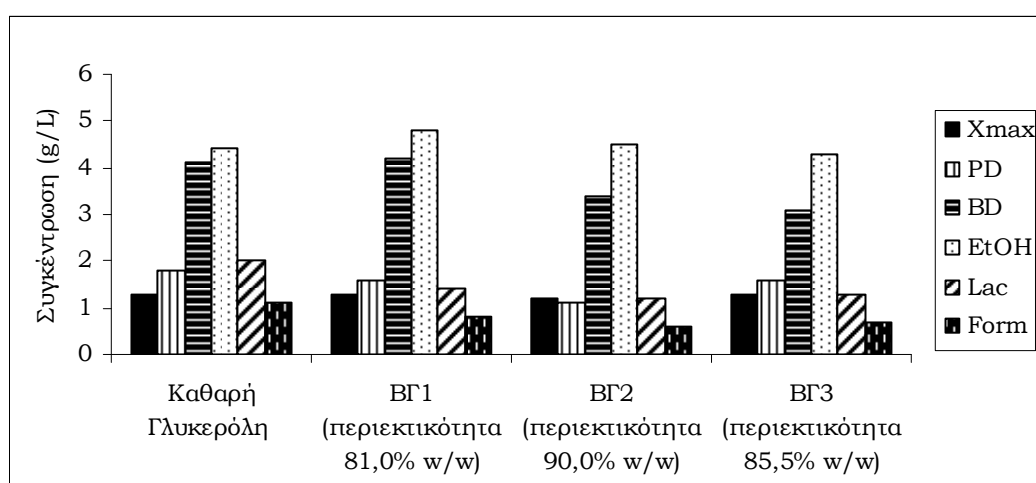
III.2.1. Βιοτεχνολογική παραγωγή μεταβολικών προϊόντων κατά την αύξηση του μικροοργανισμού *Klebsiella oxytoca* FMCC-197 σε υποστρώματα βιομηχανικής γλυκερόλης διαφορετικής σύστασης

Ο μικροοργανισμός *K. oxytoca* FMCC-197 επιλέχθηκε κατά το πρώτο στάδιο της παρούσας μελέτης για την δυνατότητα του να μεταβολίζει την βιομηχανική γλυκερόλη, προερχόμενη από την γερμανική εταιρεία βιοκαυσίμων "Archer Daniels Midland (ADM) Industries" (ΒΓ₁), προς παραγωγή μίγματος 1,3-προπανοδιόλης (PD), 2,3-βουτανοδιόλης (BD) και αιθανόλης (EtOH). Με στόχο την διεύρυνση αυτής της παρατήρησης για βιομηχανικές γλυκερόλες διαφορετικής σύστασης, πραγματοποιήθηκαν ασυνεχείς καλλιέργειες χρησιμοποιώντας ως υποστρώματα δύο βιομηχανικές γλυκερόλες προερχόμενες από τις ελληνικές εταιρείες "ΕΛΙΝ Βιοκαύσιμα Α.Ε." (ΒΓ₂) και "GF Energy Α.Ε.Β.Ε." (ΒΓ₃). Στις περιπτώσεις των γλυκερολών ΒΓ₁ και ΒΓ₃ το υλικό εκκίνησης για την παραγωγή του βιοκαυσίμου ήταν φυτικά έλαια, ενώ στην περίπτωση της γλυκερόλης ΒΓ₂ χρησιμοποιούμενα μαγειρικά έλαια, όπως τηγανέλαια (Αναλυτικότερα βλέπε § II.2.2). Ταυτόχρονα, ως μάρτυρας διενεργήθηκε μια ζύμωση σε υπόστρωμα καθαρής γλυκερόλης. Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε φιάλες τύπου Duran 1-L, σε συνθήκες μη ελεγχόμενου pH, με αρχική τιμή 7,0 και ολοκληρώθηκαν σε 24 ώρες. Επιλέχθηκε χαμηλή αρχική συγκέντρωση πηγής άνθρακα (Gly₀=20 g/L), ούτως ώστε να αποφευχθεί φαινόμενο παρεμπόδισης εξαιτίας του υποστρώματος. Μετά την ολοκλήρωση των ζυμώσεων, η κατανάλωση της γλυκερόλης κυμάνθηκε από 14,5 έως 15,5 g/L για τα υποστρώματα βιομηχανικής γλυκερόλης, ενώ στην καλλιέργεια καθαρής γλυκερόλης ήταν ελαφρώς υψηλότερη φθάνοντας τα 16,0 g/L.

Όσον αφορά την μέγιστη βιομάζα (X_{max}) παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν σε όλες τις καλλιέργειες. Ανεξάρτητα από το είδος και την προέλευση της γλυκερόλης η παραγόμενη βιομάζα εκφρασμένη σε g/L ήταν ~1,3. Όπως απεικονίζεται και στο Γράφημα III-6 τα τελικά μεταβολικά προϊόντα ήταν κυρίως αιθανόλη και 2,3-βουτανοδιόλη, ενώ μικρές ποσότητες 1,3-προπανοδιόλης, γαλακτικού (Lac) και μυρμηκικού οξέος (Form) σχηματίστηκαν.

Η περιεκτικότητα του υποστρώματος σε γλυκερόλη δεν επηρέασε την σύνθεση του κύριου μεταβολικού προϊόντος, δηλαδή της αιθανόλης, η τελική συγκέντρωση της οποίας κυμάνθηκε μεταξύ 4,3 - 4,8 g/L. Οι τιμές αυτές είναι συγκρίσιμες με τα 4,4 g/L που σχηματίστηκαν στην καλλιέργεια του μάρτυρα. Κατά αντίστοιχο τρόπο και ο σχηματισμός τόσο της 1,3-προπανοδιόλης όσο και των οργανικών οξέων (γαλακτικού και μυρμηκικού) δεν διαφοροποιήθηκαν με την σύσταση της γλυκερόλης και η τελική συγκέντρωση κυμάνθηκε από 1,1-1,6 g/L, 1,2-1,4 g/L και 0,6-0,7 g/L, αντίστοιχα. Παρόλα αυτά η σύνθεση τους φάνηκε να ευνοείται ελαφρώς από την

χρήση της καθαρής γλυκερόλης ως υποστρώματος. Οι παρατηρήσεις αυτές δεν σημειώθηκαν στην περίπτωση της 2,3-βουτανοδιόλης, η βιοσύνθεση της οποίας φαίνεται να επηρεάστηκε από την σύσταση της ακάθαρτης γλυκερόλης. Η μέγιστη συγκέντρωση 4,1 g/L παρατηρήθηκε στην καλλιέργεια με υπόστρωμα την γλυκερόλη ΒΓ₁ και είναι ελάχιστα μεγαλύτερη με την αντίστοιχη στην καλλιέργεια του μάρτυρα, ενώ η μικρότερη συγκέντρωση 3,1 g/L στην καλλιέργεια με υπόστρωμα την γλυκερόλη ΒΓ₃. Ο μέγιστος συντελεστής απόδοσης παραγωγής αιθανόλης προς αναλωθείσα γλυκερόλη ($Y_{EtOH/Gly}$) ήταν 0,22 g/g, και μέγιστος συντελεστής 2,3-βουτανοδιόλης προς αναλωθείσα γλυκερόλη ($Y_{BD/Gly}$) ήταν 0,16 g/g. Αμφότερες οι μέγιστες τιμές επιτεύχθηκαν όταν χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα η βιομηχανική γλυκερόλη ΒΓ₁.



Γράφημα III-6: Μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας (X-g/L), 1,3-προπανοδιόλης (PD-g/L), 2,3-βουτανοδιόλης (BD-g/L), αιθανόλης (EtOH-g/L), γαλακτικού (Lac-g/L) και μυρμηκικού οξέος (Form-g/L), κατά την αύξηση του στελέχους *Klebsiella oxytoca* FMCC-197 σε υποστρώματα βιομηχανικής γλυκερόλης διαφορετικής σύστασης.

Τα παραπάνω αποτελέσματα απέδειξαν ότι και οι τρεις τύποι βιομηχανικής γλυκερόλης ήταν κατάλληλα υποστρώματα για την αύξηση του μικροοργανισμού *K. oxytoca* και την παραγωγή μίγματος 1,3-προπανοδιόλης, 2,3-βουτανοδιόλης και αιθανόλης, υπό τις δεδομένες πειραματικές συνθήκες. Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν στην τελική συγκέντρωση της αιθανόλης και της 1,3-προπανοδιόλης ήταν σε απόλυτες τιμές της τάξης του 0,5 g/L, ενώ ελαφρώς μεγαλύτερες ήταν οι διαφοροποιήσεις στην σύνθεση της 2,3-βουτανοδιόλης όπου η απόκλιση μεταξύ μέγιστης και ελάχιστης συγκέντρωσης έφτασε το 1,0 g/L. Ως εκ τούτου μπορεί να θεωρηθεί ότι οι προσμίξεις των συγκεκριμένων υποστρωμάτων (άλατα, μεθανόλη, κλπ.) καθώς και η προέλευση του υλικού εκκίνησης για την παραγωγή του βιοκαυσίμου (φυτικά έλαια ή χρησιμοποιούμενα μαγειρικά έλαια) δεν φαίνεται να είχαν ιδιαίτερα αρνητική επίπτωση στον μεταβολισμό της γλυκερόλης από το στέλεχος, ενώ ταυτόχρονα και η βιοσύνθεση των διολών και της αιθανόλης δεν επηρεάστηκαν σε σημαντικό βαθμό από την περιεκτικότητα του υποστρώματος σε γλυκερόλη. Δεδομένου ότι η

βιομηχανική γλυκερόλη προερχόμενη από το εταιρεία βιοκαυσίμων "ADM Industries" ευνόησε ελαφρώς την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων, σε σύγκριση με τα άλλα είδη βιομηχανικής γλυκερόλης, επιλέχθηκε ως πηγή άνθρακα για τα επικείμενα πειράματα.

III.2.2. Επίδραση των συνθηκών αναερόβιωσης στην σύνθεση μεταβολικών προϊόντων κατά την αύξηση του στελέχους *Klebsiella oxytoca* FMCC-197 σε υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης

Τα αποτελέσματα προηγούμενων πειραμάτων απέδειξαν ότι το υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης, ανεξάρτητα από το την περιεκτικότητά του σε γλυκερόλη, είναι ιδιαίτερος ικανοποιητικό για την αύξηση του στελέχους *K. oxytoca* και την παραγωγή μίγματος 1,3-προπανοδιόλης, 2,3-βουτανοδιόλης και αιθανόλης. Ωστόσο παρατηρήθηκε διακριτή διαφορά στην αναλογία της συγκέντρωσης των τελικών προϊόντων, ανάλογα με τις πειραματικές συνθήκες που εφαρμόστηκαν και κυρίως της εμφύσησης ή όχι του μέσου καλλιέργειας με άζωτο (§ III.1-2 και III.1-3). Προκειμένου να μελετηθεί το προφίλ των μεταβολικών προϊόντων σε συνάρτηση με τις συνθήκες καλλιέργειας, πραγματοποιήθηκαν αναερόβιες ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 20 και 40 g/L, κατά τις οποίες είτε γινόταν εμφύσηση του μέσου με άζωτο (0,1 LPM) καθ' όλη την διάρκεια της ζύμωσης, είτε μόνο για χρονικό διάστημα είκοσι λεπτών πριν από τον εμβολιασμό. Στην δεύτερη περίπτωση οι εφαρμοζόμενες μετά τον εμβολιασμό αναερόβιες συνθήκες ευνοούν τη μικροβιακή αύξηση, και ο μικροοργανισμός μέσω του ίδιου του κυτταρικού μεταβολισμού παράγει αέρια (όπως διοξείδιο του άνθρακα μέσω της αποκαρβοξυλίωσης του πυροσταφυλικού οξέος, υδρογόνο μέσω της λυάσης του μυρμηγκικού οξέος), τα οποία διατηρούν το αναερόβιο περιβάλλον αύξησης. Υπό τις συνθήκες αυτές η αναερόβωση χαρακτηρίζεται ως αυτό-παραγόμενη (self-generated anaerobiosis) (Papanikolaou et al., 2004).

Πίνακας III-5: Σύγκριση της παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης (PD), 2,3-βουτανοδιόλης (BD), αιθανόλης (EtOH), γαλακτικού (Lac) και μυρμηγκικού οξέος (Form), κατά την αύξηση του στελέχους *Klebsiella oxytoca* FMCC-197 σε ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα, υπό διαφορετικές συνθήκες εμφύσησης αζώτου.

Gly ₀ (g/L)	N ₂ (LPM)	Gly _c (g/L)	Χρόνος (h)	X (g/L)	Συγκέντρωση μεταβολικών προϊόντων (g/L)					Συντελεστής απόδοσης (g/g)		
					PD	BD	EtOH	Lac	Form	PD	BD	EtOH
~20	0,1	20,6	14	2,4	4,3	1,3	5,2	0,6	0,6	0,21	0,06	0,25
~20	-	19,1	14	2,1	5,5	-	1,5	1,6	0,8	0,29	-	0,08
~40	0,1	32,2	28	2,2	9,1	2,5	10,5	1,6	1,4	0,28	0,08	0,33
~40	-	34,8	32	2,1	12,6	-	5,8	4,5	1,7	0,36	-	0,17

Συνθήκες καλλιέργειας: αναερόβιες ασυνεχείς καλλιέργειες (εμφύσηση N₂ με ροή 0,1 LPM) σε βιοαντιδραστήρα 1,2-L, pH=7,0±0,2, θερμοκρασία 30°C και ανάδευση 150 rpm.

Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν με διαφορετικά αρχικά εμβόλια, ενώ το κάθε σημείο της ζύμωσης είναι ο μέσος όρος δυο ανεξαρτήτων πειραμάτων.

Gly₀: αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης, Gly_C: καταναλωθείσα γλυκερόλη, X: μέγιστη παραγόμενη βιομάζα.

Όπως παρατηρείται και στα δεδομένα του Πίνακα III-5, οι διαφοροποιήσεις τόσο στον σχηματισμό όσο και στην αναλογία των μεταβολικών προϊόντων ήταν εμφανείς, ανεξάρτητα από την αρχική συγκέντρωση του υποστρώματος (Gly₀=20 και 40 g/L). Αναλυτικότερα, στα πειράματα χωρίς συνεχή εμφύσηση αζώτου η σύνθεση της 2,3-βουτανοδιόλης κατεστάλη και δεν ανιχνεύτηκε στο μέσο καλλιέργειας καθ' όλη την διάρκεια και των δύο ζυμώσεων. Ταυτόχρονα, η απουσία αζώτου μετέβαλε και την τελική συγκέντρωση των δύο κύριων προϊόντων, δηλαδή της 1,3-προπανοδιόλης και αιθανόλης. Στις δεδομένες πειραματικές συνθήκες ο κύριος μεταβολίτης ήταν η 1,3-προπανοδιόλη, ενώ η τελική συγκέντρωση ήταν τουλάχιστον διπλάσια της συγκέντρωσης αιθανόλης. Η μέγιστη παραγωγή PD_{max} ήταν 12,6 g/L και επιτεύχθηκε στην καλλιέργεια με Gly₀ = 40 g/L. Η τιμή αυτή αντιστοιχεί σε συντελεστή απόδοσης Y_{PD/Gly} 0,36 g/g και παραγωγικότητα 0,39 g/L/h.

Από την άλλη πλευρά η συνεχής εμφύσηση αζώτου ευνόησε την βιοσύνθεση της αιθανόλης η μέγιστη συγκέντρωση της οποίας ήταν ιδιαίτερος ικανοποιητική και έφτασε τα 10,5 g/L, στην καλλιέργεια με Gly₀=40 g/L (Πίνακας III-5). Αξίζει να σημειωθεί το γεγονός ότι στις δεδομένες πειραματικές συνθήκες η παραγωγή της αιθανόλης και 1,3-προπανοδιόλης έγινε σε αναλογία σχεδόν 1:1, με ελαφρώς μεγαλύτερη συγκέντρωση αιθανόλης (~1,1 g/L), ενώ στις καλλιέργειες χωρίς σπαργή αζώτου η συγκέντρωση της 1,3-προπανοδιόλης ξεπέρασε κατά το διπλάσιο την συγκέντρωση της αιθανόλης. Επιπλέον, και στις δύο καλλιέργειες με εμφύσηση, η ζύμωση συνοδεύεται από σχηματισμό μικρότερων ποσοτήτων γαλακτικού και μυρμηκικού οξέος σε σύγκριση με τα πειράματα χωρίς άζωτο. Συγκεκριμένα, η παραγωγή μυρμηκικού οξέος δεν επηρεάστηκε από διαφορετικές συνθήκες αναεροβίωσης, ενώ ο σχηματισμός γαλακτικού οξέος ενισχύθηκε σε καλλιέργειες χωρίς σπαργή αζώτου. Τέλος, η παραγόμενη βιομάζα έμεινε σχεδόν ανεπηρέαστη από την μεταβολή των συνθηκών αναεροβίωσης, με συνέπεια να μην παρατηρηθούν ουσιαστικές διαφορές στις αντίστοιχες καλλιέργειες.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η μη συνεχής σπαργή με άζωτο επηρέασε αρνητικά τόσο την σύνθεση της 2,3-βουτανοδιόλης, όσο και της αιθανόλης, ενισχύοντας από την άλλη πλευρά σε σημαντικό βαθμό τον σχηματισμό του κύριου μεταβολίτη, δηλαδή της 1,3-προπανοδιόλης. Προφανώς, το γεγονός ότι το pH της καλλιέργειας διατηρήθηκε σταθερό και τα αέρια προϊόντα του μεταβολισμού (CO₂ και πιθανόν H₂) παρέμειναν στο μέσο της καλλιέργειας (στην περίπτωση των πειραμάτων χωρίς διαρκή σπαργή με άζωτο) ευνόησαν την παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης και κατά συνέπεια, το αναγωγικό μεταβολικό μονοπάτι γλυκερόλη \longrightarrow 1,3-προπανοδιόλη (βλ. Σχήμα I-5). Ταυτόχρονα το μεταβολικό μονοπάτι πυροσταφυλικό \longrightarrow 2,3-βουτανοδιόλη

απενεργοποιήθηκε πλήρως, ενώ επηρεάστηκε αρνητικά και το μονοπάτι ακετυλο-CoA \longrightarrow αιθανόλη. Φαίνεται επίσης ότι προκειμένου να διατηρηθεί η ισορροπία μεταξύ των αναγωγικών ισοδυνάμων που απαιτούνται για το μεταβολισμό της γλυκερόλης ευνοήθηκε το μονοπάτι πυροσταφυλικό \longrightarrow γαλακτικό οξύ και συνεπώς αυξήθηκε η σύνθεση του γαλακτικού οξέος. Αντιθέτως όταν στο μέσο της καλλιέργειας εισάγεται άζωτο και απομακρύνονται τα αέρια προϊόντα του μεταβολισμού, τότε ευνοείται η σύνθεση και των τριών κύριων μεταβολικών προϊόντων και κυρίως το μεταβολικό μονοπάτι ακετυλο-CoA \longrightarrow αιθανόλη.

III.2.3. Επίδραση των συνθηκών pH στην σύνθεση μεταβολικών προϊόντων κατά την αύξηση του στελέχους *Klebsiella oxytoca* FMCC -197 σε υπόστρωμα με βάση την βιομηχανική γλυκερόλη

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στο κεφάλαιο της εισαγωγής, το υπόστρωμα γλυκερόλης είναι το μοναδικό που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον σχηματισμό της 1,3-προπανοδιόλης, καθώς έως σήμερα κανένας μικροοργανισμός δεν δύναται να μεταβολίσει απευθείας οποιοδήποτε σάκχαρο προς παραγωγή αυτού του μεταβολίτη. Δεδομένου ότι οι συνθήκες χωρίς συνεχή εμφύσηση αζώτου στο μέσο της καλλιέργειας, οδήγησαν σε αύξηση της συγκέντρωσης της 1,3-προπανοδιόλης και συγχρόνως περιόρισαν την σύνθεση των άλλων μεταβολιτών (2,3-βουτανοδιόλη και αιθανόλη), αποφασίστηκε να διερευνηθεί και η επίδραση των συνθηκών του pH στο σχηματισμό των προϊόντων καθώς και στην κατανάλωση του υποστρώματος. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν ασυνεχείς καλλιέργειες σε φιάλες χωρίς να ρυθμίζεται το pH της ζύμωσης και ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα 1, 2-L κατά τις οποίες το pH του μέσου διατηρήθηκε σταθερό.

III.2.3.1. Ασυνεχείς καλλιέργειες σε φιάλες υπό συνθήκες μη-σταθερού pH

Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε αναερόβιες ανακινούμενες φιάλες τύπου Duran 1-L, σε συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας, αλλά μη-σταθερού pH. Η αρχική συγκέντρωση της γλυκερόλης κυμάνθηκε από 20 έως 80 g/L. Οι τελικές συγκεντρώσεις των μεταβολικών προϊόντων, η συνολική κατανάλωση του υποστρώματος, η παραγόμενη βιομάζα και η τελική τιμή του pH της καλλιέργειας δίνονται στον Πίνακα III-6. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε όλες τις περιπτώσεις, ο χρόνος ζύμωσης παρατάθηκε έως ότου ολοκληρωθεί ουσιαστικά η κατανάλωση του υποστρώματος.

Από τα δεδομένα του Πίνακα III-6 παρατηρείται ότι σε σχετικά χαμηλή αρχική συγκέντρωση υποστρώματος ($Gly_0=20$ g/L), οι κύριοι μεταβολίτες ήταν η αιθανόλη και η 2,3-βουτανοδιόλη με συγκεντρώσεις 4,7 και 4,3 g/L, αντίστοιχα. Η συγκέντρωση της 1,3-προπανοδιόλης ήταν αρκετά χαμηλότερη μόλις 1,5 g/L, παρόμοια με αυτή του γαλακτικού οξέος. Αξίζει να σημειωθεί ότι στην αντίστοιχη καλλιέργεια με $Gly_0=20$ g/L σε βιοαντιδραστήρα χωρίς συνεχή εμφύσηση αζώτου, αλλά υπό συνθήκες σταθερού pH (Πίνακας III-5), το κύριο μεταβολικό

προϊόν ήταν η 1,3-προπανοδιόλη, ενώ δεν σχηματίστηκε καθόλου 2,3-βουτανοδιόλη. Στην ίδια καλλιέργεια η παραγωγή αιθανόλης ήταν σχεδόν τρεις φορές μικρότερη συγκριτικά με την παραγόμενη 1,3-προπανοδιόλη.

Πίνακας III-6: Παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης (PD), 2,3-βουτανοδιόλης (BD), αιθανόλης (EtOH), γαλακτικού (Lac) και μυρμηκικού οξέος (Form), κατά την αύξηση του στελέχους *Klebsiella oxytoca* FMCC-197 σε ασυνεχείς καλλιέργειες σε φιάλες, σε υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης, υπό συνθήκες μη-σταθερού pH.

Gly ₀ (g/L)	Gly _C (g/L)	Χρόνος (h)	pH _f	X (g/L)	Συγκέντρωση μεταβολικών προϊόντων (g/L)					Συντελεστής απόδοσης (g/g)		
					PD	BD	EtOH	Lac	Form	PD	BD	EtOH
~20	16,0	24	5,9	1,3	1,5	4,3	4,7	1,4	0,8	0,09	0,27	0,29
~40	26,7	48	5,7	1,3	7,5	4,8	5,1	1,3	1,0	0,28	0,18	0,19
~60	32,2	96	5,2	1,3	10,1	4,8	5,5	1,6	1,1	0,31	0,15	0,17
~80	33,9	120	5,2	1,3	8,4	4,8	5,0	1,8	1,3	0,24	0,14	0,15

Συνθήκες καλλιέργειας: αναερόβιες ασυνεχείς καλλιέργειες σε ανακινούμενες φιάλες (80 rpm) τύπου Duran 1-L, αρχική τιμή pH=7,0±0,2 και θερμοκρασία 30 °C.

Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν με διαφορετικά αρχικά εμβόλια, ενώ το κάθε σημείο της ζύμωσης είναι ο μέσος όρος δυο ανεξαρτήτων πειραμάτων.

Gly₀: αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης, Gly_C: καταναλωθείσα γλυκερόλη, pH_f: τελική τιμή pH, X: μέγιστη παραγόμενη βιομάζα.

Όταν όμως αυξήθηκε η αρχική τιμή του υποστρώματος από 20 σε 40-80 g/L, το κύριο μεταβολικό προϊόν ήταν η 1,3-προπανοδιόλη. Μάλιστα η αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκερόλης από 40 σε 60 g/L, οδήγησε σε σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης του μεταβολίτη. Έτσι η μέγιστη συγκέντρωση PD_{max} 10,1 g/L σημειώθηκε στην καλλιέργεια με Gly₀=60 g/L. Η τιμή αυτή αντιστοιχεί και στον μέγιστο συντελεστή απόδοσης ανά καταναλωθείσα γλυκερόλη Y_{PD/Gly} 0,31 g/g και παραγωγικότητα 0,10 g/L/h. Από την άλλη πλευρά η περαιτέρω αύξηση γλυκερόλη σε Gly₀=80 g/L επηρέασε αρνητικά τον σχηματισμό του μεταβολίτη, με συνέπεια να μειωθεί η συγκέντρωση στα 8,4 g/L και ο αντίστοιχος συντελεστής απόδοσης Y_{PD/Gly} στην τιμή 0,24 g/g. Προφανώς η σχετικά υψηλή συγκέντρωση της γλυκερόλης σε συνδυασμό με τις πειραματικές συνθήκες που εφαρμόστηκαν (αυτό-παραγόμενη αναεροβίωση και μη-σταθερό pH) έδρασαν παρεμποδιστικά για τον ρυθμό κατανάλωσης του υποστρώματος, οδηγώντας σε μείωση της συγκέντρωσης του κύριου μεταβολίτη.

Αναφορικά με την κυτταρική αύξηση και τον σχηματισμό των υπολοίπων μεταβολιτών φαίνεται ότι στο εύρος 40-80 g/L η μεταβολή της αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης δεν είχε επιπτώσεις στην σύνθεση τους (σε απόλυτες τιμές - g/L). Ως εκ τούτου ανεξάρτητα από την Gly₀ η παραγόμενη βιομάζα σε όλες τις καλλιέργειες ήταν 1,3 g/L, η συγκέντρωση της 2,3-βουτανοδιόλης 4,8 g/L και της αιθανόλης παρέμεινε πρακτικά σταθερή αφού κυμάνθηκε από 5,0-5,5 g/L. Ομοίως

η συγκέντρωση του γαλακτικού και του μυρμηκικού οξέος χωρίς ιδιαίτερες διαφοροποιήσεις κυμάνθηκαν από 1,3-1,8 g/L και 1,0-1,3 g/L, αντίστοιχα. Αντίθετα οι συντελεστές απόδοσης της παραγόμενης 2,3-βουτανοδιόλης και αιθανόλης προς καταναλωθείσα γλυκερόλη μειώθηκαν προοδευτικά με την αύξηση της Gly_0 . Το αποτέλεσμα αυτό ήταν αναμενόμενο καθώς η συγκέντρωση των δύο μεταβολιτών παρέμεινε σταθερή, αλλά αυξήθηκε σταδιακά η συνολική κατανάλωση του υποστρώματος.

Η συσσώρευση των οργανικών οξέων στο μέσο της καλλιέργειας είχε ως άμεση συνέπεια την ελάττωση της τιμής pH από την αρχική τιμή 7,0 σε τελική τιμή που κυμάνθηκε από 5,9 έως 5,2. Η μέγιστη μείωση κατά 1,8 μονάδες σημειώθηκε στις καλλιέργειες με $Gly_0=60$ και 80 g/L, δηλαδή σε εκείνες που παρατηρήθηκε και η μεγαλύτερη συγκέντρωση οργανικών οξέων ($Lac_{max}=1,8$ g/L $Form_{max}=1,3$ g/L). Τέλος έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον να επισημανθεί το γεγονός ότι η αυξανόμενη αρχική συγκέντρωση του υποστρώματος είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση του ποσοστού της γλυκερόλης που παρέμενε ακατανάλωτη. Ιδίως όταν η Gly_0 έφτασε τα 80 g/L, το 40% w/w της διαθέσιμης γλυκερόλης δεν μεταβολίστηκε, παρόλο που η διάρκεια της ζύμωσης παρατάθηκε έως τις 120 ώρες. Φαίνεται λοιπόν, ότι η σχετικά υψηλή αρχική συγκέντρωση του υποστρώματος αν και δεν έδρασε παρεμποδιστικά στην αύξηση του μικροοργανισμού (παραγόμενη βιομάζα 1,5 g/L), εντούτοις επηρέασε αρνητικά την κατανάλωση της γλυκερόλης και την σύνθεση των μεταβολιτών.

Δεδομένης της αδυναμίας του στελέχους να μεταβολίσει, υπό τις δεδομένες πειραματικές συνθήκες, υψηλές συγκεντρώσεις γλυκερόλης, κρίθηκε σκόπιμο να διεκρινθεί η μελέτη και σε άλλα υποστρώματα. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν υγρές καλλιέργειες υπό συνθήκες μη-σταθερού pH, με πηγή άνθρακα την εμπορική γλυκόζη, σε αρχικές συγκεντρώσεις ίδιες με τις αντίστοιχες στην γλυκερόλη, δηλαδή Glu_0 20-80 g/L. Στον Πίνακα III-7 δίνονται η συνολική κατανάλωση του υποστρώματος, οι τελικές συγκεντρώσεις των μεταβολικών προϊόντων, η παραγόμενη βιομάζα και η τελική τιμή του pH κάθε καλλιέργειας.

Πίνακας III-7: Παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης (BD), αιθανόλης (EtOH), γαλακτικού (Lac) και μυρμηκικού οξέος (Form), κατά την αύξηση του στελέχους *Klebsiella oxytoca* FMCC-197 σε ασυνεχείς καλλιέργειες σε φιάλες, σε υπόστρωμα εμπορικής γλυκόζης, υπό συνθήκες μη-σταθερού pH.

Glu_0 (g/L)	Glu_C (g/L)	Χρόνος (h)	pH _f	X (g/L)	Συγκέντρωση μεταβολικών προϊόντων (g/L)				Συντελεστής απόδοσης (g/g)	
					BD	EtOH	Lac	Form	BD	EtOH
~20	20,9	14	6,3	2,0	9,5	1,2	0,3	0,3	0,45	0,06
~40	40,9	24	6,3	2,9	18,6	4,9	0,9	0,3	0,45	0,12
~60	59,2	32	5,8	3,6	28,2	6,3	1,2	0,7	0,47	0,11
~80	75,1	48	5,3	3,1	32,1	6,7	3,4	0,7	0,43	0,09

Συνθήκες καλλιέργειας: αναερόβιες ασυνεχείς καλλιέργειες σε ανακινούμενες φιάλες (80 rpm) τύπου Duran 1-L, αρχική τιμή pH=7,0±0,2 και θερμοκρασία 30 °C.

Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν με διαφορετικά αρχικά εμβόλια, ενώ το κάθε σημείο της ζύμωσης είναι ο μέσος όρος δυο ανεξαρτήτων πειραμάτων.

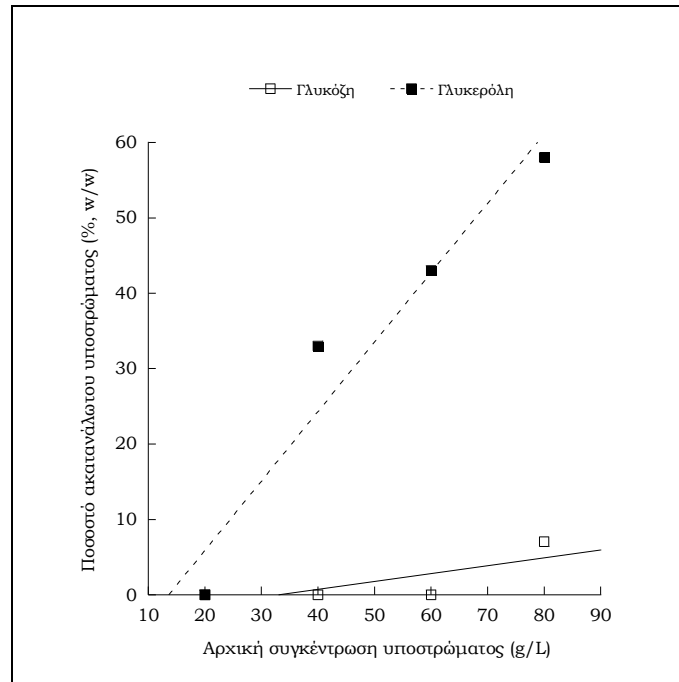
Glu₀: αρχική συγκέντρωση γλυκόζης, Glu_c: καταναλωθείσα γλυκόζη, pH_f: τελική τιμή pH, X: μέγιστη παραγόμενη βιομάζα.

Από τα δεδομένα του Πίνακα III-7 παρατηρείται ότι το υπόστρωμα της γλυκόζης καταναλώθηκε πλήρως ακόμη και σε υψηλή αρχική συγκέντρωση Glu₀=80 g/L. Όλες οι ζυμώσεις ολοκληρώθηκαν σε σύντομο χρονικό διάστημα, και η συνολική τους διάρκεια αυξήθηκε προοδευτικά από τις 14 στις 48 ώρες. Παράλληλα η κυτταρική αύξηση ενισχύθηκε σημαντικά από την παρουσία της γλυκόζης και η μέγιστη παραγόμενη βιομάζα X_{max} έφθασε τα 3,6 g/L, στην καλλιέργεια με Glu₀=60 g/L. Αξίζει να σημειωθεί το γεγονός ότι όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης αυξήθηκε από τα 60 στα 80 g/L, τότε η μέγιστη βιομάζα μειώθηκε στα 3,1 g/L, πιθανόν λόγω παρεμπόδισης από το υπόστρωμα, δεδομένης της σχετικά αυξημένης συγκέντρωσης σακχάρου στο μέσο της καλλιέργειας. Παρόλα αυτά η γλυκόζη αφομοιώθηκε σχεδόν πλήρως, ενώ ταυτόχρονα σχηματίστηκε και η υψηλότερη συγκέντρωση 2,3-βουτανοδιόλης (32,1 g/L), συγκριτικά με τις υπόλοιπες καλλιέργειες. Η τιμή αυτή αντιστοιχεί σε παραγωγικότητα 0,69 g/L/h και συντελεστή απόδοσης παραχθείσας 2,3-βουτανοδιόλης ανά καταναλωθείσα γλυκόζη Y_{BD/Glu}=0,43 g/g. Η 2,3-βουτανοδιόλη ήταν ο κύριος μεταβολίτης σε όλες τις καλλιέργειες, ανεξάρτητα από την αρχική συγκέντρωση γλυκόζης. Αξίζει επίσης, να αναφερθεί ότι η μέγιστη συγκέντρωση 2,3-βουτανοδιόλης και ο μέγιστος συντελεστής απόδοσης Y_{BD/Glu} δεν σημειώθηκαν στην ίδια καλλιέργεια. Έτσι η μέγιστη τιμή του συντελεστή Y_{BD/Glu}=0,48 g/g, παρατηρήθηκε στην καλλιέργεια με Glu₀=60 g/L και προσεγγίζει τη μέγιστη θεωρητική που είναι 0,50 g/g (Zeng & Sabra, 2012). Στην ίδια καλλιέργεια παράχθηκε αρκετά ικανοποιητική ποσότητα 2,3-βουτανοδιόλης (28,2 g/L).

Η παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης συνοδεύτηκε από την σύνθεση αρκετά μικρότερων ποσοτήτων αιθανόλης και οργανικών οξέων. Η αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης από τα 20 έως τα 80 g/L, οδήγησε σε σταδιακά αύξηση της παραγόμενης αιθανόλης, η συγκέντρωση της οποίας προοδευτικά έφτασε τα 6,7 g/L. Τα οργανικά οξέα της ζύμωσης ήταν το γαλακτικό και το μυρμηκικό οι συγκεντρώσεις των οποίων ήταν αρκετά χαμηλότερες και κυμάνθηκαν από 0,3-3,4 g/L και 0,3-0,7 g/L, αντίστοιχα. Η έκκριση των οργανικών οξέων στο μέσο της καλλιέργειας είχε ως άμεση συνέπεια την πτώση της τιμής pH από την αρχική τιμή 7,0 σε τελική τιμή που κυμάνθηκε από 6,3 έως 5,3. Η μέγιστη μείωση κατά 1,7 μονάδες σημειώθηκε στην καλλιέργεια με Glu₀=80 g/L, δηλαδή σε εκείνη με την μεγαλύτερη παραγωγή γαλακτικού οξέος (Lac_{max}=3,4 g/L).

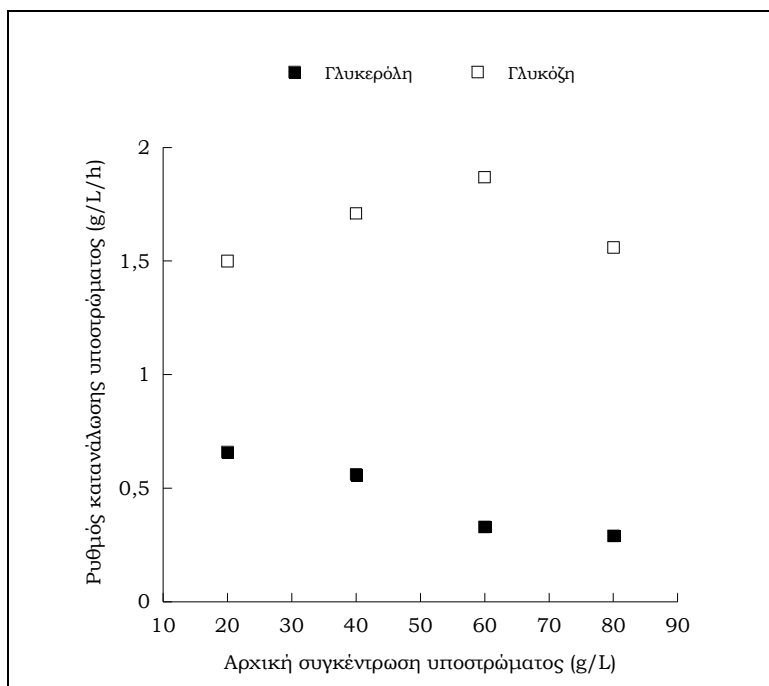
Συγκρίνοντας τις καλλιέργειες σε υπόστρωμα γλυκόζης με τις αντίστοιχες σε υπόστρωμα γλυκερόλης (Πίνακας III-6), παρατηρείται ότι η γλυκόζη αποτέλεσε καλύτερο υπόστρωμα για την αύξηση του μικροοργανισμού και την παραγωγή μεταβολιτών. Κυριότερο χαρακτηριστικό ήταν η

ταχύτατη και πλήρης αφομοίωση της γλυκόζης συγκριτικά με την γλυκερόλη. Έτσι ακόμη και σε $Glu_0=80$ g/L, το ποσοστό της γλυκόζης που δεν καταναλώθηκε ήταν αμελητέο συγκριτικά με το 60% της ακατανάλωτης γλυκερόλης (Γράφημα III-7).



Γράφημα III-7: Ποσοστό ακατανάλωτου υποστρώματος, εκφρασμένο σε % w/w, κατά την αύξηση του στελέχους *Klebsiella oxytoca* FMCC-197 σε ασυνεχείς καλλιέργειες σε φιάλες.

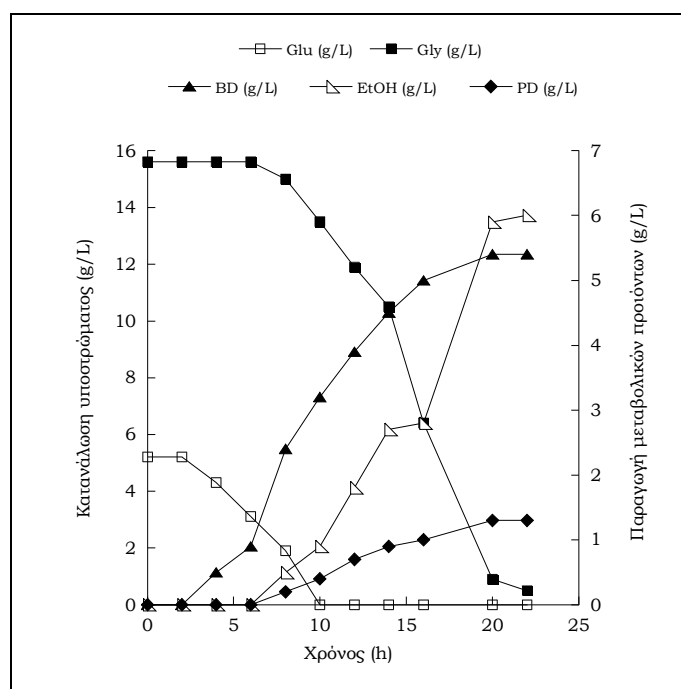
Επιπλέον και η διάρκεια της ζύμωσης μειώθηκε σημαντικά σε όλες τις καλλιέργειες με υπόστρωμα την γλυκόζη, με αποτέλεσμα ο ρυθμός κατανάλωσης της γλυκόζης να είναι μεγαλύτερος συγκριτικά με τον αντίστοιχο ρυθμό κατανάλωσης της γλυκερόλης (Γράφημα III-8). Έτσι σε $Glu_0=60$ g/L ο ρυθμός κατανάλωσης της γλυκόζης (υπολογισμένος με βάση την μεταβολή της συγκέντρωσης του υποστρώματος προς το αντίστοιχο χρονικό διάστημα, $r_{Gly}''' = dGly/dt$) έλαβε τη μέγιστη τιμή 1,86 g/L/h και μειώθηκε στην τιμή 1,5 g/L/h όταν η αρχική συγκέντρωση του υποστρώματος αυξήθηκε στα 80 g/L. Στην περίπτωση που η γλυκερόλη ήταν η μόνη πηγή άνθρακα στο θρεπτικό μέσο, η μέγιστη τιμή του ρυθμού κατανάλωσης ήταν 0,66 g/L/h στην καλλιέργεια με $Gly_0=20$ g/L και μειώθηκε προοδευτικά με την αύξηση της γλυκερόλης, φτάνοντας τελικά στην τιμή 0,29 g/L/h για $Gly_0=80$ g/L



Γράφημα III-8: Ρυθμός κατανάλωσης γλυκόζης και γλυκερόλης σε διαφορετικές αρχικές συγκέντρωσης υποστρώματος, κατά την αύξηση του στελέχους *Klebsiella oxytoca* FMCC-197 σε ασυνεχείς καλλιέργειες σε ανακινούμενες φιάλες.

Αναφορικά με την σύνθεση μεταβολικών προϊόντων στα δύο υποστρώματα, όπως ήταν αναμενόμενο η 1,3-προπανοδιόλη σχηματίστηκε μόνο στο υπόστρωμα γλυκερόλης, καθώς αποτελεί και το χαρακτηριστικό προϊόν της ζύμωσης της, ενώ δεν μπορεί να παραχθεί απευθείας από κανένα σάκχαρο. Στην περίπτωση της 2,3-βουτανοδιόλης, η παρουσία της γλυκόζης στο μέσο της καλλιέργειας βελτίωσε την βιοσύνθεση, κι έτσι η αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης της γλυκόζης (Glu_0) οδήγησε σε σταδιακή αύξηση της παραγόμενης 2,3-βουτανοδιόλης έως τα 32,1 g/L, ενώ αντίθετα στις καλλιέργειες με γλυκερόλη η συγκέντρωση παρέμεινε σταθερή (4,8 g/L).

Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι ο ρυθμός κατανάλωσης της γλυκόζης ήταν σημαντικά μεγαλύτερος από τον αντίστοιχο της γλυκερόλης, ενώ εξίσου μεγαλύτερη κυτταρική αύξηση σημειώθηκε στις καλλιέργειες με υπόστρωμα γλυκόζης, προκειμένου να βελτιωθεί η αφομοίωση της γλυκερόλης σε συνθήκες μη-σταθερού pH, διεξήχθησαν δύο επιπλέον ζυμώσεις με τη γλυκόζη και τη γλυκερόλη ως συνυποστρώματα σε αναλογία 1:3 (w/w).

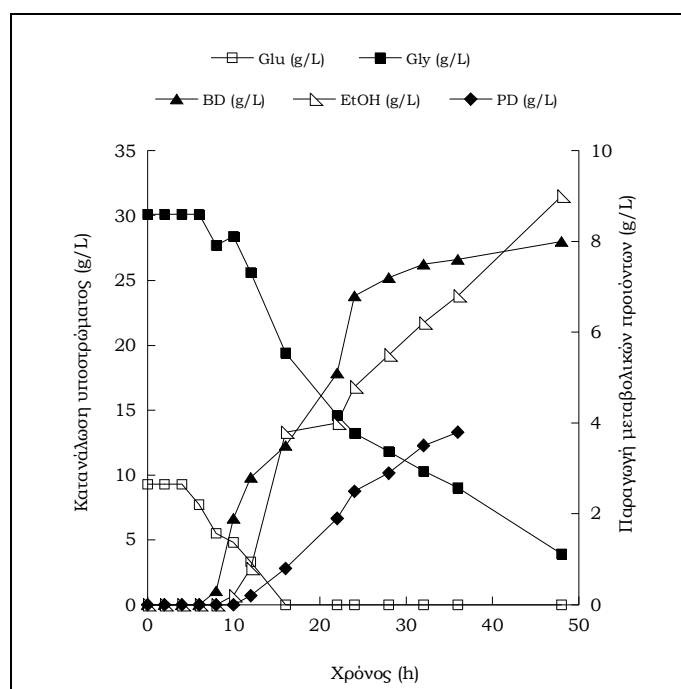


Γράφημα III-9α: Γραφική παράσταση της κατανάλωσης υποστρώματος και παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης (PD), 2,3-βουτανοδιόλης (BD) και αιθανόλης (EtOH) σε συνάρτηση με τον χρόνο, κατά την αύξηση του στελέχους *Klebsiella oxytoca* FMCC-197, σε ασυνεχή καλλιέργεια σε φιάλες, σε θρεπτικό μέσο με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης ~15 g/L και γλυκόζης ~5 g/L.

Συνθήκες καλλιέργειας: αναερόβια ασυνεχής καλλιέργεια σε ανακινούμενες φιάλες (80 rpm) τύπου Duran 1-L, αρχική τιμή pH=7,0±0,2, θερμοκρασία 30 °C και ανάδευση 150 rpm.

Με βάση τα Γραφήματα III-9α και III-9β παρατηρούμε ότι και στις δύο καλλιέργειες η κατανάλωση των υποστρωμάτων έγινε σχεδόν ταυτόχρονα. Στην καλλιέργεια με $Gly_0=15$ g/L και $Glu_0=5$ g/L φάση προσαρμογής (lag phase) ήταν δύο ώρες και κατόπιν ξεκίνησε η αφομοίωση της γλυκόζης, ενώ τέσσερις ώρες μετά άρχισε και η κατανάλωση της γλυκερόλης, έτσι ώστε για ένα χρονικό διάστημα της αύξησης τα δύο υποστρώματα αφομοιώνονταν συγχρόνως, μέχρι να εξαντληθούν πλήρως. Στην καλλιέργεια με $Gly_0=30$ g/L και $Glu_0=10$ g/L η κατανάλωση των υποστρωμάτων ξεκίνησε έξι ώρες μετά τον εμβολιασμό για την γλυκόζη και οκτώ ώρες μετά τον εμβολιασμό για την γλυκερόλη. Παρόλα αυτά αξίζει να σημειωθεί ότι στην εν λόγω καλλιέργεια, ένα μέρος της γλυκερόλης (ποσοστό ~13%) παρέμεινε ακατανάλωτο.

Η παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης έγινε παράλληλα με τον μεταβολισμό της γλυκόζης, ενώ όπως ήταν αναμενόμενο η σύνθεση της 1,3-προπανοδιόλης ξεκίνησε ταυτόχρονα με την κατανάλωση της γλυκερόλης.



Γράφημα III-9β: Γραφική παράσταση της κατανάλωσης υποστρώματος και παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης (PD), 2,3-βουτανοδιόλης (BD) και αιθανόλης (EtOH) σε συνάρτηση με τον χρόνο, κατά την αύξηση του στελέχους *Klebsiella oxytoca* FMCC-197 σε ασυνεχή καλλιέργεια σε φιάλες, σε θρεπτικό μέσο με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης ~30 g/L και γλυκόζης ~10 g/L.

Συνθήκες καλλιέργειας: αναερόβια ασυνεχής καλλιέργεια σε ανακινούμενες φιάλες (80 rpm) τύπου Duran 1-L, αρχική τιμή pH=7,0±0,2 και θερμοκρασία 30 °C.

Στον Πίνακα III-8 δίνονται η συνολική κατανάλωση των υποστρωμάτων, οι τελικές συγκεντρώσεις των μεταβολικών προϊόντων, η παραγόμενη βιομάζα και η τελική τιμή του pH κάθε καλλιέργειας. Σημειώνεται ότι για τον υπολογισμό του συντελεστή απόδοσης ελήφθη υπόψη η συνολική ποσότητα γλυκόζης και γλυκερόλης που καταναλώθηκε.

Πίνακας III-8: Παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης (PD), 2,3-βουτανοδιόλης (BD), αιθανόλης (EtOH), γαλακτικού (Lac) και μυρμηκικού οξέος (Form), κατά την αύξηση του στελέχους *Klebsiella oxytoca* FMCC-197 σε συνυπόστρωμα εμπορικής γλυκόζης και βιομηχανικής γλυκερόλης, υπό συνθήκες μη-σταθερού pH.

Gly ₀ (g/L)	Glu ₀ (g/L)	Gly _C (g/L)	Glu _C (g/L)	Χρόνος (h)	pH _f	X (g/L)	Συγκέντρωση μεταβολικών προϊόντων (g/L)					Συντελεστής απόδοσης (g/g)		
							PD	BD	EtOH	Lac	Form	PD	BD	EtOH
~15	~5	15,0	5,0	22	6,1	2,6	1,3	5,4	6,0	1,2	0,7	0,07	0,27	0,30
~30	~10	26,1	10,2	48	5,9	2,1	3,8	8,0	9,0	1,3	1,1	0,10	0,22	0,25

Συνθήκες καλλιέργειας: αναερόβιας ασυνεχείς καλλιέργειες σε ανακινούμενες φιάλες (80 rpm) τύπου Duran 1-L, αρχική τιμή pH=7,0±0,2 και θερμοκρασία 30°C.

Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν με διαφορετικά αρχικά εμβόλια, ενώ το κάθε σημείο της ζύμωσης είναι ο μέσος όρος δυο ανεξαρτήτων πειραμάτων.

Gly₀: αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης, Glu₀: αρχική συγκέντρωση γλυκόζης, Gly_c: καταναλωθείσα γλυκερόλη, Glu_c: καταναλωθείσα γλυκόζη, pH_f: τελική τιμή pH, X: μέγιστη παραγόμενη βιομάζα.

Από τα δεδομένα του Πίνακα III-8 είναι φανερό ότι υπό τις δεδομένες πειραματικές συνθήκες η ροή του άνθρακα κατευθύνθηκε κυρίως προς σχηματισμό βιομάζας, η συγκέντρωση της οποίας αυξήθηκε σημαντικά, σε σύγκριση με τις αντίστοιχες καλλιέργειες σε υπόστρωμα με μοναδική πηγή άνθρακα την γλυκερόλη (π.χ. συγκρίνοντας τις καλλιέργειες με Gly₀=20 g/L και Gly₀=15 g/L - Glu₀=5 g/L). Επιπλέον η σύνθεση των δύο κύριων μεταβολικών προϊόντων βελτιώθηκε σε σημαντικό βαθμό από την παρουσία της γλυκόζης και στα δύο πειράματα. Ειδικότερα, στη καλλιέργεια Gly₀=30 g/L - Glu₀=10 g/L σε σχέση με τη καλλιέργεια Gly₀=40 g/L, η συγκέντρωση της 2,3-βουτανοδιόλης αυξήθηκε από 4,8 στα 8,0 g/L και της αιθανόλης από 5,1 στα 9,0 g/L. Από την άλλη πλευρά σε χαμηλή συγκέντρωση υποστρώματος (Gly₀=15 g/L - Glu₀=5 g/L) η παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης ήταν σχεδόν ίδια με το αντίστοιχο πείραμα σε υπόστρωμα γλυκερόλης. Όταν όμως η συγκέντρωση της πηγής άνθρακα αυξήθηκε Gly₀=30 g/L - Glu₀=10 g/L, τότε παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στην συγκέντρωση του μεταβολίτη από 7,5 σε 3,8 g/L, συγκριτικά πάντα με την καλλιέργεια στη γλυκερόλη.

Μπορούμε να συμπεράνουμε, ως εκ τούτου, ότι, η παρουσία της γλυκόζης στο μέσο της καλλιέργειας, αν και βελτίωσε την κυτταρική αύξηση δεν ευνόησε εξίσου την αφομοίωση της γλυκερόλης, που ήταν και ο στόχος της πειραματικής διαδικασίας.

Με βάση τα αποτελέσματα στις υγρές καλλιέργειες, προκύπτει ότι σύμφωνα με τις δεδομένες πειραματικές συνθήκες δηλαδή μη-σταθερό pH του μέσου καλλιέργειας και πιθανόν περιορισμένη απομάκρυνση των αερίων όπως το CO₂ από το υγρό μέσον, ο μεταφορέας της γλυκερόλης επηρεάστηκε αρνητικά, με αποτέλεσμα την μειωμένη αφομοίωση του υποστρώματος, ιδίως στις καλλιέργειες με υψηλή αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης.

III.2.3.2. Ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα υπό συνθήκες σταθερού pH

Οι καλλιέργειες, κατά την διάρκεια των οποίων μελετήθηκαν οι κινητικές παράμετροι του μικροοργανισμού, πραγματοποιήθηκαν σε βιοαντιδραστήρα 1,2-L και το pH κάθε καλλιέργειας διατηρήθηκε σταθερό στην τιμή 7,0. Για την επίτευξη της αυτό-παραγόμενης αναεροβίωσης γινόταν εμφύσηση του θρεπτικού μέσου με άζωτο (0,1 LPM) μόνο για χρονικό διάστημα είκοσι λεπτών πριν από κάθε εμβολιασμό. Η αρχική συγκέντρωση της γλυκερόλης κυμάνθηκε από 60 έως 170 g/L. Η παραγόμενη βιομάζα, η συνολική κατανάλωση του υποστρώματος και οι τελικές συγκεντρώσεις των μεταβολικών προϊόντων, δίνονται στον Πίνακα III-9.

Πίνακας III-9: Επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης στην παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης (PD), αιθανόλης (EtOH), γαλακτικού (Lac) και μυρμηκικού οξέος (Form), κατά την αύξηση του στελέχους *Klebsiella oxytoca* FMCC-197 σε ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα, υπό συνθήκες σταθερού pH.

Gly ₀ (g/L)	Gly _C (g/L)	Χρόνος (h)	X (g/L)	Συγκέντρωση μεταβολικών προϊόντων (g/L)				Συντελεστής απόδοσης (g/g)			
				PD	EtOH	Lac	Form	PD	EtOH	Lac	Form
~60	49,5	32	2,5	20,5	7,5	6,2	3,1	0,42	0,15	0,12	0,06
~80	67,5	66	2,1	28,5	5,7	11,2	5,6	0,42	0,08	0,17	0,08
~100	89,6	99	2,1	38,1	4,0	11,1	5,5	0,43	0,05	0,12	0,06
~120	89,1	147	2,1	41,3	4,0	11,5	5,8	0,47	0,05	0,13	0,07
~150	69,2	152	1,8	26,2	1,0	8,7	4,9	0,38	0,02	0,12	0,07
~170	61,2	171	1,8	22,6	1,8	7,0	3,9	0,37	0,03	0,11	0,07

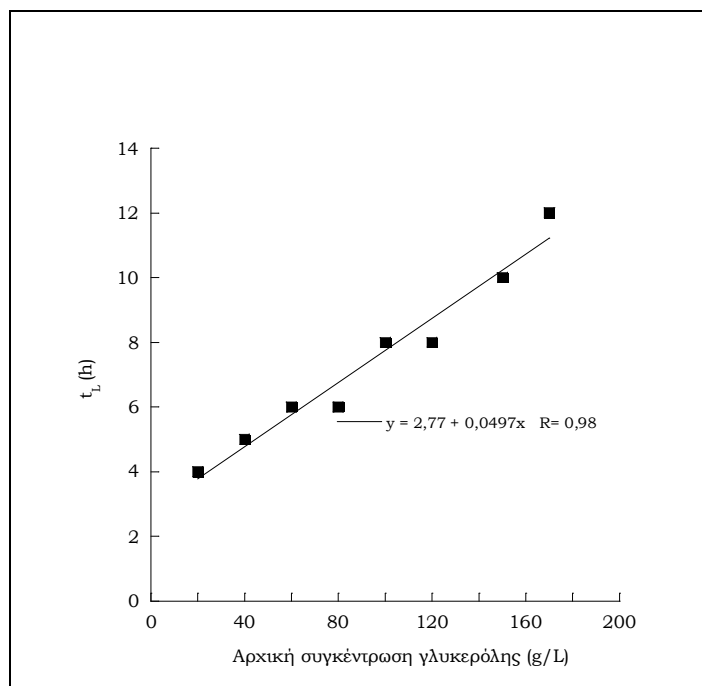
Συνθήκες καλλιέργειας: αναερόβιες ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα 1,2-L, υπό συνθήκες αυτό-παραγόμενης αναεροβίωσης, pH=7,0±0,2 και θερμοκρασία 30 °C.

Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν με διαφορετικά αρχικά εμβόλια, ενώ το κάθε σημείο της ζύμωσης είναι ο μέσος όρος δυο ανεξαρτήτων πειραμάτων.

Gly₀: αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης, Gly_C: καταναλωθείσα γλυκερόλη, X: μέγιστη παραγόμενη βιομάζα.

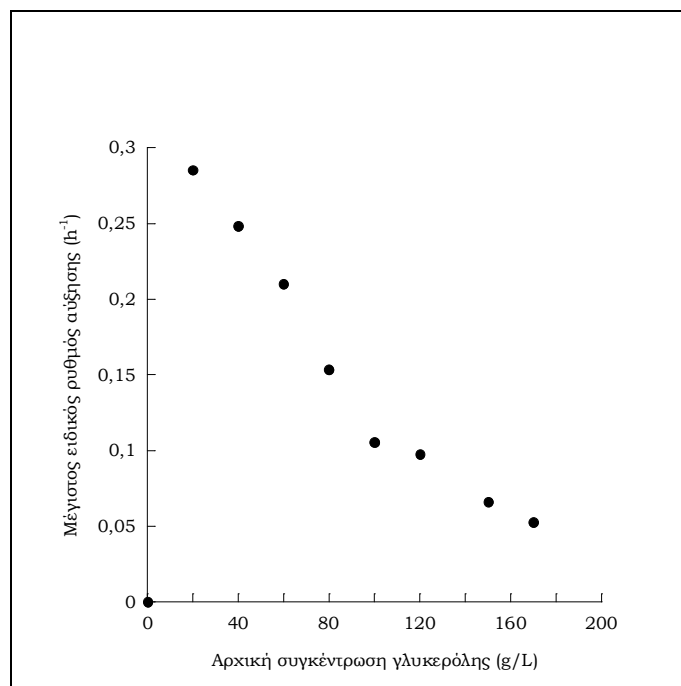
Όπως φαίνεται και στα δεδομένα του Πίνακα III-9, σε όλες τις καλλιέργειες ανεξάρτητα από την αρχική συγκέντρωση του υποστρώματος, παρατηρήθηκε κυτταρική αύξηση. Σημειώνεται δε ότι η παραχθείσα βιομάζα ήταν υψηλότερη, συγκριτικά με τις αντίστοιχες αναερόβιες καλλιέργειες που διενεργήθηκαν σε συνθήκες μη-σταθερού pH. Η μέγιστη παραγωγή βιομάζας πραγματοποιήθηκε στην καλλιέργεια με Gly₀=60 g/L και μειώθηκε από την τιμή 2,5 στα 1,8 g/L, όταν η αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης ξεπέρασε τα 150 g/L. Αξίζει να αναφερθεί ότι, παρά την σχετική μείωση της συγκέντρωσης της βιομάζας, δεν σημειώθηκε διακοπή της κυτταρικής αύξησης.

Από την άλλη πλευρά, παρά την αφομοίωση της γλυκερόλης και την μη αμελητέα βιομάζα που παρατηρήθηκαν ακόμα και στις καλλιέργειες με υψηλή αρχική συγκέντρωση υποστρώματος, η αύξηση της Gly₀ είχε σαν συνέπεια την παρεμπόδιση της μικροβιακής αύξησης. Όπως απεικονίζεται και στο Γράφημα III-10, ο χρόνος προσαρμογής (t_L) σχετίζεται γραμμικά με την αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης, και ως εκ τούτου αυξήθηκε προοδευτικά από τέσσερις σε δώδεκα ώρες, με την υψηλότερη τιμή στην καλλιέργεια με Gly₀=170 g/L.



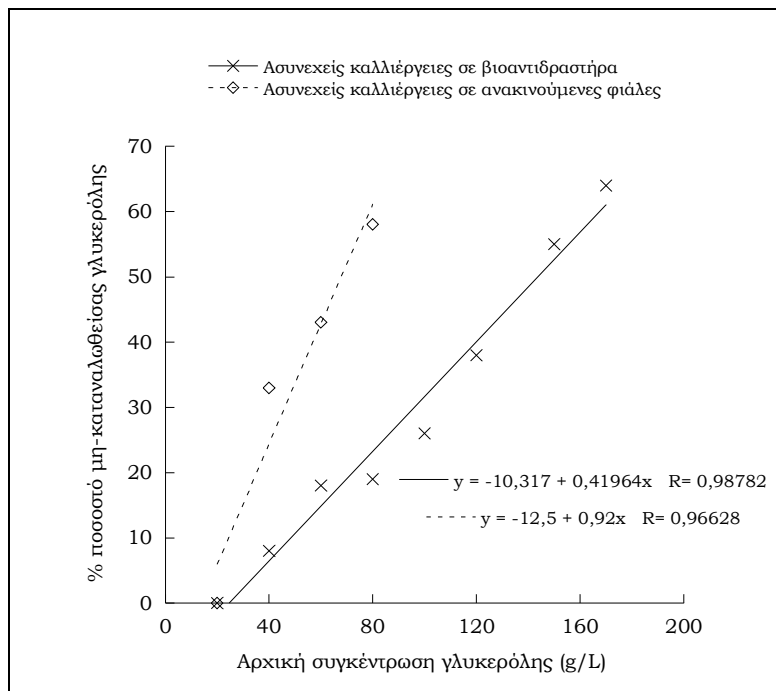
Γράφημα III-10: Συσχέτιση του χρόνου προσαρμογής και της αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης, κατά την αύξηση του στελέχους *Klebsiella oxytoca* FMCC-197 σε ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα, υπό συνθήκες σταθερού pH.

Παράλληλα υπολογίστηκε ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης (μ_{\max}), με προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων στην ευθεία με $\ln\left(\frac{X}{X_0}\right) = \mu_{\max} \times \Delta t$ για την εκθετική φάση αύξησης του μικροοργανισμού. Οι τιμές που κυμάνθηκαν μεταξύ $0,05 \text{ h}^{-1}$ και $0,29 \text{ h}^{-1}$ και όπως παρουσιάζεται και στο Γράφημα III-11 μειώθηκε αισθητά με την βαθμιαία αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης. Τα αποτελέσματα αυτά είναι ενδεικτικά της παρεμπόδισης της κυτταρικής αύξησης, εξαιτίας της αύξησης της αρχικής συγκέντρωσης του υποστρώματος.



Γράφημα III-11: Μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης (μ_{\max}), κατά την αύξηση του στελέχους *Klebsiella oxytoca* FMCC-197 σε ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα, υπό συνθήκες σταθερού pH.

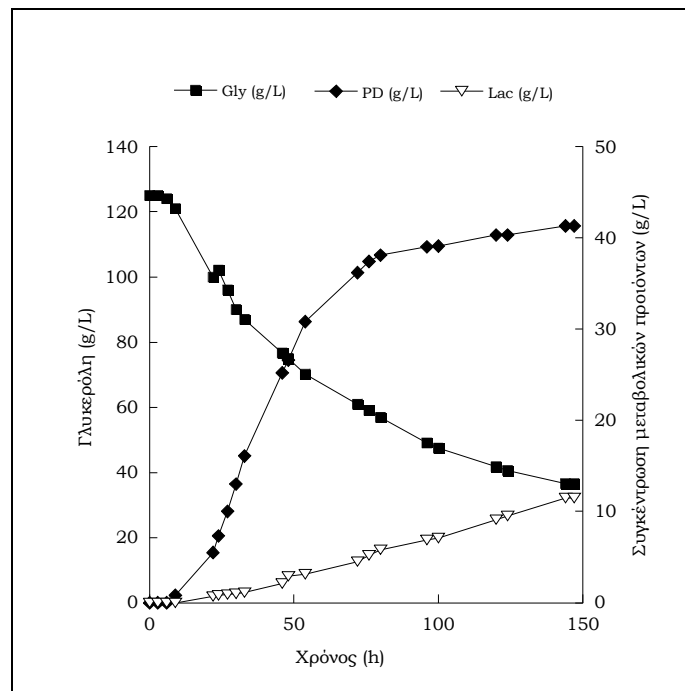
Ένα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό που παρατηρήθηκε κατά την διάρκεια των ασυνεχών καλλιιεργειών, ήταν ότι σημαντικό ποσοστό από τις ολοένα αυξανόμενες συγκεντρώσεις γλυκερόλης στο μέσο της καλλιιεργειας, παρέμενε ακατανάλωτο μετά και το ουσιαστικό τέλος της ζύμωσης (Γράφημα III-12). Η τάση αυτή έχει παρατηρηθεί αρχικά στις υγρές καλλιιεργειας χωρίς σταθερό pH (πειράματα σε ανακινούμενες φιάλες), αλλά και στις ασυνεχείς καλλιιεργειας με διαφορετικές συνθήκες αεροβίωσης (Πίνακες III-5 και III-6). Σχετίζοντας γραμμικά το ποσοστό της μη καταναλωθείσας γλυκερόλης και της αρχικής συγκέντρωσης στο μέσο καλλιιεργειας, στα πειράματα σε ανακινούμενες φιάλες και στα πειράματα βιοαντιδραστήρα, παρατηρήθηκε ότι αρκετά μεγαλύτερες ποσότητες υποστρώματος δεν αφομοιώθηκαν στα πειράματα υπό συνθήκες μη-σταθερού pH, κατά την αύξηση του μικροοργανισμού σε ανακινούμενες φιάλες (Γράφημα III-12). Ειδικότερα, όταν το μέσο καλλιιεργειας περιέχονταν ~80 g/L γλυκερόλης, το ποσοστό του ακατανάλωτου υποστρώματος ήταν ~19% w/w στα πειράματα σε σταθερό pH, ενώ η αντίστοιχη τιμή στις υγρές καλλιιεργειας έφτασε το ~58% w/w. Ωστόσο και στα πειράματα σε βιοαντιδραστήρα το αντίστοιχο ποσοστό μη καταναλωθείσας γλυκερόλης ήταν ~38% w/w στην καλλιιεργεια με $Gly_0=120$ g/L και έφτασε το ~63% w/w όταν η συγκέντρωση του υποστρώματος έγινε 170 g/L.



Γράφημα III-12: Ποσοστό της μη καταναλωθείσας γλυκερόλης, εκφρασμένη σε % w/w, κατά την αύξηση του στελέχους *Klebsiella oxytoca* FMCC-197 σε ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα και σε ανακινούμενες φιάλες.

Προφανώς, το μικρό ποσοστό της κατανάλωσης υποστρώματος σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις (π.χ. $Gly_0 \geq 120$ g/L) αποτελεί ένα σημαντικό μειονέκτημα για μια πιθανή εφαρμογή της διαδικασίας σε μεγάλη κλίμακα, δεδομένου ότι, παρά την παράταση του χρόνου καλλιέργειας, σημαντικές ποσότητες γλυκερόλης δεν μεταβολίζονται.

Όσον αφορά τη σύνθεση των μεταβολικών προϊόντων, και συγκεκριμένα την παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης (τόσο από την άποψη των απολύτων - g/L όσο και των σχετικών τιμών - g/g) παρατηρήθηκε σταδιακή αύξηση, έως ότου η συγκέντρωση γλυκερόλης φτάσει την τιμή των 120 g/L. Η μέγιστη συγκέντρωση ήταν 41,3 g/L και επιτεύχθηκε στην καλλιέργεια με $Gly_0=120$ g/L, δίνοντας τον υψηλότερο συντελεστή απόδοσης $Y_{PD/Gly}=0,47$ g/g, μετά από 147 ώρες ζύμωσης. Όπως απεικονίζεται και στο Γράφημα III-13 ο ρυθμός παραγωγής ήταν υψηλός τις πρώτες 48 ώρες της ζύμωσης και προοδευτικά μειώθηκε. Ωστόσο, για μεγαλύτερες τιμές αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης (δηλαδή 150 και 170 g/L), η συγκέντρωση της 1,3-προπανοδιόλης μειώθηκε αισθητά, με συνέπεια στην καλλιέργεια με $Gly_0=170$ g/L, να φτάσει μόλις τα 22,6 g/L.

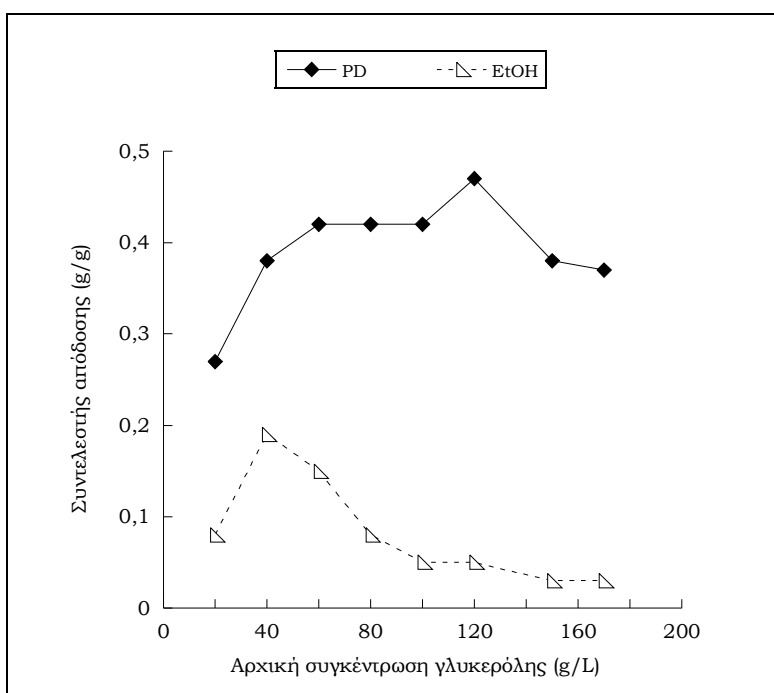


Γράφημα III-13: Γραφική παράσταση της κατανάλωσης γλυκερόλης και παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης (PD-g/L) και γαλακτικού οξέος (Lac-g/L) σε συνάρτηση με τον χρόνο, κατά την αύξηση του στελέχους *Klebsiella oxytoca* FMCC-197 σε ασυνεχή καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα με $Gly_0=120$ g/L, υπό συνθήκες σταθερού pH.

Συνθήκες καλλιέργειας: αναερόβια ασυνεχής καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα 1,2-L, υπό συνθήκες αυτό-παραγόμενης αναερόβιωσης, $pH=7,0\pm 0,2$ και θερμοκρασία 30 °C.

Από την άλλη πλευρά η παραγωγή της αιθανόλης μειώθηκε προοδευτικά, με την προσθήκη περισσότερης γλυκερόλης στο μέσο της καλλιέργειας. Συγκεκριμένα η υψηλότερη συγκέντρωση, η οποία ήταν 7,5 g/L, επιτεύχθηκε στην καλλιέργεια με την μικρότερη Gly_0 (δηλαδή 60 g/L), ενώ η χαμηλότερη τιμή, 1,8 g/L παρατηρήθηκε στην καλλιέργεια με $Gly_0=170$ g/L.

Στο Γράφημα III-14 απεικονίζονται οι τιμές των συντελεστών απόδοσης της 1,3-προπανοδιόλης και αιθανόλης ανά μονάδα καταναλωθείσας γλυκερόλης, για όλο το εύρος αρχικών συγκεντρώσεων γλυκερόλης. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως και όπως απεικονίζεται ο συντελεστής απόδοσης $Y_{PD/Gly}$ είχε αυξητική τάση, μέχρι την προσθήκη 120 g/L γλυκερόλης στο θρεπτικό μέσο, και ελαττώθηκε πιθανότατα εξαιτίας παρεμπόδισης εκ του υποστρώματος ή/και της συγκέντρωσης των μεταβολικών προϊόντων. Από την άλλη πλευρά, η συγκέντρωση της γλυκερόλης στο μέσο θα πρέπει να διατηρηθεί ουσιαστικά σε χαμηλά επίπεδα (~40 g/L), προκειμένου να επιτευχθεί ο μέγιστος συντελεστής απόδοσης αιθανόλης, και, έτσι, να επηρεαστεί θετικά ο μεταβολισμός γλυκερόλης προς παραγωγή αιθανόλης (Γράφημα III-14). Όσον αφορά τη βιοσύνθεση των οργανικών οξέων, η συγκέντρωση του γαλακτικού και μυρμηκικού αυξήθηκε σταδιακά μέχρι $Gly_0 \sim 120$ g/L, και στη συνέχεια μειώθηκε.



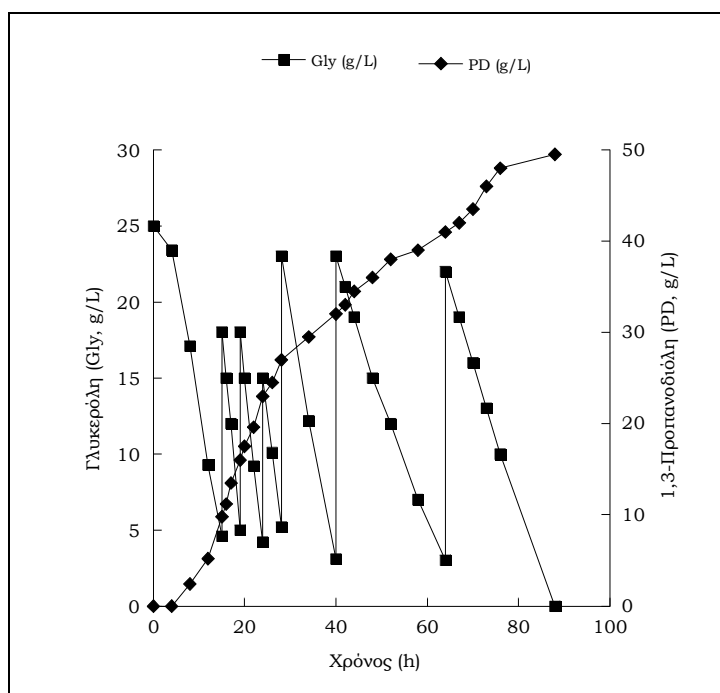
Γράφημα III-14: Προφίλ των συντελεστών απόδοσης 1,3-προπανοδιόλης (PD – g/L) και αιθανόλης (EtOH – g/L) ανά καταναλωθείσα γλυκερόλη, κατά την αύξηση του στελέχους *Klebsiella oxytoca* FMCC-197 σε ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα, υπό συνθήκες σταθερού pH.

Κρίνοντας από τα αποτελέσματα των κινητικών, παρά την παρεμπόδιση εκ του υποστρώματος που ασκείται από την προοδευτική αύξηση της συγκέντρωσης γλυκερόλης στο μέσο καλλιέργειας, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η συγκέντρωση γλυκερόλης των 120 g/L ήταν το όριο άνω του οποίου αφομοίωση γλυκερόλη και η σύνθεση του κύριου μεταβολικού προϊόντος, δηλαδή της 1,3-προπανοδιόλης, ήταν περιορισμένη. Ωστόσο, το συμπέρασμα αυτό εγείρει το ερώτημα αν η συσσώρευση προσμίξεων που περιέχονται στην βιομηχανική γλυκερόλη παρεμπόδισαν την κατανάλωση του υποστρώματος, ή ήταν το στέλεχος, το ίδιο, που δεν ήταν σε θέση να αφομοιώσει ποσότητες γλυκερόλης άνω των 100 g/L.

III.2.3.3. Ημι-συνεχής καλλιέργεια υπό συνθήκες σταθερού pH

Παρά το γεγονός ότι στις ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα υπό συνθήκες σταθερού pH, ο μικροοργανισμός είχε την ικανότητα να αναπτυχθεί ακόμη και σε αρκετά υψηλή συγκέντρωση γλυκερόλης, όπως τα 170 g/L, εντούτοις, οι τιμές αυτές του υποστρώματος είχαν σαν συνέπεια την μείωση του ρυθμού κατανάλωσης της γλυκερόλης. Ως εκ τούτου, πραγματοποιήθηκε ημι-συνεχής καλλιέργεια με στόχο, αφενός μεν την βελτίωση της αφομοίωσης του υποστρώματος, αφετέρου δε την πιθανή ενίσχυση της σύνθεσης μεταβολικών προϊόντων. Για την πειραματική αυτή διαδικασία επιλέχθηκε αρχική τιμή $Gly_0=25$ g/L, καθώς αποτέλεσε τον βέλτιστο συνδυασμό υψηλού συντελεστή απόδοσης 1,3-προπανοδιόλης και αιθανόλης και μικρού ποσοστού μη-καταναλωθείσας γλυκερόλης.

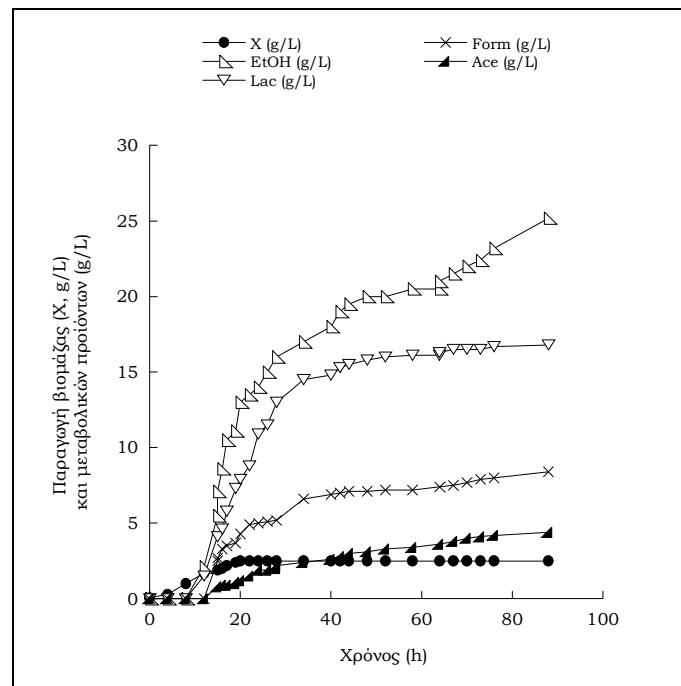
Όπως απεικονίζεται και στα Γραφήματα III-15α και III-15β, μετά από 88 ώρες της ζύμωσης, 126,0 g/L γλυκερόλης μετατράπηκαν σε 50,1 g/L 1,3-προπανοδιόλης, 25,2 g/L αιθανόλης και 16,8 g/L γαλακτικού οξέος. Η παραγωγή των τριών κύριων μεταβολικών προϊόντων συνοδεύεται από το σχηματισμό μικρότερων ποσοτήτων του οξικού και μυρμηκικού οξέος (8,4 g/L και 4,4 g/L, αντίστοιχα).



Γράφημα III-15α: Κατανάλωση γλυκερόλης (Gly–g/L) και παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης (PD–g/L), κατά την αύξηση του στελέχους *Klebsiella oxytoca* FMCC-197 σε ημι-συνεχή καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα, υπό συνθήκες σταθερού pH.

Συνθήκες καλλιέργειας: αναερόβια ημι-συνεχής καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα 1,2-L, υπό συνθήκες αυτό-παραγόμενης αναεροβίωσης, pH=7,0±0,2 και θερμοκρασία 30 °C.

Η 1,3-προπανοδιόλη παρέμεινε το κύριο μεταβολικό προϊόν καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης, ωστόσο ο ρυθμός παραγωγής σταδιακά μειώθηκε. Έτσι, κατά την διάρκεια των πρώτων 24 ωρών της ζύμωσης, ο συντελεστής απόδοσης 1,3-προπανοδιόλης ανά καταναλωθείσα γλυκερόλη, έλαβε την υψηλότερη τιμή 0,42 g/g, και εν συνεχεία μειώθηκε στην τιμή 0,39 στο τέλος της ζύμωσης. Μετά από 40 ώρες ζύμωσης τόσο ο ρυθμός κατανάλωσης γλυκερόλης, όσο και ο ρυθμός παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης μειώθηκαν. Τελικά η παραγωγικότητα του κύριου μεταβολίτη ήταν 0,55 g/L/h.



Γράφημα III-15β: Παραγωγή βιομάζας (X–g/L), αιθανόλης (EtOH–g/L), γαλακτικού (Lac–g/L), μυρμηκικού (Form–g/L) και οξικού οξέος (Ace–g/L), κατά την αύξηση του στελέχους *Klebsiella oxytoca* FMCC-197 σε ημι-συνεχή καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα, υπό συνθήκες σταθερού pH.

Συνθήκες καλλιέργειας: αναερόβια ημι-συνεχής καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα 1,2-L, υπό συνθήκες αυτό-παραγόμενης αναεροβίωσης, pH=7,0±0,2 και θερμοκρασία 30 °C.

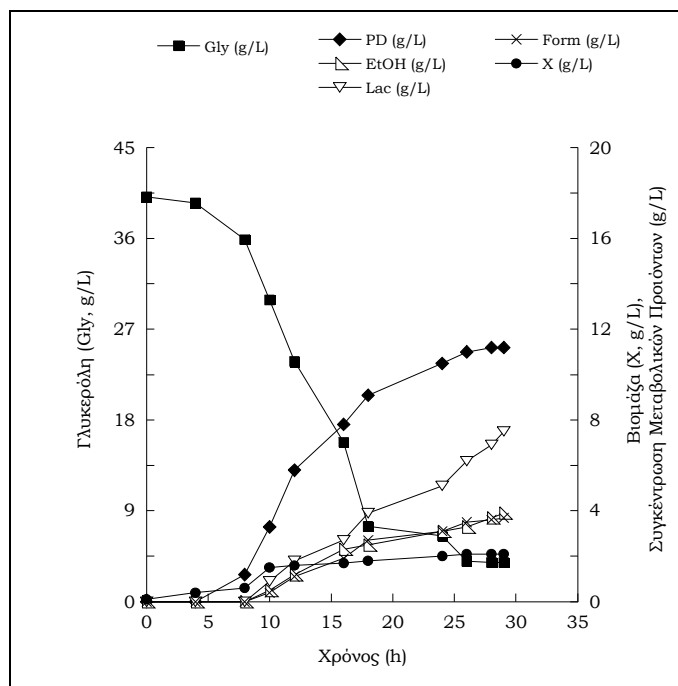
Αντίθετα η σύνθεση της αιθανόλης πραγματοποιήθηκε κυρίως μετά τις πρώτες 24 ώρες, χωρίς να παρατηρηθούν σημαντικές διακυμάνσεις στο ρυθμό σχηματισμού. Στις ασυνεχείς καλλιέργειες η παραγωγή της αιθανόλης, μειώθηκε αισθητά όταν στο μέσο της ζύμωσης επικρατούσαν υψηλές αρχικές συγκεντρώσεις γλυκερόλης. Όμως, κατά τη διάρκεια της ημι-συνεχούς καλλιέργειας, όπου η συγκέντρωση του υποστρώματος στο εσωτερικό του βιοαντιδραστήρα διατηρήθηκε σε χαμηλά επίπεδα σε όλα τα στάδια ζύμωσης (<40 g/L), παρατηρήθηκε σημαντική συσσώρευση αιθανόλης. Ο συντελεστής απόδοσης αιθανόλης ανά καταναλωθείσα γλυκερόλη $Y_{\text{EtOH/Gly}}$ έλαβε την τιμή 0,20 g/g. Το αποτέλεσμα αυτό φαίνεται να υποδεικνύει ότι ο σχηματισμός της αιθανόλης ενισχύθηκε από τις συνθήκες περιορισμένης συγκέντρωσης γλυκερόλης.

Από όλα τα παραπάνω αποτελέσματα, είναι προφανές ότι η ημι-συνεχής καλλιέργεια ήταν η αποτελεσματική για την κατανάλωση γλυκερόλης, καθώς και για τον σχηματισμό 1,3-προπανοδιόλης και αιθανόλης. Παράλληλα η βιομηχανική γλυκερόλη, προερχόμενη από την εταιρεία "ADM Industry", αποδείχθηκε ένα εντελώς κατάλληλο υπόστρωμα για τη βιοσύνθεση των μεταβολιτών αυτών, από το στέλεχος *K. oxytoca* FMCC-197.

III.2.4 Επίδραση μη-ασηπτικών συνθηκών καλλιέργειας στην σύνθεση μεταβολικών προϊόντων κατά την ασυνεχής καλλιέργεια του στελέχους *Klebsiella oxytoca* FMCC-197 σε υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης

Η προπανοδιολική ζύμωση τελείται σύμφωνα με της πλειοψηφία των μελετών υπό αυστηρά αναερόβιες συνθήκες, οι οποίες επιτυγχάνονται με την συνεχή εμφύσηση αζώτου στο μέσο της καλλιέργειας. Η βιοσύνθεση 1,3-προπανοδιόλης από ακάθαρτη γλυκερόλη ελλείπει εμφυσήσεως αζώτου, είναι μια ευεργετική διαδικασία για τη βιομηχανική παραγωγή, η οποία συνδυάζει το χαμηλό κόστος του υποστρώματος, αλλά και την αποφυγή του κόστους διατήρησης των αναερόβιων συνθηκών. Επιπλέον, όπως πρότειναν πρόσφατα οι Chatzifragkou et al. (2012b) οι μη ασηπτικές συνθήκες μπορεί να μειώσουν περαιτέρω το συνολικό κόστος της βιο-διεργασίας, δεδομένου ότι μπορεί να ελαττωθεί σημαντικά το κόστος για τον εξοπλισμό του βιοαντιδραστήρα και το κόστος λειτουργίας σε βιομηχανικό επίπεδο όπως για παράδειγμα την ενέργεια για την επεξεργασία και την αποστείρωση του υποστρώματος, καθώς οι βιοαντιδραστήρες μεγάλης κλίμακας υποβάλλονται σε επί τόπου αποστείρωση. Ως εκ τούτου, πραγματοποιήθηκε μία ασυνεχής καλλιέργεια υπό μη ασηπτικές συνθήκες, με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης $Gly_0=40$ g/L, κατά την οποία το pH του μέσου διατηρήθηκε σταθερό (τιμή $7,0 \pm 0,2$), χωρίς την εμφύσηση αζώτου στην διάρκεια της ζύμωσης.

Συγκρίνοντας τα δεδομένα του Πίνακα III-5 και του Γραφήματος III-16, προκύπτει ότι τόσο η κυτταρική αύξηση όσο και παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης δεν επηρεάστηκαν σημαντικά από την εφαρμογή των μη-ασηπτικών συνθηκών. Πιο συγκεκριμένα, η παραγόμενη βιομάζα είχε την ίδια τελική τιμή 2,1 g/L και στις δύο καλλιέργειες, ενώ στην αναποστειρωτή καλλιέργεια παρουσιάστηκε μείωση στη συγκέντρωση του κύριου μεταβολίτη από τα 12,6 στα 11,2 g/L, συγκριτικά με ζύμωση υπό ασηπτικές συνθήκες (βλ. Πίνακα III-5). Αξίζει να σημειωθεί το γεγονός ότι αν και η σύνθεση του κύριου μεταβολικού προϊόντος δεν επηρεάστηκε από τις μη στείρες συνθήκες, αντίθετα η παραγωγή των οργανικών οξέων ενισχύθηκε σημαντικά. Έτσι η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος αυξήθηκε από τα 4,5 στα 7,5 g/L, ενώ μικρότερη αύξηση παρατηρήθηκε στην περίπτωση του μυρμηκικού οξέος, η τελική συγκέντρωση του οποίου αυξήθηκε από 1,7 στα 3,7 g/L.



Γράφημα III-16: Κατανάλωση γλυκερόλης (Gly-g/L) και παραγωγή βιομάζας (X-g/L), 1,3-προπανοδιόλης (PD-g/L), 2,3-βουτανοδιόλης (BD-g/L), αιθανόλης (EtOH-g/L), γαλακτικού (Lac-g/L) και μυρμηκικού οξέος (Form-g/L), κατά την αύξηση του στελέχους *Klebsiella oxytoca* FMCC-197 σε ασυνεχή καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα, με μοναδική πηγή άνθρακα την βιομηχανική γλυκερόλη με αρχική συγκέντρωση 40 g/L, υπό μη ασηπτικές συνθήκες.

Συνθήκες καλλιέργειας: αναερόβια ασυνεχής καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα 1,2-L, υπό συνθήκες αυτό-παραγόμενης αναεροβίωσης, pH=7,0±0,2 και θερμοκρασία 30 °C.

Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης υπό μη στειρές συνθήκες, προκειμένου να παρατηρηθεί κατά πόσο διατηρείται η καθαρότητα της καλλιέργειας, λαμβάνονταν περιοδικώς δείγματα τα οποία μετά από χρώση κατά Gram, ελέγχονταν στο μικροσκόπιο. Οι μικροσκοπικές παρατηρήσεις έδειξαν ότι ο μικροοργανισμός *K. oxytoca* ήταν ο κυρίαρχος μικροοργανισμός στο μέσο της καλλιέργειας. Κατά συνέπεια η αύξηση της συγκέντρωσης των οργανικών οξέων ενδεχομένως να προκλήθηκε από μια μικρή παρουσία άλλων άγνωστων μικροοργανισμών λόγω των μη ασηπτικών συνθηκών.

Τα παραπάνω αποτελέσματα φανερώνουν ότι, η εφαρμογή μη-ασηπτικών συνθηκών καλλιέργειας δεν επηρέασαν την αύξηση και την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων, κτά τον μεταβολισμό της βιομηχανικής γλυκερόλης από το στέλεχος *K. oxytoca* FMCC-197.

Το παρόν κεφάλαιο έχει δημοσιευθεί:

Maria Metsoviti, Kleopatra Paraskevaïdou, Apostolis Koutinas, An-Ping Zeng, Seraphim Papanikolaou (2012). Production of 1,3-propanediol, 2,3-butanediol and ethanol by a newly isolated *Klebsiella oxytoca* strain growing on biodiesel-derived glycerol based media. *Process Biochemistry* 47:1872-1882.

III.3 Βιοτεχνολογική παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης και αιθανόλης κατά την καλλιέργεια του μικροοργανισμού *Citrobacter freundii* FMCC-207

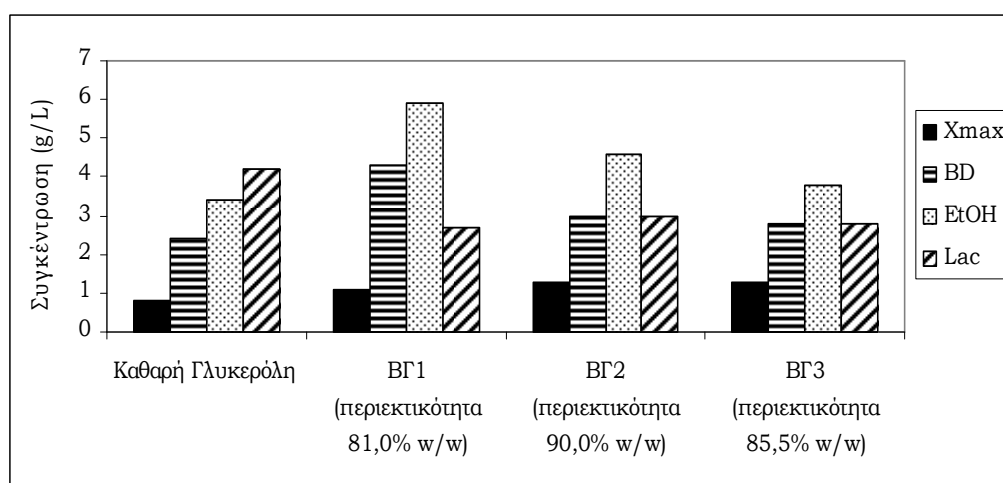
III.3.1. Βιοτεχνολογική παραγωγή μεταβολικών προϊόντων κατά την αύξηση του μικροοργανισμού *Citrobacter freundii* FMCC-207 σε υποστρώματα βιομηχανικής γλυκερόλης διαφορετικής σύστασης

Ο μικροοργανισμός *C. freundii* FMCC-207 επιλέχθηκε κατά το πρώτο στάδιο της παρούσας μελέτης για την δυνατότητα του να μεταβολίζει την βιομηχανική γλυκερόλη, προερχόμενη από την γερμανική εταιρεία βιοκαυσίμων "ADM Industries" (ΒΓ₁), προς παραγωγή μίγματος 2,3-βουτανοδιόλης (BD) και αιθανόλης (EtOH). Με στόχο την διεύρυνση αυτής της παρατήρησης για βιομηχανικές γλυκερόλες διαφορετικής σύστασης, πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες χρησιμοποιώντας ως υποστρώματα δύο βιομηχανικές γλυκερόλες προερχόμενες από τις ελληνικές εταιρείες "ΕΛΙΝ Βιοκαύσιμα Α.Ε." (ΒΓ₂) και "GF Energy Α.Ε.Β.Ε." (ΒΓ₃). Στις περιπτώσεις των γλυκερολών ΒΓ₁ και ΒΓ₃ το υλικό εκκίνησης για την παραγωγή του βιοκαυσίμου ήταν φυτικά έλαια, ενώ στην περίπτωση της γλυκερόλης ΒΓ₂ χρησιμοποιούμενα μαγειρικά έλαια, όπως τηγανέλαια (Αναλυτικότερα βλέπε § II.2.2). Ταυτόχρονα, ως μάρτυρας διενεργήθηκε μια ζύμωση σε υπόστρωμα καθαρής γλυκερόλης. Όλες οι υγρές καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε φιάλες τύπου Duran 1-L, σε συνθήκες μη ελεγχόμενου pH, με αρχική τιμή 7,0 και ολοκληρώθηκαν σε 32 - 48 ώρες. Επιλέχθηκε χαμηλή αρχική συγκέντρωση πηγής άνθρακα ($Gly_0=20$ g/L), ούτως ώστε να αποφευχθεί φαινόμενο παρεμπόδισης εξαιτίας του υποστρώματος. Μετά την ολοκλήρωση των ζυμώσεων, η κατανάλωση της γλυκερόλης κυμάνθηκε από 16,1 έως 17,9 g/L για τα υποστρώματα βιομηχανικής γλυκερόλης, ενώ στην καλλιέργεια καθαρής γλυκερόλης ήταν 16,3 g/L. Η μέγιστη κατανάλωση γλυκερόλης παρατηρήθηκε στην καλλιέργεια με υπόστρωμα την γλυκερόλη ΒΓ₁.

Αναφορικά με την παραγωγή βιομάζας (X_{max}) όπως απεικονίζεται και στο Γράφημα III-17, παρουσίασε παρόμοιες τιμές (1,1-1,3 g/L) στις καλλιέργειες με υπόστρωμα τις τρεις βιομηχανικές γλυκερόλες, ενώ στην ζύμωση καθαρής γλυκερόλης, η συγκέντρωση που παρατηρήθηκε ήταν ελαφρώς χαμηλότερη (0,8 g/L). Ανεξάρτητα από το είδος της γλυκερόλης που χρησιμοποιήθηκε, σε όλες τις καλλιέργειες τα τελικά μεταβολικά προϊόντα ήταν αιθανόλη (EtOH), 2,3-βουτανοδιόλη (BD) και γαλακτικό οξύ (Lac). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι παρά τον μεταβολισμό της γλυκερόλης υπό αναερόβιες συνθήκες, σε καμία περίπτωση δεν ανιχνεύτηκε 1,3-προπανοδιόλη στο μέσο της καλλιέργειας. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει την εμπλοκή του ρεγουλόνιου-glp κατά την αναερόβια αφομοίωση γλυκερόλης από το εν λόγω στέλεχος, ανεξάρτητα από τον τύπο της γλυκερόλης (καθαρή ή βιομηχανική) ή την περιεκτικότητα του υποστρώματος σε γλυκερόλη. Αυτό συμβαίνει παρά την απουσία κάποιου εξωτερικού αποδέκτη ηλεκτρονίων, όπως ηλεκτρικό οξύ, νιτρικά άλατα κτλ. Η παρατήρηση αυτή παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον δεδομένου ότι με βάση

τις αναφορές στην διεθνή βιβλιογραφία, ο αναερόβιος μεταβολισμός της γλυκερόλης οδηγεί στην σύνθεση 1,3-προπανοδιόλης (Biebl et al., 1999).

Σε όλες τις καλλιέργειες με υποστρώματα βιομηχανική γλυκερόλη ο κύριος μεταβολίτης ήταν η αιθανόλη, η τελική συγκέντρωση της οποίας κυμάνθηκε μεταξύ 3,8 - 5,9 g/L. Η μεγαλύτερη τιμή παρατηρήθηκε στην ζύμωση με υπόστρωμα την γλυκερόλη ΒΓ₁, και παράλληλα ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής αιθανόλης προς αναλωθείσα γλυκερόλη ($Y_{EtOH/Gly}$) έλαβε την μέγιστη τιμή (0,33 g/g). Αντίθετα στην καλλιέργεια του μάρτυρα η παραγόμενη αιθανόλη έλαβε την μικρότερη τιμή (3,4 g/L), στην οποία το κύριο μεταβολικό προϊόν ήταν το γαλακτικό οξύ, η συγκέντρωση του οποίου έφτασε στην μεγαλύτερη τιμή (4,2 g/L), συγκριτικά με τις υπόλοιπες καλλιέργειες. Αντίστοιχα με την περίπτωση της αιθανόλης ήταν τα αποτελέσματα και στην περίπτωση της 2,3-βουτανοδιόλης. Η τελική συγκέντρωση κυμάνθηκε μεταξύ 2,5 και 4,3 g/L, με την μέγιστη τιμή στην ζύμωση με υπόστρωμα την γλυκερόλη ΒΓ₁ και την μικρότερη στην καλλιέργεια του μάρτυρα.



Γράφημα III-17: Μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας (X-g/L), 2,3-βουτανοδιόλης (BD-g/L), αιθανόλης (EtOH-g/L) και γαλακτικού οξέος (Lac-g/L), κατά την αύξηση του στελέχους *Citrobacter freundii* FMCC-207 σε υποστρώματα βιομηχανικής γλυκερόλης διαφορετικής σύστασης.

Τα παραπάνω αποτελέσματα απέδειξαν ότι και οι τρεις τύποι βιομηχανικής γλυκερόλης ήταν κατάλληλα υποστρώματα για την αύξηση του μικροοργανισμού *C. freundii* και την παραγωγή μίγματος 2,3-βουτανοδιόλης και αιθανόλης, υπό τις δεδομένες πειραματικές συνθήκες. Οι διαφοροποιήσεις που παρατηρήθηκαν στην τελική συγκέντρωση των μεταβολιτών συγκριτικά με τα υποστρώματα καθαρής και βιομηχανικής γλυκερόλης έφτασαν τα 2,5 g/L στην περίπτωση της αιθανόλης και τα 1,8 g/L στην περίπτωση της 2,3-βουτανοδιόλης, με τις ελάχιστες τιμές να λαμβάνονται στην καλλιέργεια του μάρτυρα. Αντίθετα η χρήση καθαρής γλυκερόλης ευνόησε την παραγωγή γαλακτικού οξέος, η συγκέντρωση του οποίου ήταν αρκετά χαμηλότερη στις υπόλοιπες καλλιέργειες. Ως εκ τούτου μπορεί να θεωρηθεί ότι οι προσμίξεις των συγκεκριμένων

υποστρώματων (άλατα, μεθανόλη, κλπ.) καθώς και η προέλευση του υλικού εκκίνησης για την παραγωγή του βιοκαυσίμου (φυτικά έλαια ή χρησιμοποιούμενα μαγειρικά έλαια) όχι μόνο δεν είχαν ιδιαίτερα αρνητική επίπτωση στον μεταβολισμό της γλυκερόλης από το στέλεχος, αλλά αντιθέτως ευνόησαν τη βιοσύνθεση των επιθυμητών μεταβολιτών. Δεδομένου ότι η βιομηχανική γλυκερόλη προερχόμενη από το εταιρεία βιοκαυσίμων "ADM Industries" ενίσχυσε ελαφρώς την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων, σε σύγκριση με τα άλλα είδη βιομηχανικής γλυκερόλης, επιλέχθηκε αυτή ως πηγή άνθρακα για τα επικείμενα πειράματα.

III.3.2. Επίδραση των συνθηκών pH στην σύνθεση μεταβολικών προϊόντων κατά την αύξηση του στελέχους *Citrobacter freundii* FMCC-207 σε υπόστρωμα με βάση την βιομηχανική γλυκερόλη και την εμπορική γλυκόζη

Με βάση την διεθνή βιβλιογραφία, οι αναφορές για την παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης από υποστρώματα καθαρής και βιομηχανικής γλυκερόλης είναι αρκετά περισσότερες και συγκριτικά με την σύνθεση 2,3-βουτανοδιόλης και αιθανόλης από τα εν λόγω υποστρώματα. Ιδιαίτερα ελκυστική θεωρείται η ιδέα χρήσης μιας εξαιρετικά φθηνής πρώτης ύλης, όπως είναι η βιομηχανική γλυκερόλη, για την βιοτεχνολογική παραγωγή αυτών των μεταβολικών προϊόντων. Δεδομένου ότι το στέλεχος *C. freundii* FMCC-207, ανεξάρτητα από την περιεκτικότητα του μέσου σε γλυκερόλη, εμφάνισε ικανοποιητική παραγωγή και των δύο επιθυμητών μεταβολιτών, αποφασίστηκε η διερεύνηση και η επίδραση των συνθηκών του pH στο σχηματισμό των προϊόντων καθώς και στην κατανάλωση του υποστρώματος. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν υγρές καλλιέργειες χωρίς να ρυθμίζεται το pH της ζύμωσης και ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα 1,2-L κατά τις οποίες το pH του μέσου διατηρήθηκε σταθερό.

III.3.2.1. Ασυνεχείς καλλιέργειες σε φιάλες υπό συνθήκες μη-σταθερού pH

Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε αναερόβιες ανακινούμενες φιάλες τύπου Duran 1-L, σε συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας, αλλά μη-σταθερού pH. Η αρχική συγκέντρωση της γλυκερόλης κυμάνθηκε από 20 έως 60 g/L. Οι τελικές συγκεντρώσεις των μεταβολικών προϊόντων, η συνολική κατανάλωση του υποστρώματος, η παραγόμενη βιομάζα και η τελική τιμή του pH της καλλιέργειας δίνονται στον Πίνακα III-10. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε όλες τις περιπτώσεις, ο χρόνος ζύμωσης παρατάθηκε έως ότου ολοκληρωθεί ουσιαστικά η κατανάλωση του υποστρώματος. Από τα δεδομένα του Πίνακα III-10 παρατηρείται ότι σε όλες τις ζυμώσεις ο κύριος μεταβολίτης ήταν η αιθανόλη η συγκέντρωση της οποίας αυξήθηκε προοδευτικά με αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης. Έτσι η μέγιστη συγκέντρωση EtOH_{max} 12,8 g/L σημειώθηκε στην καλλιέργεια με Gly₀=60 g/L. Η τιμή αυτή αντιστοιχεί και στον μέγιστο συντελεστή απόδοσης ανά καταναλωθείσα γλυκερόλη (Y_{EtOH/Gly} 0,46 g/g). Αναφορικά με την κυτταρική αύξηση και τον

σηματισμό των υπολοίπων μεταβολιτών φαίνεται ότι στο εύρος 20-60 g/L η μεταβολή της αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης δεν είχε επιπτώσεις στην σύνθεση τους (σε απόλυτες τιμές - g/L). Ως εκ τούτου ανεξάρτητα από την Gly₀ η παραγόμενη βιομάζα σε όλες τις καλλιέργειες ήταν 1,1 g/L, η συγκέντρωση της 2,3-βουτανودیόλης ήταν ~4,5 g/L, και του γαλακτικού οξέος παρέμεινε πρακτικά σταθερή αφού κυμάνθηκε από 4,2-5,1 g/L. Ταυτόχρονα εκκρίθηκαν στο μέσο της καλλιέργειας μικρότερες ποσότητες μυρμηκικού οξέος που κυμάνθηκαν από 0,6 έως 1,1 g/L. Από την άλλη πλευρά οι συντελεστές απόδοσης της παραγόμενης 2,3-βουτανودیόλης και του γαλακτικού οξέος προς καταναλωθείσα γλυκερόλη μειώθηκαν προοδευτικά με την αύξηση της Gly₀. Το αποτέλεσμα αυτό ήταν αναμενόμενο καθώς η συγκέντρωση των δύο μεταβολιτών παρέμεινε σταθερή, αλλά αυξήθηκε σταδιακά η συνολική κατανάλωση του υποστρώματος. Η συσσώρευση των οργανικών οξέων στο μέσο της καλλιέργειας είχε ως άμεση συνέπεια την ελάττωση της τιμής pH από την αρχική τιμή 7,0 σε τελική τιμή που κυμάνθηκε από 6,3 έως 5,9. Η μέγιστη μείωση σημειώθηκε στην καλλιέργειες με Gly₀=20 g/L, μολονότι δεν παρατηρήθηκε και η μεγαλύτερη συγκέντρωση οργανικών οξέων.

Πίνακας III-10: Παραγωγή 2,3-βουτανودیόλης (BD), αιθανόλης (EtOH), γαλακτικού (Lac) και μυρμηκικού οξέος (Form), κατά την αύξηση του στελέχους *Citrobacter freundii* FMCC-207 σε ασυνεχείς καλλιέργειες σε φιάλες, σε υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης, υπό συνθήκες μη-σταθερού pH.

Gly ₀ (g/L)	Gly _C (g/L)	Χρόνος (h)	pH _F	X (g/L)	Συγκέντρωση μεταβολικών προϊόντων (g/L)				Συντελεστής απόδοσης (g/g)		
					BD	EtOH	Lac	Form	BD	EtOH	Lac
~20	17,9	48	5,9	1,1	4,3	5,9	4,2	0,6	0,24	0,33	0,23
~40	19,5	72	6,3	1,1	4,5	8,8	4,6	0,9	0,23	0,45	0,23
~60	27,6	152	6,3	1,1	4,5	12,8	5,1	1,1	0,16	0,46	0,17

Συνθήκες καλλιέργειας: αναερόβιες ασυνεχείς καλλιέργειες σε ανακινούμενες φιάλες (80 rpm.) τύπου Duran 1-L, αρχική τιμή pH=7±0,2 και θερμοκρασία 30 °C.

Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν με διαφορετικά αρχικά εμβόλια, ενώ το κάθε σημείο της ζύμωσης είναι ο μέσος όρος δυο ανεξαρτήτων πειραμάτων.

Gly₀: αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης, Gly_C: καταναλωθείσα γλυκερόλη, pH_F: τελική τιμή pH, X: μέγιστη παραγόμενη βιομάζα.

Τέλος έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον να επισημανθεί το γεγονός ότι η αυξανόμενη αρχική συγκέντρωση του υποστρώματος είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση του ποσοστού της γλυκερόλης που παρέμενε ακατανάλωτη. Ιδίως όταν η Gly₀ έφτασε τα 60 g/L, το ~50 % w/w της διαθέσιμης γλυκερόλης δεν μεταβολίστηκε, παρόλο που η διάρκεια της ζύμωσης παρατάθηκε έως τις 152 ώρες. Φαίνεται λοιπόν, ότι η σχετικά υψηλή αρχική συγκέντρωση του υποστρώματος αν και δεν

έδρασε παρεμποδιστικά στην αύξηση του μικροοργανισμού (παραγόμενη βιομάζα 1,1 g/L, παραγόμενη αιθανόλη 12,8 g/L), εντούτοις επηρέασε αρνητικά την κατανάλωση της γλυκερόλης και την σύνθεση των μεταβολιτών.

Δεδομένης της αδυναμίας του στελέχους να μεταβολίσει, υπό τις δεδομένες πειραματικές συνθήκες, υψηλές συγκεντρώσεις γλυκερόλης, κρίθηκε σκόπιμο να διευρυνθεί η μελέτη και σε άλλα υποστρώματα. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν υγρές καλλιέργειες υπό συνθήκες μη-σταθερού pH, με πηγή άνθρακα την εμπορική γλυκόζη, σε αρχικές συγκεντρώσεις Glu_0 20-80 g/L. Στον Πίνακα III-11 δίνονται η συνολική κατανάλωση του υποστρώματος, οι τελικές συγκεντρώσεις των μεταβολικών προϊόντων, η παραγόμενη βιομάζα και η τελική τιμή του pH κάθε καλλιέργειας.

Πίνακας III-11: Παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης (BD), αιθανόλης (EtOH), γαλακτικού (Lac) και ηλεκτρικού οξέος (Suc), κατά την αύξηση του στελέχους *Citrobacter freundii* FMCC-207 σε ασυνεχείς καλλιέργειες σε φιάλες, σε υπόστρωμα εμπορικής γλυκόζης, υπό συνθήκες μη-σταθερού pH.

Glu_0 (g/L)	Glu_c (g/L)	Χρόνος (h)	pH _f	X (g/L)	Συγκέντρωση μεταβολικών προϊόντων (g/L)				Συντελεστής απόδοσης (g/g)	
					BD	EtOH	Lac	Suc	BD	EtOH
~20	21,8	14	6,4	1,4	9,9	2,5	1,3	0,9	0,45	0,11
~40	40,4	24	5,4	1,8	17,0	4,6	3,1	1,1	0,42	0,11
~60	62,6	48	5,2	2,6	26,4	4,6	3,9	1,2	0,42	0,07
~80	75,5	72	5,0	2,7	30,1	6,3	5,8	1,4	0,40	0,08

Συνθήκες καλλιέργειας: αναερόβιες ασυνεχείς καλλιέργειες σε ανακινούμενες φιάλες (80 rpm) τύπου Duran 1-L, αρχική τιμή pH=7,0±0,2 και θερμοκρασία 30 °C.

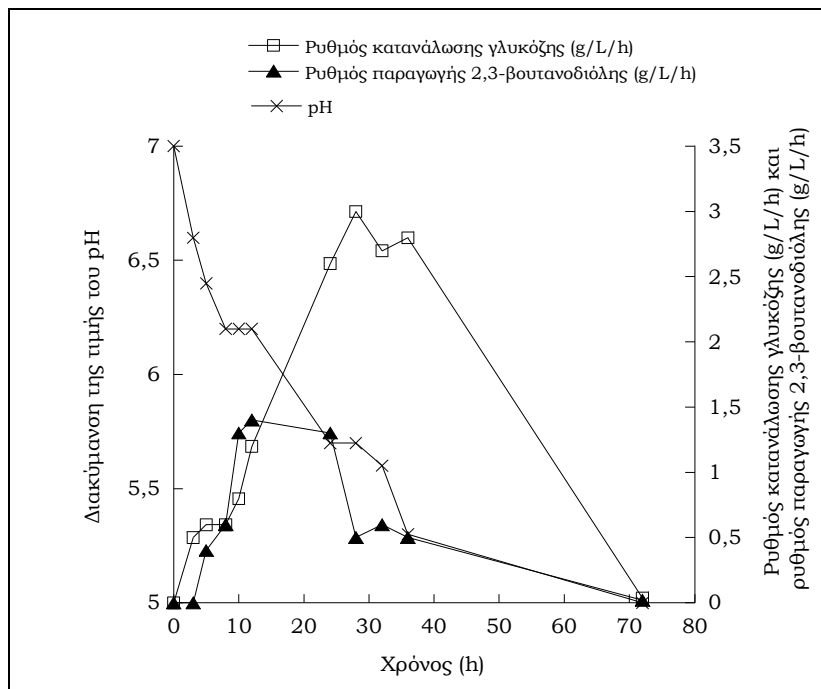
Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν με διαφορετικά αρχικά εμβόλια, ενώ το κάθε σημείο της ζύμωσης είναι ο μέσος όρος δυο ανεξαρτήτων πειραμάτων.

Glu_0 : αρχική συγκέντρωση γλυκόζης, Glu_c : καταναλωθείσα γλυκόζη, pH_f: τελική τιμή pH, X: μέγιστη παραγόμενη βιομάζα.

Από τα δεδομένα του Πίνακα III-11 παρατηρείται ότι η γλυκόζη καταναλώθηκε σχεδόν πλήρως ακόμη και σε υποστρώματα υψηλής αρχικής συγκέντρωσης ($Glu_0=80$ g/L). Όλες οι ζυμώσεις ολοκληρώθηκαν σε σύντομο χρονικό διάστημα, και η συνολική τους διάρκεια αυξήθηκε προοδευτικά από τις 14 στις 72 ώρες. Παράλληλα η κυτταρική αύξηση ενισχύθηκε σημαντικά από την παρουσία της γλυκόζης και η μέγιστη παραγόμενη βιομάζα X_{max} έφθασε τα 2,6 g/L, στην καλλιέργεια με $Glu_0=80$ g/L. Στην ίδια καλλιέργεια παρατηρήθηκε και η υψηλότερη συγκέντρωση 2,3-βουτανοδιόλης ($BD_{max}=30,1$ g/L), τιμή που αντιστοιχεί σε παραγωγικότητα 0,42 g/L/h και συντελεστή απόδοσης παραχθείσας 2,3-βουτανοδιόλης ανά καταναλωθείσα γλυκόζη $Y_{BD/Glu}=0,40$ g/g. Όπως απεικονίζεται και στο Γράφημα III-18 για την εν λόγω καλλιέργεια ο ρυθμός παραγωγής της διόλης λαμβάνει την μέγιστη τιμή όταν το pH του μέσου της καλλιέργειας μειώθηκε στην τιμή 6,2, μόλις οκτώ ώρες μετά τον εμβολιασμό. Το εύρημα αυτό έρχεται σε συμφωνία με τα

αποτελέσματα ερευνών στην διεθνή βιβλιογραφία με βάση τα οποία η σύνθεση της 2,3-βουτανοδιόλης ευνοείται από ελαφρώς όξινες και μη ελεγχόμενες συνθήκες pH (Biebl et al., 1998). Σημειώνεται ότι ο υπολογισμός του ρυθμού κατανάλωσης της γλυκόζης και του ρυθμού παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης βασίστηκε στα συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα.

Η 2,3-βουτανοδιόλη ήταν ο κύριος μεταβολίτης σε όλες τις καλλιέργειες, ανεξάρτητα από την αρχική συγκέντρωση γλυκόζης. Αξίζει επίσης, να αναφερθεί ότι η μέγιστη συγκέντρωση 2,3-βουτανοδιόλης και ο μέγιστος συντελεστής απόδοσης $Y_{BD/Glu}$ δεν σημειώθηκαν στην ίδια καλλιέργεια. Έτσι η μέγιστη τιμή του συντελεστή $Y_{BD/Glu}=0,45$ g/g, παρατηρήθηκε στην καλλιέργεια με $Glu_0=20$ g/L και προσεγγίζει τη μέγιστη θεωρητική που είναι 0,50 g/g (Zeng & Sabra, 2012), ενώ φαίνεται να υπάρχει μια ελαφρά τάση μείωσης του συντελεστή $Y_{BD/Glu}$ με την αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης της γλυκόζης.



Γράφημα III-18: Γραφική παράσταση του ρυθμού κατανάλωσης της γλυκόζης, του ρυθμού παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης και η διακύμανση της τιμής του pH σε συνάρτηση με τον χρόνο, κατά την αύξηση του στελέχους *Citrobacter freundii* FMCC-207, σε ασυνεχή καλλιέργεια σε φιάλες, σε θρεπτικό μέσο με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 80 g/L.

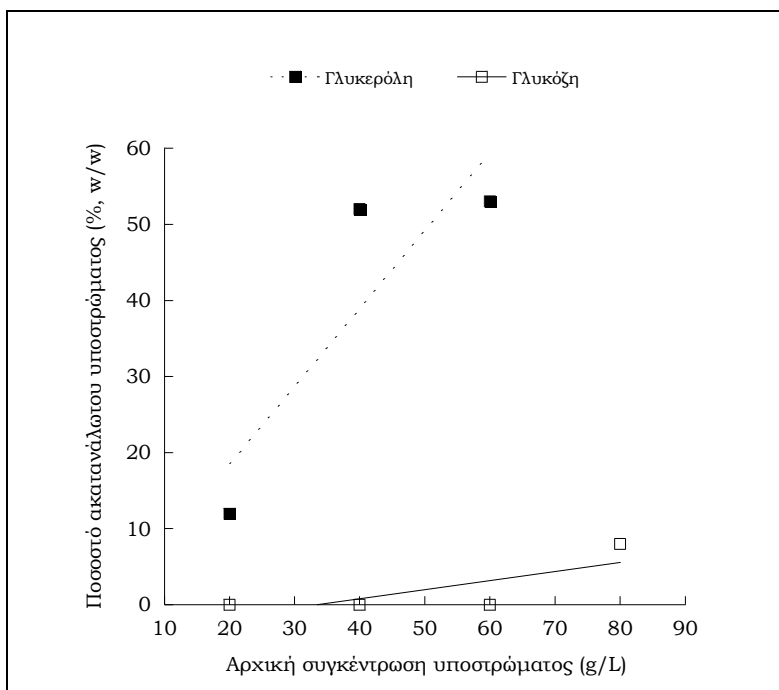
Συνθήκες καλλιέργειας: αναερόβια ασυνεχής καλλιέργεια σε ανακινούμενες φιάλες (80 rpm) τύπου Duran 1-L, αρχική τιμή pH=7,0±0,2 και θερμοκρασία 30 °C.

Ο υπολογισμός του ρυθμού κατανάλωσης της γλυκερόλης (r_{Gly}''') έγινε με βάση την μεταβολή της συγκέντρωσης του υποστρώματος προς το αντίστοιχο χρονικό διάστημα, [$r_{Gly}'''=dGly/dt$].

Ο υπολογισμός του ρυθμού παραγωγής της 2,3-βουτανοδιόλης (r_{BD}''') έγινε με βάση την μεταβολή της συγκέντρωσης του υποστρώματος προς το αντίστοιχο χρονικό διάστημα, [$r_{BD}'''=dBD/dt$].

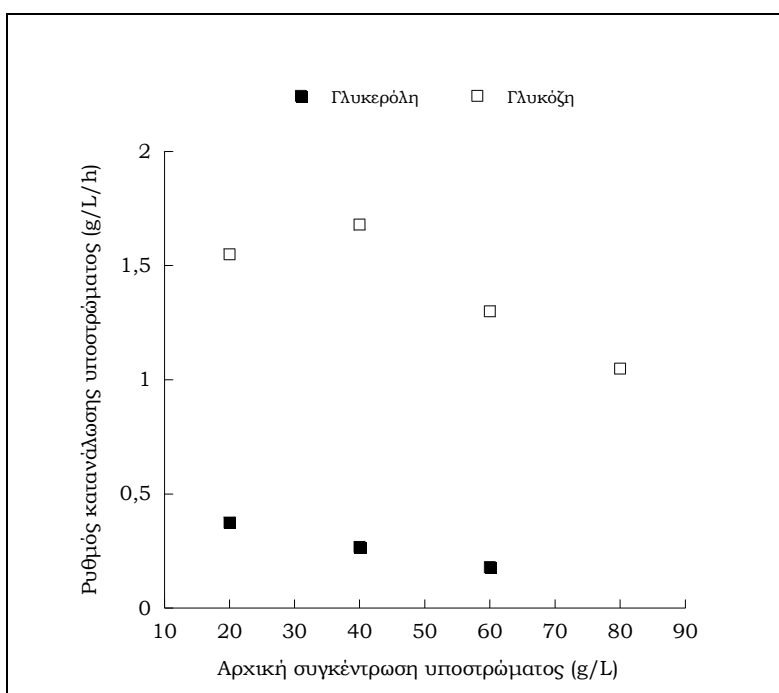
Η παραγωγή της 2,3-βουτανодиόλης συνοδεύτηκε από την σύνθεση αρκετά μικρότερων ποσοτήτων αιθανόλης και οργανικών οξέων. Η αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης από τα 20 έως τα 80 g/L, οδήγησε σε σταδιακά αύξηση της παραγόμενης αιθανόλης, η συγκέντρωση της οποίας προοδευτικά έφτασε τα 6,3 g/L. Τα οργανικά οξέα της ζύμωσης ήταν το γαλακτικό και το ηλεκτρικό οι συγκεντρώσεις των οποίων ήταν χαμηλότερες και κυμάνθηκαν από 1,3-5,8 g/L και 0,9-1,4 g/L, αντίστοιχα. Η έκκριση των οργανικών οξέων στο μέσο της καλλιέργειας είχε ως άμεση συνέπεια την πτώση της τιμής pH από την αρχική τιμή 7,0 σε τελική τιμή που κυμάνθηκε από 6,4 έως 5,0. Η μέγιστη μείωση κατά 2,0 μονάδες σημειώθηκε στην καλλιέργεια με $Glu_0=80$ g/L, δηλαδή σε εκείνη με την μεγαλύτερη παραγωγή γαλακτικού οξέος ($Lac_{max}=5,8$ g/L).

Συγκρίνοντας τις καλλιέργειες σε υπόστρωμα γλυκόζης με τις αντίστοιχες σε υπόστρωμα γλυκερόλης (βλέπε Πίνακες III-10 και III-11), παρατηρείται ότι η γλυκόζη αποτέλεσε καλύτερο υπόστρωμα για την αύξηση του μικροοργανισμού και την παραγωγή μεταβολιτών. Κυριότερο χαρακτηριστικό ήταν η ταχύτατη και πλήρης αφομοίωση της γλυκόζης συγκριτικά με την γλυκερόλη. Έτσι ακόμη και σε $Glu_0=80$ g/L, το ποσοστό της γλυκόζης που δεν καταναλώθηκε ήταν αμελητέο συγκριτικά με το 50% της ακατανάλωτης γλυκερόλης (Γράφημα III-19). Δεδομένου ότι το pH μειώθηκε εξίσου στις καλλιέργειες τόσο με υπόστρωμα την γλυκόζη όσο και την βιομηχανική γλυκερόλη, ενώ ο κυτταρικός μεταβολισμός για αμφότερα τα υποστρώματα ήταν ταυτόσημος από το επίπεδο της δι-υδροξυ-φωσφορικής ακετόνης (DHA-P) και ύστερα, πιθανόν ο μεταφορέας (carrier) της γλυκόζης να μην επηρεάστηκε από την μεταβολή του pH, όπως να φαίνεται να συνέβη με τον μεταφορέα της γλυκερόλης. Άλλη πιθανή εξήγηση του μειωμένου ρυθμού κατανάλωσης της γλυκερόλης θα μπορούσε να οφείλεται σε περιορισμένη δράση του ενζύμου που εμπλέκεται στη φωσφορυλίωση της γλυκερόλης, λόγω της μείωσης της τιμής του pH ή της αύξησης της συγκέντρωσης του διοξειδίου του άνθρακα στο μέσο της καλλιέργειας.



Γράφημα III-19: Ποσοστό ακατανάλωτου υποστρώματος, εκφρασμένο σε % w/w, κατά την αύξηση του στελέχους *Citrobacter freundii* FMCC-207 σε ασυνεχείς καλλιέργειες σε φιάλες.

Επιπλέον και η διάρκεια της ζύμωσης μειώθηκε σημαντικά σε όλες τις καλλιέργειες με υπόστρωμα την γλυκόζη, με αποτέλεσμα ο ρυθμός κατανάλωσης της γλυκόζης να είναι μεγαλύτερος συγκριτικά με τον αντίστοιχο ρυθμό κατανάλωσης της γλυκερόλης (Γράφημα III-20). Έτσι στην καλλιέργεια με $Glu_0=40$ g/L ο ρυθμός κατανάλωσης της γλυκόζης έλαβε τη μέγιστη τιμή 1,68 g/L/h και μειώθηκε στην τιμή 1,1 g/L/h όταν η αρχική συγκέντρωση του υποστρώματος αυξήθηκε στα 80 g/L. Στην περίπτωση που η γλυκερόλη ήταν η μόνη πηγή άνθρακα στο θρεπτικό μέσο, η μέγιστη τιμή του ρυθμού κατανάλωσης ήταν μόλις 0,38 g/L/h στην καλλιέργεια με $Gly_0=20$ g/L και μειώθηκε προοδευτικά με την αύξηση της γλυκερόλης, έως την τιμή 0,18 g/L/h για $Gly_0=60$ g/L



Γράφημα III-20: Ρυθμός κατανάλωσης γλυκόζης και γλυκερόλης σε διαφορετικές αρχικές συγκέντρωσης υποστρώματος, κατά την αύξηση του στελέχους *Citrobacter freundii* FMCC-207 σε ασυνεχείς καλλιέργειες σε φιάλες. Ο υπολογισμός του ρυθμού κατανάλωσης των υποστρωμάτων έγινε με βάση την μεταβολή της συγκέντρωσης του υποστρώματος προς το αντίστοιχο χρονικό διάστημα.

Αναφορικά με την σύνθεση μεταβολικών προϊόντων στα δύο υποστρώματα, η παρουσία της γλυκόζης στο μέσο της καλλιέργειας βελτίωσε την βιοσύνθεση της 2,3-βουτανοδιόλης, κι έτσι η αύξηση της συγκέντρωσης της Glu_0 οδήγησε σε σταδιακή αύξηση της τελικής συγκέντρωσης του προϊόντος έως τα 30,1 g/L, ενώ αντίθετα στις καλλιέργειες με γλυκερόλη η συγκέντρωση παρέμεινε σταθερή (4,5 g/L).

Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι ο ρυθμός κατανάλωσης της γλυκόζης ήταν σημαντικά μεγαλύτερος από τον αντίστοιχο της γλυκερόλης, ενώ εξίσου μεγαλύτερη κυτταρική αύξηση σημειώθηκε στις καλλιέργειες με υπόστρωμα γλυκόζης, προκειμένου να βελτιωθεί η αφομοίωση της γλυκερόλης σε συνθήκες μη-σταθερού pH, διεξήχθησαν δύο επιπλέον ζυμώσεις με τη γλυκόζη και τη γλυκερόλη ως συνυποστρώματα σε αναλογία 1:3 (w/w). Στον Πίνακα III-12 δίνονται η συνολική κατανάλωση των υποστρωμάτων, οι τελικές συγκεντρώσεις των μεταβολικών προϊόντων, η παραγόμενη βιομάζα και η τελική τιμή του pH κάθε καλλιέργειας. Σημειώνεται ότι για τον υπολογισμό του συντελεστή απόδοσης ελήφθη υπόψη η συνολική ποσότητα γλυκόζης και γλυκερόλης που καταναλώθηκε.

Πίνακας III-12: Παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης (BD), αιθανόλης (EtOH), γαλακτικού (Lac) και μυρμηκικού οξέος (Form), κατά την αύξηση του στελέχους *Citrobacter freundii* FMCC-207 σε ασυνεχείς καλλιέργειες σε φιάλες, σε συνυπόστρωμα εμπορικής γλυκόζης και βιομηχανικής γλυκερόλης, υπό συνθήκες μη-σταθερού pH.

Gly ₀ (g/L)	Glu ₀ (g/L)	Gly _C (g/L)	Glu _C (g/L)	Χρόνος (h)	pH _F	X (g/L)	Συγκέντρωση μεταβολικών προϊόντων (g/L)				Συντελεστής απόδοσης (g/g)*	
							BD	EtOH	Lac	Form	BD	EtOH
~30	~10	17,4	10,3	48	5,8	2,0	7,2	8,5	1,7	0,4	0,26	0,31

* Οι συντελεστές απόδοσης υπολογίστηκαν με βάση την συνολική κατανάλωση γλυκόζης και γλυκερόλης.

Συνθήκες καλλιέργειας: αναερόβιες ασυνεχείς καλλιέργειες σε ανακινούμενες φιάλες (80 rpm) τύπου Duran 1-L, αρχική τιμή pH=7,0±0,2 και θερμοκρασία 30 °C.

Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν με διαφορετικά αρχικά εμβόλια, ενώ το κάθε σημείο της ζύμωσης είναι ο μέσος όρος δυο ανεξαρτήτων πειραμάτων.

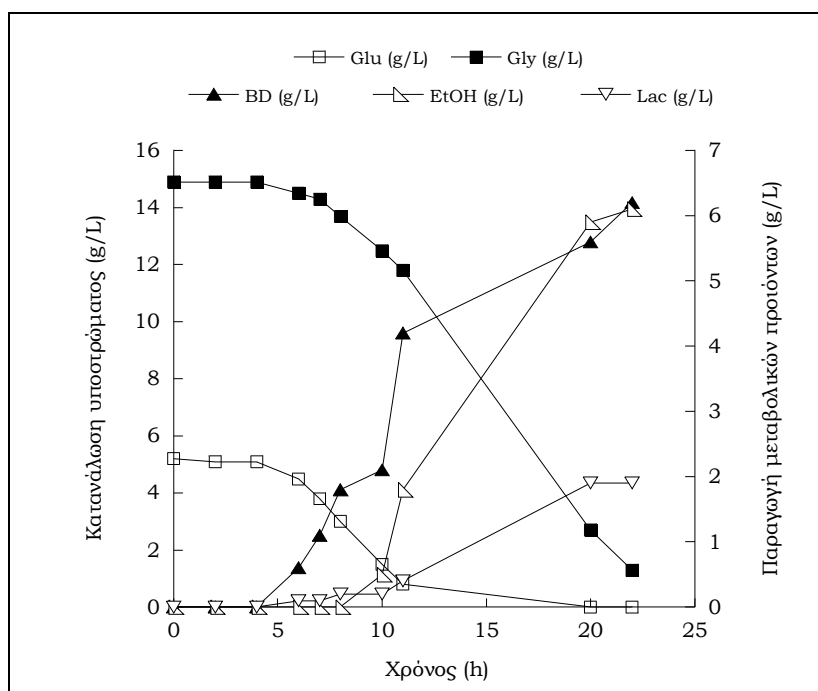
Gly₀: αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης, Glu₀: αρχική συγκέντρωση γλυκόζης, Gly_C: καταναλωθείσα γλυκερόλη, Glu_C: καταναλωθείσα γλυκόζη, pH_F: τελική τιμή pH, X: μέγιστη παραγόμενη βιομάζα.

Από τα δεδομένα του Πίνακα III-8 είναι φανερό ότι υπό τις δεδομένες πειραματικές συνθήκες η προσθήκη γλυκόζης στο μέσο της καλλιέργειας ευνόησε την τον σχηματισμό βιομάζας και την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης, συγκριτικά με τις αντίστοιχες καλλιέργειες σε υπόστρωμα με μοναδική πηγή άνθρακα την γλυκερόλη. Ειδικότερα, στη καλλιέργεια Gly₀=30 g/L - Glu₀=10 g/L σε σχέση με τη καλλιέργεια Gly₀=40 g/L, η συγκέντρωση της 2,3-βουτανοδιόλης αυξήθηκε από 4,5 στα 7,2 g/L και η παραγόμενη βιομάζα από 1,1 σε 2,0 g/L. Από την άλλη πλευρά η σύνθεση της αιθανόλης σε απόλυτες τιμές (g/L), δεν επηρεάστηκε από την παρουσία της γλυκόζης, καθώς παρόμοιες ποσότητες παράχθηκαν με τα αντίστοιχα πειράματα σε υπόστρωμα γλυκερόλης (Πίνακας III-10 και III-12). Ωστόσο, όταν η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε υπόστρωμα με βάση την γλυκερόλη (Gly₀=40 g/L), η τιμή του συντελεστή απόδοσης ήταν υψηλότερη συγκριτικά με την καλλιέργεια σε συνυπόστρωμα γλυκόζης-γλυκερόλης Gly₀=30 g/L - Glu₀=10 g/L (0,45 g/g έναντι 0,31 g/g). Όπως απεικονίζεται και στα Γραφήματα III-21α και III-21β η κατανάλωση των υποστρωμάτων έγινε σχεδόν ταυτόχρονα, και στις δύο καλλιέργειες. Έτσι, η συγκέντρωση της παραγόμενης βιομάζας εμφάνισε απλή σιγμοειδή καμπύλη, κατά τα τυπικά της μικροβιακής αύξησης και όχι διπλή σιγμοειδή καμπύλη (όπου κάτι τέτοιο θα συνέβαινε αν ο μεταβολισμός των υποστρωμάτων δεν γινόταν ταυτόχρονα) (Γράφημα III-21γ). Σε αμφότερες τις καλλιέργειες ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης (μ_{\max}) υπολογίστηκε με προσαρμογή των πειραματικών

δεδομένων στην ευθεία με $\ln\left(\frac{X}{X_0}\right) = \mu_{\max} \times \Delta t$ για την εκθετική φάση αύξησης του

μικροοργανισμού και οι τιμές κυμάνθηκαν μεταξύ 0,25 h⁻¹ και 0,30 h⁻¹. Στην καλλιέργεια με Gly₀=30 g/L και Glu₀=10 g/L η αφομοίωση των υποστρωμάτων ξεκίνησε τέσσερις ώρες μετά τον

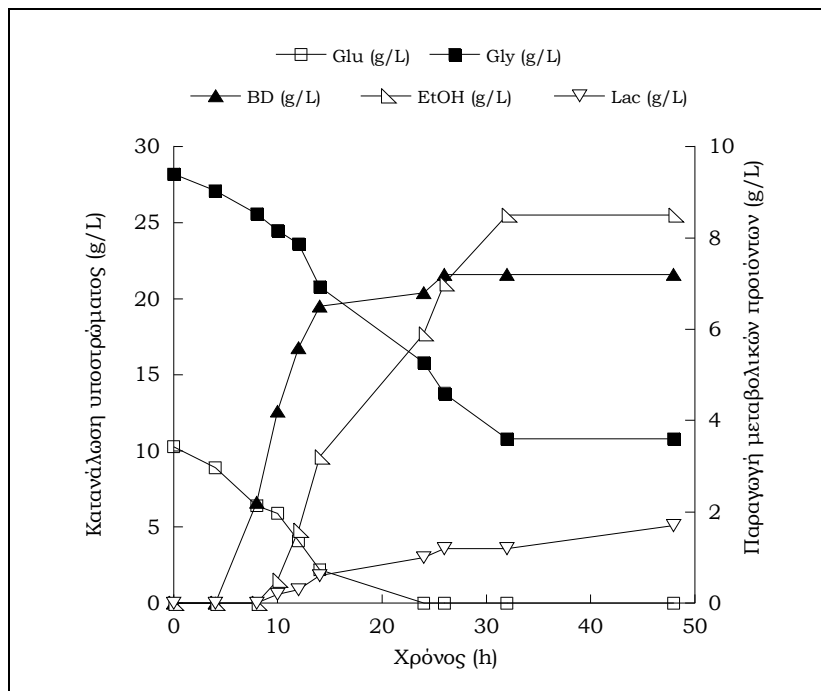
εμβολιασμό. Παρόλα αυτά αξίζει να σημειωθεί ότι στην εν λόγω καλλιέργεια, ένα μέρος της γλυκερόλης (ποσοστό ~40%) παρέμεινε ακατανάλωτο, το οποίο είναι μικρότερο συγκριτικά με το αντίστοιχο ποσοστό την καλλιέργεια με $Gly_0=40$ g/L (ποσοστό ~50%).



Γράφημα III-21α: Γραφική παράσταση της κατανάλωσης υποστρώματος και παραγωγής 2,3-βουτανολίου (BD-g/L), αιθανόλης (EtOH-g/L) και γαλακτικού οξέος (Lac-g/L) σε συνάρτηση με τον χρόνο, κατά την αύξηση του στελέχους *Citrobacter freundii* FMCC-207 σε ασυνεχή καλλιέργεια σε φιάλες, σε θρεπτικό μέσο με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης ~15 g/L και γλυκόζης ~5 g/L.

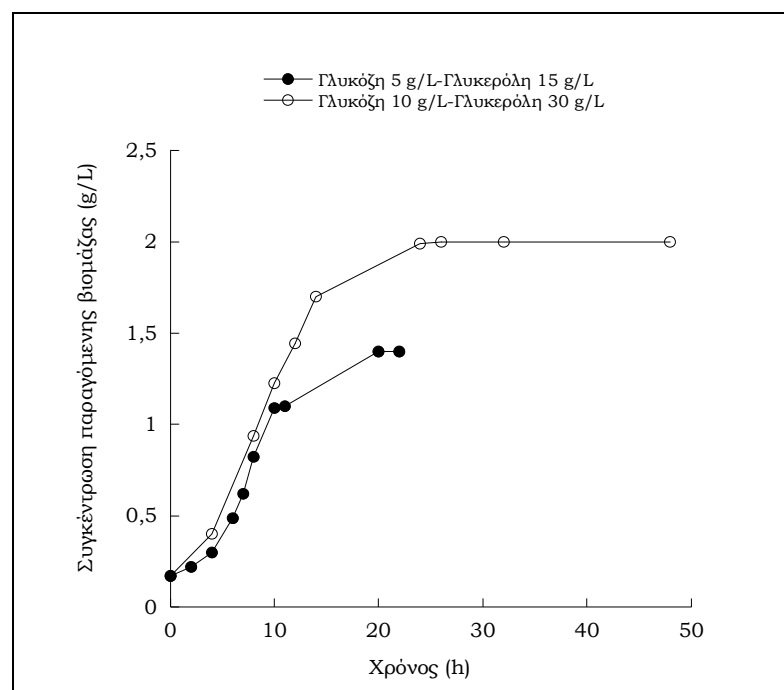
Συνθήκες καλλιέργειας: αναερόβια ασυνεχής καλλιέργεια σε ανακινούμενες φιάλες (80 rpm) τύπου Duran 1-L, αρχική τιμή $pH=7,0\pm 0,2$ και θερμοκρασία 30 °C.

Αναφορικά με την σύνθεση των κύριων μεταβολικών προϊόντων παρατηρείται ότι η παραγωγή της 2,3-βουτανολίου πραγματοποιείται παράλληλα με τον μεταβολισμό της γλυκόζης και μετά την εξάντληση του υποστρώματος ο ρυθμός παραγωγής μειώνεται. Το φαινόμενο είναι πιο εμφανές στην καλλιέργεια $Gly_0=30$ g/L και $Glu_0=10$ g/L, όπου η σύνθεση του μεταβολίτη ξεκινάει οκτώ ώρες μετά τον εμβολιασμό με σταθερό ρυθμό και πρακτικά σταματάει στις εικοσιτέσσερις ώρες, όταν πλέον έχει ολοκληρωθεί και αφομοίωση της γλυκόζης (βλέπε Γράφημα III-21β). Η σύνθεση της αιθανόλης ξεκινάει λίγες ώρες μετά της 2,3-βουτανολίου, και στις δύο ζυμώσεις, ταυτόχρονα με την αφομοίωση της γλυκερόλης. Καθώς ο ρυθμός κατανάλωσης αυξάνεται, παρατηρείται σταδιακή αύξηση και της συγκέντρωσης της αιθανόλης. Έτσι στην καλλιέργεια $Gly_0=30$ g/L και $Glu_0=10$ g/L δεκατέσσερις ώρες μετά τον εμβολιασμό ο ρυθμός παραγωγής της αιθανόλης μεγαλώνει και σταματά όταν πρακτικά ολοκληρωθεί και η κατανάλωση της γλυκερόλης.



Γράφημα III-21β: Γραφική παράσταση της κατανάλωσης υποστρώματος και παραγωγής 2,3-βουτανδιόλης (BD), αιθανόλης (EtOH) και γαλακτικού οξέος (Lac) σε συνάρτηση με τον χρόνο, κατά την αύξηση του στελέχους *Citrobacter freundii* FMCC-207, σε ασυνεχή καλλιέργεια σε θρεπτικό μέσο με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης ~30 g/L και γλυκόζης ~10 g/L.

Συνθήκες καλλιέργειας: αναερόβια ασυνεχής καλλιέργεια σε ανακινούμενες φιάλες (80 rpm) τύπου Duran 1-L, αρχική τιμή pH=7,0±0,2 και θερμοκρασία 30 °C.



Γράφημα III-21γ: Γραφική παράσταση της συγκέντρωσης της παραγόμενης βιομάζας, κατά την αύξηση του στελέχους *Citrobacter freundii* FMCC-207 σε θρεπτικό μέσο με α) αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης ~15 g/L και γλυκόζης ~5 g/L και β) αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης ~30 g/L και γλυκόζης ~10 g/L.

Συνθήκες καλλιέργειας: αναερόβια ασυνεχείς καλλιέργειες σε ανακινούμενες φιάλες (80 rpm) τύπου Duran 1-L, αρχική τιμή pH=7,0±0,2 και θερμοκρασία 30 °C.

Φαίνεται λοιπόν ότι η παρουσία της γλυκόζης στο μέσο της καλλιέργειας, βελτίωσε την κυτταρική αύξηση και την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης. Παράλληλα συντέλεσε στην μείωση του συνολικού χρόνου καλλιέργειας και στην αύξηση του ρυθμού κατανάλωσης της γλυκερόλης. Παρόλα αυτά δεν συνέβαλε στη πλήρη αφομοίωση του υποστρώματος της γλυκερόλης, που ήταν και ο κύριος στόχος της πειραματικής διαδικασίας.

III.3.2.2. Ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα υπό συνθήκες σταθερού pH

Προκειμένου να μελετηθεί το προφίλ των μεταβολικών προϊόντων σε συνάρτηση με τις συνθήκες καλλιέργειας, αρχικά πραγματοποιήθηκαν αναερόβιες ζυμώσεις με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 20 g/L, κατά τις οποίες είτε γινόταν εμφύσηση του μέσου με άζωτο (0,1 LPM) καθ' όλη την διάρκεια της ζύμωσης, είτε μόνο για χρονικό διάστημα είκοσι λεπτών πριν από τον εμβολιασμό, δεδομένου ότι οι συνθήκες αυτές προσομοιάζουν καλύτερα τις συνθήκες καλλιέργειας στις ανακινούμενες φιάλες. Στην δεύτερη περίπτωση η αναεροβίωση χαρακτηρίζεται ως αυτό-παραγόμενη (self-generated anaerobiosis). Η παραγόμενη βιομάζα, η συνολική κατανάλωση του υποστρώματος και οι τελικές συγκεντρώσεις των μεταβολικών προϊόντων, δίνονται στον Πίνακα III-13.

Πίνακας III-13: Επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης στην παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης (BD), αιθανόλης (EtOH), γαλακτικού (Lac) και μυρμηκικού οξέος (Form), κατά την αύξηση του στελέχους *Citrobacter freundii* FMCC-207 σε ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα, υπό συνθήκες σταθερού pH.

Gly ₀ (g/L)	Gly _c (g/L)	N ₂ (LPM)	Χρόνος (h)	X (g/L)	Συγκέντρωση μεταβολικών προϊόντων (g/L)				Συντελεστής απόδοσης (g/g)			
					EtOH	Lac	Form	BD	EtOH	Lac	Form	BD
~20	19,1	-	24	2,2	4,6	5,8	1,9	-	0,24	0,30	0,09	-
~20	19,9	0,1	14	2,2	8,6	2,8	0,5	-	0,43	0,14	0,03	-
~60	57,7	0,1	64	2,5	25,1	7,5	1,8	0,9	0,44	0,13	0,03	0,02
~100	77,2	0,1	72	2,7	26,5	16,9	2,5	1,2	0,34	0,22	0,03	0,02

Συνθήκες καλλιέργειας: αναερόβιες ασυνεχείς καλλιέργειες (εμφύσηση N₂ με ροή 0,1 LPM) σε βιοαντιδραστήρα 1,2-L, pH=7,0±0,2, θερμοκρασία 30°C και ανάδευση 150 rpm.

Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν με διαφορετικά αρχικά εμβόλια, ενώ το κάθε σημείο της ζύμωσης είναι ο μέσος όρος δυο ανεξαρτήτων πειραμάτων.

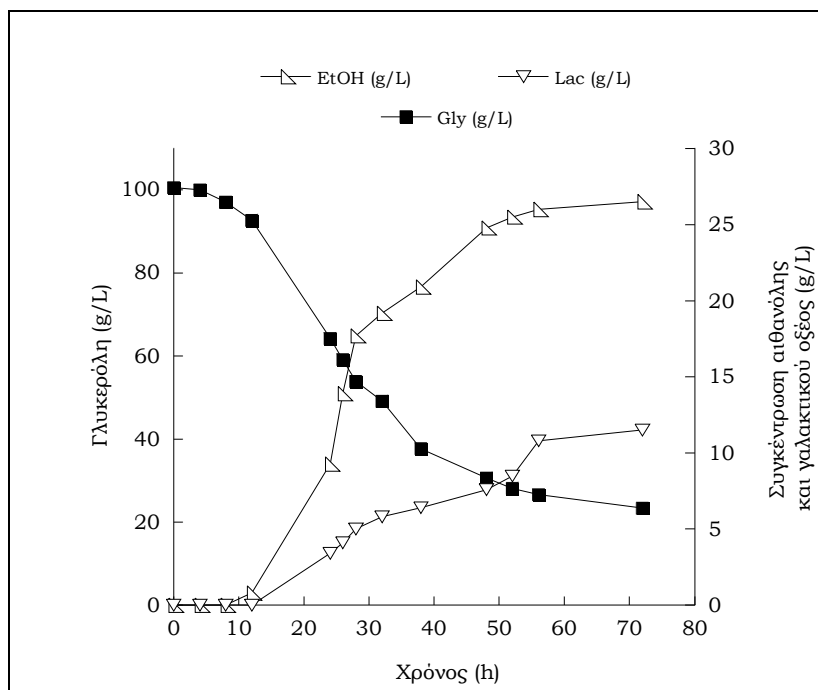
Gly₀: αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης, Gly_c: καταναλωθείσα γλυκερόλη, X: μέγιστη παραγόμενη βιομάζα.

Οι συνθήκες αυτό-παραγόμενης αναεροβίωσης, υπό σταθερό pH ευνόησαν κυρίως την σύνθεση του γαλακτικού οξέος, η συγκέντρωση του οποίου ήταν σχεδόν διπλάσια συγκριτικά με την αναερόβια καλλιέργεια υπό συνεχή εμφύσηση αζώτου. Ταυτόχρονα, παρατηρήθηκε αύξηση της διάρκειας της ζύμωσης από τις 14 στις ώρες, όταν στο μέσο δεν γινόταν συνεχής εμφύσηση αζώτου. Φαίνεται λοιπόν ότι, το γεγονός ότι το pH της καλλιέργειας διατηρήθηκε σταθερό και τα

αέρια προϊόντα του μεταβολισμού (CO_2 και πιθανόν H_2) παρέμειναν στο μέσο της καλλιέργειας (στην περίπτωση των πειραμάτων αυτό-παραγόμενης αναερόβιας) ευνόησαν την παραγωγή γαλακτικού οξέος, έναντι της αιθανόλης. Δεδομένου ότι η σύνθεση της αιθανόλης αποτέλεσε αντικείμενο μελέτης στην παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκαν δύο ακόμη καλλιέργειες υπό συνεχή παροχή αζώτου, με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 60 και 100 g/L.

Όπως φαίνεται και στα δεδομένα του Πίνακα III-13, σε όλες τις καλλιέργειες ανεξάρτητα από την αρχική συγκέντρωση του υποστρώματος, παρατηρήθηκε κυτταρική αύξηση, η οποία ήταν σχεδόν διπλάσια, συγκριτικά με τις αντίστοιχες αναερόβιες καλλιέργειες που διενεργήθηκαν σε συνθήκες μη-σταθερού pH. Η αύξηση της συγκέντρωσης της Gly_0 οδήγησε σε σταδιακή αύξηση της παραγόμενης βιομάζας, η μέγιστη συγκέντρωση της οποίας ήταν $X_{\max}=2,7$ g/L και πραγματοποιήθηκε στην καλλιέργεια με $\text{Gly}_0=100$ g/L. Οι συνθήκες σταθερού pH βελτίωσαν σημαντικά την κατανάλωση του υποστρώματος και την συνολική διάρκεια τις καλλιέργειας και στα τρία πειράματα. Πιο συγκεκριμένα το ποσοστό της ακατανάλωτης γλυκερόλης ήταν λιγότερο από 0,5% για $\text{Gly}_0=20$ και αυξήθηκε μόλις στο 23% όταν η αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης έφτασε τα 100 g/L. Η αντίστοιχη τιμή για την καλλιέργεια $\text{Gly}_0=60$ g/L υπό συνθήκες μη-σταθερού pH είχε ανέλθει στο 53%. Φαίνεται λοιπόν ότι η διατήρηση του pH της καλλιέργειας σε σταθερή τιμή ευνοεί σημαντικά τόσο την κυτταρική αύξηση όσο και την μεταβολισμό της γλυκερόλης.

Αναφορικά με την σύνθεση μεταβολικών προϊόντων και συγκεκριμένα την παραγωγή της αιθανόλης, παρατηρήθηκε προοδευτική αύξηση της συγκέντρωσης, με την αύξηση της Gly_0 . Η μέγιστη συγκέντρωση ήταν 26,5 g/L και επιτεύχθηκε στην καλλιέργεια με $\text{Gly}_0=100$ g/L, μετά από 72 ώρες ζύμωσης. Ιδιαίτερα υψηλή ήταν και η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος ($\text{Lac}_{\max}=16,9$ g/L), που καταγράφηκε στην καλλιέργεια με $\text{Gly}_0=100$ g/L. Συγκριτικά με τις καλλιέργειες υπό συνθήκες μη-σταθερού pH σε ανακινούμενες φιάλες υπό αναερόβιες συνθήκες, η παραγωγή της αιθανόλης ενισχύθηκαν σημαντικά, καθώς η αντίστοιχη μέγιστη συγκέντρωση έφτασε μόλις τα 12,8 g/L (βλέπε Πίνακας III-10). Όπως απεικονίζεται και στο Γράφημα III-22 ο ρυθμός παραγωγής ήταν υψηλός τις πρώτες 48 ώρες της ζύμωσης και προοδευτικά μειώθηκε. Αξίζει ωστόσο να σημειωθεί το γεγονός ότι στην εν λόγω καλλιέργεια, αν και η κατανάλωση του υποστρώματος έφτασε τα 77,2 g/L, η παραγωγή αιθανόλης αυξήθηκε μόνο κατά 1,4 g/L συγκριτικά με την καλλιέργεια με $\text{Gly}_0=60$ g/L. Έτσι και ο υψηλότερος συντελεστής απόδοσης παραχθείσας γλυκερόλης προς αναλωθείσα γλυκερόλη $Y_{\text{EtOH/Gly}}=0,44$ g/g, αντιστοιχεί στην καλλιέργεια με $\text{Gly}_0=60$ g/L. Πιθανόν η σχετικά υψηλή συγκέντρωση του μεταβολίτη σε συνδυασμό με σχετικά υψηλή συγκέντρωση γαλακτικού οξέος στο μέσο της καλλιέργειας ($\text{Lac}_{\max}=16,9$ g/L) να έδρασαν παρεμποδιστικά στην σύνθεση μεταβολικών προϊόντων.



Γράφημα III-22: Γραφική παράσταση της κατανάλωσης γλυκερόλης και παραγωγής αιθανόλης (EtOH-g/L) και γαλακτικού οξέος (Lac-g/L) σε συνάρτηση με τον χρόνο, κατά την αύξηση του στελέχους *Citrobacter freundii* FMCC-207 σε ασυνεχή καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 100 g/L, υπό συνθήκες σταθερού pH.

Συνθήκες καλλιέργειας: αναερόβια ασυνεχής καλλιέργεια (εμφύσηση N₂ με ροή 0,1LPM) σε βιοαντιδραστήρα 1,2-L, pH=7,0±0,2, θερμοκρασία 30 °C και ανάδευση 150 rpm.

Από την άλλη πλευρά οι συνθήκες σταθερού pH επηρέασαν αρνητικά τον σχηματισμό 2,3-βουτανοδιόλης, Ειδικότερα στο πείραμα με Gly₀=20 g/L η διόλη δεν ανιχνεύτηκε καθόλου στο υγρό της καλλιέργειας. Ακόμη και όταν η κατανάλωση του υποστρώματος ανήλθε στα ~77 g/L, η συγκέντρωση του μεταβολίτη έφτασε μόλις τα 0,9 g/L.

Δεδομένης της επίδρασης των συνθηκών pH στην παραγωγή μεταβολικών προϊόντων, καθώς και η ικανοποιητική παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης από γλυκόζη σε ασυνεχείς καλλιέργειες σε φιάλες, κρίθηκε σκόπιμη η περαιτέρω διερεύνηση της μελέτης και σε υπόστρωμα εμπορικής γλυκόζης. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα 1,2-L, υπό συνεχή παροχή αζώτου 0,1 LPM. Επιλέχθηκε ως αρχική συγκέντρωση σακχάρου τα 80 g/L, καθώς στην τιμή αυτή παρατηρήθηκε η μέγιστη παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης, κατά την αύξηση του στελέχους σε υγρές καλλιέργειες υπό συνθήκες μη-ελεγχόμενου pH (Πίνακας III-11). Διενεργήθηκαν τρία πειράματα με διαφορετικές τιμές και συνθήκες pH. Στην πρώτη ζύμωση το pH της καλλιέργειας διατηρήθηκε σταθερό στην τιμή 7,0, στην δεύτερη η τιμή του pH διατηρήθηκε στην τιμή 7,0 για τις πρώτες οκτώ ώρες και στη συνέχεια μέχρι το πέρας της ζύμωσης έλαβε σταθερή τιμή 6,2. Η μεταβολή στην τιμή του pH κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί, καθώς ένα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό που παρατηρήθηκε κατά την διάρκεια της ασυνεχούς καλλιέργειας με

$Glu_0=80$ g/L, ήταν ότι ο ρυθμός παραγωγής της διόλης λαμβάνει την μέγιστη τιμή όταν το pH του μέσου της καλλιέργειας μειώθηκε στην τιμή 6,2, μόλις οκτώ ώρες μετά τον εμβολιασμό (Γράφημα III-20). Τέλος στην τρίτη ζύμωση το pH της καλλιέργειας διατηρήθηκε σταθερό στην τιμή 6,2, ώστε να διερευνηθεί η παραγωγή της διόλης σε όξινη τιμή pH. Η παραγόμενη βιομάζα, η συνολική κατανάλωση του υποστρώματος και οι τελικές συγκεντρώσεις των μεταβολικών προϊόντων, δίνονται στον Πίνακα III-14.

Πίνακας III-14: Επίδραση των συνθηκών pH στην παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης (BD), αιθανόλης (EtOH), γαλακτικού (Lac) και ηλεκτρικού οξέος (Suc), κατά την αύξηση του στελέχους *Citrobacter freundii* FMCC-207 σε ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα, σε υπόστρωμα εμπορικής γλυκόζης αρχικής συγκέντρωσης 80g/L.

pH	Glu _c (g/L)	Χρόνος (h)	X (g/L)	Συγκέντρωση μεταβολικών προϊόντων (g/L)				Συντελεστής απόδοσης (g/g)	
				BD	EtOH	Lac	Suc	BD	EtOH
				7,0	77,3	23	4,0	24,6	5,7
7,0→6,2	77,6	23	3,3	26,6	5,6	2,5	1,9	0,34	0,07
6,2	79,1	26	2,9	33,3	2,4	2,7	1,3	0,42	0,03

Συνθήκες καλλιέργειας: αναερόβιες ασυνεχείς καλλιέργειες (εμφύσηση N₂ με ροή 0,1LPM) σε βιοαντιδραστήρα 1,2-L, θερμοκρασία 30 °C και ανάδευση 150 rpm.

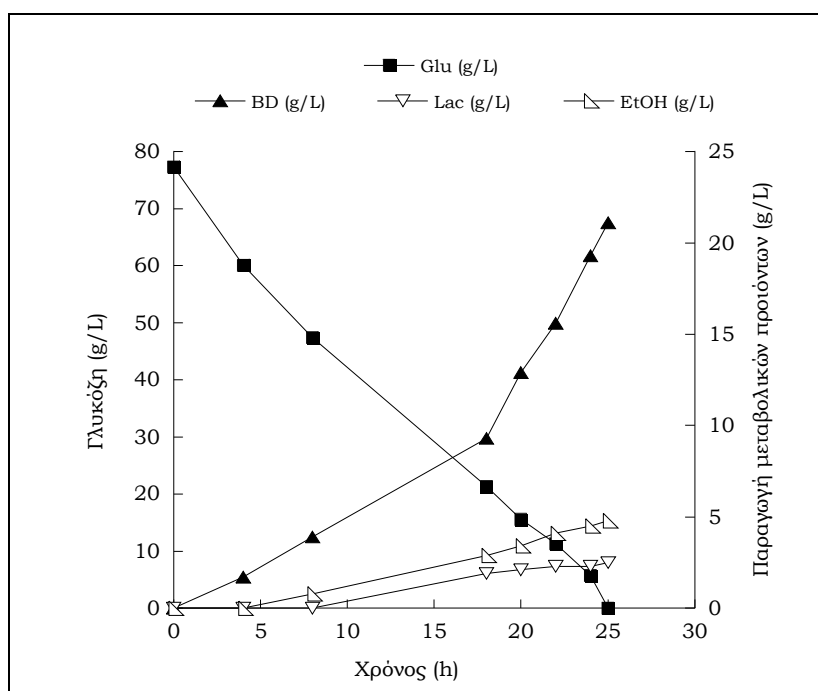
Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν με διαφορετικά αρχικά εμβόλια, ενώ το κάθε σημείο της ζύμωσης είναι ο μέσος όρος δυο ανεξαρτήτων πειραμάτων.

Glu_c: καταναλωθείσα γλυκόζη, X: μέγιστη παραγόμενη βιομάζα.

Από τα δεδομένα του Πίνακα III-14 προκύπτει ότι για το υπόστρωμα της γλυκόζης η σταθερή τιμή του pH ανεξάρτητα από την τιμή του δεν επέδρασε αρνητικά στην σύνθεση της 2,3-βουτανοδιόλης, όπως είχε παρατηρηθεί στις αντίστοιχες καλλιέργειες σε υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης (Πίνακας III-13). Και στις τρεις ζυμώσεις σημειώθηκε ικανοποιητική παραγωγή της διόλης, με την μέγιστη τιμή $BD_{max}=33,3$ g/L να καταγράφεται στην καλλιέργεια με τιμή pH 6,2. Συγκρίνοντας το αποτέλεσμα του εν λόγω πειράματος με το αντίστοιχο της ασυνεχούς καλλιέργειας σε φιάλες με $Glu_0=80$ g/L, παρατηρείται βελτίωση στην τελική συγκέντρωση τόσο στην παραγόμενης βιομάζας και 2,3-βουτανοδιόλης, αλλά κυρίως στον χρόνο της ζύμωσης από τις 72 στις 26 ώρες. Όπως φαίνεται το ουδέτερο pH καθ' όλη την διάρκεια της ζύμωσης ευνόησε την παραγωγή βιομάζας, η οποία έλαβε την μέγιστη τιμή 4,0 g/L, συγκριτικά και με όλες τις καλλιέργειες με υπόστρωμα γλυκόζης, που πραγματοποιήθηκαν είτε σε ανακινούμενες φιάλες είτε σε βιοαντιδραστήρα. Αναφορικά με την μεταβολή του pH λίγες ώρες μετά τον εμβολιασμό, αν και επηρέασε αρνητικά, έστω και σε μικρό βαθμό, την κυτταρική αύξηση, εντούτοις συνέβαλλε στην αύξηση της συγκέντρωσης του κύριου μεταβολίτη κατά 2,0 g/L, που αντιστοιχεί σε ποσοστό ~8%. Η

βελτίωση αυτή μολονότι είναι μικρή, κρίνεται ικανοποιητική, δεδομένου ότι τόσο η κατανάλωση του υποστρώματος, όσο και η συνολική διάρκεια της καλλιέργειας δεν μεταβλήθηκαν. Όσον αφορά με την καλλιέργεια σε όξινη περιοχή του pH από την αρχή της ζύμωσης φαίνεται πως αποτέλεσε την καλύτερη πειραματική συνθήκη για την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης σε υπόστρωμα γλυκόζης. Σημειώνεται ότι στην εν λόγω καλλιέργεια παρατηρήθηκε ελαφρώς μικρότερη παραγωγή τόσο της βιομάζας όσο και των υπολοίπων μεταβολιτών. Φαίνεται ότι οι μη βέλτιστες συνθήκες pH για την κυτταρικά αύξηση του στελέχους, στρέφουν την ροή του άνθρακα από την παραγωγή βιομάζας και οξέων προς την σύνθεση της διόλης. Το συμπέρασμα αυτό συνάδει και με τις αναφορές στην διεθνή βιβλιογραφία, καθώς όπως έχει ήδη αναφερθεί στο κεφάλαιο της εισαγωγής υπό όξινες συνθήκες pH, η σύνθεση οργανικών οξέων είναι μειωμένη, ενώ αντίθετα ευνοείται η παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης, η οποία θεωρείται λιγότερο τοξική ένωση για τους μικροοργανισμούς σε σύγκριση με τα οργανικά οξέα (§ I.3.5).

Τέλος θέλοντας να μελετηθεί το προφίλ των μεταβολικών προϊόντων και σε συνάρτηση με τις αυτό-παραγόμενες συνθήκες αναεροβίωσης, πραγματοποιήθηκε μια αναερόβια καλλιέργεια με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 80 g/L, σε τιμή pH 6,2, κατά την οποία γινόταν εμφύσηση του μέσου με άζωτο (0,1 LPM) μόνο για χρονικό διάστημα είκοσι λεπτών πριν από τον εμβολιασμό. Αυτές οι συνθήκες αναεροβίωσης προσομοιάζουν καλύτερα τις συνθήκες καλλιέργειας στις ανακινούμενες φιάλες. Όπως απεικονίζεται στο Γράφημα III-23 η συγκέντρωση της διόλης ανήλθε στα 21,1 g/L, και είναι χαμηλότερη συγκριτικά με την καλλιέργεια στις ίδιες πειραματικές συνθήκες, αλλά με συνεχή εμφύσηση αζώτου. Πέραν τούτου η συνολική διάρκεια της ζύμωσης, η παραγόμενη βιομάζα και η κατανάλωση της γλυκόζης παρέμειναν πρακτικά σταθερές. Ενδεχομένως όταν η ζύμωση ολοκληρώνεται σε μικρό χρονικό διάστημα, όπως στα πειράματα σε βιοαντιδραστήρα, και στο μέσο της καλλιέργειας εισάγεται άζωτο και απομακρύνονται τα αέρια προϊόντα του μεταβολισμού (CO_2 και πιθανόν H_2), τότε ευνοείται η σύνθεση της 2,3-βουτανοδιόλης. Όταν όμως παρατείνεται η διάρκεια της ζύμωσης, τότε πιθανώς το στέλεχος να προλαβαίνει να προσαρμοστεί στις συνθήκες μερικής αναεροβίωσης και να μην είναι απαραίτητη η απομάκρυνση των αερίων προϊόντων από το μέσο της καλλιέργειας. Έτσι, μολονότι στα πειράματα σε βιοαντιδραστήρα η συνεχής εμφύσηση αζώτου είναι αναγκαία για την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης, δεν συμβαίνει το ίδιο και στις καλλιέργειες στις ανακινούμενες φιάλες.



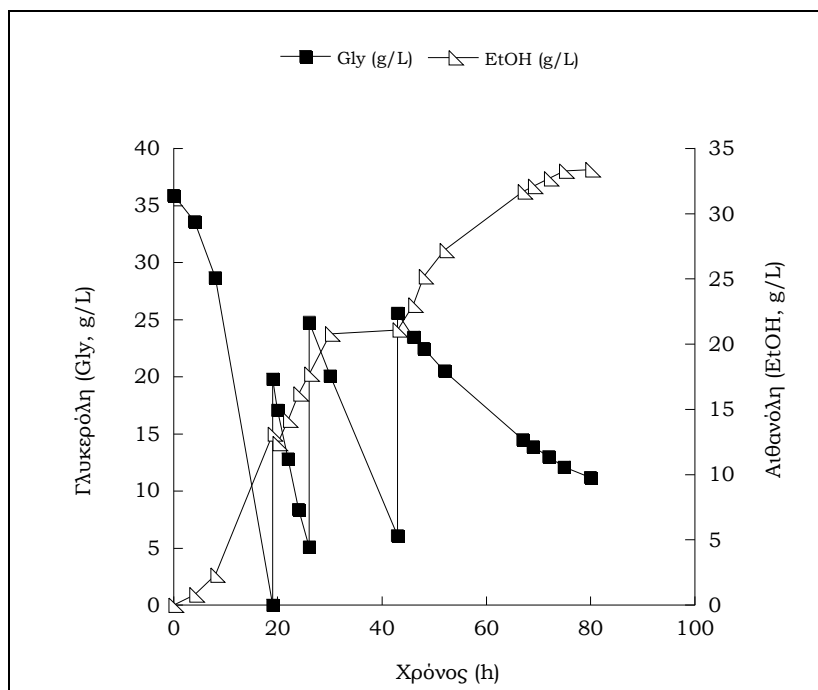
Γράφημα III-23: Γραφική παράσταση της κατανάλωσης εμπορικής γλυκόζης και παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης, αιθανόλης (EtOH) και γαλακτικού οξέος (Lac – g/L) σε συνάρτηση με τον χρόνο, κατά την αύξηση του στελέχους *Citrobacter freundii* FMCC-207 σε ασυνεχή καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 80 g/L, υπό συνθήκες σταθερού pH.

Συνθήκες καλλιέργειας αναερόβια ασυνεχής καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα 1,2-L, υπό συνθήκες αυτό-παραγόμενης αναεροβίωσης, pH=6,2±0,2 και θερμοκρασία 30 °C.

Κρίνοντας από τα αποτελέσματα των καλλιεργειών σε βιοαντιδραστήρα, δηλαδή σε συνθήκες σταθερού pH, σε υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης και εμπορικής γλυκόζης, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η γλυκερόλη αποτέλεσε κατάλληλο υπόστρωμα για την παραγωγή αιθανόλης, ενώ η γλυκόζη για την σύνθεση 2,3-βουτανοδιόλης.

III.3.2.3. Ημι-συνεχείς καλλιέργειες υπό συνθήκες σταθερού pH και συνεχούς εμφύσησης αζώτου

Παρά το γεγονός ότι στις ασυνεχείς καλλιέργειες υπό συνθήκες σταθερού pH, ο μικροοργανισμός είχε την ικανότητα να αναπτυχθεί και στα δύο υποστρώματα (βιομηχανική γλυκερόλη και εμπορική γλυκόζη) παράγοντας ικανοποιητικές ποσότητες μεταβολιτών, εντούτοις, κρίθηκε σκόπιμη η πραγματοποίηση ημι-συνεχών καλλιεργειών με στόχο, αφενός μεν την βελτίωση της αφομοίωσης του υποστρώματος, αφετέρου δε την πιθανή ενίσχυση της σύνθεσης μεταβολικών προϊόντων.

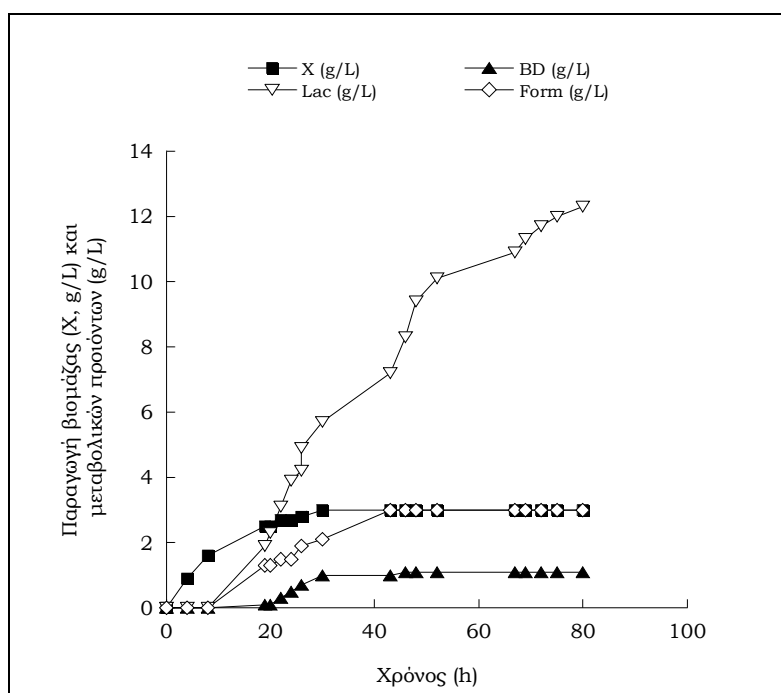


Γράφημα III-24α: Κατανάλωση γλυκερόλης (Gly–g/L) και παραγωγή αιθανόλης (EtOH–g/L), κατά την αύξηση του στελέχους *Citrobacter freundii* FMCC-207 σε ημι-συνεχή καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα, σε υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης, υπό συνθήκες σταθερού pH.

Συνθήκες καλλιέργειας: αναερόβια ημι-συνεχής καλλιέργεια (εμφύσηση N₂ με ροή 0,1 LPM) σε βιοαντιδραστήρα 1,2-L, pH=7,0±0,2, θερμοκρασία 30 °C και ανάδευση 150 rpm.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε ημι-συνεχής καλλιέργεια σε υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης σε τιμή pH 7,0 και όπως απεικονίζεται στα Γραφήματα III-24α και III-24β, μετά από 80 ώρες ζύμωσης, 82,3 g/L γλυκερόλης μετατράπηκαν σε 33,4 g/L αιθανόλης και 12,3 g/L γαλακτικού οξέος. Σημειώνεται ότι, κατά την διάρκεια των ανατροφοδοτήσεων η συγκέντρωση του υποστρώματος διατηρήθηκε σε τιμές χαμηλές (μικρότερη από ~30,0 g/L), καθώς στις ασυνεχείς καλλιέργειες η υψηλή αρχική συγκέντρωση της γλυκερόλης είχε ευνοήσει την σύνθεση του γαλακτικού οξέος έναντι της αιθανόλης (βλέπε Πίνακα III-13). Η αιθανόλη παρέμεινε το κύριο μεταβολικό προϊόν καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης και η παραγωγή της συνοδεύτηκε από το σχηματισμό μικρών ποσοτήτων 2,3-βουτανودیόλης και μυρμηκικού οξέος (1,1 g/L και 3,0 g/L, αντίστοιχα). Ο συντελεστής απόδοσης αιθανόλης ανά καταναλωθείσα γλυκερόλη $Y_{EtOH/Gly}$, έλαβε την τιμή 0,40 g/g στο τέλος της ζύμωσης και η παραγωγικότητα του μεταβολίτη 0,42 g/L/h. Αναφορικά με την σύνθεση των υπολοίπων μεταβολιτών, η παραγωγή του γαλακτικού οξέος πραγματοποιήθηκε κυρίως μετά τις πρώτες 24 ώρες, χωρίς να παρατηρηθούν σημαντικές διακυμάνσεις στο ρυθμό σχηματισμού. Αμελητέες ποσότητες 2,3-βουτανودیόλης και μυρμηκικού οξέος, επίσης ανιχνεύθηκαν στο μέσο της καλλιέργειας. Ο σχηματισμός τους παρατηρήθηκε κυρίως στις 19 με 26 ώρες της ζύμωσης και στη συνέχεια σταμάτησε. Σημειώνεται ότι η κατανάλωση της γλυκερόλης ήταν εντονότερη τις πρώτες 30 ώρες της ζύμωσης και στη συνέχεια ο ρυθμός φθίνει.

Στο χρονικό αυτό διάστημα είχαν ήδη σχηματιστεί το 62% της συνολικής παραχθείσας αιθανόλης (~21 g/L). Προφανώς οι σχετικά υψηλές ποσότητες του μεταβολίτη που συσσωρεύτηκαν στο μέσο της καλλιέργειας, παρεμπόδισαν τον μεταβολισμό της γλυκερόλης και τον σχηματισμό προϊόντων. Ως εκ τούτου η αφομοίωση του υποστρώματος δεν βελτιώθηκε αισθητά συγκριτικά με τις ασυνεχείς καλλιέργειες, στις οποίες η κατανάλωση ήταν 77,2 g/L, όμως βελτιώθηκε αξιοσημείωτα η παραγωγή της αιθανόλης, τόσο σε απόλυτες (g/L) όσο και σχετικές τιμές (g/g).

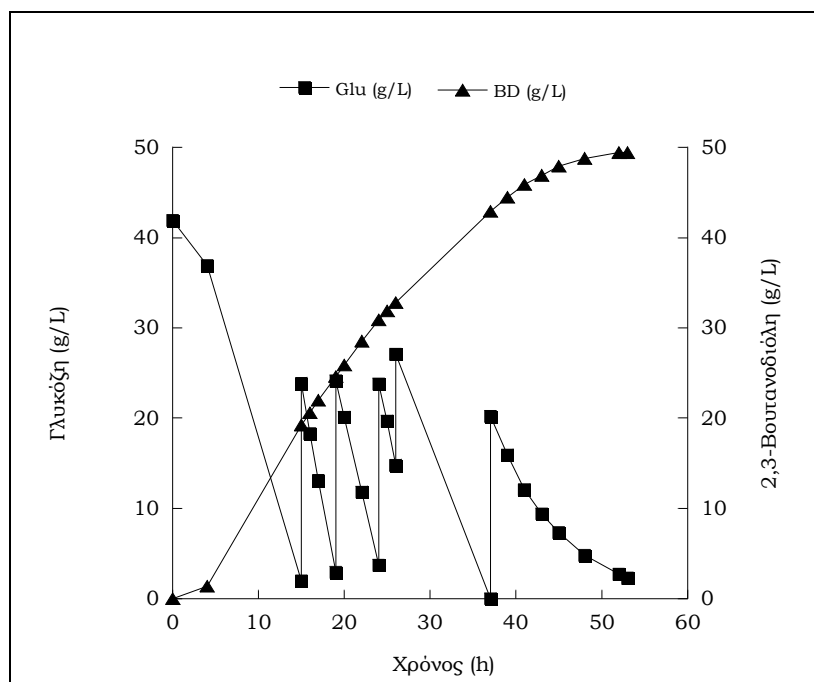


Γράφημα III-24β: Παραγωγή βιομάζας (X–g/L), 2,3-βουτανολιόλης (BD–g/L), γαλακτικού (Lac–g/L) και μυρμηκικού οξέος (Form–g/L), κατά την αύξηση του στελέχους *Citrobacter freundii* FMCC-207 σε ημι-συνεχή καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα, σε υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης, υπό συνθήκες σταθερού pH.

Συνθήκες καλλιέργειας: αναερόβια ημι-συνεχής καλλιέργεια (εμφύσηση N₂ με ροή 0,1 LPM) σε βιοαντιδραστήρα 1,2-L, pH=7,0±0,2, θερμοκρασία 30 °C και ανάδευση 150 rpm.

Από την άλλη πλευρά όταν η γλυκόζη χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα ο μικροοργανισμός κατάφερε να μεταβολίσει 135,3 g/L του σακχάρου προς παραγωγή 49,4 g/L 2,3-βουτανολιόλης (Γράφημα III-25α). Η σύνθεση της διόλης συνοδεύτηκε από τον σχηματισμό 16,2 αιθανόλης, 12,3 g/L γαλακτικού οξέος και 7,0 g/L ηλεκτρικού οξέος, ενώ η μέγιστη παραγόμενη βιομάζα ήταν 3,1 g/L. Όπως απεικονίζεται στα Γραφήματα II-25α και III-25β κατά το χρονικό διάστημα μεταξύ 15 και 19 ωρών μετά τον εμβολιασμό, ο ρυθμός κατανάλωσης της γλυκόζης ήταν ιδιαίτερα υψηλός, φτάνοντας τα 5,0 g/L/h, και ταυτόχρονα ο ρυθμός παραγωγής της 2,3-βουτανολιόλης έλαβε την μέγιστη τιμή του 1,4 g/L/h. Η ζύμωση συνεχίστηκε σε λιγότερο υψηλούς ρυθμούς και μετά την πέμπτη ανατροφοδότηση ο μεταβολισμός άρχισε να φθίνει και ουσιαστικά ολοκληρώθηκε σε 68

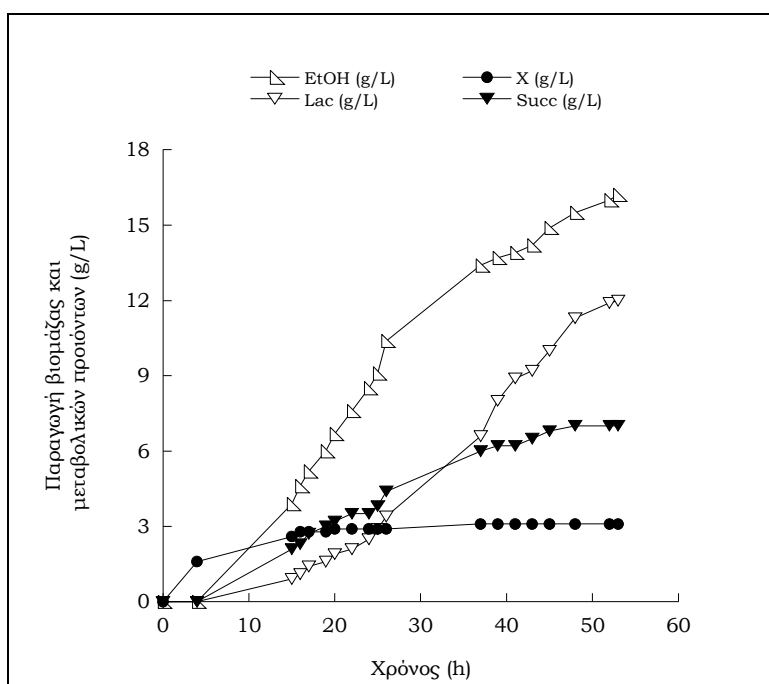
ώρες. Κατά την διάρκεια των πρώτων ωρών της ζύμωσης, ο συντελεστής απόδοσης της διόλης ανά καταναλωθείσα γλυκερόλη, έλαβε την υψηλότερη τιμή 0,46 g/g, και εν συνεχεία μειώθηκε στην τιμή 0,37 g/g στο τέλος της ζύμωσης. Η παραγωγικότητα του κύριου μεταβολίτη ήταν 0,93 g/L/h. Κατά την ανατροφοδότηση που έγινε μετά τις 55 ώρες καλλιέργειας, ελάχιστη αύξηση στην συγκέντρωση της 2,3-βουτανοδιόλης παρατηρήθηκε, ενώ το μεγαλύτερο μέρος της αναλωθείσας γλυκόζης φαίνεται πως χρησιμοποιήθηκε για ενεργειακή συντήρηση των κυττάρων.



Γράφημα III-25α: Κατανάλωση γλυκόζης (Glu–g/L) και παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης (BD–g/L), κατά την αύξηση του στελέχους *Citrobacter freundii* FMCC-207 σε ημι-συνεχή καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα σε υπόστρωμα εμπορικής γλυκόζης, υπό συνθήκες σταθερού pH.

Συνθήκες καλλιέργειας: αναερόβια ημι-συνεχής καλλιέργεια (εμφύσηση N₂ με ροή 0,1 LPM) σε βιοαντιδραστήρα 1,2-L, pH=6,2±0,2, θερμοκρασία 30 °C και ανάδευση 150 rpm.

Η παραγωγή γαλακτικού οξέος πραγματοποιήθηκε κυρίως μετά τις πρώτες 24 ώρες, ενώ η σύνθεση της αιθανόλης και του ηλεκτρικού οξέος δεν σημείωσαν διακυμάνσεις στο ρυθμό σχηματισμού. Αξίζει να αναφερθεί το γεγονός ότι η παραγωγή της αιθανόλης και του γαλακτικού οξέος βελτιώθηκαν σημαντικά, συγκριτικά με τις ασυνεχείς καλλιέργειες σε σταθερό pH 6,2 (Πίνακας III-14). Πιθανόν οι σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις αυτών των δύο μεταβολιτών (EtOH_{max}=16,2 g/L και Lac_{max}=12,3 g/L) προς το τέλος της ζύμωσης να έδρασαν παρεμποδιστικά στον μεταβολισμό του στελέχους.



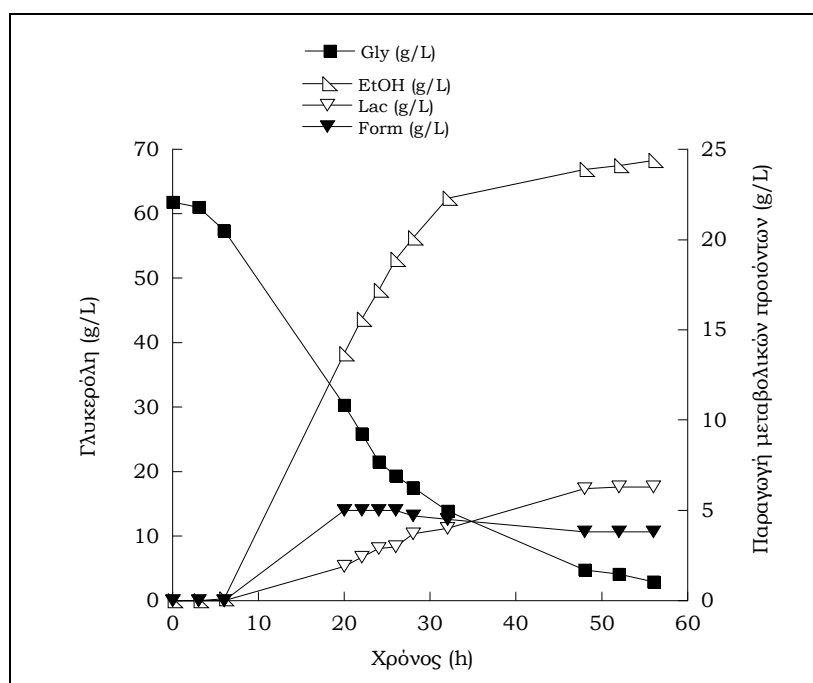
Γράφημα III-25β: Παραγωγή βιομάζας (X–g/L), αιθανόλης (EtOH–g/L), γαλακτικού (Lac–g/L) και ηλεκτρικού οξέος (Suc–g/L), κατά την αύξηση του στελέχους *Citrobacter freundii* FMCC-207 σε ημι-συνεχή καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα, σε υπόστρωμα εμπορικής γλυκόζης, υπό συνθήκες σταθερού pH. Συνθήκες καλλιέργειας: θερμοκρασία 30 °C, pH 6,2±0,2.

Από όλα τα παραπάνω αποτελέσματα, είναι προφανές ότι η ημι-συνεχής καλλιέργεια ήταν η αποτελεσματική για την κατανάλωση γλυκόζης, καθώς και για τον σχηματισμό 2,3-βουτανοδιόλης και αιθανόλης. Παράλληλα η βιομηχανική γλυκερόλη, αποδείχθηκε κατάλληλο υπόστρωμα για τη βιοσύνθεση αιθανόλης, όμως οι σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις του μεταβολίτη φαίνεται πως παρεμπόδισαν την αύξηση του στελέχους και τον μεταβολισμό του εν λόγω υποστρώματος.

III.3.4. Επίδραση μη-ασηπτικών συνθηκών καλλιέργειας στην σύνθεση μεταβολικών προϊόντων κατά την αύξηση του στελέχους *Citrobacter freundii* FMCC-207 σε υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης

Η χρήση φθηνών πρώτων υλών όπως η βιομηχανική γλυκερόλη για την βιοτεχνολογική σύνθεση διολών είναι μια οικονομικά συμφέρουσα διεργασία για τη βιομηχανική παραγωγή. Ταυτόχρονα όπως έχει ήδη αναφερθεί οι μη ασηπτικές συνθήκες μπορεί να μειώσουν περαιτέρω το συνολικό κόστος της βιοδιεργασίας, δεδομένου ότι μπορεί να ελαττωθεί σημαντικά το κόστος για τον εξοπλισμό του βιοαντιδραστήρα και το κόστος λειτουργίας σε βιομηχανικό επίπεδο όπως για παράδειγμα την ενέργεια για την επεξεργασία και την αποστείρωση του υποστρώματος, καθώς οι βιοαντιδραστήρες μεγάλης κλίμακας υποβάλλονται σε επί τόπου αποστείρωση. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν δύο επιπλέον μη ασηπτικές καλλιέργειες σε υπόστρωμα βιομηχανικής

γλυκερόλης, με στόχο να εξεταστεί η δυνατότητα του στελέχους για παραγωγή μεταβολιτών υπό τις συνθήκες αυτές. Αρχικά διενεργήθηκε μία ασυνεχής καλλιέργεια με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης $Gly_0=60$ g/L, κατά την οποία το pH του μέσου διατηρήθηκε σταθερό (τιμή $7,0 \pm 0,2$), υπό αναερόβιες συνθήκες. Συγκρίνοντας με την αντίστοιχη καλλιέργεια υπό ασηπτικές συνθήκες (Πίνακας III-13), παρατηρείται ότι τόσο η κυτταρική αύξηση όσο και παραγωγή της αιθανόλης δεν επηρεάστηκαν σημαντικά από την εφαρμογή των μη-ασηπτικών συνθηκών. Όπως απεικονίζεται και στο Γράφημα III-26 η παραγόμενη βιομάζα είχε την ίδια τελική τιμή 2,5 g/L και στις δύο καλλιέργειες, ενώ στην αναποστειρωτή ζύμωση παρουσιάστηκε αμελητέα μείωση στη συγκέντρωση του κύριου μεταβολίτη από τα 25,1 στα 24,4 g/L, συγκριτικά με ζύμωση υπό ασηπτικές συνθήκες. Ομοίως δεν παρουσιάστηκαν ουσιαστικές διαφορές και στην σύνθεση των οργανικών οξέων.



Γράφημα III-26: Κατανάλωση γλυκερόλης (Gly-g/L) και παραγωγή αιθανόλης (EtOH-g/L), γαλακτικού (Lac-g/L) και μυρμηκικού οξέος (Form-g/L), κατά την αύξηση του στελέχους *Citrobacter freundii* FMCC-207 σε ασυνεχή καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα, με μοναδική πηγή άνθρακα την βιομηχανική γλυκερόλη με αρχική συγκέντρωση 60 g/L, υπό μη ασηπτικές συνθήκες.

Συνθήκες καλλιέργειας: αναερόβια ασυνεχής καλλιέργεια (εμφύσηση N_2 με ροή 0,1 LPM) σε βιοαντιδραστήρα 1,2-L, pH=7,0±0,2, θερμοκρασία 30 °C και ανάδευση 150 rpm.

Δεδομένης της ικανότητας του στελέχους να αυξηθεί σε μη ασηπτικές συνθήκες πραγματοποιήθηκε μια επιπλέον ημι-συνεχής καλλιέργεια, με στόχο της βελτίωσης της παραγωγής αιθανόλης στις συνθήκες αυτές. Στον Πίνακα III-15 παραθέτονται η παραγόμενη βιομάζα, η

συνολική κατανάλωση του υποστρώματος και οι τελικές συγκεντρώσεις των μεταβολικών προϊόντων, καθώς και τα αποτελέσματα της ασηπτικής ημι-συνεχούς καλλιέργειας.

Όπως και στην περίπτωση της μη-αποστειρωμένης ασυνεχούς καλλιέργειας, η αύξηση του μικροοργανισμού, η κατανάλωση του υποστρώματος και η σύνθεση των μεταβολικών προϊόντων δεν επηρεάστηκαν σημαντικά από την εφαρμογή των μη-ασηπτικών συνθηκών. Η παραγόμενη βιομάζα είχε την ίδια τελική τιμή 3,0 g/L και στις δύο καλλιέργειες, ενώ η συγκέντρωση της αιθανόλης μειώθηκε από την τιμή 33,4 στα 31,7 g/L. Ελάχιστη αύξηση σημειώθηκε στην συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος, ενώ δεν παρουσιάστηκαν διαφορές και στην σύνθεση της 2,3-βουτανодиόλης και του μυρμηκικού οξέος.

Πίνακας III-15: Παραγωγή 2,3-βουτανодиόλης (BD), αιθανόλης (EtOH), γαλακτικού (Lac) και μυρμηκικού οξέος (Form), κατά την αύξηση του στελέχους *Citrobacter freundii* FMCC-207 σε ημι-συνεχείς καλλιέργειες, σε υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης, υπό ασηπτικές και μη ασηπτικές συνθήκες.

Συνθήκες	Glyc (g/L)	Χρόνος (h)	X (g/L)	Συγκέντρωση μεταβολικών προϊόντων (g/L)				Συντελεστής απόδοσης (g/g)	
				EtOH	Lac	Form	BD	EtOH	Lac
Ασηπτικές	82,3	80	3,0	33,4	12,3	3,0	1,1	0,41	0,15
Μη- ασηπτικές	80,1	86	3,0	31,7	13,4	3,1	1,1	0,40	0,16

Συνθήκες καλλιέργειας: αναερόβιες ημι-συνεχείς καλλιέργειες (εμφύσηση N₂ με ροή 0,1 LPM) σε βιοαντιδραστήρα 1,2-L, υπό αναερόβιες συνθήκες, pH=7,0±0,2 και θερμοκρασία 30°C.

Glyc: καταναλωθείσα γλυκερόλη, X: μέγιστη παραγόμενη βιομάζα.

Σημειώνεται ότι κατά τη διάρκεια και των δύο ζυμώσεων υπό μη στειρές συνθήκες, προκειμένου να παρατηρηθεί κατά πόσο διατηρείται η καθαρότητα της καλλιέργειας, λαμβάνονταν περιοδικώς δείγματα τα οποία μετά από χρώση κατά Gram, ελέγχονταν στο μικροσκόπιο. Οι μικροσκοπικές παρατηρήσεις έδειξαν ότι ο μικροοργανισμός *C. freundii* ήταν ο κυρίαρχος μικροοργανισμός στο μέσο της καλλιέργειας.

Τα παραπάνω αποτελέσματα φανερώνουν ότι, όπως και στην περίπτωση του στελέχους *K. oxytoca* FMCC-197, η εφαρμογή μη-ασηπτικών συνθηκών καλλιέργειας δεν επηρέασαν την αύξηση και την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων, κτά τον μεταβολισμό της βιομηχανικής γλυκερόλης από το στέλεχος *C. freundii* FMCC-207.

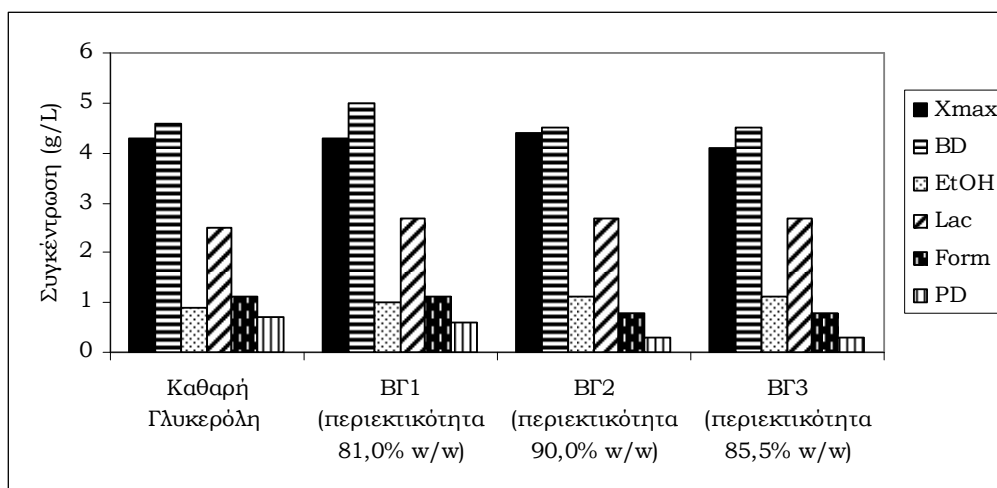
III.4 Βιοτεχνολογική παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης και αιθανόλης κατά την καλλιέργεια του μικροοργανισμού *Enterobacter aerogenes* FMCC-10

III.4.1. Βιοτεχνολογική παραγωγή μεταβολικών προϊόντων κατά την αύξηση του μικροοργανισμού *Enterobacter aerogenes* FMCC-10 σε υποστρώματα βιομηχανικής γλυκερόλης διαφορετικής σύστασης

Ο μικροοργανισμός *E. aerogenes* FMCC-10 επιλέχθηκε κατά το πρώτο στάδιο της παρούσας μελέτης για την δυνατότητα του να μεταβολίζει την βιομηχανική γλυκερόλη υπό αναερόβιες και αερόβιες συνθήκες. Σημειώνεται ότι στις αερόβιες καλλιέργειες βελτιώθηκαν τόσο η κατανάλωση του υποστρώματος όσο και η παραγωγή του κύριου μεταβολίτη, δηλαδή της 2,3-βουτανοδιόλης. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε η βιομηχανική γλυκερόλη προερχόμενη από την από την γερμανική εταιρεία βιοκαυσίμων "ADM Industries" (BG₁). Με στόχο την διεύρυνση αυτής της παρατήρησης για βιομηχανικές γλυκερόλες διαφορετικής σύστασης, πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες χρησιμοποιώντας ως υποστρώματα δύο βιομηχανικές γλυκερόλες προερχόμενες από τις ελληνικές εταιρείες "ΕΛΙΝ Βιοκαύσιμα Α.Ε." (BG₂) και "GF Energy Α.Ε.Β.Ε." (BG₃). Στις περιπτώσεις των γλυκερολών BG₁ και BG₃ το υλικό εκκίνησης για την παραγωγή του βιοκαυσίμου ήταν φυτικά έλαια, ενώ στην περίπτωση της γλυκερόλης BG₂ χρησιμοποιούμενα μαγειρικά έλαια, όπως τηγανέλαια (Αναλυτικότερα βλέπε § II.2.2). Ταυτόχρονα, ως μάρτυρας διενεργήθηκε μια ζύμωση σε υπόστρωμα καθαρής γλυκερόλης. Όλες οι υγρές καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες των 250 mL πληρωμένες κατά το 1/5, υπό αερόβιες συνθήκες και μη ελεγχόμενο pH ζύμωσης, με αρχική τιμή 7,0. Επιλέχθηκε χαμηλή αρχική συγκέντρωση πηγής άνθρακα (Gly₀=20 g/L), ούτως ώστε να αποφευχθεί φαινόμενο παρεμπόδισης εξαιτίας του υποστρώματος. Η κατανάλωση της γλυκερόλης ήταν πλήρης σε όλες τις καλλιέργειες και ολοκληρώθηκε 12 ώρες μετά τον εμβολιασμό. Αναλυτικότερα στο υπόστρωμα του μάρτυρα απομοιώθηκαν 20,2 g/L, και στα υποστρώματα βιομηχανικής γλυκερόλης κυμάνθηκε από 19,8-20,6 g/L. Η ελάχιστη μεγαλύτερα κατανάλωση παρατηρήθηκε στην καλλιέργεια με υπόστρωμα την γλυκερόλη BG₁.

Όπως απεικονίζεται και στο Γράφημα III-27 η κυτταρική αύξηση ήταν παρόμοια και στις τέσσερις καλλιέργειες, με τις μέγιστες συγκεντρώσεις βιομάζας (X_{max}) να ανέρχονται στα 4,2-4,4 g/L. Ανεξάρτητα από το είδος της γλυκερόλης που χρησιμοποιήθηκε, σε όλες τις καλλιέργειες, τα κύρια μεταβολικά προϊόντα ήταν η 2,3-βουτανοδιόλη (BD) και το γαλακτικό οξύ (Lac), ενώ μικρότερες ποσότητες 1,3-προπανοδιόλης (PD), αιθανόλης (EtOH) και μυρμηκικού οξέος (Form) σχηματίστηκαν. Ιδιαίτερο παραμένει το γεγονός, ότι σε όλες τις αερόβιες ζυμώσεις ανιχνεύτηκε 1,3-προπανοδιόλη στο μέσο της καλλιέργειας, παρόλο που με βάση τις περισσότερες βιβλιογραφικές αναφορές, η παραγωγή του μεταβολίτη έχει συνδεθεί με αναερόβιες συνθήκες (Saxena et al., 2009).

Η συγκέντρωση της παραγόμενης 2,3-βουτανοδιόλης δεν παρουσίασε ουσιαστικές διαφοροποιήσεις και κυμάνθηκε μεταξύ 4,5-5,0 g/L, με την μέγιστη παραγωγή να σημειώνεται στην καλλιέργεια με υπόστρωμα την γλυκερόλη ΒΓ₁. Στην ίδια ζύμωση καταγράφηκε και η μέγιστη τιμή του συντελεστή απόδοσης παραγόμενης 2,3-βουτανοδιόλης ανά αναλωθείσα γλυκερόλη ($Y_{BD/Gly}$) 0,25 g/g. Ομοίως οι τελικές συγκεντρώσεις των υπολοίπων μεταβολικών προϊόντων δεν παρουσίασαν σημαντικές διακυμάνσεις, τόσο στην καλλιέργεια του μάρτυρα όσο και μεταξύ των καλλιεργειών σε υποστρώματα βιομηχανικής γλυκερόλης.



Γράφημα III-27: Μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας (X-g/L), 1,3-προπανοδιόλης (PD-g/L), 2,3-βουτανοδιόλης (BD-g/L), αιθανόλης (EtOH-g/L), γαλακτικού (Lac-g/L) και μυρμηκικού οξέος (Form-g/L), κατά την αύξηση του στελέχους *Enterobacter aerogenes* FMCC-10 σε υποστρώματα βιομηχανικής γλυκερόλης διαφορετικής σύστασης.

Τα παραπάνω αποτελέσματα απέδειξαν ότι και οι τρεις τύποι βιομηχανικής γλυκερόλης ήταν κατάλληλα υποστρώματα, τουλάχιστον σε χαμηλή αρχική συγκέντρωση, για την αύξηση του μικροοργανισμού *E. aerogenes* και την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης, υπό τις δεδομένες πειραματικές συνθήκες. Θέλοντας να μελετηθεί το παραπάνω συμπέρασμα και σε υψηλότερες συγκεντρώσεις βιομηχανικής γλυκερόλης, πραγματοποιήθηκαν τρεις καλλιέργειες με αρχική συγκέντρωση 60 g/L. Από τα αποτελέσματα να παραθέτονται στον Πίνακα III-16, προκύπτει ότι και σε υψηλότερες αρχικές συγκεντρώσεις των υποστρωμάτων, η σύνθεση των μεταβολικών προϊόντων δεν επηρεάζεται σημαντικά από την προέλευση της βιομηχανικής γλυκερόλης. Έτσι η τελική συγκέντρωση της 2,3-βουτανοδιόλης κυμάνθηκε από 19,1-22,1 g/L, με την μέγιστη τιμή να σημειώνεται στην καλλιέργεια με υπόστρωμα την γλυκερόλη ΒΓ₁ και την μικρότερη στην καλλιέργεια με υπόστρωμα την γλυκερόλη ΒΓ₃. Αμελητέες ήταν οι διαφορές στην τελική συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος που κυμάνθηκε μεταξύ 8,3-8,9 g/L.

Πίνακας III-16: Αύξηση του στελέχους *Enterobacter aerogenes* FMCC-10 σε διαφορετικής προέλευσης υποστρώματα βιομηχανικής γλυκερόλης, αρχικής συγκέντρωσης 60 g/L.

Τύπος βιομηχανικής γλυκερόλης	Gly _c (g/L)	Χρόνος (h)	pH _f	X (g/L)	Συγκέντρωση μεταβολικών προϊόντων (g/L)				
					BD	EtOH	PD	Lac	Form
					ΒΓ ₁	59,9	52	5,3	4,3
ΒΓ ₂	60,1	52	5,5	4,3	20,3	6,1	0,6	8,3	0,4
ΒΓ ₃	59,3	52	5,3	4,3	19,1	5,2	0,6	8,5	0,4

Συνθήκες καλλιέργειας: αερόβιες ασυνεχείς καλλιέργειες σε κωνικές φιάλες 250 mL, αρχική τιμή pH=7,0±0,2 και θερμοκρασία 30°C.

Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν με διαφορετικά αρχικά εμβόλια, ενώ το κάθε σημείο της ζύμωσης είναι ο μέσος όρος δυο ανεξαρτήτων πειραμάτων.

Gly_c: καταναλωθείσα γλυκερόλη, pH_f: τελική τιμή pH, X: μέγιστη παραγόμενη βιομάζα.

Ως εκ τούτου μπορεί να θεωρηθεί ότι οι προσμίξεις των συγκεκριμένων υποστρωμάτων (άλατα, μεθανόλη, κλπ.) καθώς και η προέλευση του υλικού εκκίνησης για την παραγωγή του βιοκαυσίμου (φυτικά έλαια ή χρησιμοποιούμενα μαγειρικά έλαια) δεν φαίνεται να είχαν αρνητική επίπτωση στον μεταβολισμό της γλυκερόλης από το στέλεχος, ενώ ταυτόχρονα και η σύνθεση των μεταβολικών προϊόντων δεν επηρεάστηκαν από την περιεκτικότητα του υποστρώματος σε γλυκερόλη. Δεδομένου ότι η βιομηχανική γλυκερόλη προερχόμενη από το εταιρεία βιοκαυσίμων "ADM Industries" (ΒΓ₁) ενίσχυσε ελαφρώς την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων, σε σύγκριση με τα άλλα είδη βιομηχανικής γλυκερόλης, επιλέχθηκε ως πηγή άνθρακα για τα επικείμενα πειράματα.

III.4.2. Επίδραση των συνθηκών καλλιέργειας στην σύνθεση μεταβολικών προϊόντων κατά την αύξηση του στελέχους *Enterobacter aerogenes* FMCC-10 σε υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης

Στο πρώτο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας (§ III.1.2 και III.1.3) κατά την αύξηση του στελέχους *E. aerogenes* σε υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης, παρατηρήθηκε διακριτή διαφοροποίηση στην τελική τιμή της συγκέντρωσης των μεταβολικών προϊόντων, ανάλογα με τις πειραματικές συνθήκες που εφαρμόστηκαν και κυρίως της παρουσίας ή όχι οξυγόνου στο μέσο της καλλιέργειας. Προκειμένου να μελετηθεί το προφίλ των μεταβολικών προϊόντων σε συνάρτηση με τις συνθήκες καλλιέργειας, πραγματοποιήθηκαν αναερόβιες και αερόβιες ασυνεχείς ζυμώσεις σε βιοαντιδραστήρα 1,2-L, με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 20 g/L. Για την επίτευξη των αναερόβιων συνθηκών είτε γινόταν εμφύσηση του μέσου με άζωτο (0,1 LPM) καθ' όλη την διάρκεια της ζύμωσης, είτε μόνο για χρονικό διάστημα είκοσι λεπτών πριν από τον εμβολιασμό. Στην δεύτερη περίπτωση η αναεροβίωση χαρακτηρίζεται ως αυτό-παραγόμενη (self-generated anaerobiosis). Οι αερόβιες συνθήκες διατηρήθηκαν με την συνεχή ροή αέρα στο μέσο της

καλλιέργειας σε όλη την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Σημειώνεται ότι παρά τη σχετική μείωση του κορεσμού σε οξυγόνο, όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε αερόβιες συνθήκες (θεωρείται ότι μη-επαρκώς αερόβιες συνθήκες εμφανίζονται όταν ο κορεσμός σε οξυγόνο είναι χαμηλότερος από 10% v/v – Αγγελής, 2007).

Πίνακας III-17: Επίδραση των συνθηκών καλλιέργειας (αναερόβωση/αερόβωση και pH) στην σύνθεση μεταβολικών προϊόντων, κατά την αύξηση του στελέχους *Enterobacter aerogenes* FMCC-10, ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα, σε υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης, αρχικής συγκέντρωσης 20 g/L.

Συνθήκες καλλιέργειας			pH _f	Gly _c (g/L)	Χρόνος (h)	X (g/L)	Συγκέντρωση μεταβολικών προϊόντων (g/L)					
N ₂ (LPM)	Air (LPM)	Agitation (rpm)					BD	EtOH	PD	Lac	Form	
Αναερόβιες συνθήκες/ pH σταθερό												
0,1	-	150	7,0	20,7	12	2,9	0,8	4,6	-	5,6	2,6	
-	-	150	7,0	22,2	12	3,4	1,2	8,9	0,3	1,9	2,6	
Αερόβιες συνθήκες/ pH σταθερό												
-	0,3	200	7,0	20,6	14	3,4	1,8	7,8	0,3	2,3	2,6	
-	0,8	200	7,0	19,7	10	4,1	2,8	6,5	0,6	2,9	3,4	
Αερόβιες συνθήκες/ pH μη-σταθερό												
-	0,8	200	6,4	20,1	9	4,9	3,3	4,3	0,3	1,5	1,6	
-	0,8	400	6,4	20,6	8	5,5	5,3	3,0	1,0	3,3	0,7	

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα 1,2-L, αρχική τιμή pH=7,0±0,2 και θερμοκρασία 30 °C.

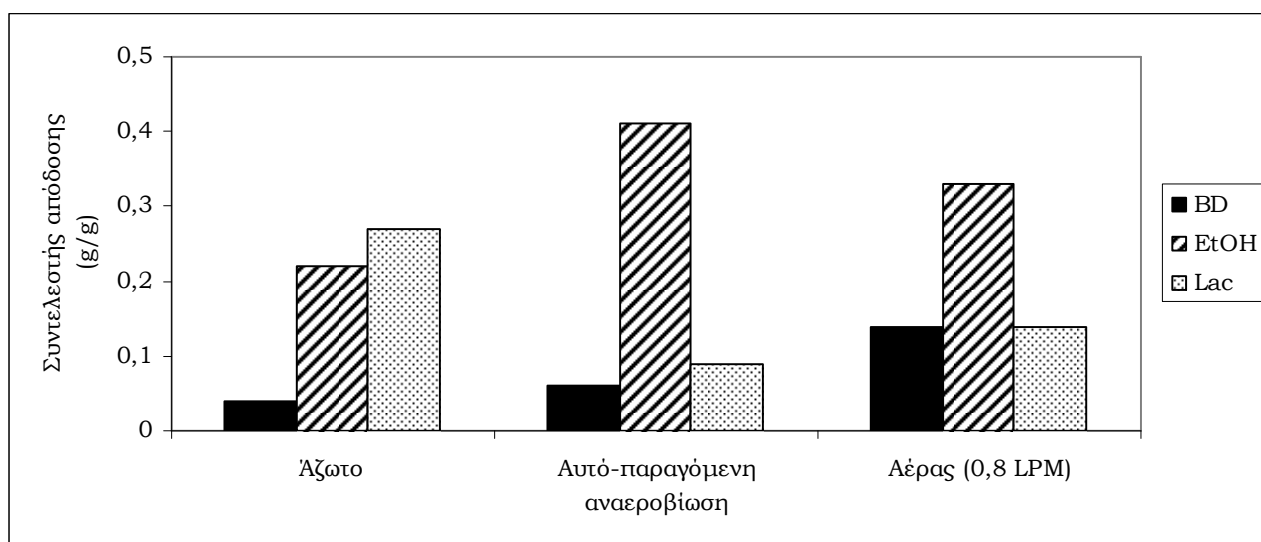
Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν με διαφορετικά αρχικά εμβόλια, ενώ το κάθε σημείο της ζύμωσης είναι ο μέσος όρος δυο ανεξαρτήτων πειραμάτων.

Gly_c: καταναλωθείσα γλυκερόλη, pH_f: τελική τιμή pH, X: μέγιστη παραγόμενη βιομάζα.

Αρχικά διενεργήθηκε αναερόβια καλλιέργεια με συνεχή ροή αζώτου 0,1 LPM και το pH διατηρήθηκε σταθερό στην τιμή 7,0. Μετά από 12 ώρες ζύμωσης η γλυκερόλη καταναλώθηκε πλήρως (20,7 g/L) και το κύριο μεταβολικό προϊόν ήταν το γαλακτικό οξύ, με τελική συγκέντρωση 5,6 g/L. Συγχρόνως σχηματίστηκαν 4,6 g/L αιθανόλης, ενώ η σύνθεση της 2,3-βουτανодиόλης ήταν αρκετά μικρότερη, μόλις 0,8 g/L. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι δεν ανιχνεύτηκε 1,3-προπανοδιόλη στο μέσο της καλλιέργειας, παρόλο που ο μεταβολισμός της γλυκερόλης έγινε κάτω από αναερόβιες συνθήκες. Κατά την διάρκεια της καλλιέργειας σε αυτό-παραγόμενη αναερόβωση, η κατανάλωση του υποστρώματος ολοκληρώθηκε επίσης 12 ώρες μετά τον εμβολιασμό, ωστόσο το κύριο μεταβολικό προϊόν ήταν η αιθανόλη. Η συγκέντρωση του μεταβολίτη ανήλθε στα 8,9 g/L, τιμή που είναι και η μέγιστη που επιτεύχθηκε σε όλες τις ασυνεχείς καλλιέργειες με Gly₀=20 g/L είτε υπό αναερόβιες είτε υπό αερόβιες συνθήκες. Η απουσία του

αζώτου μετέβαλε και την τελική συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος, η οποία ήταν ~ 4 g/L μικρότερη, συγκριτικά με την αναερόβια καλλιέργεια. Από την άλλη πλευρά αυξήθηκε σε μικρό βαθμό η παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης κατά 0,4 g/L, ενώ σημειώθηκε αμελητέα σύνθεση 1,3-προπανοδιόλης της τάξης των 0,3 g/L. Στο σημείο αυτό υπενθυμίζεται ότι στην καλλιέργεια του πραγματοποιήθηκε στην πρώτη φάση της πειραματικής διαδικασίας (Πίνακας III-2) σε φιάλες Duran 1-L, υπό αναερόβιες συνθήκες και pH μη σταθερό, η αφομοίωση της γλυκερόλης ήταν μόλις ~ 14 g/L και η παραγωγή των τριών κύριων μεταβολιτών δεν ξεπέρασε τα 2,0 g/L.

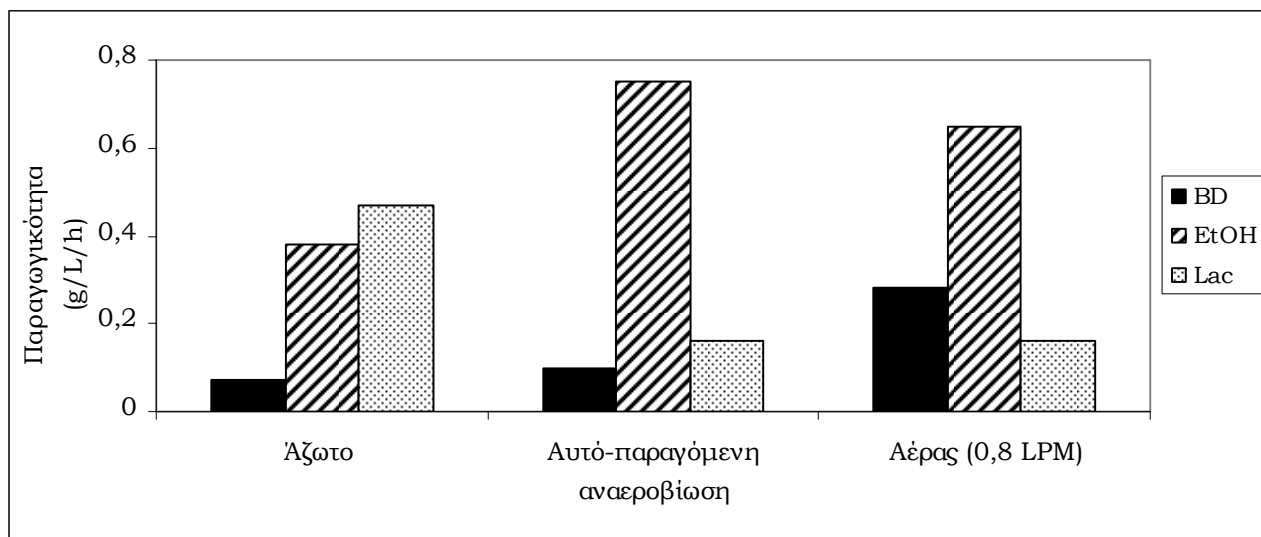
Με δεδομένο ότι στα αρχικά πειράματα κατά τις αερόβιες ζυμώσεις σε κωνικές φιάλες το κύριο μεταβολικό προϊόν ήταν η 2,3-βουτανοδιόλη (Πίνακας III-2), διενεργήθηκαν αερόβιες καλλιέργειες και σε βιοαντιδραστήρα υπό συνθήκες σταθερού pH (τιμή 7,0), προκειμένου να μελετηθεί η σύνθεση του εν λόγω μεταβολίτη. Αρχικά επιλέχθηκε χαμηλή ροή αέρα 0,3 LPM και όπως δίνεται και στον Πίνακα III-17, η γλυκερόλη καταναλώθηκε πλήρως 14 ώρες μετά τον εμβολιασμό. Το κύριο προϊόν ήταν η αιθανόλη με συγκέντρωση 7,8 g/L, και ακολούθησαν το μυρμηκικό και το γαλακτικό οξύ με συγκεντρώσεις 2,6 και 2,3 g/L, αντίστοιχα. Η συγκέντρωση της παραγόμενης 2,3-βουτανοδιόλης ήταν 1,8 g/L, τιμή αρκετά χαμηλότερη από τα 5,0 g/L που σχηματίστηκαν στο αντίστοιχο πείραμα σε κωνικές φιάλες (Πίνακας III-2). Για το λόγο αυτό η παροχή του αέρα αυξήθηκε στα 0,8 LPM, οπότε και παρατηρήθηκε μείωση της παραγόμενης αιθανόλης στα 6,5 g/L και αύξηση της συγκέντρωσης της διόλης στα 2,8 g/L.



Γράφημα 28α: Επίδραση των συνθηκών αναεροβίωσης/αεροβίωσης στην τιμή των συντελεστών απόδοσης 2,3-βουτανοδιόλης, αιθανόλης και γαλακτικού οξέος ανά αναλωθείσα γλυκερόλη, κατά την αύξηση του στελέχους *Enterobacter aerogenes* FMCC-10 σε ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα, υπό σταθερό pH, σε υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης, αρχικής συγκέντρωσης 20 g/L.

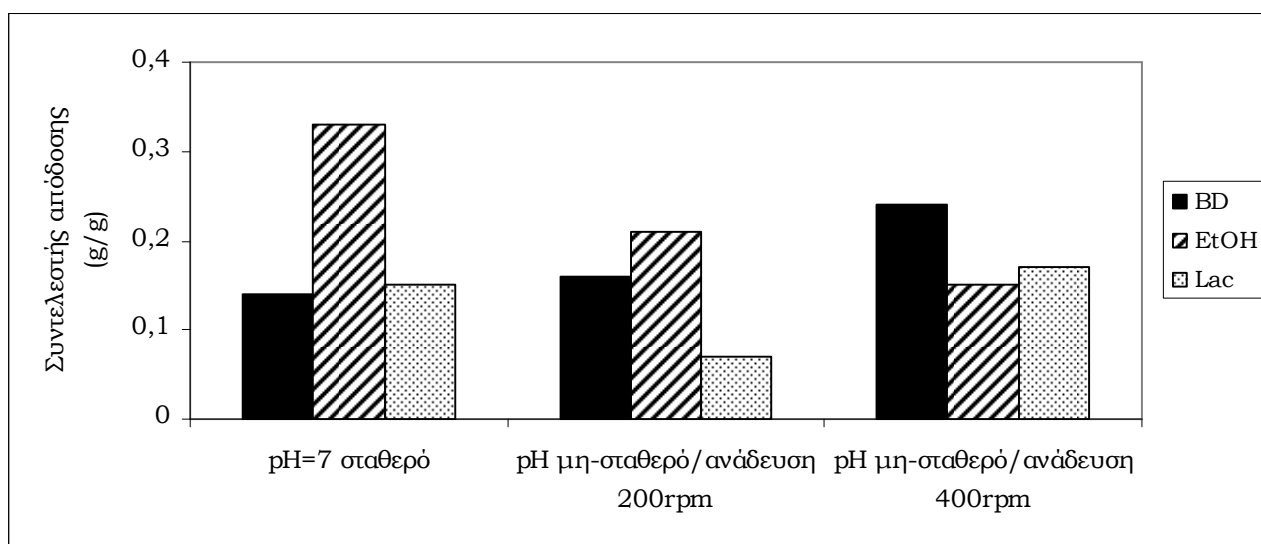
Συγκρίνοντας τις καλλιέργειες σε συνθήκες σταθερού pH διαπιστώνεται ότι η σύνθεση της αιθανόλης ήταν εφικτή σε όλες τις περιπτώσεις, ωστόσο ευνοήθηκε σημαντικά τόσο η τελική

συγκέντρωση όσο και ο συντελεστής απόδοσης ($Y_{EtOH/Gly}=0,41$ g/g) στην καλλιέργεια με αυτό- παραγόμενη αναεροβίωση (Γράφημα III-28α). Συγχρόνως στην εν λόγω ζύμωση καταγράφηκε επίσης και η μέγιστη παραγωγικότητα του μεταβολίτη που έλαβε τιμή 0,74 g/L/h (Γράφημα III-28β).



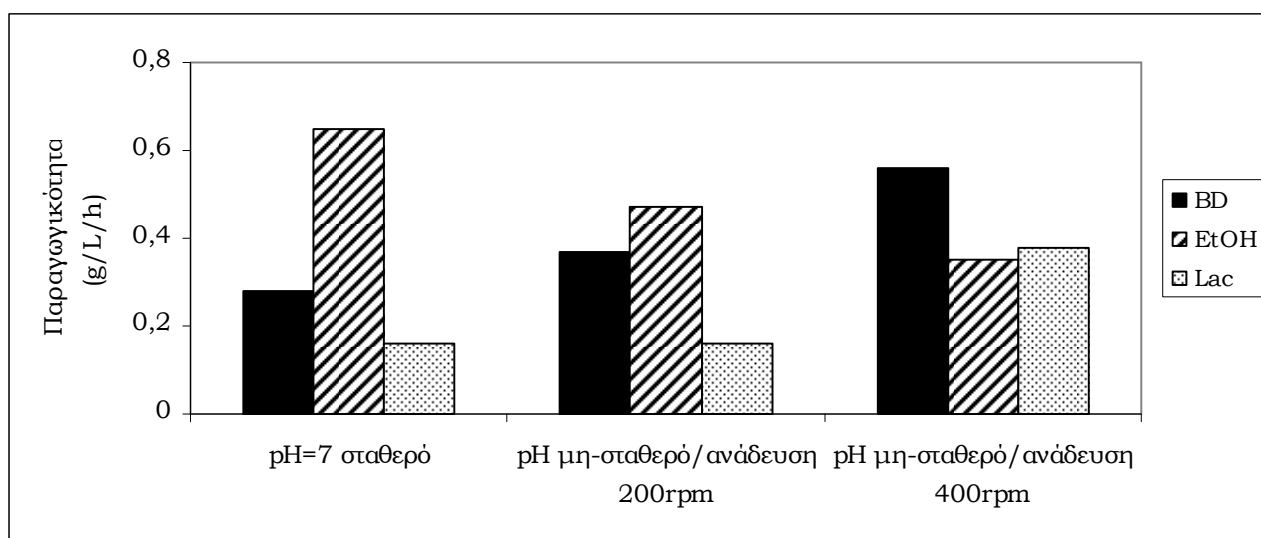
Γράφημα 28β: Επίδραση των συνθηκών αναεροβίωσης/αεροβίωσης στην παραγωγικότητα της 2,3-βουτανοδιόλης, αιθανόλης και γαλακτικού οξέος, κατά την αύξηση του στελέχους *Enterobacter aerogenes* FMCC-10 σε ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα, υπό σταθερό pH, σε υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης, αρχικής συγκέντρωσης 20 g/L.

Αναφορικά με την παρουσία οξυγόνου στο μέσο της καλλιέργειας φαίνεται πως επέδρασε θετικά στην κυτταρική αύξηση και στην σύνθεση της 2,3-βουτανοδιόλης. Έτσι ο συντελεστής απόδοσης της διόλης ανά αναλωθείσα γλυκερόλη καθώς και η παραγωγικότητα του μεταβολίτη αυξήθηκαν σημαντικά στην καλλιέργεια με ροή αέρα 0,8 LPM (Γράφημα III-28α III-28β). Παρόλα αυτά η συγκέντρωση της διόλης εξακολουθούσε να είναι χαμηλότερη συγκριτικά με τις αερόβιες καλλιέργειες που πραγματοποιήθηκαν στις κωνικές φιάλες. Για το λόγο αυτό στην συνέχεια της πειραματικής διαδικασίας διενεργήθηκαν ζυμώσεις με ροή αέρα 0,8 LPM και μη σταθερό pH.



Γράφημα 29α: Επίδραση των συνθηκών pH στην τιμή των συντελεστών απόδοσης 2,3-βουτανοδιόλης, αιθανόλης και γαλακτικού οξέος ανά αναλωθείσα γλυκερόλη, κατά την αύξηση του στελέχους *Enterobacter aerogenes* FMCC-10 σε ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα, σε υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης, αρχικής συγκέντρωσης 20 g/L.

Όπως δίνεται στον Πίνακα III-17, η μεταβολή των συνθηκών pH επηρέασε αρνητικά την παραγωγή αιθανόλης και γαλακτικού οξέος σε αντίθεση με την κυτταρική αύξηση και τον σχηματισμό 2,3-βουτανοδιόλης που αν και σε μικρό βαθμό ευνοήθηκαν από τις νέες συνθήκες. Αναλυτικότερα η συγκέντρωση της παραγόμενης αιθανόλης μειώθηκε από τα 6,5 στα 4,3 g/L και η τιμή του συντελεστή απόδοσης $Y_{EtOH/Gly}$ μειώθηκε από 0,41 σε 0,21 g/g (Γράφημα III-29α). Ομοίως παρατηρήθηκε μείωση στην συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος από τα 2,9 στα 1,5 g/L. Από τη άλλη πλευρά σημειώθηκε μικρή αύξηση στην συγκέντρωση της διόλης κατά 0,5 g/L, καθώς και στην τιμή του συντελεστή απόδοσης παραχθείσας 2,3-βουτανοδιόλης ανά καταναλωθείσα γλυκερόλη (Γράφημα III-29α). Συγχρόνως μείωση παρατηρήθηκε και στην διάρκεια της καλλιέργειας, με συνέπεια να αυξηθεί η παραγωγικότητα της διόλης στα 0,37 g/L/h (Γράφημα III-29β).

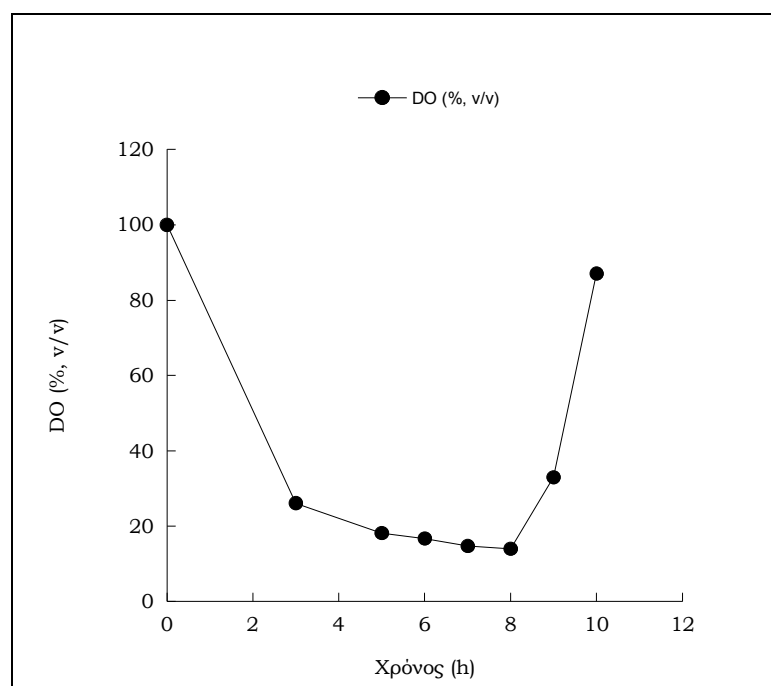


Γράφημα 29β: Επίδραση των συνθηκών pH στην παραγωγικότητα της 2,3-βουτανοδιόλης, αιθανόλης και γαλακτικού οξέος, κατά την αύξηση του στελέχους *Enterobacter aerogenes* FMCC-10 σε ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα, σε υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης, αρχικής συγκέντρωσης 20 g/L.

Με δεδομένη την θετική επίδραση του μη-σταθερού pH και της παρουσίας οξυγόνου, πραγματοποιήθηκε τέλος μια καλλιέργεια κατά την οποία αυξήθηκε η ταχύτητα ανάδευσης από 200 σε 400 rpm, ώστε να επιτευχθεί ακόμη καλύτερη διασπορά του οξυγόνου στο μέσο της καλλιέργειας (Βλέπε Πίνακα III-17). Η κυτταρική αύξηση ενισχύθηκε σημαντικά και η παραχθείσα βιομάζα $X_{\max}=5,5$ g/L ήταν η υψηλότερη συγκριτικά με όλες τις ασυνεχείς καλλιέργειες με $Gly_0=20$ g/L είτε υπό αναερόβιες είτε υπό αερόβιες συνθήκες. Συγχρόνως η κατανάλωση του υποστρώματος ολοκληρώθηκε στο μικρότερο χρονικό διάστημα, συγκριτικά με τις υπόλοιπες καλλιέργειες, με την ζύμωση να τελείται σε 8 ώρες. Όσον αφορά τη σύνθεση των μεταβολικών προϊόντων, και συγκεκριμένα την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης (τόσο από την άποψη των απολύτων - g/L όσο και των σχετικών τιμών - g/g) παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση. Η συγκέντρωση του μεταβολίτη έλαβε την μέγιστη τιμή $BD_{\max}=5,3$ g/L, συγκριτικά όλες τις καλλιέργειες με $Gly_0=20$ g/L που πραγματοποιήθηκαν σε βιοαντιδραστήρα και σε κωνικές φιάλες. Ο μέγιστος συντελεστής απόδοσης παραχθείσας 2,3-βουτανοδιόλης ανά καταναλωθείσα γλυκερόλη ήταν $Y_{BD/Gly}=0,25$ g/g και η μέγιστη παραγωγικότητα της διόλης 0,65 g/L/h. Από την άλλη πλευρά η παραγωγή της αιθανόλης μειώθηκε περαιτέρω και έτσι καταγράφηκε η μικρότερη συγκέντρωση 3,0 g/L. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε και η σύνθεση 1,0 g/L 1,3-προπανοδιόλης, υπό τις δεδομένες πειραματικές συνθήκες.

Κατά τα τυπικά από τη βιοχημική μηχανική ο επί τοις εκατό (% , v/v) κορεσμός σε οξυγόνο του περιβάλλοντος αύξησης του μικροοργανισμού μειώθηκε σταδιακά κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (Γράφημα III-30). Ήδη από την αρχή της φάσης προσαρμογής, ο κορεσμός σε οξυγόνο μειώνεται σημαντικά και μόλις 4 ώρες μετά τον εμβολιασμό φτάνει στο 20%, v/v. Καθ' όλη την

διάρκεια της εκθετικής φάσης κυμαίνεται σε ποσοστό 15-20%, v/v. Κατά την επιβραδυνόμενη και τη στάσιμη φάση του αυξητικού κύκλου, κατά τα τυπικά ο κορεσμός σε οξυγόνο αρχίζει παροδικά να αυξάνεται και να διατηρείται σε υψηλά επίπεδα. Σημειώνεται ότι παρά τη σχετική μείωση του κορεσμού του οξυγόνου, η ζύμωση πραγματοποιήθηκε σε αερόβιες συνθήκες (θεωρείται ότι μη-επαρκώς αερόβιες συνθήκες εμφανίζονται όταν ο κορεσμός σε οξυγόνο είναι χαμηλότερος από 10% v/v – Αγγελής, 2007).



Γράφημα III-30: Γραφική παράσταση του % διαλυμένου οξυγόνου κατά την αύξηση του στελέχους *E. aerogenes* FMCC-10 σε αερόβια καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα, με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 20,0 g/L.

Συνθήκες καλλιέργειας: παροχή αέρα 0,8 LPM, ανάδευση 400rpm, θερμοκρασία 30 °C, pH_{in} 7,0 \pm 0,2 μη σταθερό.

Κρίνοντας από τα αποτελέσματα των προηγούμενων πειραμάτων προκύπτει ότι η κατανάλωση της γλυκερόλης ήταν πλήρης, ανεξάρτητα από τις πειραματικές συνθήκες που εφαρμόστηκαν και μια μικρή διαφοροποίηση παρατηρήθηκε ως προς την χρονική διάρκεια των καλλιεργειών. Ταυτόχρονα η κυτταρική αύξηση ευνοήθηκε από την παρουσία οξυγόνου στο μέσο της καλλιέργειας. Από την άλλη πλευρά οι πειραματικές συνθήκες επέδρασαν καταλυτικά στην σύνθεση των μεταβολικών προϊόντων. Οι αναερόβιες συνθήκες με συνεχή σπαργή αζώτου και η σταθερή τιμή pH ευνόησαν κυρίως την παραγωγή γαλακτικού οξέος, και κατ' επέκταση το μονοπάτι πυροσταφυλικό \longrightarrow γαλακτικό οξύ, ενώ αντίθετα περιόρισαν σε μεγάλο βαθμό την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης. Η παραγωγή της αιθανόλης πραγματοποιήθηκε σε ικανοποιητικό βαθμό σε όλες τις συνθήκες, ωστόσο όταν το pH της καλλιέργειας διατηρήθηκε σταθερό και τα αέρια προϊόντα του μεταβολισμού (CO_2 και πιθανόν H_2) παρέμειναν στο μέσο της καλλιέργειας (στην περίπτωση των πειραμάτων της αυτό-παραγόμενης αεροβίωσης) ευνόησαν την

σύνθεση του μεταβολίτη και κατά συνέπεια, το μεταβολικό μονοπάτι ακετύλο-CoA \longrightarrow αιθανόλη. Αντιθέτως όταν στο μέσο της καλλιέργειας επικρατούν αυστηρά αερόβιες συνθήκες και το pH είναι μη-σταθερό, τότε ευνοείται το μεταβολικό μονοπάτι πυροσταφυλικό \longrightarrow 2,3-βουτανودیόλη, και η σύνθεση της διόλης γίνεται μέγιστη. Ως εκ τούτου, κατά την αύξηση του στελέχους *E. aerogenes* σε υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης, μεταβάλλοντας τις συνθήκες καλλιέργειας μπορεί να επιτευχθεί η παραγωγή του εκάστοτε επιθυμητού μεταβολικού προϊόντος

III.4.3. Επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης υποστρώματος στην σύνθεση μεταβολικών προϊόντων, κατά την αύξηση του στελέχους *Enterobacter aerogenes* FMCC-10 σε υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης

Με στόχο την περαιτέρω μελέτη της παραγωγής 2,3-βουτανودیόλης και με δεδομένο ότι οι αερόβιες συνθήκες μη-σταθερού pH ευνοούν την βιοσύνθεσή της, πραγματοποιήθηκαν ασυνεχείς καλλιέργειες σε κωνικές φιάλες των 250 mL και σε βιοαντιδραστήρα 1,2-L. Η αρχική συγκέντρωση της γλυκερόλης κυμάνθηκε από 40 έως 80 g/L. Η παραγόμενη βιομάζα, η συνολική κατανάλωση του υποστρώματος και οι τελικές συγκεντρώσεις των μεταβολικών προϊόντων, δίνονται στον Πίνακα III-18.

Πίνακας III-18: Επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης στην παραγωγή 2,3-βουτανودیόλης (BD), αιθανόλης (EtOH), γαλακτικού (Lac) και μυρμηκικού οξέος (Form), κατά την αύξηση του στελέχους *Enterobacter aerogenes* FMCC-10 σε ασυνεχείς καλλιέργειες.

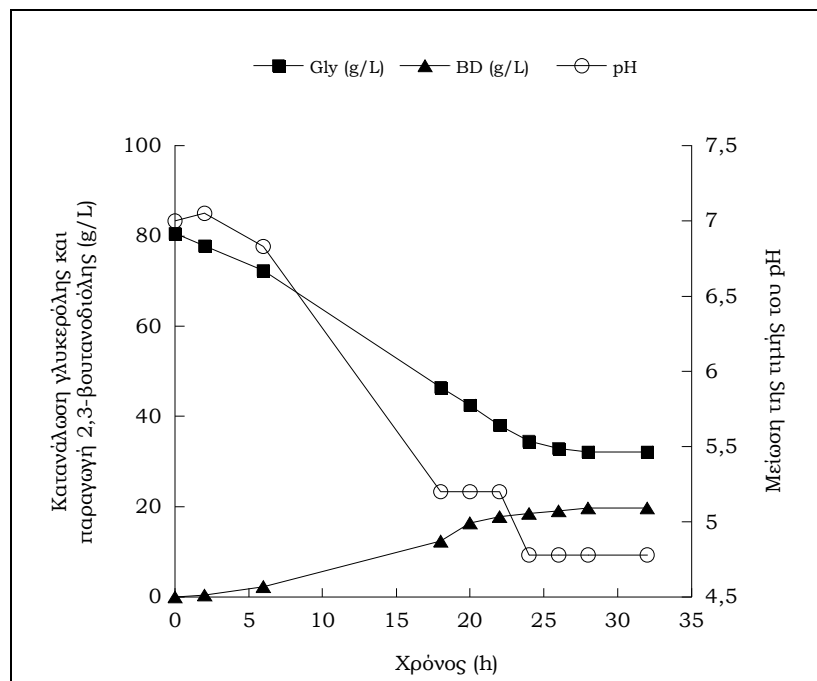
Gly ₀ (g/L)	Gly _C (g/L)	Χρόνος (h)	pH _f	X (g/L)	Συγκέντρωση μεταβολικών προϊόντων (g/L)				Παραγωγικότητα (g/L/h)	
					BD	EtOH	Lac	Form	BD	EtOH
Ασυνεχείς καλλιέργειες σε κωνικές φιάλες										
~40	37,0	31	5,4	4,5	11,6	4,7	8,5	0,2	0,37	0,15
~80	69,3	78	5,3	4,1	25,7	3,4	8,6	0,7	0,33	0,04
Ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα										
~40	36,6	18	5,8	5,9	8,9	3,7	2,7	2,3	0,49	0,20
~80	58,7	28	4,8	5,2	19,7	2,3	5,1	1,9	0,70	0,08

Συνθήκες καλλιέργειας: α) ασυνεχείς καλλιέργειες σε κωνικές φιάλες 250 mL, πληρωμένες κατά το 1/5, υπό αερόβιες συνθήκες, αρχική τιμή pH=7±0,2 και θερμοκρασία 30 °C. β) ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα 1,2-L, με ενεργό όγκο 0,9 L, υπό αερόβιες συνθήκες, αρχική τιμή pH=7,0±0,2 και θερμοκρασία 30 °C.

Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν με διαφορετικά αρχικά εμβόλια, ενώ το κάθε σημείο της ζύμωσης είναι ο μέσος όρος δυο ανεξαρτήτων πειραμάτων.

Gly₀: αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης, Gly_C: καταναλωθείσα γλυκερόλη, pH_f: τελική τιμή pH, X: μέγιστη παραγόμενη βιομάζα.

Συγκρίνοντας τις καλλιέργειες που διενεργήθηκαν σε κωνικές φιάλες και σε βιοαντιδραστήρα είναι φανερό ότι οι συνθήκες του βιοαντιδραστήρα ευνόησαν σημαντικά την κυτταρική αύξηση με αποτέλεσμα η μέγιστη συγκέντρωση παραγόμενης βιομάζας $X_{max}=5,9$ g/L να σημειωθεί στην καλλιέργεια με $Gly_0=40$ g/L. Ταυτόχρονα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των παραπάνω πειραμάτων αποτέλεσε το γεγονός ότι ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση Gly_0 ο συνολικός χρόνος ζύμωσης βελτιώθηκε σημαντικά στις καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα. Συγκεκριμένα όταν η Gly_0 έφτασε τα 80 g/L η διάρκεια μειώθηκε από τις 78 στις 28 ώρες. Έτσι η παραγωγικότητα του κύριου μεταβολίτη ήταν ιδιαίτερα υψηλή, παρόλο που η τελική συγκέντρωση της παραγόμενης διόλης ήταν μικρότερη. Ωστόσο, η σημαντική μείωση του pH της εν λόγω καλλιέργειας, σε τιμή μικρότερη του 5,0 είχε σαν συνέπεια την διακοπή του μεταβολισμού του υποστρώματος πριν ολοκληρωθεί η πλήρης κατανάλωση του (Γράφημα III-31). Ως εκ τούτου η κατανάλωση γλυκερόλης παρέμεινε πρακτικά σταθερή 24 ώρες μετά τον εμβολιασμό, με συνέπεια το 25% του υποστρώματος να παραμείνει ακατανάλωτο. Αντίθετα στην αντίστοιχη καλλιέργεια στις κωνικές φιάλες, όπου το pH διατηρήθηκε σε τιμή μεγαλύτερη του 5,0, μόλις το 12% της γλυκερόλης δε αφομοιώθηκε. Φαίνεται λοιπόν, ότι οι χαμηλές τιμές pH αν και δεν έδρασαν παρεμποδιστικά στην αύξηση του μικροοργανισμού (παραγόμενη βιομάζα 5,2-5,9 g/L), εντούτοις επηρέασαν αρνητικά την κατανάλωση της γλυκερόλης.



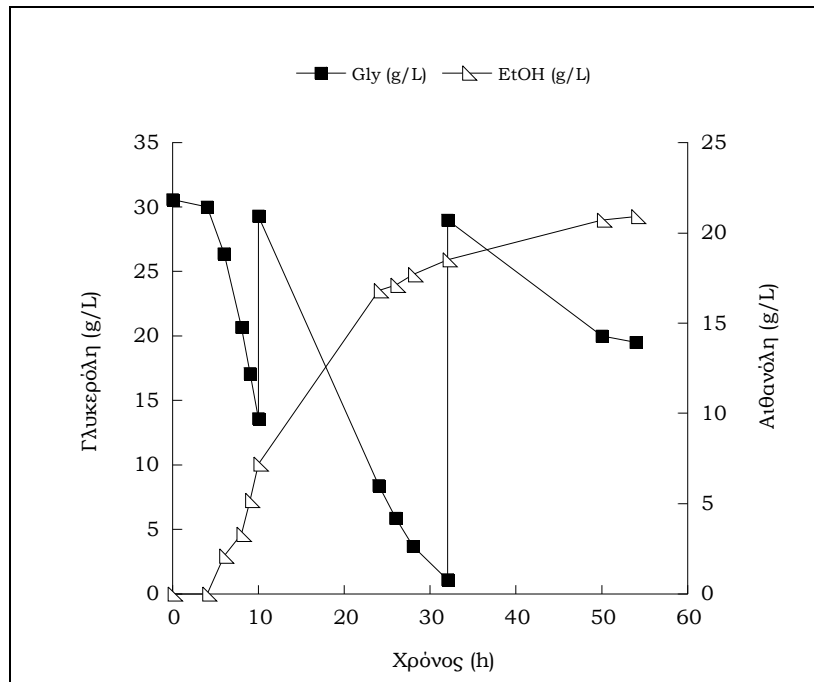
Γράφημα III-31: Επίδραση της μείωσης της τιμής του pH στην κατανάλωση γλυκερόλης και την παραγωγή 2,3-βουτανодиόλης, κατά την αύξηση του στελέχους *Enterobacter aerogenes* FMCC-10 σε ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα, σε υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης, αρχικής συγκέντρωσης 80 g/L. Συνθήκες καλλιέργειας: αερόβια ασυνεχής καλλιέργεια (παροχή αέρα με ροή 0,8 LPM) σε βιοαντιδραστήρα 1,2-L, αρχική τιμή pH=7,0±0,2, θερμοκρασία 30 °C και ανάδευση 400 rpm.

Αναφορικά με την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης όπως προκύπτει και από τα δεδομένα του Πίνακα III-18, ήταν μεγαλύτερη στις καλλιέργειες σε κωνικές φιάλες. Η μέγιστη συγκέντρωση $BD_{max}=25,7$ g/L καταγράφηκε στην ζύμωση με $Gly_0=80$ g/L, ενώ στην ίδια ζύμωση καταγράφηκε και η μέγιστη τιμή του συντελεστή απόδοσης παραχθείσας 2,3-βουτανοδιόλης ανά καταναλωθείσα γλυκερόλη ($Y_{BD/Gly}=0,37$ g/g). Στην αντίστοιχη καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα η συγκέντρωση του μεταβολίτη ήταν κατά 6,0 g/L μικρότερη, όμως η τιμή του συντελεστή απόδοσης ήταν ελάχιστα μικρότερη ($Y_{BD/Gly}=0,34$ g/g). Σημειώνεται δε ότι η παραγωγικότητα του μεταβολίτη έφτασε τα 0,7 g/L/h στην καλλιέργεια με $Gly_0=80$ g/L σε βιοαντιδραστήρα, ενώ η αντίστοιχη τιμή στην καλλιέργεια στις κωνικές φιάλες ήταν 0,33 g/L/h. Συγκρίνοντας την σύνθεση και των υπολοίπων μεταβολιτών στα πειράματα σε κωνικές φιάλες και σε βιοαντιδραστήρα παρατηρείται ότι και η μέγιστη συγκέντρωση γαλακτικού οξέος $Lac_{max}=8,6$ g/L σημειώθηκε στην καλλιέργεια στις κωνικές φιάλες με $Gly_0=80$ g/L. Αντίθετα στα πειράματα σε βιοαντιδραστήρα η παραγωγή του οξέος μειώθηκε σημαντικά από την τιμή 8,5 g/L σε 2,7 g/L στην καλλιέργεια με $Gly_0=40$ g/L και από 8,6 g/L σε 5,1 g/L στην καλλιέργεια με $Gly_0=80$ g/L. Ομοίως και η παραγωγή της αιθανόλης ήταν μικρότερη στα πειράματα που τελέστηκαν σε βιοαντιδραστήρα. Αντίθετα ο σχηματισμός του φορμικού οξέος ευνοήθηκε από τις πειραματικές συνθήκες του βιοαντιδραστήρα και η μέγιστη συγκέντρωση ήταν 2,3 g/L στην καλλιέργεια με $Gly_0=40$ g/L.

Κρίνοντας από τα αποτελέσματα των παραπάνω πειραμάτων προκύπτει ότι οι συνθήκες σε βιοαντιδραστήρα (καλύτερη διασπορά του οξυγόνου και των θρεπτικών συστατικών) ευνόησαν την κυτταρική αύξηση, μειώνοντας σημαντικά την χρονική διάρκεια των καλλιεργειών. Ωστόσο, ελάττωση του pH του μέσου στις καλλιέργειες στον βιοαντιδραστήρα, φαίνεται να παρεμπόδισαν το μεταβολισμό του υποστρώματος. Με στόχο να ξεπεραστεί το εμπόδιο της ταχείας μείωσης του pH, αλλά να διατηρηθεί το πλεονέκτημα της υψηλής παραγωγικότητας κρίθηκε σκόπιμη η πραγματοποίηση ημι-συνεχών καλλιεργειών σε βιοαντιδραστήρα.

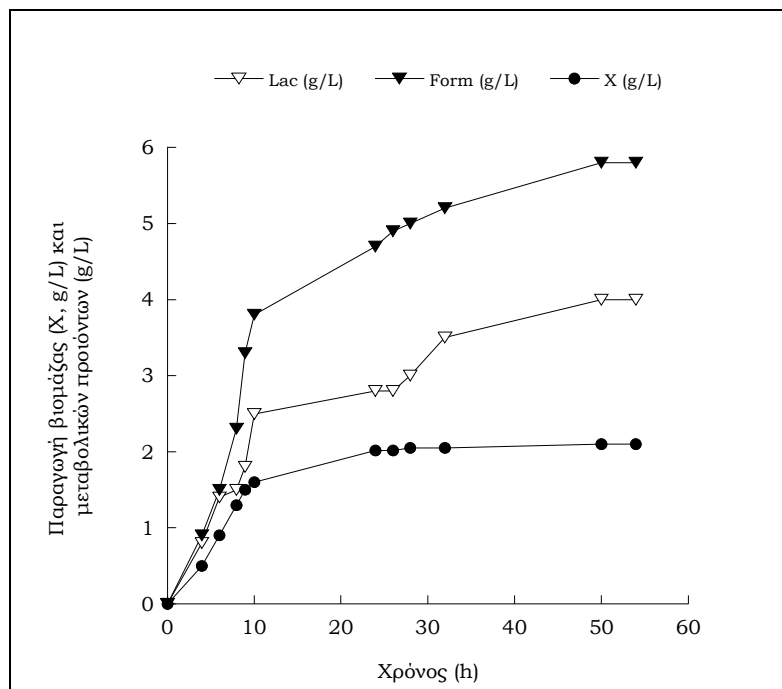
III.4.4. Ημι-συνεχής καλλιέργεια υπό συνθήκες σταθερού pH για την παραγωγή αιθανόλης

Κατά τις ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα, υπό συνθήκες αυτό-παραγόμενης αναεροβίωσης και σταθερού pH, σημειώθηκε σημαντική παραγωγή αιθανόλης. Δεδομένου ότι η σύνθεση του μεταβολίτη από υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης δεν είναι ευρέως μελετημένη στη διεθνή βιβλιογραφία, κρίθηκε σκόπιμη η πραγματοποίηση ημι-συνεχούς καλλιέργειας με στόχο της αύξησης της παραγωγής. Όπως δίνεται και στα Γραφήματα III-32α και III-32β, μετά από 54 ώρες ζύμωσης, 54,7 g/L γλυκερόλης μετατράπηκαν σε 20,9 g/L αιθανόλης, 4,0 g/L γαλακτικού οξέος και 5,8 g/L μυρμηκικού οξέος.



Γράφημα III-32α: Κατανάλωση γλυκερόλης (Gly-g/L) και παραγωγή αιθανόλης (EtOH-g/L), κατά την αύξηση του στελέχους *Enterobacter aerogenes* FMCC-10 σε ημι-συνεχή καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα, υπό συνθήκες σταθερού pH.

Συνθήκες καλλιέργειας: ημι-συνεχής καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα 1,2-L, συνθήκες αυτό-παραγόμενης αναερόβιωσης, pH=7,0±0,2, θερμοκρασία 30 °C και ανάδευση 150 rpm.

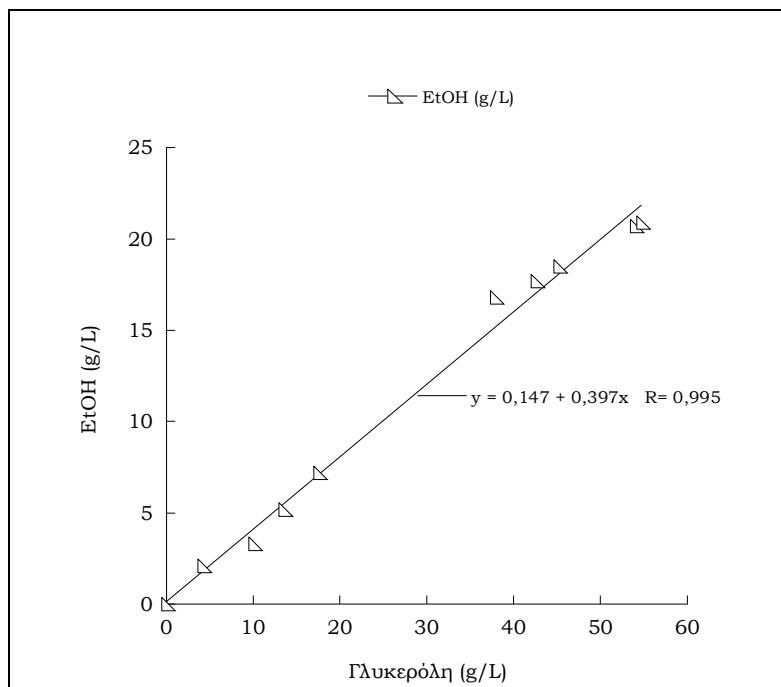


Γράφημα III-32β: Παραγωγή βιομάζας (X-g/L), γαλακτικού (Lac-g/L) και μυρμηκικού (Form-g/L) οξέος, κατά την αύξηση του στελέχους *Enterobacter aerogenes* FMCC-10 σε ημι-συνεχή καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα, υπό συνθήκες σταθερού pH.

Συνθήκες καλλιέργειας: ημι-συνεχής καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα 1,2-L, συνθήκες αυτό-παραγόμενης αναερόβιωσης, pH=7,0±0,2, θερμοκρασία 30 °C και ανάδευση 150 rpm.

Η αιθανόλη παρέμεινε το κύριο μεταβολικό προϊόν καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης και η παραγωγή της συνοδεύτηκε από το σχηματισμό αμελητέων ποσοτήτων 2,3-βουτανοδιόλης και 1,3-προπανοδιόλης (0,7 g/L και 0,3 g/L, αντίστοιχα). Ο συντελεστής απόδοσης αιθανόλης ανά καταναλωθείσα γλυκερόλη $Y_{\text{EtOH}/\text{Gly}}$, έλαβε την τιμή 0,38 g/g στο τέλος της ζύμωσης (Γράφημα III-33) και η παραγωγικότητα του μεταβολίτη 0,39 g/L/h.

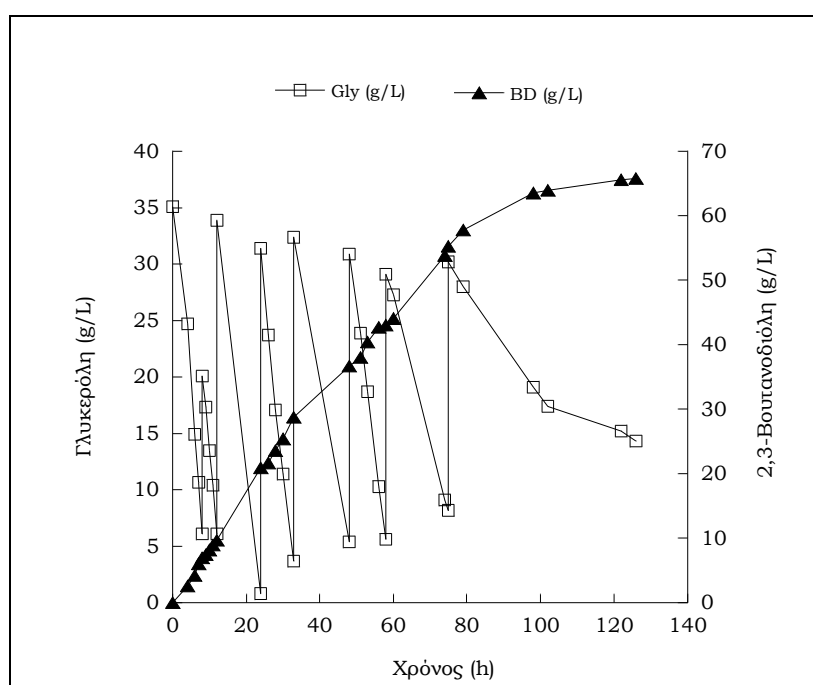
Σημειώνεται ότι η κατανάλωση της γλυκερόλης ήταν μεγαλύτερη τις πρώτες 24 ώρες της ζύμωσης και στη συνέχεια ο ρυθμός ελαττώθηκε, με αποτέλεσμα να πραγματοποιηθούν μόλις δύο ανατροφοδοτήσεις. Στο χρονικό αυτό διάστημα είχε ήδη σχηματιστεί το 80% της συνολικής παραχθείσας αιθανόλης (~17 g/L). Προφανώς οι σχετικά υψηλές ποσότητες του μεταβολίτη που συσσωρεύτηκαν στο μέσο της καλλιέργειας, παρεμπόδισαν την αφομοίωση του υποστρώματος και τον σχηματισμό προϊόντων και ως εκ τούτου στο στάδιο αυτό η κατανάλωση της γλυκερόλης παρέμεινε σε χαμηλά επίπεδα. Ωστόσο, η συγκέντρωση της παραγόμενης αιθανόλης από υπόστρωμα γλυκερόλης είναι από τις μέγιστες της διεθνούς βιβλιογραφίας. Αναφορικά με την σύνθεση των υπολοίπων μεταβολιτών δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διακυμάνσεις στο ρυθμό σχηματισμού. Όπως και στις ασυνεχείς καλλιέργειες η συγκέντρωση του μυρμηκικού οξέος ήταν μεγαλύτερη από του γαλακτικού, ενώ αμελητέες ποσότητες 2,3-βουτανοδιόλης και 1,3-προπανοδιόλης, επίσης ανιχνεύτηκαν στο μέσο της καλλιέργειας.



Γράφημα III-33: Συσχέτιση συγκέντρωσης καταναλωθείσας γλυκερόλης και παραχθείσας αιθανόλης (EtOH-g/L), κατά την αύξηση του στελέχους *Enterobacter aerogenes* FMCC-10 σε ημι-συνεχή καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα, υπό συνθήκες σταθερού pH και αυτό-παραγόμενης αναεροβίωσης.

III.4.5. Ημι-συνεχείς καλλιέργειες υπό συνθήκες μη-σταθερού pH για την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης

Κατά την διάρκεια των ασυνεχών καλλιεργείων σε βιοαντιδραστήρα, υπό συνθήκες μη-σταθερού pH και αεροβίωσης 0,8 LPM, ο μικροοργανισμός είχε την ικανότητα να αναπτυχθεί σε συγκέντρωση γλυκερόλης 80 g/L. Ωστόσο η μείωση της τιμής του pH είχε σαν συνέπεια την μείωση του ρυθμού κατανάλωσης της γλυκερόλης και την διακοπή της ζύμωσης πριν ολοκληρωθεί η πλήρης αφομοίωση του υποστρώματος. Ως εκ τούτου, κρίθηκε σκόπιμη η πραγματοποίηση δύο ημι-συνεχών καλλιεργείων με στόχο, αφενός μεν την βελτίωση της κατανάλωσης του υποστρώματος, αφετέρου δε την αύξηση της συγκέντρωσης της 2,3-βουτανοδιόλης. Στην πρώτη καλλιέργεια το pH παρέμεινε μη-σταθερό σε όλη την διάρκεια της ζύμωσης, ώστε να μελετηθεί η μεταβολή του και η πιθανή επίδραση της στον μεταβολισμό.



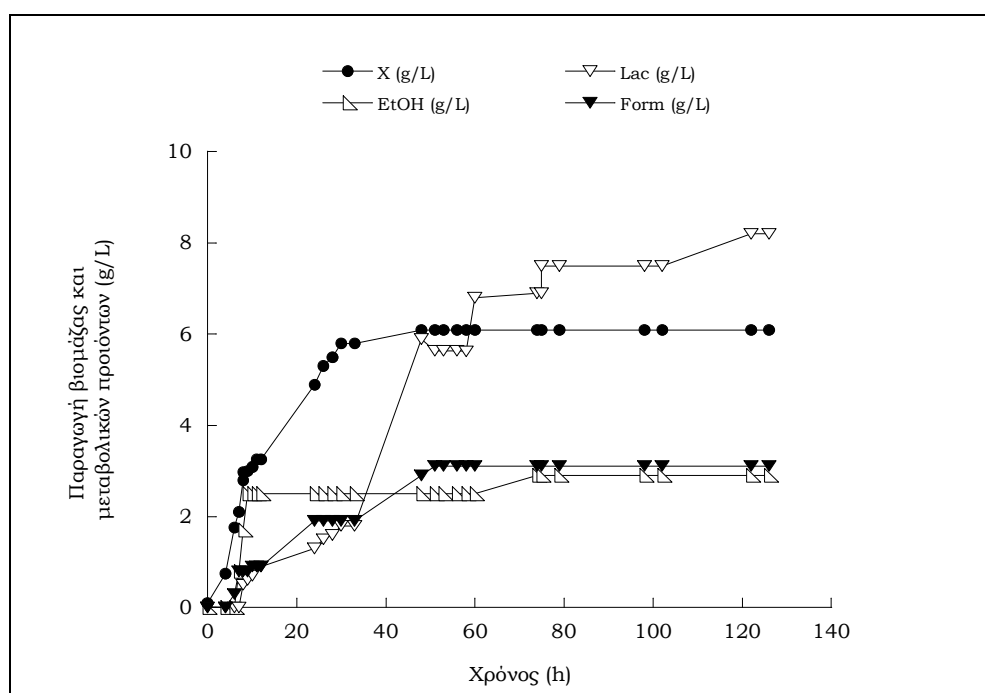
Γράφημα III-34α: Κατανάλωση γλυκερόλης (Gly–g/L) και παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης (BD–g/L), κατά την αύξηση του στελέχους *Enterobacter aerogenes* FMCC-10 σε ημι-συνεχή καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα, υπό συνθήκες μη-σταθερού pH.

Συνθήκες καλλιέργειας: αερόβια ημι-συνεχής καλλιέργεια (παροχή αέρα με ροή 0,8 LPM) σε βιοαντιδραστήρα 1,2-L, αρχική τιμή pH=7,0±0,2, θερμοκρασία 30 °C και ανάδευση 400 rpm.

Όπως απεικονίζεται και στα Γραφήματα III-34α και III-34β, μετά από 126 ώρες ζύμωσης, 192,9 g/L γλυκερόλης μετατράπηκαν σε 65,8 g/L 2,3-βουτανοδιόλης και 8,2 g/L γαλακτικού οξέος. Στο χρονικό αυτό διάστημα πραγματοποιήθηκαν επτά ανατροφοδοτήσεις και τις πρώτες 12 ώρες της ζύμωσης ο ρυθμός κατανάλωσης του υποστρώματος ήταν ιδιαίτερα υψηλός, φτάνοντας τα 5,8 g/L/h και στη συνέχεια έως τις 58 ώρες ζύμωσης, αν και μειώθηκε παρέμεινε πάνω από 2,0 g/L/h.

Στο διάστημα αυτό είχαν μεταβολιστεί ~157 g/L γλυκερόλης που αντιστοιχούν σε ποσοστό 81% του συνολικού καταναλωθέντος υποστρώματος. Ο μεταβολισμός της γλυκερόλης συνεχίστηκε έως τις 124 ώρες, με συνεχώς μειούμενο ρυθμό, με αποτέλεσμα σε διάστημα 66 ωρών η κατανάλωση να είναι μόλις ~36 g/L. Αξίζει να σημειωθεί ότι η σταδιακή μείωση του ρυθμού κατανάλωσης συμπίπτει χρονικά με την πτώση του pH στην τιμή 4,8 (Γράφημα III-35).

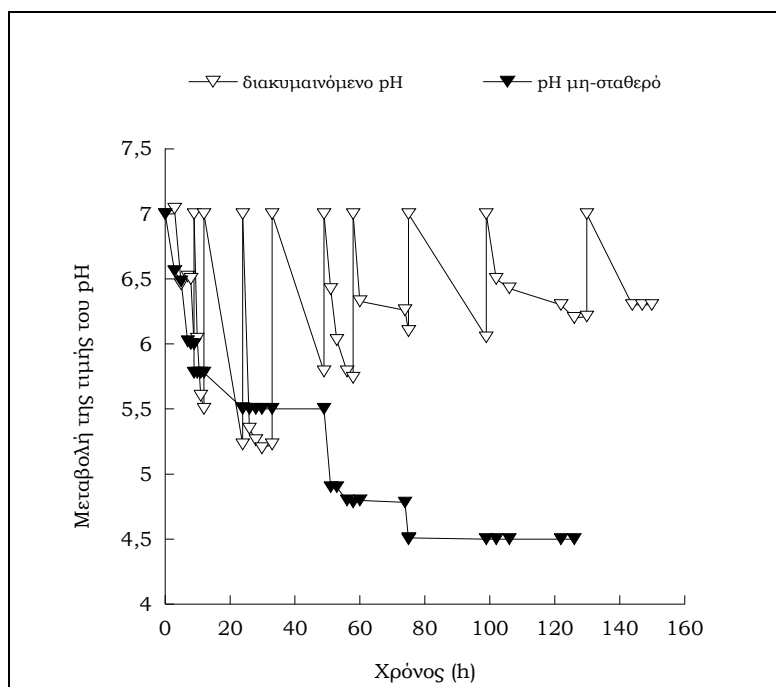
Η παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης συνοδεύτηκε από το σχηματισμό μικρών ποσοτήτων 1,3-προπανοδιόλης, αιθανόλης και μυρμηκικού οξέος (1,5 g/L, 2,9 g/L και 3,1 g/L, αντίστοιχα). Ο ρυθμός παραγωγής δεν παρουσίασε ιδιαίτερες διακυμάνσεις και για το μεγαλύτερο διάστημα της ζύμωσης παρέμεινε ~0,8 g/L/h. Στο τέλος της ζύμωσης ο συντελεστής απόδοσης της διόλης ανά καταναλωθείσα γλυκερόλη $Y_{BD/Gly}$, έλαβε την τιμή 0,34 g/g και η παραγωγικότητα 0,52 g/L/h. Αναφορικά με την σύνθεση των υπολοίπων μεταβολιτών, η παραγωγή του γαλακτικού οξέος πραγματοποιήθηκε κυρίως μετά τις πρώτες 24 ώρες, χωρίς να παρατηρηθούν σημαντικές μεταβολές στο ρυθμό σχηματισμού. Τέλος η κυτταρική αύξηση ήταν μεγαλύτερη τις πρώτες 12 ώρες της ζύμωσης, χωρίς να παρατηρηθεί ιδιαίτερη φάση προσαρμογής (lag phase) στον αυξητικό κύκλο και η μέγιστη παραγόμενη βιομάζα ήταν 6,2 g/L



Γράφημα III-34β: Παραγωγή βιομάζας (X-g/L), αιθανόλης (EtOH-g/L), γαλακτικού (Lac-g/L) και μυρμηκικού (Form - g/L) οξέος, κατά την αύξηση του στελέχους *Enterobacter aerogenes* FMCC-10 σε ημι-συνεχή καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα, υπό συνθήκες μη-σταθερού pH.

Συνθήκες καλλιέργειας: αερόβια ημι-συνεχής καλλιέργεια (παροχή αέρα με ροή 0,8 LPM) σε βιοαντιδραστήρα 1,2-L, αρχική τιμή pH=7,0±0,2, θερμοκρασία 30 °C και ανάδευση 400 rpm.

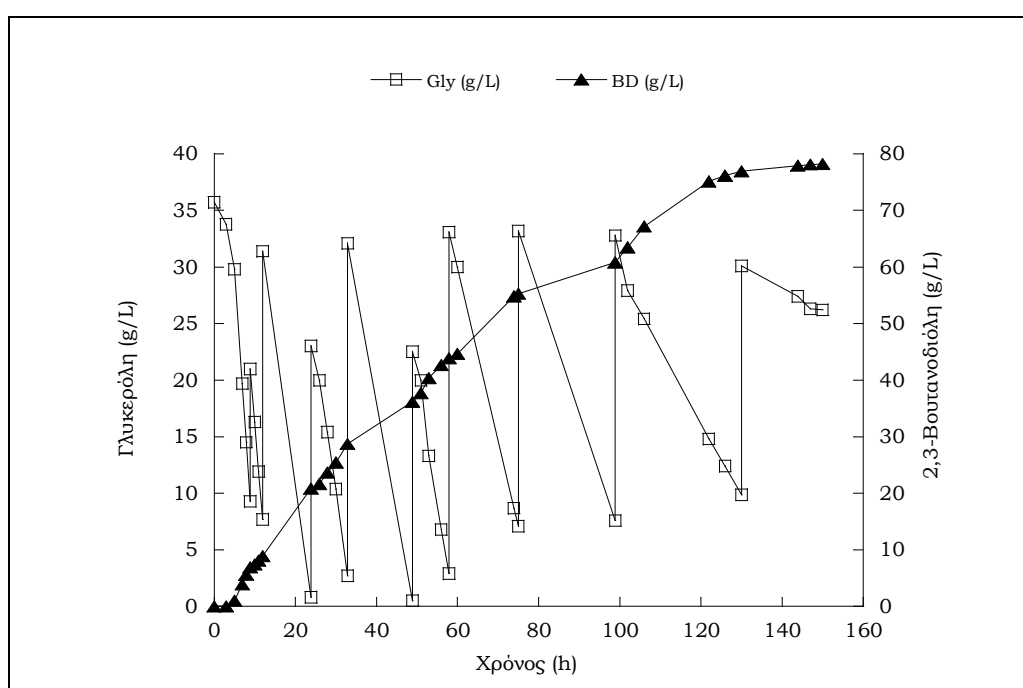
Έτσι λοιπόν, όπως φάνηκε και από τις ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα, η μείωση του pH σε τιμή χαμηλότερη από 5,0, επέδρασε πρωτίστως στην κατανάλωση της γλυκερόλης, και κατά συνέπεια στην παραγωγή μεταβολικών προϊόντων. Ως εκ τούτου διενεργήθηκε μία δεύτερη ημι-συνεχής καλλιέργεια, κατά την οποία μετά από κάθε ανατροφοδότηση το pH αυξάνονταν στην τιμή 7,0, στη συνέχεια έμενε μη σταθερό, και χαρακτηρίστηκε ως διακυμαινόμενο. Όπως δίνεται και στο Γράφημα III-35 μετά από κάθε διόρθωση στην αρχική τιμή 7,0 το pH μειωνόταν σχεδόν ακαριαία, εντούτοις, διατηρήθηκε πάνω από την τιμή 5,0 η οποία αποδείχτηκε κρίσιμη για τον μεταβολισμό της γλυκερόλης. Μετά από 150 ώρες ζύμωσης 215,3 g/L γλυκερόλης μετατράπηκαν σε 78,2 g/L 2,3-βουτανοδιόλης και 13,1 g/L γαλακτικού οξέος (Γραφήματα III-36α και III-36β). Στο χρονικό αυτό διάστημα πραγματοποιήθηκαν εννέα ανατροφοδοτήσεις και τις πρώτες 12 ώρες της ζύμωσης ο ρυθμός κατανάλωσης του υποστρώματος ήταν ιδιαίτερα υψηλός, φτάνοντας τα 5,0 g/L/h. Μετά το πέρας των 100 ωρών και αφού είχαν ήδη καταναλωθεί ~195 g/L γλυκερόλης ο ρυθμός μειώθηκε σημαντικά στα 0,6 g/L/h. Την χρονική αυτή περίοδο το pH της καλλιέργειας κυμάνθηκε από 5,8-7,0, καθώς με τις συνεχείς διορθώσεις μετά από κάθε ανατροφοδότηση διατηρήθηκε πάνω από την τιμή 5,0. Ως εκ τούτου η προοδευτική μείωση της κατανάλωσης της γλυκερόλης φαίνεται να οφείλεται σε κορεσμό του υποστρώματος και όχι στις συνθήκες pH.



Γράφημα III-35: Μεταβολή της τιμής του pH κατά την αύξηση του στελέχους *Enterobacter aerogenes* FMCC-10 σε ημι-συνεχείς καλλιέργειες, υπό συνθήκες μη-σταθερού και διακυμαινόμενου pH.

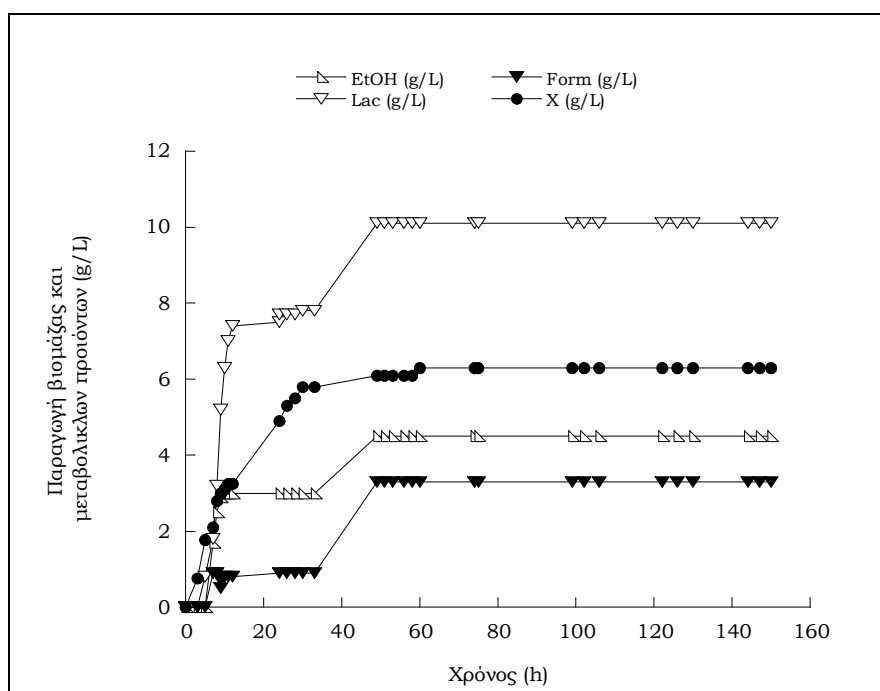
Η 2,3-βουτανοδιόλη παρέμεινε το κύριο μεταβολικό προϊόν καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης. Ο ρυθμός παραγωγής δεν παρουσίασε ιδιαίτερες διακυμάνσεις και για το μεγαλύτερο

διάστημα της ζύμωσης παρέμεινε $\sim 1,0$ g/L/h. Στο τέλος της ζύμωσης ο συντελεστής απόδοσης της διόλης ανά καταναλωθείσα γλυκερόλη $Y_{BD/Gly}$, έλαβε την τιμή 0,36 g/g και η παραγωγικότητα 0,52 g/L/h. Αναφορικά με την σύνθεση των υπολοίπων μεταβολιτών, η παραγωγή του γαλακτικού οξέος πραγματοποιήθηκε κυρίως τις πρώτες 24 ώρες, χωρίς να παρατηρηθούν σημαντικές μεταβολές στο ρυθμό σχηματισμού. Η παραγωγή της διόλης συνοδεύτηκε από το σχηματισμό μικρών ποσοτήτων 1,3-προπανοδιόλης, αιθανόλης και μυρμηκικού οξέος (1,5 g/L, 4,5 g/L και 3,3 g/L, αντίστοιχα). Τέλος η κυτταρική αύξηση ήταν μεγαλύτερη τις πρώτες 12 ώρες της ζύμωσης, χωρίς να παρατηρηθεί ιδιαίτερη φάση προσαρμογής (lag phase) στον αυξητικό κύκλο και η μέγιστη παραγόμενη βιομάζα ήταν 6,3 g/L.



Γράφημα III-36α: Κατανάλωση γλυκερόλης (Gly–g/L) και παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης (BD–g/L), κατά την αύξηση του στελέχους *Enterobacter aerogenes* FMCC-10 σε ημι-συνεχή καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα, υπό συνθήκες διακυμαινόμενου pH.

Συνθήκες καλλιέργειας: αερόβια ημι-συνεχής καλλιέργεια (παροχή αέρα με ροή 0,8 LPM) σε βιοαντιδραστήρα 1,2-L, αρχική τιμή pH=7,0±0,2, θερμοκρασία 30 °C και ανάδευση 400 rpm.



Γράφημα III-36β: Παραγωγή βιομάζας (X-g/L), αιθανόλης (EtOH-g/L), γαλακτικού (Lac-g/L) και μυρμηκικού (Form - g/L) οξέος, κατά την αύξηση του στελέχους *Enterobacter aerogenes* FMCC-10 σε ημι-συνεχή καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα, υπό συνθήκες διακυμαινόμενου pH.

Συνθήκες καλλιέργειας: αερόβια ημι-συνεχής καλλιέργεια (παροχή αέρα με ροή 0,8 LPM) σε βιοαντιδραστήρα 1,2-L, αρχική τιμή pH=7,0±0,2, θερμοκρασία 30 °C και ανάδευση 400 rpm.

Συγκρίνοντας τις δύο ημι-συνεχείς καλλιέργειες σε συνθήκες μη σταθερού και διακυμαινόμενου pH προκύπτει ότι τις πρώτες 48 ώρες καλλιέργειας ο ρυθμός κατανάλωσης της γλυκερόλης και η ο ρυθμός παραγωγής της 2,3-βουτανοδιόλης είχαν παρόμοιες τιμές και στις δύο καλλιέργειες (Πίνακας III-19). Ωστόσο η διόρθωση του pH στην τιμή 7,0 μετά από κάθε ανατροφοδότηση βοήθησε στην διατήρηση του σε τιμές υψηλότερες των 5,0 μονάδων σε όλη την διάρκεια της ζύμωσης, γεγονός που βοήθησε τον μεταβολισμό της γλυκερόλης. Ως εκ τούτου πραγματοποιήθηκαν περισσότερες ανατροφοδοτήσεις και αυξήθηκε η κατανάλωση υποστρώματος κατά 22 g/L. Ταυτόχρονα οι συνθήκες αυτές ευνόησαν και την σύνθεση 2,3-βουτανοδιόλης, καθώς οι τιμές pH μικρότερες των 5,0 μονάδων φαίνεται ότι έδρασαν παρεμποδιστικά στην παραγωγικότητα του μεταβολίτη. Φαίνεται λοιπόν ότι η διόρθωση του pH στην αρχική τιμή 7,0 κατά την διάρκεια της ημι-συνεχούς καλλιέργειας, αποτέλεσε τον κατάλληλο συνδυασμό μη-σταθερού pH, που ευνοεί την σύνθεση της διόλης, και ταυτόχρονα διατηρείται σε τέτοια επίπεδα (μεγαλύτερα από τις 5,0 μονάδες) ώστε να ενισχύεται συγχρόνως η κατανάλωση της γλυκερόλης.

Πίνακας III-19: Σύγκριση του ρυθμού κατανάλωσης γλυκερόλης και της παραγωγικότητας της 2,3-βουτανοδιόλης, κατά την αύξηση του στελέχους *Enterobacter aerogenes* FMCC-10 σε ημι-συνεχείς καλλιέργειες, υπό συνθήκες μη-σταθερού και διακυμαινόμενου pH.

Χρονικό διάστημα καλλιέργειας (h)	Τελική τιμή pH		Ρυθμός κατανάλωσης γλυκερόλης (g/L/h)*		Παραγωγικότητα (g/L/h)*	
	pH _{μσ}	pH _δ	pH _{μσ}	pH _δ	pH _{μσ}	pH _δ
0-12	5,8	5,5	3,6	2,8	0,80	0,74
12-24	5,5	5,3	2,7	2,6	0,93	1,0
24-48	5,5	5,8	2,3	2,1	0,66	0,61
48-72	4,8	6,3	1,7	1,8	0,68	0,74
72-96	4,5	6,1	0,5	1,1	0,35	0,56
96-126	4,5	6,4	0,1	0,8	0,06	0,24
126-150	-	6,3	-	0,3	-	0,09

pH_{μσ}: pH μη-σταθερό, pH_δ: διακυμαινόμενου pH

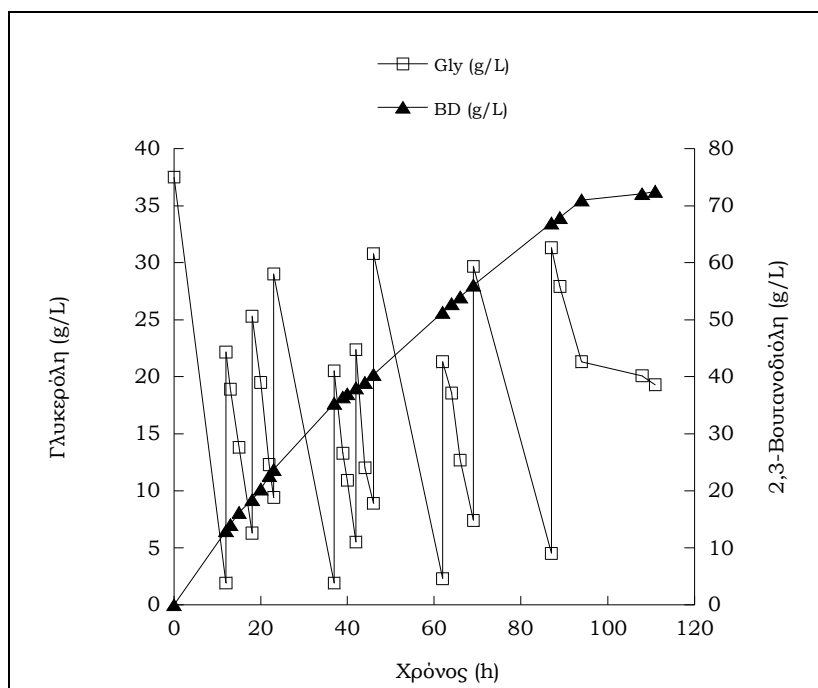
*Ο υπολογισμός του ρυθμού κατανάλωσης γλυκερόλης και της παραγωγικότητας βασίστηκε στα συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα.

Τα παραπάνω αποτελέσματα φανερώνουν τη δυνατότητα του στελέχους να μεταβολίζει σημαντικές ποσότητες βιομηχανικής γλυκερόλης προς παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης. Σημειώνεται ότι η σύνθεση του μεταβολίτη από το εν λόγω υπόστρωμα δεν έχει μελετηθεί ιδιαίτερα στην διεθνή βιβλιογραφία. Ως επί το πλείστον η παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης έχει πραγματοποιηθεί από σακχαρούχα υποστρώματα, ενώ ο μεταβολισμός της γλυκερόλης έχει συνδεθεί με την παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης.

III.4.6. Επίδραση μη-ασηπτικών συνθηκών καλλιέργειας στην σύνθεση μεταβολικών προϊόντων κατά την αύξηση του στελέχους *Enterobacter aerogenes* FMCC-10 σε υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης

Δεδομένου ότι η παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης από βιομηχανική γλυκερόλη, ως το κύριο μεταβολικό προϊόν και όχι ως παραπροϊόν της προπανοδιολικής ζύμωσης, αποτελεί μια διεργασία που δεν έχει μελετηθεί στην διεθνή βιβλιογραφία, κρίθηκε σκόπιμη η διερεύνηση της παραγωγής του μεταβολίτη και σε μη ασηπτικές συνθήκες. Όπως έχει ήδη αναφερθεί η εφαρμογή μη-ασηπτικών συνθηκών καλλιέργειας δύναται να μειώσουν περαιτέρω το συνολικό κόστος της βιο-διεργασίας, δεδομένου ότι μπορεί να ελαττωθεί σημαντικά το κόστος για τον εξοπλισμό του βιοαντιδραστήρα και το κόστος λειτουργίας σε βιομηχανικό επίπεδο όπως για παράδειγμα την ενέργεια για την επεξεργασία και την αποστείρωση του υποστρώματος, Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε μια επιπλέον ημι-συνεχής καλλιέργεια σε υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης υπό μη ασηπτικές συνθήκες, με παροχή αέρα 0,8 LPM και διακυμαινόμενο pH.

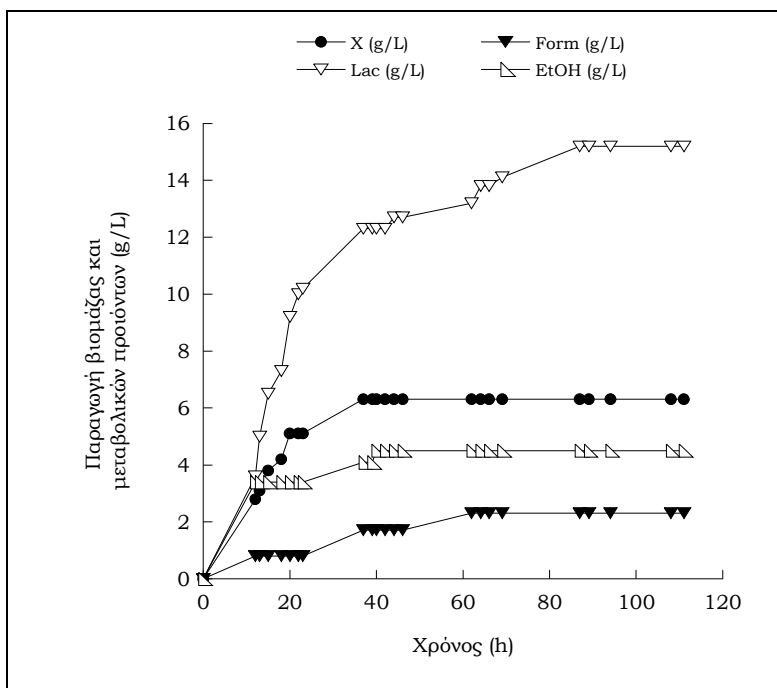
Όπως απεικονίζεται και στα Γραφήματα III-37α και III-37β μετά από 111 ώρες ζύμωσης 202,4 g/L γλυκερόλης μετατράπηκαν σε 72,5 g/L 2,3-βουτανοδιόλης και 15,1 g/L γαλακτικού οξέος. Στο χρονικό αυτό διάστημα πραγματοποιήθηκαν εννέα ανατροφοδοτήσεις και τις πρώτες 24 ώρες της ζύμωσης ο ρυθμός κατανάλωσης του υποστρώματος ήταν ιδιαίτερα υψηλός. Μετά το πέρας των 87 ωρών και αφού είχαν ήδη καταναλωθεί ~191 g/L γλυκερόλης ο ρυθμός μειώθηκε σημαντικά στα 0,5 g/L/h.



Γράφημα III-37α: Κατανάλωση γλυκερόλης (Gly – g/L) και παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης (BD – g/L), κατά την αύξηση του στελέχους *Enterobacter aerogenes* FMCC-10 σε ημι-συνεχή μη ασηπτική καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα, υπό συνθήκες διακυμαινόμενου pH.

Συνθήκες καλλιέργειας: αερόβια ημι-συνεχής καλλιέργεια (παροχή αέρα με ροή 0,8 LPM) σε βιοαντιδραστήρα 1,2-L, αρχική τιμή pH=7,0±0,2, θερμοκρασία 30 °C και ανάδευση 400 rpm.

Η 2,3-βουτανοδιόλη παρέμεινε το κύριο μεταβολικό προϊόν καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης και ο συντελεστής απόδοσης της διόλης ανά καταναλωθείσα γλυκερόλη $Y_{BD/Gly}$, έλαβε την τιμή 0,35 g/g και η παραγωγικότητα 0,65 g/L/h. Αναφορικά με την σύνθεση των υπολοίπων μεταβολιτών, η παραγωγή του γαλακτικού οξέος πραγματοποιήθηκε κυρίως τις πρώτες 24 ώρες, χωρίς να παρατηρηθούν σημαντικές μεταβολές στο ρυθμό σχηματισμού. Η παραγωγή της διόλης συνοδεύτηκε από το σχηματισμό μικρών ποσοτήτων 1,3-προπανοδιόλης, αιθανόλης και μυρμηκικού οξέος (1,5 g/L, 4,5 g/L και 2,3 g/L, αντίστοιχα).



Γράφημα III-37β: Παραγωγή βιομάζας (X – g/L), αιθανόλης (EtOH – g/L), γαλακτικού (Lac – g/L) και μυρμηκικού (Form – g/L) οξέος, κατά την αύξηση του στελέχους *Enterobacter aerogenes* FMCC-10 σε ημι-συνεχή μη ασηπτική καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα, υπό συνθήκες διακυμαινόμενου pH.

Συνθήκες καλλιέργειας: αερόβια ημι-συνεχής καλλιέργεια (παροχή αέρα με ροή 0,8 LPM) σε βιοαντιδραστήρα 1,2-L, αρχική τιμή pH=7,0±0,2, θερμοκρασία 30 °C και ανάδευση 400 rpm.

Συγκρίνοντας τις ημι-συνεχείς καλλιέργειες υπό ασηπτικές και μη συνθήκες, προκύπτει ότι η κυτταρική αύξηση, η κατανάλωση γλυκερόλης, καθώς και η παραγωγή της 2,3-βουτανодиόλης δεν επηρεάστηκαν σημαντικά από την εφαρμογή των μη-ασηπτικών συνθηκών. Πιο συγκεκριμένα, η παραγόμενη βιομάζα είχε την ίδια τελική τιμή 6,3 g/L και στις δύο καλλιέργειες, ενώ στην αναποστείρωτη καλλιέργεια παρουσιάστηκε μείωση στη συγκέντρωση του κύριου μεταβολίτη από τα 78,2 στα 72,5 g/L. Ομοίως και η ποσότητα του καταναλωθέντος υποστρώματος ήταν κατά ~13 g/L μικρότερη, κατά την διάρκεια των μη-ασηπτικών συνθηκών. Από την άλλη πλευρά σημειώθηκε μικρή αύξηση της τελικής συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέος.

Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης υπό μη στειρές συνθήκες, προκειμένου να παρατηρηθεί κατά πόσο διατηρείται η καθαρότητα της καλλιέργειας, λαμβάνονταν περιοδικώς δείγματα τα οποία μετά από χρώση κατά Gram, ελέγχονταν στο μικροσκόπιο. Οι μικροσκοπικές παρατηρήσεις έδειξαν ότι ο μικροοργανισμός *E. aerogenes* ήταν ο κυρίαρχος μικροοργανισμός στο μέσο της καλλιέργειας. Κατά συνέπεια η αύξηση της συγκέντρωσης των οργανικών οξέων ενδεχομένως να προκλήθηκε από μια μικρή παρουσία άλλων άγνωστων μικροοργανισμών λόγω των μη ασηπτικών συνθηκών.

Τα παραπάνω αποτελέσματα αποδεικνύουν, όπως και στις περιπτώσεις των στελεχών *K. oxytoca* FMCC–197 και *C. freundii* FMCC–207, ότι η εφαρμογή των μη-ασηπτικών συνθηκών συνιστάται για τον μεταβολισμό της βιομηχανικής γλυκερόλης.

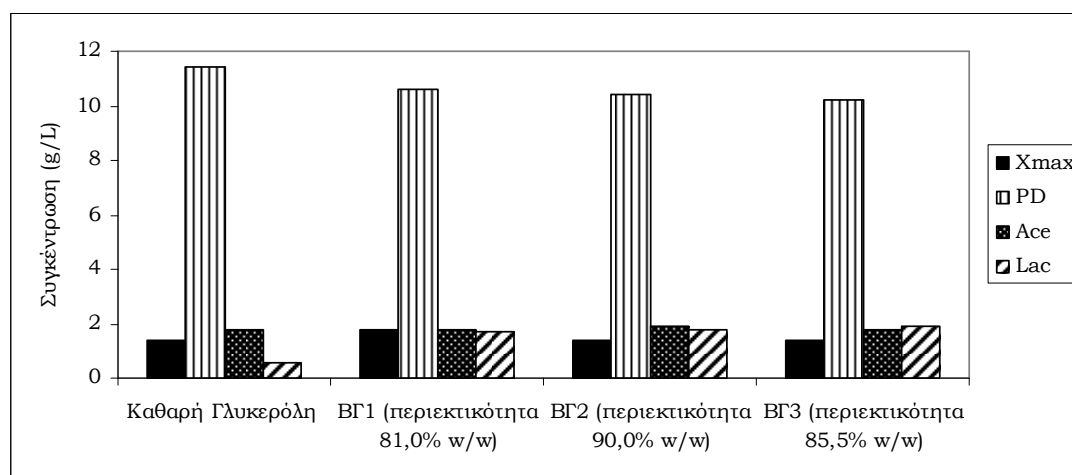
III.5. Βιοτεχνολογική παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης κατά την καλλιέργεια του μικροοργανισμού *Citrobacter freundii* FMCC-B 294 (VK-19)

III.5.1. Βιοτεχνολογική παραγωγή μεταβολικών προϊόντων κατά την αύξηση του μικροοργανισμού *Citrobacter freundii* FMCC-B 294 (VK-19) σε υποστρώματα βιομηχανικής γλυκερόλης διαφορετικής σύστασης

Ο μικροοργανισμός *C. freundii* FMCC-B 294 (VK-19) επιλέχθηκε κατά το πρώτο στάδιο της παρούσας μελέτης για την δυνατότητα του να μεταβολίζει την βιομηχανική γλυκερόλη υπό αναερόβιες συνθήκες, προς παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης, με αρκετά υψηλή παραγωγικότητα (1,0 g/L/h), ικανοποιητικό συντελεστή απόδοσης ($Y_{PD/Gly}=0,04$ g/g) και σχετικά υψηλή τελική συγκέντρωση 1,3-προπανοδιόλης (10,1 g/L). Ως εκ τούτου η βιομηχανική γλυκερόλη προερχόμενη από την από την γερμανική εταιρεία βιοκαυσίμων "ADM Industries" (BG₁) αποδείχτηκε κατάλληλο υπόστρωμα για την κυτταρική αύξηση και της παραγωγή της διόλης σε ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα. Με στόχο την διεύρυνση αυτής της παρατήρησης για βιομηχανικές γλυκερόλες διαφορετικής σύστασης, πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες χρησιμοποιώντας ως υποστρώματα δύο βιομηχανικές γλυκερόλες προερχόμενες από τις ελληνικές εταιρείες "ΕΛΙΝ Βιοκαύσιμα Α.Ε." (BG₂) και "GF Energy Α.Ε.Β.Ε." (BG₃). Όπως έχει ήδη διατυπωθεί στις περιπτώσεις των γλυκερολών BG₁ και BG₃ το υλικό εκκίνησης για την παραγωγή του βιοκαυσίμου ήταν φυτικά έλαια, ενώ στην περίπτωση της γλυκερόλης BG₂ χρησιμοποιούμενα μαγειρικά έλαια, όπως τηγανέλαια (Αναλυτικότερα βλέπε § II.2.2). Ταυτόχρονα, ως μάρτυρας διενεργήθηκε μια ζύμωση σε υπόστρωμα καθαρής γλυκερόλης. Όλες οι ασυνεχείς καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε βιοαντιδραστήρα 1,2-L, υπό αναερόβιες συνθήκες και τιμή pH 7,0. Για την επίτευξη των αναερόβιων συνθηκών γινόταν εμφύσηση του μέσου με άζωτο (0,1 LPM) καθ' όλη την διάρκεια της ζύμωσης. Επιλέχθηκε χαμηλή αρχική συγκέντρωση πηγής άνθρακα ($Gly_0=20$ g/L), ούτως ώστε να αποφευχθεί φαινόμενο παρεμπόδισης εξαιτίας του υποστρώματος, καθώς και των προσμίξεων που περιείχε. Η κατανάλωση της γλυκερόλης ήταν πλήρης και ταχύτατη σε όλες τις καλλιέργειες και ολοκληρώθηκε 9-12 ώρες μετά τον εμβολιασμό, αποδεικνύοντας ότι το στέλεχος προσαρμόστηκε γρήγορα στις προσμίξεις και των τριών υποστρωμάτων. Αναλυτικότερα στο υπόστρωμα του μάρτυρα αφομοιώθηκαν 20,2 g/L, και στα υποστρώματα βιομηχανικής γλυκερόλης η κατανάλωση κυμάνθηκε από 19,3-20,1 g/L. Η ελάχιστη μεγαλύτερα κατανάλωση παρατηρήθηκε στην καλλιέργεια με υπόστρωμα την γλυκερόλη BG₁.

Όπως απεικονίζεται και στο Γράφημα III-38 η κυτταρική αύξηση ήταν παρόμοια και στις τέσσερις καλλιέργειες, με τις τελικές συγκεντρώσεις βιομάζας (X_{max}) να ανέρχονται στα 1,4-1,8 g/L. Η μεγαλύτερη τιμή σημειώθηκε στην καλλιέργεια με υπόστρωμα την γλυκερόλη BG₁.

Ανεξάρτητα από το είδος της γλυκερόλης που χρησιμοποιήθηκε, σε όλες τις καλλιέργειες το κύριο μεταβολικό προϊόν ήταν η 1,3-προπανοδιόλη, η μέγιστη συγκέντρωση της οποίας ήταν 11,4 g/L στην καλλιέργεια του μάρτυρα, ενώ σχεδόν ίσες ποσότητες μεταξύ 10,2-10,6 g/L σχηματίστηκαν στις περιπτώσεις των βιομηχανικών γλυκερολών. Ο συντελεστής απόδοσης παραχθείσας 1,3-προπανοδιόλης ανά καταναλωθείσα γλυκερόλη έλαβε την μέγιστη τιμή 0,54 g/g στο πείραμα ελέγχου με υπόστρωμα την καθαρή γλυκερόλη και μια αμελητέα μείωση σημειώθηκε και στα τρία υποστρώματα βιομηχανικής γλυκερόλης (0,53 g/g). Η σύνθεση της διόλης συνοδεύτηκε από την παραγωγή μικρότερων ποσοτήτων οξικού (Ace) και γαλακτικού οξέος (Lac) ($Ace_{max}=1,9$ g/L, $Lac_{max}=1,9$ g/L), καθώς και ασήμαντων ποσοτήτων μυρμηκικού οξέος (συγκέντρωση μικρότερη από 0,5 g/L).



Γράφημα III-38: Μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας (X-g/L), 1,3-προπανοδιόλης (PD-g/L), οξικού (Ace-g/L), και γαλακτικού (Lac-g/L), κατά την αύξηση του στελέχους *Citrobacter freundii* FMCC- B 294 (VK-19) σε υποστρώματα βιομηχανικής γλυκερόλης διαφορετικής σύστασης.

Υπό τις δεδομένες πειραματικές συνθήκες και οι τρεις τύποι βιομηχανικής γλυκερόλης ήταν κατάλληλα υποστρώματα για την αύξηση του μικροοργανισμού *C. freundii* και την παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης. Ως εκ τούτου μπορεί να θεωρηθεί ότι οι προσμίξεις των συγκεκριμένων υποστρωμάτων (άλατα, μεθανόλη, κλπ.) καθώς και η προέλευση του υλικού εκκίνησης για την παραγωγή του βιοκαυσίμου (φυτικά έλαια ή χρησιμοποιούμενα μαγειρικά έλαια) δεν φαίνεται να είχαν ιδιαίτερα αρνητική επίπτωση στον μεταβολισμό της γλυκερόλης από το στέλεχος, ενώ ταυτόχρονα και η βιοσύνθεση των διολών και της αιθανόλης δεν επηρεάστηκαν σε σημαντικό βαθμό από την περιεκτικότητα του υποστρώματος σε γλυκερόλη. Δεδομένου ότι η βιομηχανική γλυκερόλη προερχόμενη από το εταιρεία βιοκαυσίμων "ADM Industries" ευνόησε ελαφρώς την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων, σε σύγκριση με τα άλλα είδη βιομηχανικής γλυκερόλης, επιλέχθηκε αυτή ως πηγή άνθρακα για τα επικείμενα πειράματα.

III.5.2. Επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης στην σύνθεση μεταβολικών προϊόντων κατά την αύξηση του μικροοργανισμού *Citrobacter freundii* FMCC-B 294 (VK-19) σε υποστρώματα βιομηχανικής γλυκερόλης

Με στόχο την περαιτέρω μελέτη της παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης πραγματοποιήθηκαν αναερόβιες ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα, κατά την διάρκεια των οποίων μελετήθηκαν οι κινητικές παράμετροι της αύξησης του μικροοργανισμού. Η αρχική συγκέντρωση της γλυκερόλης κυμάνθηκε από 40 έως 170 g/L. Η παραγόμενη βιομάζα, η συνολική κατανάλωση του υποστρώματος και οι τελικές συγκεντρώσεις των μεταβολικών προϊόντων, δίνονται στον Πίνακα III-20.

Πίνακας III-20: Επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης στην παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης (PD), οξικού (Ace) και γαλακτικού (Lac) και οξέος, κατά την αύξηση του στελέχους *Citrobacter freundii* FMCC- B 294 (VK-19), σε ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα.

Gly ₀ (g/L)	Gly _c (g/L)	Χρόνος (h)	X (g/L)	Συγκέντρωση μεταβολικών προϊόντων (g/L)				Συντελεστής απόδοσης (g/g)	
				PD	Lac	Ace	EtOH	PD	Lac
~40	40,5	14	1,9	21,5	4,6	3,0	-	0,53	0,11
~80	80,7	26	2,5	39,9	14,6	4,6	0,4	0,49	0,18
~100	98,0	38	2,3	45,9	20,3	3,7	1,5	0,47	0,20
~150	96,6	70	1,8	38,2	26,3	3,5	6,9	0,40	0,27
~170	88,7	96	1,8	35,1	28,9	3,5	7,5	0,40	0,33

Συνθήκες καλλιέργειας: αναερόβιες ασυνεχείς καλλιέργειες (εμφύσηση N₂ με ροή 0,1LPM) σε βιοαντιδραστήρα 1,2-L, pH=7,0±0,2, θερμοκρασία 30 °C και ανάδευση 150 rpm.

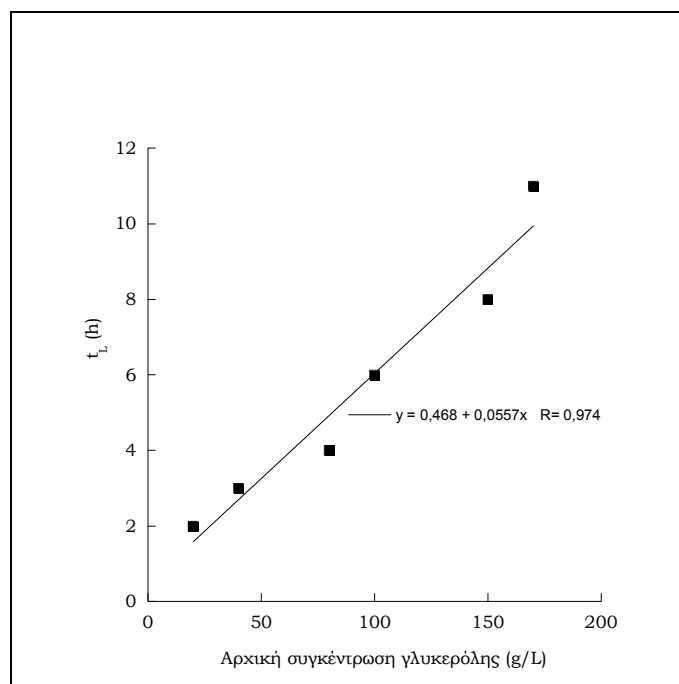
Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν με διαφορετικά αρχικά εμβόλια, ενώ το κάθε σημείο της ζύμωσης είναι ο μέσος όρος δυο ανεξαρτήτων πειραμάτων.

Gly₀: αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης, Gly_c: καταναλωθείσα γλυκερόλη, X: μέγιστη παραγόμενη βιομάζα.

Όπως φαίνεται και στα δεδομένα του Πίνακα III-20, σε όλες τις καλλιέργειες ανεξάρτητα από την αρχική συγκέντρωση του υποστρώματος, παρατηρήθηκε κυτταρική αύξηση. Η μέγιστη παραγωγή βιομάζας πραγματοποιήθηκε στην καλλιέργεια με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης (Gly₀) 80 g/L και μειώθηκε από την τιμή 2,5 στα 1,8 g/L, όταν η αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης ξεπέρασε τα 150 g/L. Αξίζει να αναφερθεί ότι, παρά την σχετική μείωση της συγκέντρωσης της βιομάζας, δεν σημειώθηκε διακοπή της κυτταρικής αύξησης.

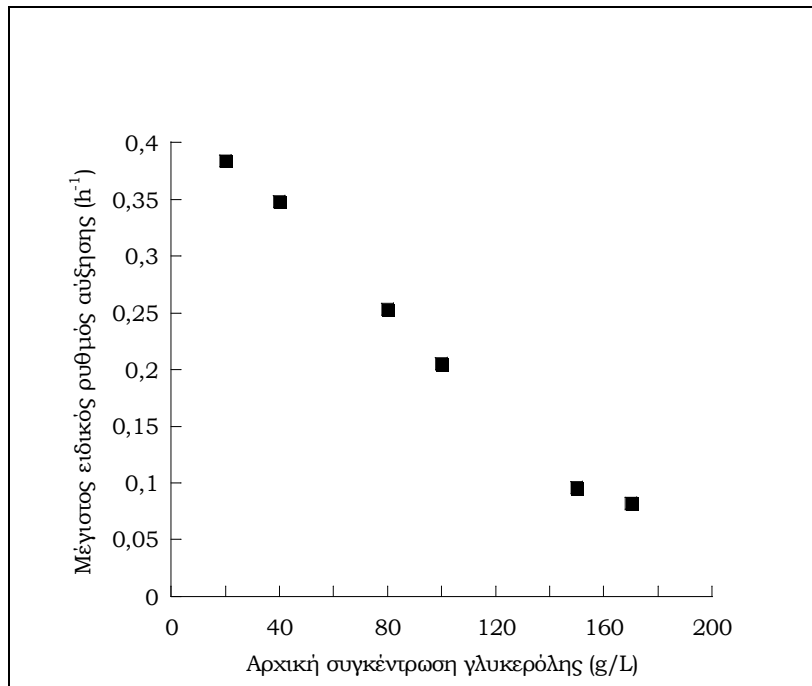
Από την άλλη πλευρά, παρά την αφομοίωση της γλυκερόλης και την μη αμελητέα παραγωγή βιομάζας που παρατηρήθηκαν ακόμα και στις καλλιέργειες με υψηλή αρχική συγκέντρωση υποστρώματος, η αύξηση της Gly₀ είχε σαν συνέπεια τη σχετική παρεμπόδιση της μικροβιακής αύξησης. Όπως απεικονίζεται και στο Γράφημα III-39, ο χρόνος προσαρμογής (t_L)

σχετίζεται γραμμικά με την αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης, και ως εκ τούτου αυξήθηκε προοδευτικά από δύο σε έντεκα ώρες, με την υψηλότερη τιμή στην καλλιέργεια με $Gly_0=170$ g/L.

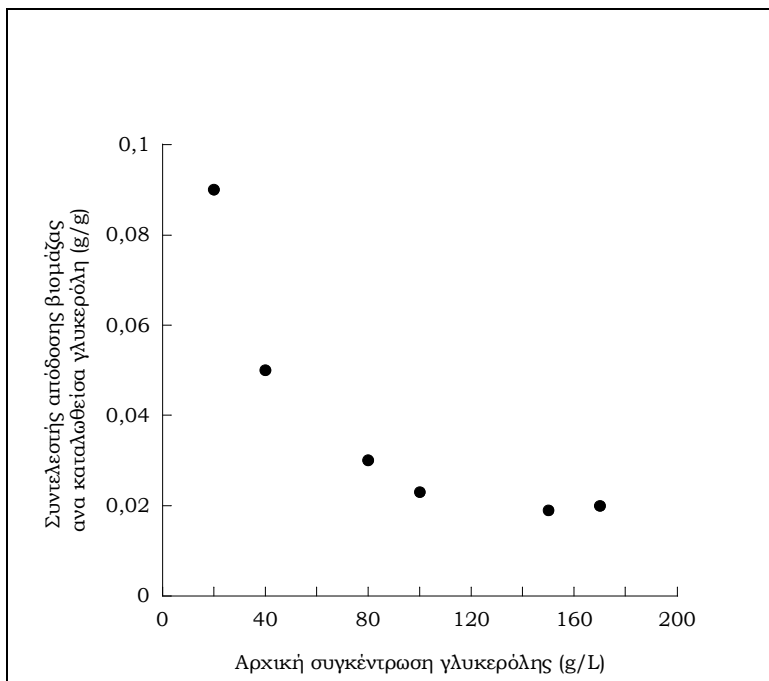


Γράφημα III-39: Συσχέτιση του χρόνου προσαρμογής και της αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης, κατά την αύξηση του στελέχους *Citrobacter freundii* FMCC- B 294 (VK-19) σε ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα.

Παράλληλα υπολογίστηκε ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης (μ_{max}), με προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων στην ευθεία με $\ln\left(\frac{X}{X_0}\right) = \mu_{max} \times \Delta t$ για την εκθετική φάση αύξησης του μικροοργανισμού. Οι τιμές που κυμάνθηκαν μεταξύ $0,09$ h⁻¹ και $0,39$ h⁻¹ και όπως παρουσιάζεται και στο Γράφημα III-40α μειώθηκε αισθητά με την βαθμιαία αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης. Ταυτόχρονα μειώθηκε και η τιμή του συντελεστή απόδοσης βιομάζας ανά καταναλωθείσα γλυκερόλη ($Y_{X/Gly}$), που κυμάνθηκε μεταξύ $0,09$ - $0,02$ g/g, όπως απεικονίζεται και στο Γράφημα III-40β. Τα αποτελέσματα αυτά είναι ενδεικτικά της παρεμπόδισης της κυτταρικής αύξησης, εξαιτίας της αύξησης της αρχικής συγκέντρωσης του υποστρώματος.



Γράφημα III-40α: Μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης (μ_{max}), κατά την αύξηση του στελέχους *Citrobacter freundii* FMCC- B 294 (VK-19) σε ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα.

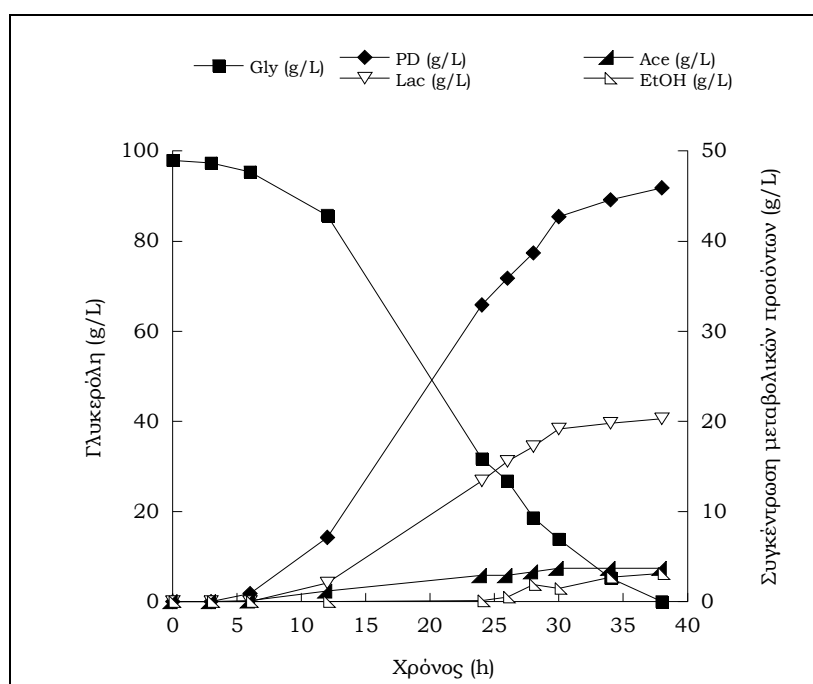


Γράφημα III-40β: Συντελεστής απόδοσης βιομάζας ανά καταλωθείσα γλυκερόλη ($Y_{X/Gly}$), κατά την αύξηση του στελέχους *Citrobacter freundii* FMCC- B 294 (VK-19) σε ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα.

Η κατανάλωση της γλυκερόλης ήταν πλήρης και ταχεία έως την $Gly_0=100$ g/L, ενώ πέραν της τιμής αυτής ένα σημαντικό ποσοστό από τις ολόενα αυξανόμενες συγκεντρώσεις γλυκερόλης στο μέσο της καλλιέργειας, παρέμενε ακατανάλωτο μετά και το ουσιαστικό τέλος της ζύμωσης. Ειδικότερα όταν στο μέσο καλλιέργειας περιέχονταν ~170 g/L γλυκερόλης, το ποσοστό του

ακατανάλωτου υποστρώματος έφτασε το ~48% w/w, ενώ ο χρόνος της ζύμωσης ήταν 2,5 φορές μεγαλύτερος, συγκριτικά με την καλλιέργεια με $Gly_0=100$ g/L όπου είχε σημειωθεί η μέγιστη κατανάλωσης γλυκερόλης. Προφανώς, το μικρό ποσοστό της κατανάλωσης υποστρώματος σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις (π.χ. $Gly_0 \geq 150$ g/L) αποτελεί ένα σημαντικό μειονέκτημα για μια πιθανή εφαρμογή της διαδικασίας σε μεγάλη κλίμακα, δεδομένου ότι, παρά την παράταση του χρόνου καλλιέργειας, σημαντικές ποσότητες γλυκερόλης δεν μεταβολίζονται.

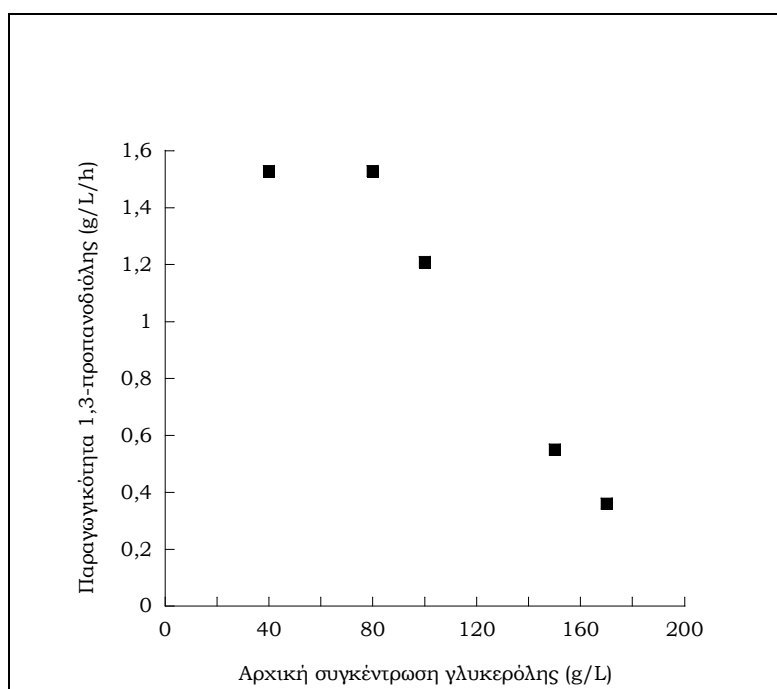
Όσον αφορά τη σύνθεση των μεταβολικών προϊόντων, και συγκεκριμένα την παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης παρατηρήθηκε σταδιακή αύξηση, έως ότου η συγκέντρωση γλυκερόλης φτάσει την τιμή των 100 g/L. Η μέγιστη συγκέντρωση ήταν 45,9 g/L και επιτεύχθηκε στην καλλιέργεια με $Gly_0=100$ g/L (Γράφημα III-41), που αντιστοιχεί σε συντελεστή απόδοσης παραχθείσας γλυκερόλης ανά καταναλωθείσα γλυκερόλη $Y_{PD/Gly}=0,47$ g/g και παραγωγικότητα 1,2 g/L/h. Ωστόσο, για μεγαλύτερες τιμές αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης (δηλαδή 150 και 170 g/L), η συγκέντρωση της διόλης μειώθηκε αισθητά, με συνέπεια στην καλλιέργεια με $Gly_0=170$ g/L, να φτάσει μόλις τα 35,1 g/L, τιμή χαμηλότερη και από την καλλιέργεια με $Gly_0=80$ g/L.



Γράφημα III-41: Γραφική παράσταση της κατανάλωσης γλυκερόλης και παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης (PD-g/L), γαλακτικού οξέος (Lac-g/L), οξικού οξέος (Ace-g/L) και αιθανόλης (EtOH-g/L) σε συνάρτηση με τον χρόνο, κατά την αύξηση του στελέχους *Citrobacter freundii* FMCC- B 294 (VK-19) σε ασυνεχή καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα με $Gly_0=100$ g/L.

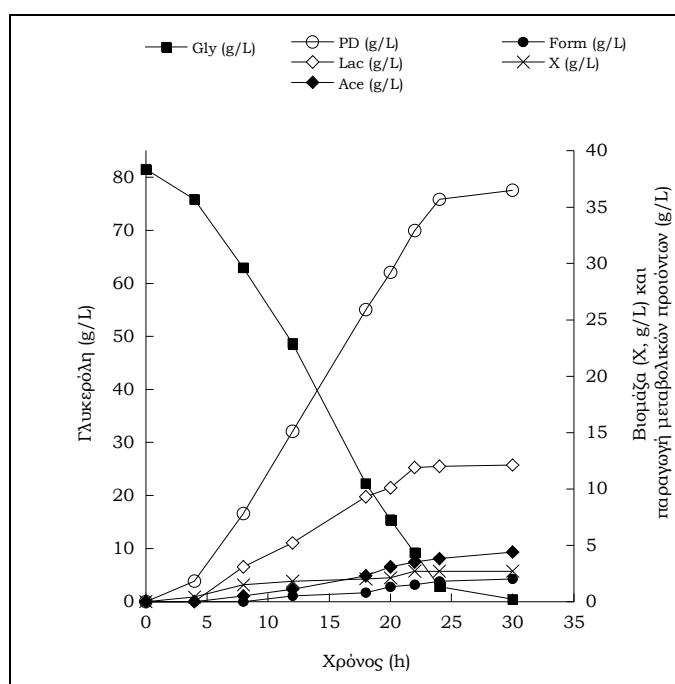
Συνθήκες καλλιέργειας: αναερόβια ασυνεχής καλλιέργεια (εμφύσηση N_2 με ροή 0,1LPM) σε βιοαντιδραστήρα 1,2-L, pH=7,0±0,2, θερμοκρασία 30 °C και ανάδευση 150 rpm.

Η μέγιστη τιμή του συντελεστή απόδοσης της διόλης $Y_{PD/Gly}=0,53$ g/g παρατηρήθηκε στην καλλιέργεια με την μικρότερη συγκέντρωση υποστρώματος, ενώ η περαιτέρω αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης του υποστρώματος οδήγησε σε προοδευτική μείωση του συντελεστή έως την τιμή 0,40 g/g στην καλλιέργεια με $Gly_0=170$ g/L. Παράλληλα και η παραγωγικότητα εμφάνισε τις μέγιστες τιμές 1,53 g/L/h στις καλλιέργειες με μικρότερη συγκέντρωση υποστρώματος (40 και 80 g/L) και σταδιακά μειώθηκε έως την τιμή 0,36 g/L/h στην καλλιέργεια με $Gly_0=170$ g/L (Γράφημα III-42). Από την άλλη πλευρά η παραγωγή του γαλακτικού οξέος και αιθανόλης αυξήθηκαν προοδευτικά, με την προσθήκη περισσότερης γλυκερόλης στο μέσο της καλλιέργειας. Συγκεκριμένα οι υψηλότερες συγκεντρώσεις $Lac_{max}=28,9$ g/L και $EtOH_{max}=7,5$ g/L, επιτεύχθηκαν στην καλλιέργεια με $Gly_0=170$ g/L. Είναι χαρακτηριστικό ότι οι τιμές του συντελεστή απόδοσης παραγόμενου γαλακτικού οξέος προς αναλωθείσα γλυκερόλη ($Y_{Lac/Gly}$), αυξήθηκαν προοδευτικά με την αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης. Έτσι, η μέγιστη τιμή του συντελεστή απόδοσης του γαλακτικού οξέος $Y_{Lac/Gly}=0,33$ g/g, σημειώθηκε στην καλλιέργεια με $Gly_0=170$ g/L. Σημειώνεται ότι στην εν λόγω καλλιέργεια παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη παρεμπόδιση στην κυτταρική αύξηση και την παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης. Πιθανόν η ιδιαίτερα υψηλή αρχική συγκέντρωση υποστρώματος ευνόησε κυρίως την σύνθεση του γαλακτικού οξέος και το μεταβολικό μονοπάτι πυροσταφυλικό \longrightarrow γαλακτικό οξύ, ενώ αντίθετα περιορίσαν το μεταβολικό μονοπάτι γλυκερόλη \longrightarrow 1,3-προπανοδιόλη. Σχετικά με τον σχηματισμό οξικού οξέος δεν παρατηρήθηκαν φαινόμενα παρεμπόδισης και οι ποσότητες που εκκρίθηκαν στο μέσο της καλλιέργειας παρέμειναν χαμηλές (3,0 έως 4,9 g/L), ανεξάρτητα από την αρχική συγκέντρωση υποστρώματος.



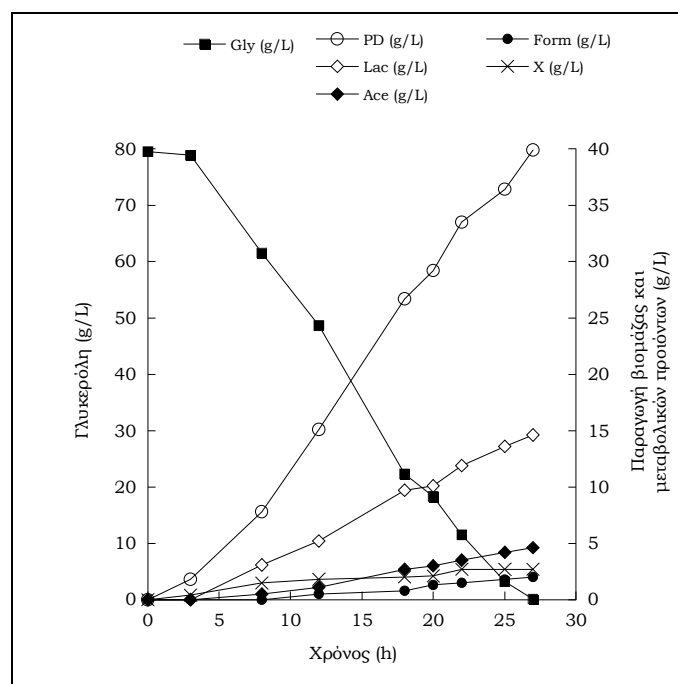
Γράφημα III-42: Συσχέτιση της παραγωγικότητας και της αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης, κατά την αύξηση του στελέχους *Citrobacter freundii* FMCC- B 294 (VK-19) σε ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα.

Λαμβάνοντας υπόψη ότι η καλλιέργεια με $Gly_0=80$ g/L συνδυάζει την μέγιστη κυτταρική αύξηση ($X_{max}=2,5$ g/L) και παραγωγικότητα της 1,3-προπανοδιόλης (1,53 g/L/h) διενεργήθηκε μία επιπλέον καλλιέργεια στην ίδια αρχική συγκέντρωση αλλά με διαφορετικό τύπο βιομηχανικής γλυκερόλης. Επιλέχθηκε ως υπόστρωμα η βιομηχανική γλυκερόλη καθαρότητας 90,0 % w/w (BG₂), καθώς στην καλλιέργεια του εν λόγω υποστρώματος με $Gly_0=20$ g/L σημειώθηκε η μεγαλύτερη διάρκεια ζύμωσης, υποδηλώνοντας ότι απαιτήθηκε περισσότερος χρόνος από τον μικροοργανισμό να προσαρμοστεί στις προσμίξεις. Όπως απεικονίζεται και στο Γράφημα III-43α, μετά από 30 ώρες ζύμωσης σχηματίστηκαν 36,5 g/L 1,3-προπανοδιόλης και 12,1 g/L γαλακτικού οξέος. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της εν λόγω καλλιέργειας με τα αντίστοιχα που επιτεύχθηκαν στην καλλιέργεια με βιομηχανική γλυκερόλη περιεκτικότητας 81,0 % w/w (BG₁) (Γράφημα III-43β), προκύπτει ότι η συγκέντρωση της διόλης αν και χαμηλότερη παραμένει ικανοποιητική. Πιθανόν το είδος των προσμίξεων της γλυκερόλης να επηρέασε την τελική συγκέντρωση του μεταβολίτη και όχι η περιεκτικότητα του υποστρώματος σε γλυκερόλη, δεδομένου ότι η βιομηχανική γλυκερόλη καθαρότητας 90,0 % w/w (BG₂) είχε ως υλικό εκκίνησης για την παραγωγή βιοντίτζελ χρησιμοποιούμενα μαγειρικά λίπη, ενώ η BG₁ φυτικά έλαια. Σημειώνεται δε, ότι και στα δύο υποστρώματα η παραγόμενη βιομάζα έλαβε την ίδια τιμή 2,7 g/L. Επομένως μπορεί να θεωρηθεί ότι ο μικροοργανισμός είναι ικανός να μεταβολίσει βιομηχανική γλυκερόλη προς παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης, χωρίς να επηρεάζεται σημαντικά από το είδος των προσμίξεων και σε συγκεντρώσεις υποστρώματος μεγαλύτερες από 20 g/L.



Γράφημα III-43α: Γραφική παράσταση της κατανάλωσης γλυκερόλης και παραγωγής βιομάζας(X-g/L), 1,3-προπανοδιόλης (PD-g/L), γαλακτικού (Lac-g/L), οξικού (Ace-g/L) και μυρμηκικού (Form-g/L) οξέος σε συνάρτηση με τον χρόνο, κατά την αύξηση του στελέχους *Citrobacter freundii* FMCC- B 294 (VK-19) σε ασυνεχή καλλιέργεια με $Gly_0=80$ g/L (περιεκτικότητας 90,0% w/w, υλικό εκκίνησης για την παραγωγή βιοκαυσίμου χρησιμοποιούμενα μαγειρικά έλαια)

Συνθήκες καλλιέργειας: αναερόβια ασυνεχής καλλιέργεια (εμφύσηση N_2 με ροή 0,1LPM) σε βιοαντιδραστήρα 1,2-L, pH=7,0±0,2, θερμοκρασία 30 °C και ανάδευση 150 rpm.



Γράφημα III-43β: Γραφική παράσταση της κατανάλωσης γλυκερόλης και παραγωγής βιομάζας(X-g/L), 1,3-προπανοδιόλης (PD), γαλακτικού (Lac-g/L), οξικού (Ace-g/L) και μυρμηκικού (Form-g/L) οξέος σε συνάρτηση με τον χρόνο, κατά την αύξηση του στελέχους *Citrobacter freundii* FMCC- B 294 (VK-19) σε ασυνεχή καλλιέργεια με $Gly_0=80$ g/L (περιεκτικότητας 81,0 % w/w, υλικό εκκίνησης για την παραγωγή βιοκαυσίμου φυτικά έλαια).

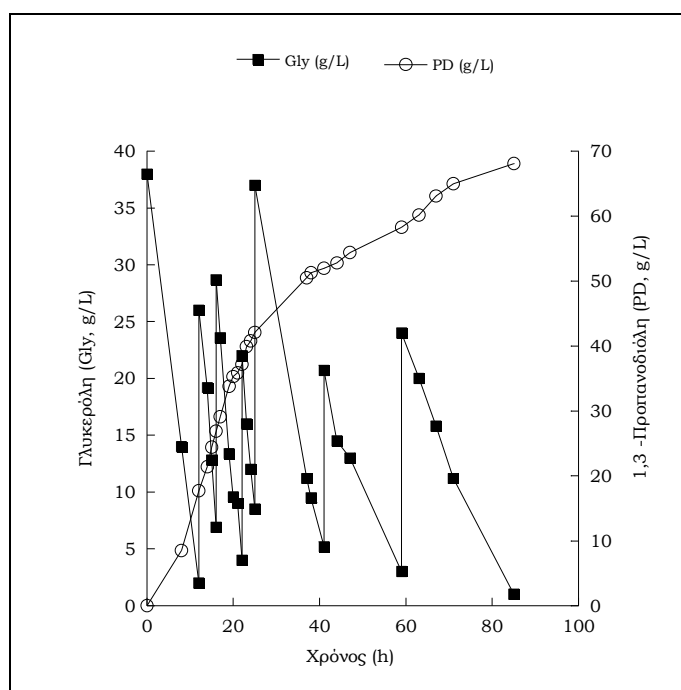
Συνθήκες καλλιέργειας: αναερόβια ασυνεχής καλλιέργεια (εμφύσηση N_2 με ροή 0,1LPM) σε βιοαντιδραστήρα 1,2-L, pH=7,0±0,2, θερμοκρασία 30 °C και ανάδευση 150 rpm.

Κρίνοντας από τα παραπάνω αποτελέσματα μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι παρά την κυτταρική αύξηση, την κατανάλωση γλυκερόλης και παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης που παρατηρήθηκαν σε καλλιέργειες με υψηλή αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης, η προσάυξηση της Gly_0 στο εύρος από 150 έως 170 g/L, οδήγησε σε σχετικά ισχυρή παρεμπόδιση υποστρώματος προς στέλεχος. Ωστόσο, το συμπέρασμα αυτό εγείρει το ερώτημα αν η συσσώρευση προσμίξεων που περιέχονται στην βιομηχανική γλυκερόλη παρεμπόδισαν την κατανάλωση του υποστρώματος, ή ήταν το στέλεχος, το ίδιο, που δεν ήταν σε θέση να αφομοιώσει ποσότητες γλυκερόλης άνω των 100 g/L.

III.5.3. Ημι-συνεχής καλλιέργεια για την παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης

Μολονότι στις ασυνεχείς καλλιέργειες ο μικροοργανισμός είχε την ικανότητα να αναπτυχθεί ακόμη και σε αρκετά υψηλή συγκέντρωση γλυκερόλης, όπως τα 170 g/L, εντούτοις, οι τιμές αυτές του υποστρώματος είχαν σαν συνέπεια την μείωση του ρυθμού κατανάλωσης. Ως εκ τούτου, πραγματοποιήθηκε ημι-συνεχής καλλιέργεια με στόχο, αφενός μεν την βελτίωση της αφομοίωσης του υποστρώματος, αφετέρου δε την πιθανή ενίσχυση της σύνθεσης μεταβολικών προϊόντων. Για την πειραματική αυτή διαδικασία επιλέχθηκε αρχική τιμή $Gly_0=40$ g/L, καθώς αποτέλεσε τον βέλτιστο συνδυασμό υψηλού συντελεστή απόδοσης 1,3-προπανοδιόλης (0,53 g/L) και παραγωγικότητας (1,53 g/L/h).

Όπως απεικονίζεται και στα Γραφήματα III-44α και III-44β τις πρώτες 24 ώρες της ζύμωσης είχε μεταβολιστεί σχεδόν η μισή ποσότητα της συνολικής καταναλωθείσας γλυκερόλης (~90 g/L). Ο ειδικός ρυθμός κατανάλωσης υποστρώματος (q_s) έλαβε την μέγιστη τιμή 1,15 g/g h, 15 ώρες μετά τον εμβολιασμό. Μόλις πραγματοποιήθηκε και η τρίτη ανατροφοδότηση στο μέσο της καλλιέργειας, ο ρυθμός πρόσληψης της γλυκερόλης μειώθηκε και τελικά μετά από 86 ώρες ζύμωσης μεταβολίστηκαν 172,3 g/L γλυκερόλης.

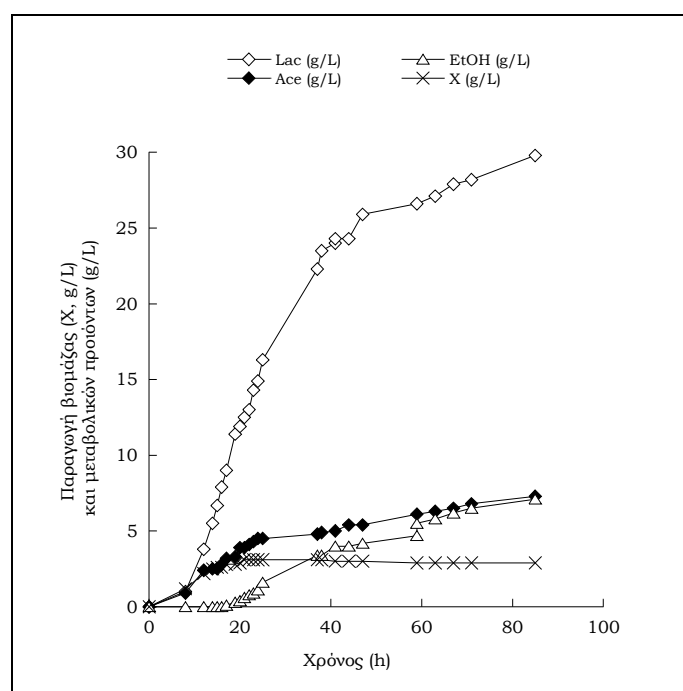


Γράφημα III-44α: Κατανάλωση γλυκερόλης (Gly–g/L) και παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης (PD–g/L), κατά την αύξηση του στελέχους *Citrobacter freundii* FMCC- B 294 (VK-19) σε ημι-συνεχή καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα.

Συνθήκες καλλιέργειας: αναερόβια ημι-συνεχής καλλιέργεια (εμφύσηση N_2 με ροή 0,1LPM) σε βιοαντιδραστήρα 1,2-L, pH=7,0±0,2, θερμοκρασία 30 °C και ανάδευση 150 rpm.

Η 1,3-προπανοδιόλη αποτέλεσε τον κύριο μεταβολίτη σε όλη την διάρκεια της ζύμωσης και 68,1 g/L σχηματίστηκαν. Η αρχικά υψηλή παραγωγικότητα της διόλης 1,62 g/L/h επιτεύχθηκε τις

πρώτες 24 ώρες της ζύμωσης και μειώθηκε στην τιμή 0,79 g/L/h έως το τέλος της διεργασίας. Ομοίως και η τιμή του συντελεστή απόδοσης της διόλης ανά καταναλωθείσα γλυκερόλη έφτασε στην μέγιστη τιμή 0,50 g/g τις πρώτες 24 ώρες της ζύμωσης και μειώθηκε στην τιμή 0,40 g/g στο τέλος της καλλιέργειας. Η παραγωγή της διόλης συνοδεύτηκε από το σχηματισμό 29,8 g/L γαλακτικού και 7,3 g/L οξικού οξέος, καθώς και μικρότερων ποσοτήτων αιθανόλης και μυρμηκικού οξέος (5,5 g/L και 1,3 g/L, αντίστοιχα), χωρίς να παρατηρηθούν σημαντικές μεταβολές στο ρυθμό σχηματισμού των μεταβολιτών αυτών. Ο συντελεστής απόδοσης γαλακτικού οξέος ανά καταναλωθείσα γλυκερόλη $Y_{Lac/Gly}$ έλαβε την τιμή 0,17 g/g. Τέλος η κυτταρική αύξηση ήταν μεγαλύτερη τις πρώτες 12 ώρες της ζύμωσης, χωρίς να παρατηρηθεί ιδιαίτερη φάση προσαρμογής (lag phase) στον αυξητικό κύκλο και η μέγιστη παραγόμενη βιομάζα ήταν 3,1 g/L.



Γράφημα III-44β: Παραγωγή βιομάζας (X-g/L), αιθανόλης (EtOH-g/L), γαλακτικού (Lac-g/L), μυρμηκικού (Form-g/L) και οξικού οξέος (Ace-g/L), κατά την αύξηση του στελέχους *Citrobacter freundii* FMCC- B 294 (VK-19) σε ημι-συνεχή καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα.

Συνθήκες καλλιέργειας: αναερόβια ημι-συνεχής καλλιέργεια (εμφύσηση N_2 με ροή 0,1LPM) σε βιοαντιδραστήρα 1,2-L, pH=7,0±0,2, θερμοκρασία 30 °C και ανάδευση 150 rpm.

Από όλα τα παραπάνω αποτελέσματα, είναι προφανές ότι η ημι-συνεχής καλλιέργεια ήταν η πιο αποτελεσματική για την κατανάλωση γλυκερόλης, καθώς και για τον σχηματισμό 1,3-προπανοδιόλης. Παράλληλα η βιομηχανική γλυκερόλη, προερχόμενη από την εταιρεία "ADM Industries", αποδείχθηκε ένα εντελώς κατάλληλο υπόστρωμα για τη βιοσύνθεση της διόλης, από το στέλεχος *C. freundii* FMCC- B 294 (VK-19).

III.5.4 Επίδραση μη-ασηπτικών συνθηκών καλλιέργειας στην σύνθεση μεταβολικών προϊόντων κατά την αύξηση του στελέχους *Citrobacter freundii* FMCC-B 294 (VK-19) σε υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στα προηγούμενα κεφάλαια, η χρησιμοποίηση ενός οικονομικού υποστρώματος όπως η βιομηχανική γλυκερόλη σε συνδυασμό με την εφαρμογή μη ασηπτικών συνθηκών καλλιέργειας, αποτελούν μια οικονομικά συμφέρουσα διεργασία για τη βιομηχανική παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης. Υπό αυτό το πρίσμα διενεργήθηκαν ασυνεχείς καλλιέργειες και μία ημι-συνεχής καλλιέργεια υπό μη-ασηπτικές συνθήκες, με στόχο να εξεταστεί η δυνατότητα του στελέχους για παραγωγή μεταβολιτών υπό τις συνθήκες αυτές.

III.5.5.1 Ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα υπό μη-ασηπτικές συνθήκες

Αρχικά διενεργήθηκαν ασυνεχείς καλλιέργειες με την αρχική συγκέντρωση της γλυκερόλης να κυμαίνεται από 40 έως 170 g/L. Η παραγόμενη βιομάζα, η συνολική κατανάλωση του υποστρώματος και οι τελικές συγκεντρώσεις των μεταβολικών προϊόντων, δίνονται στον Πίνακα III-21.

Πίνακας III-21: Επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης στην παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης (PD), οξικού (Ace) και γαλακτικού (Lac) και οξέος, κατά την αύξηση του στελέχους *Citrobacter freundii* FMCC-B 294 (VK-19), σε ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα υπό μη ασηπτικές συνθήκες καλλιέργειας.

Gly ₀ (g/L)	Gly _c (g/L)	Χρόνος (h)	X (g/L)	Συγκέντρωση μεταβολικών προϊόντων (g/L)			
				PD	Lac	Ace	EtOH
~40	42,5	14	2,2	21,6	4,1	3,8	-
~80	79,2	27	2,5	40,2	15,9	4,9	0,8
~100	97,1	38	2,3	43,5	21,2	3,9	2,5
~150	95,6	70	1,8	35,7	26,9	3,5	7,0
~170	87,8	96	1,8	33,4	29,6	3,5	7,8

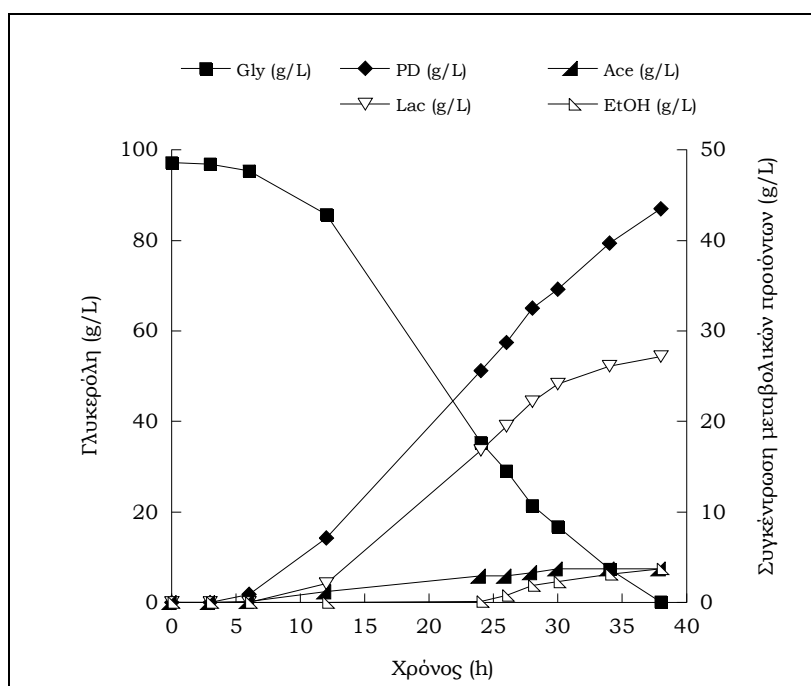
Συνθήκες καλλιέργειας: αναερόβιες ασυνεχείς καλλιέργειες (εμφύσηση N₂ με ροή 0,1LPM) σε βιοαντιδραστήρα 1,2-L, pH=7,0±0,2, θερμοκρασία 30 °C και ανάδευση 150 rpm.

Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν με διαφορετικά αρχικά εμβόλια, ενώ το κάθε σημείο της ζύμωσης είναι ο μέσος όρος δυο ανεξαρτήτων πειραμάτων.

Gly₀: αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης, Gly_c: καταναλωθείσα γλυκερόλη, X: μέγιστη παραγόμενη βιομάζα.

Όπως φαίνεται και στα δεδομένα του Πίνακα III-21, σε όλες τις καλλιέργειες ανεξάρτητα από την αρχική συγκέντρωση του υποστρώματος, παρατηρήθηκε κυτταρική αύξηση. Η μέγιστη παραγωγή βιομάζας πραγματοποιήθηκε στην καλλιέργεια με Gly₀=80 g/L και μειώθηκε από την

τιμή 2,5 στα 1,8 g/L, όταν η αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης ξεπέρασε τα 150 g/L. Αξίζει να αναφερθεί ότι, παρά την σχετική μείωση της συγκέντρωσης της βιομάζας, δεν σημειώθηκε διακοπή της κυτταρικής αύξησης, ούτε της αφομοίωσης του υποστρώματος. Η κατανάλωση της γλυκερόλης ήταν πλήρης και ταχύτατη έως την $Gly_0=100$ g/L, ενώ πέραν της τιμής αυτής ένα σημαντικό ποσοστό από τις ολοένα αυξανόμενες συγκεντρώσεις γλυκερόλης στο μέσο της καλλιέργειας, παρέμενε ακατανάλωτο μετά και το ουσιαστικό τέλος της ζύμωσης. Ειδικότερα όταν στο μέσο καλλιέργειας περιέχονταν ~170 g/L γλυκερόλης, το ποσοστό του ακατανάλωτου υποστρώματος έφτασε το ~51% w/w, ενώ και η διάρκεια της ζύμωσης παρατάθηκε σημαντικά. Αναφορικά με τη σύνθεση της 1,3-προπανοδιόλης παρατηρήθηκε σταδιακή αύξηση, έως ότου η συγκέντρωση γλυκερόλης φτάσει την τιμή των 100 g/L. Η μέγιστη συγκέντρωση ήταν 43,5 g/L και επιτεύχθηκε στην καλλιέργεια με $Gly_0=100$ g/L (Γράφημα III-43), που αντιστοιχεί σε συντελεστή απόδοσης παραχθείσας γλυκερόλης ανά καταναλωθείσα γλυκερόλη $Y_{PD/Gly}=0,45$ g/g και παραγωγικότητα 1,14 g/L/h. Ωστόσο, για μεγαλύτερες τιμές αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης (δηλαδή 150 και 170 g/L), η συγκέντρωση της διόλης μειώθηκε αισθητά, με συνέπεια στην καλλιέργεια με $Gly_0=170$ g/L, να φτάσει μόλις τα 33,4 g/L.



Γράφημα III-45: Γραφική παράσταση της κατανάλωσης γλυκερόλης και παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης (PD-g/L), γαλακτικού οξέος (Lac - g/L), οξικού οξέος (Ace-g/L) και αιθανόλης (EtOH-g/L) σε συνάρτηση με τον χρόνο, κατά την αύξηση του στελέχους *Citrobacter freundii* FMCC- B 294 (VK-19) σε ασυνεχή καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα με $Gly_0=100$ g/L, υπό μη-ασηπτικές.

Συνθήκες καλλιέργειας: αναερόβια ασυνεχής καλλιέργεια (εμφύσηση N_2 με ροή 0,1LPM) σε βιοαντιδραστήρα 1,2-L, pH=7,0±0,2, θερμοκρασία 30 °C και ανάδευση 150 rpm.

Αντίθετα η παραγωγή του γαλακτικού οξέος και αιθανόλης αυξήθηκαν προοδευτικά, με την προσθήκη περισσότερης γλυκερόλης στο μέσο της καλλιέργειας. Συγκεκριμένα οι υψηλότερες

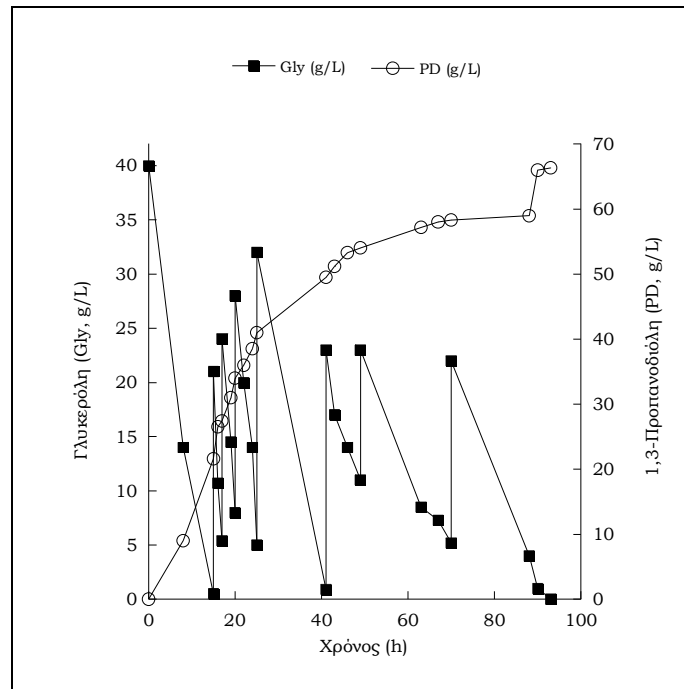
συγκεντρώσεις $Lac_{max}=29,6$ g/L και $EtOH_{max}=7,8$ g/L, επιτεύχθηκαν στην καλλιέργεια με $Gly_0=170$ g/L. Σχετικά με τον σχηματισμό οξικού οξέος οι ποσότητες που εκκρίθηκαν στο μέσο της καλλιέργειας παρέμειναν χαμηλές (3,5 έως 4,9 g/L), ανεξάρτητα από την αρχική συγκέντρωση υποστρώματος.

Συγκρίνοντας με τα αντίστοιχα αποτελέσματα των ασηπτικών ασυνεχών καλλιεργειών (Πίνακας III-20) προκύπτουν δύο συμπεράσματα: πρώτον, ότι η αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης του υποστρώματος επέδρασε ομοιοτρόπως στον μεταβολισμό της γλυκερόλης και την σύνθεση μεταβολιτών, ανεξάρτητα από την εφαρμογή ασηπτικών ή μη συνθηκών. Δεύτερον, η κυτταρική αύξηση, η κατανάλωση του υποστρώματος, καθώς και η παραγωγή της 1,3-προνοδιόλης δεν επηρεάστηκαν σημαντικά από την εφαρμογή των μη-ασηπτικών συνθηκών. Πιο αναλυτικά, η μέγιστη παραγόμενη βιομάζα είχε την ίδια τιμή 2,5 g/L και σημειώθηκε στις καλλιέργειες με $Gly_0=80$ g/L. Η συνολική καταναλωθείσα γλυκερόλη ήταν ~0,5-1,0 g/L μικρότερη στις μη-ασηπτικές καλλιέργειες με $Gly_0 \geq 80$ g/L. Ομοίως στις μη-αποστειρωμένες καλλιέργειες παρατηρήθηκε μείωση στην συγκέντρωση της παραγόμενης διόλης, με την μεγαλύτερη διαφορά 2,5 g/L να καταγράφεται στις καλλιέργειες με $Gly_0=100$ g/L και 150 g/L. Από την άλλη πλευρά η σύνθεση του γαλακτικού οξέος ευνοήθηκε σε μικρό βαθμό στις μη-ασηπτικές καλλιέργειες με $Gly_0 \geq 80$ g/L. Έτσι σημειώθηκε αύξηση της συγκέντρωσης του οξέος που κυμάνθηκε από 0,6-1,3 g/L.

Σημειώνεται ότι κατά τη διάρκεια των μη-ασηπτικών ζυμώσεων, προκειμένου να παρατηρηθεί και μελετηθεί κατά πόσο διατηρείται η καθαρότητα της καλλιέργειας, λαμβάνονταν περιοδικώς δείγματα τα οποία μετά από χρώση κατά Gram, ελέγχονταν στο μικροσκόπιο. Οι μικροσκοπικές παρατηρήσεις έδειξαν ότι ο μικροοργανισμός *C. freundii* ήταν ο κυρίαρχος μικροοργανισμός στο μέσο της καλλιέργειας. Κατά συνέπεια η έστω και αμελητέα αύξηση της συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέος και της αιθανόλης ενδεχομένως να προκλήθηκε από μια μικρή παρουσία άλλων άγνωστων μικροοργανισμών λόγω των μη ασηπτικών συνθηκών.

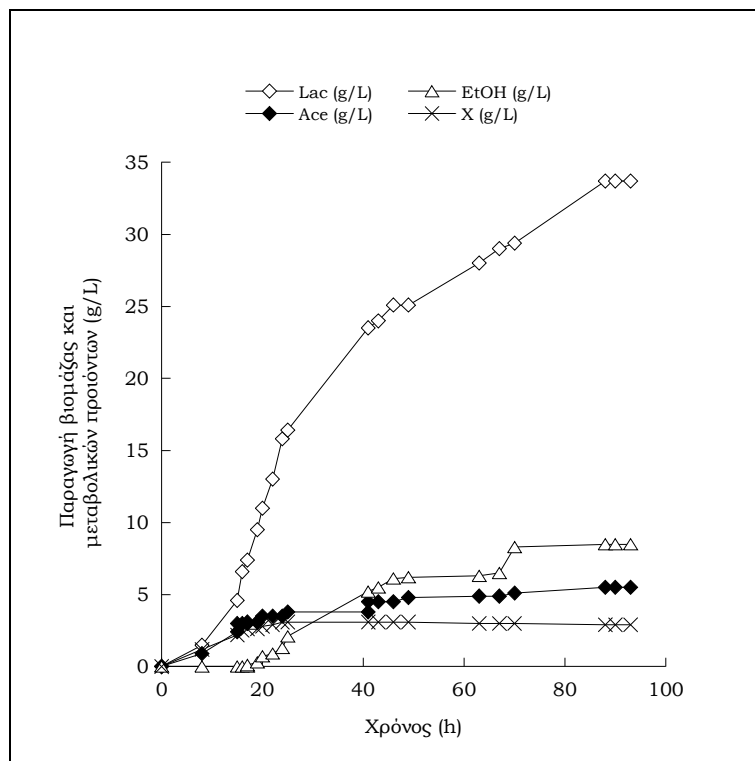
III.5.5.2. Ημι-συνεχής καλλιέργεια υπό μη-ασηπτικές συνθήκες

Δεδομένης της ικανότητας του στελέχους να αυξηθεί σε μη-ασηπτικές συνθήκες πραγματοποιήθηκε μια επιπλέον ημι-συνεχής καλλιέργεια, με στόχο της βελτίωσης της παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης στις συνθήκες αυτές. Όπως απεικονίζεται και στα Γραφήματα III-46α και III-46β, μετά από 93 ώρες, ζύμωσης 175,8 g/L υποστρώματος μετατράπηκαν σε 66,3 g/L 1,3-προπανοδιόλης και 33,7 g/L γαλακτικού οξέος. Η σύνθεση των κυρίων μεταβολιτών συνοδεύτηκε από τον σχηματισμό 8,3 g/L αιθανόλης και 6,9 g/L οξικού οξέος.



Γράφημα III-46α: Κατανάλωση γλυκερόλης (Gly–g/L) και παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης (PD–g/L), κατά την αύξηση του στελέχους *Citrobacter freundii* FMCC- B 294 (VK-19) σε ημι-συνεχή καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα, υπό μη-ασηπτικές συνθήκες.

Συνθήκες καλλιέργειας: αναερόβια ημι-συνεχής καλλιέργεια (εμφύσηση N₂ με ροή 0,1LPM) σε βιοαντιδραστήρα 1,2-L, pH=7,0±0,2, θερμοκρασία 30 °C και ανάδευση 150 rpm.



Γράφημα III-46β: Παραγωγή βιομάζας (X – g/L), αιθανόλης (EtOH – g/L), γαλακτικού (Lac – g/L), μυρμηκικού (Form – g/L) και οξικού οξέος (Ace – g/L), κατά την αύξηση του στελέχους *Citrobacter freundii* FMCC- B 294 (VK-19) σε ημι-συνεχή καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα, υπό μη-ασηπτικές συνθήκες.

Συνθήκες καλλιέργειας: αναερόβια ημι-συνεχής καλλιέργεια (εμφύσηση N₂ με ροή 0,1LPM) σε βιοαντιδραστήρα 1,2-L, pH=7,0±0,2, θερμοκρασία 30 °C και ανάδευση 150 rpm.

Τις πρώτες 24 ώρες της ζύμωσης πραγματοποιήθηκαν τέσσερις ανατροφοδοτήσεις και είχε μεταβολιστεί περισσότερη από την μισή ποσότητα της συνολικής καταναλωθείσας γλυκερόλης (~95 g/L). Ο ειδικός ρυθμός κατανάλωσης υποστρώματος (q_s) έλαβε την μέγιστη τιμή 0,89 g/g/h, 23 ώρες μετά τον εμβολιασμό και στη συνέχεια μειώθηκε. Ομοiotρόπως, η αρχικά υψηλή παραγωγικότητα της διόλης 1,58 g/L/h επιτεύχθηκε τις πρώτες 24 ώρες της ζύμωσης και μειώθηκε στην τιμή 0,71 g/L/h έως το τέλος της διεργασίας. Η τιμή του συντελεστή απόδοσης της διόλης ανά καταναλωθείσα γλυκερόλη έφτασε στην μέγιστη τιμή 0,50 g/g τις πρώτες 12 ώρες της ζύμωσης και μειώθηκε στην τιμή 0,38 g/g στο τέλος της καλλιέργειας.

Συγκρίνοντας τις ημι-συνεχείς καλλιέργειες σε ασηπτικές και μη συνθήκες (Πίνακας III-22), προκύπτει ότι όπως και στην περίπτωση των ασυνεχών καλλιεργειών, η εφαρμογή των μη-ασηπτικών συνθηκών δεν επηρέασαν την αύξηση του μικροοργανισμού. Έτσι και στις δύο καλλιέργειες η μέγιστη βιομάζα ανήλθε στα 3,3 g/L. Μικρές διαφοροποιήσεις παρατηρήθηκαν στην κατανάλωση του υποστρώματος και στην τελική τιμή των μεταβολικών προϊόντων. Στην αναποστειρωτή καλλιέργεια η συγκέντρωση της καταναλωθείσας γλυκερόλης αυξήθηκε κατά 2,5 g/L, αλλά λόγω του μικρότερου ρυθμού κατανάλωσης η ζύμωση παρατάθηκε κατά 7 ώρες.

Πίνακας III-22: Σύγκριση της καταναλωθείσας γλυκερόλης, της μέγιστης βιομάζας και της συγκέντρωσης μεταβολικών προϊόντων, κατά την αύξηση του στελέχους *Citrobacter freundii* FMCC-B 294 (VK-19), σε ημι-συνεχείς καλλιέργειες υπό ασηπτικές και μη-ασηπτικές συνθήκες.

Συνθήκες καλλιέργειας	Χρόνος (h)	Gly _C (g/L)	X (g/L)	Συγκέντρωση μεταβολικών προϊόντων (g/L)				
				PD	Lac	Ace	EtOH	Form
Ασηπτικές	86	172,3	3,3	68,1	29,8	7,3	5,5	1,3
Μη-ασηπτικές	93	175,8	3,3	66,3	33,7	6,9	8,3	0,9

Συνθήκες καλλιέργειας: αναερόβιες ημι-συνεχείς καλλιέργειες (εμφύσηση N₂ με ροή 0,1LPM) σε βιοαντιδραστήρα 1,2-L, υπό ασηπτικές και μη-ασηπτικές συνθήκες, pH=7,0±0,2, θερμοκρασία 30 °C και ανάδευση 150 rpm.

Gly₀: αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης, Gly_C: καταναλωθείσα γλυκερόλη, X: μέγιστη παραγόμενη βιομάζα.

Όπως φαίνεται και στα δεδομένα του Πίνακα III-23 η παραγωγικότητα της 1,3-προπανοδιόλης ήταν μεγαλύτερη στην μη-ασηπτική καλλιέργεια μόνο κατά την διάρκεια των πρώτων 12 ωρών της ζύμωσης. Στην συνέχεια παρέμεινε χαμηλότερη και ως εκ τούτου η τελική συγκέντρωση της παραγόμενης διόλης ήταν 1,8 g/L μικρότερη. Ομοίως και η τιμή του συντελεστή απόδοσης της διόλης ανά καταναλωθείσα γλυκερόλη είχε την ίδια τιμή στις δύο καλλιέργειες τις

πρώτες 24 ώρες μετά τον εμβολιασμό, και εκ τότε παρέμεινε μικρότερη στην μη-ασηπτική καλλιέργεια. Αντίθετα η παραγωγή του γαλακτικού οξέος και της αιθανόλης ευνοήθηκαν από την εφαρμογή των μη-ασηπτικών και έτσι καταγράφηκε μικρή αύξηση στην τελική συγκέντρωση και των δύο μεταβολιτών της τάξης των 3,9 g/L και 2,8 g/L, αντίστοιχα. Αξίζει να σημειωθεί ότι όπως και στην περίπτωση των ασυνεχών καλλιιεργειών προκειμένου να διασφαλιστεί η καθαρότητα της καλλιέργειας, λαμβάνονταν περιοδικώς δείγματα τα οποία μετά από χρώση κατά Gram, ελέγχονταν στο μικροσκόπιο. Οι μικροσκοπικές παρατηρήσεις έδειξαν ότι ο μικροοργανισμός *C. freundii* ήταν ο κυρίαρχος μικροοργανισμός στο μέσο της καλλιέργειας. Κατά συνέπεια η έστω και μικρή αύξηση της συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέος και της αιθανόλης ενδεχομένως να προκλήθηκε από μια μικρή παρουσία άλλων άγνωστων μικροοργανισμών λόγω των μη ασηπτικών συνθηκών.

Πίνακας III-23: Σύγκριση των συντελεστών απόδοσης της παραχθείσας 1,3-προπανοδιόλης ανά αναλωθείσα γλυκερόλη και της παραγωγικότητας της διόλης στα στάδια των ημι-συνεχών καλλιιεργειών του στελέχους *Citrobacter freundii* FMCC-B 294 (VK-19), υπό ασηπτικές και μη-ασηπτικές συνθήκες.

Χρονικό διάστημα καλλιέργειας (h)	Συντελεστής απόδοσης $Y_{PD/Gly}$ (g/g)*		Παραγωγικότητα PD (g/L/h)*	
	Ασηπτικές συνθήκες	Μη-ασηπτικές συνθήκες	Ασηπτικές συνθήκες	Μη-ασηπτικές συνθήκες
0-12	0,50	0,50	1,42	1,44
12-24	0,48	0,48	1,62	1,58
24-36	0,44	0,43	1,61	1,29
36-48	0,41	0,39	1,27	1,01
48-86	0,40	0,38	0,79	0,79
0-86	0,40	0,38	0,79	0,71

Συνθήκες καλλιέργειας: ημι-συνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα 1,2-L, με ενεργό όγκο 0,9 L, υπό ασηπτικές και μη-ασηπτικές συνθήκες, αρχική τιμή pH=7±0,2 και θερμοκρασία 30°C.

Gly₀: αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης, Gly_C: καταναλωθείσα γλυκερόλη, X: μέγιστη παραγόμενη βιομάζα.

*Ο υπολογισμός του συντελεστή απόδοσης και της παραγωγικότητας της διόλης βασίστηκε στα συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα.

Τα παραπάνω αποτελέσματα φανερώνουν, όπως και στις περιπτώσεις των υπολοίπων μη-ασηπτικών καλλιιεργειών της παρούσας μελέτης, ότι η εφαρμογή των μη-ασηπτικών συνθηκών συνιστάται για τον μεταβολισμό της βιομηχανικής γλυκερόλης.

Το παρόν κεφάλαιο έχει δημοσιευθεί:

Maria Metsoviti, An-Ping Zeng, Apostolis A. Koutinas, Seraphim Papanikolaou (2013). Enhanced 1,3-propanediol production by a newly isolated *Citrobacter freundii* strain cultivated on biodiesel-derived waste glycerol through sterile and non-sterile bioprocesses. *Journal of Biotechnology* 163:408-418.

IV. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τις τελευταίες δεκαετίες η αυξημένη ζήτηση πετρελαίου από τις ραγδαία αναπτυσσόμενες χώρες, η διαφαινόμενη εξάντληση των αποθεμάτων, η συνεπακόλουθη αύξηση των τιμών του και η ασταθής πολιτική κατάσταση στις πετρελαιοπαραγωγές χώρες, έχουν στρέψει το ενδιαφέρον της παγκόσμιας οικονομίας στη χρήση εναλλακτικών βιοτεχνολογικών λύσεων για την αύξηση της χρήσης των ανανεώσιμων πόρων. Προς την κατεύθυνση αυτή κινείται και η παραγωγή βιοκαυσίμων, όπως το βιολογικό πετρέλαιο (βιοντίζελ), η βιοαιθανόλη και το βιοαέριο. Το βιοντίζελ θεωρείται ανανεώσιμη πηγή ενέργειας λόγω της ανανεώσιμης προέλευσης των πρώτων υλών που συμμετέχουν στην παραγωγή του και η χρήση του παρουσιάζει σημαντικά περιβαλλοντικά και ενεργειακά οφέλη. Παρόλα αυτά η ραγδαία αύξηση της παραγωγής του, τόσο σε ευρωπαϊκό, όσο και σε παγκόσμιο επίπεδο, είχε σαν συνέπεια την συσσώρευση αντίστοιχα μεγάλων ποσοτήτων του κύριου παραπροϊόντος παραγωγής του, που είναι η βιομηχανική/ακατέργαστη γλυκερόλη. Υπενθυμίζεται ότι παράγεται περίπου 1 kg ακατέργαστης γλυκερόλης ανά 10 kg παραγόμενου βιοντίζελ. Οι ποσότητες αυτές υπερβαίνουν τη ζήτηση σε γλυκερόλη με αποτέλεσμα αφενός μεν την δραματική μείωση της τιμής της, αφετέρου δε την αδυναμία διάθεσης των παραγόμενων ποσοτήτων που συχνά οδηγεί στη δαπανηρή λύση της απόρριψής της. Αν και η καθαρή γλυκερόλη έχει πολλές βιομηχανικές εφαρμογές, η χρησιμοποίηση της ακατέργαστης γλυκερόλης είναι ακόμη περιορισμένη λόγω της σύνθεσής της. Προσμίξεις, όπως υπολειμματική μεθανόλη, καταλύτες, άλατα, ελεύθερα λιπαρά οξέα και μεθυλικοί εστέρες περιορίζουν την εφαρμογή στην χημική και φαρμακευτική βιομηχανία, χωρίς προ-επεξεργασία, ενώ το κόστος του καθαρισμού κάνει την εφαρμογή οικονομικά ανέφικτη (Yazdani & Gonzalez, 2007). Ως εκ τούτου, ενώ κατά το παρελθόν αποτελούσε ένα επιθυμητό παραπροϊόν που μπορούσε να συμβάλλει στην οικονομική βιωσιμότητα των εργοστασίων, πλέον θεωρείται απόβλητο με μηδενική ή/και αρνητική αξία. Αρκετά συχνά οι μονάδες παραγωγής επιβαρύνονται είτε με το κόστος καθαρισμού, ή με το κόστος μεταφοράς και απόρριψης, με αποτέλεσμα η συνολική αξία της επεξεργασίας να φτάνει ή/και να ξεπερνά την αξία της γλυκερόλης (Dasari, 2007; Johnson & Taconi, 2007; Yazdani & Gonzalez, 2007). Στις Η.Π.Α η τιμή της ακάθαρτης γλυκερόλης υποδεκαπλασιάστηκε την διετία 2004-2006, με άμεση συνέπεια τη μείωση της επιχειρηματικής δραστηριότητας ή ακόμα και το κλείσιμο εργοστασίων χημικής παραγωγής γλυκερόλης (McCoy 2005; Yazdani & Gonzalez, 2007). Η σημαντική μείωση της τιμής της γλυκερόλης έχει άμεσο αντίκτυπο και στο κόστος παραγωγής του βιοντίζελ, καθώς εκτιμάται ότι το 75-95% του τελικού κόστους του βιοντίζελ προκύπτει από το οικονομικό αποτέλεσμα της διάθεσης ή επεξεργασίας των παραπροϊόντων (Yuste & Dorado, 2006; Vlysidis et al., 2011a).

Η μετατροπή της βιομηχανικής γλυκερόλης προς προϊόντα υψηλότερης αξίας θα μπορούσε να είναι μια οικονομική, όσο και οικολογική λύση για τις βιομηχανίες βιοντίζελ (Dobson et al., 2011; Johnson et al., 2007; Papanikolaou and Aggelis, 2003). Δεδομένου ότι το κόστος του υποστρώματος για μικροβιακή παραγωγή χημικών ενώσεων μπορεί να φτάσει έως και το ήμισυ του συνολικού κόστους παραγωγής, η βιομηχανική γλυκερόλη θα μπορούσε να αποτελέσει μια οικονομικά αποδοτική και άφθονη πρώτη ύλη για αυτές τις βιοδιεργασίες (Zeng & Sabra, 2011). Μέχρι σήμερα σε ερευνητικό κυρίως επίπεδο η κυριότερη και πιο ελπιδοφόρα μετατροπή της γλυκερόλης σχετίζεται με την προπανοδιολική ζύμωση, υπό αναερόβιες συνθήκες, αλλά μέχρι τώρα στην πλειοψηφία των μελετών χρησιμοποιείται καθαρή γλυκερόλη ως υπόστρωμα (Zeng & Biebl, 2002; Willke & Vorlop, 2008; Papanikolaou, 2009). Σχετικά μικρός αριθμός ερευνών έχει επικεντρωθεί στην παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης από βιομηχανική γλυκερόλη, με την πλειοψηφία των μελετών να σχετίζεται με βακτηριακά στελέχη του είδους *Klebsiella pneumoniae* και *Clostridium butyricum* (Saxena et al., 2009; Celinska et al., 2010). Ακόμη λιγότερες μελέτες χρησιμοποιούν την γλυκερόλη για την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης και αιθανόλης, ως τα κύρια προϊόντα του μικροβιακού μεταβολισμού (Barbirato & Bories, 1997; Biebl et al., 1998; Ito et al., 2005; Petrov & Petrova, 2009a,b; Oh et al., 2011; Choi et al., 2011)

Στην παρούσα πτυχιακή μελέτη 84 βακτηριακά στελέχη ερευνήθηκαν για την ικανότητά τους να μεταβολίζουν την βιομηχανική γλυκερόλη προς παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης, 2,3-βουτανοδιόλης και αιθανόλης, υπό διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας. Από αυτά, 12 στελέχη βρέθηκαν κατάλληλα να αφομοιώνουν το υπόστρωμα γλυκερόλης υπό αναερόβιες συνθήκες και 3 υπό αερόβιες, με σημαντικές διαφορές στο προφίλ των μεταβολικών προϊόντων ανάλογα με το εκάστοτε στέλεχος και τις πειραματικές συνθήκες που εφαρμόστηκαν.

Έτσι, υπό αναερόβιες συνθήκες αύξησης, μόνο σε δύο καλλιέργειες από τα τρία στελέχη του είδους *Citrobacter freundii*, συγκεκριμένα τα στελέχη FMCC-8 και FMCC B-294 (VK-19), η 1,3-προπανοδιόλη ήταν το κύριο προϊόν, ενώ στην τρίτη καλλιέργεια δεν ανιχνεύτηκε ο μεταβολίτης στο μέσο της καλλιέργειας. Ιδιαίτερα σημαντική ήταν η επίδραση των συνθηκών και αναεροβίωσης και pH στον σχηματισμό των μεταβολικών προϊόντων. Πιο χαρακτηριστική ήταν η περίπτωση των καλλιεργειών του στελέχους *K. oxytoca* FMCC-197 όταν η αύξηση πραγματοποιήθηκε υπό αναερόβιες συνθήκες και σταθερό pH, τότε παράχθηκε μίγμα 1,3-προπανοδιόλης, 2,3-βουτανοδιόλης και αιθανόλης, με την τελευταία να αποτελεί και τον κύριο μεταβολίτη. Αντίθετα στην καλλιέργεια με αυτό-παραγόμενη αναεροβίωση η 1,3-προπανοδιόλη αποτέλεσε το κύριο μεταβολικό προϊόν, ενώ η σύνθεση της 2,3-βουτανοδιόλης κατεστάλη. Στην περίπτωση της καλλιέργειας του στελέχους *Enterobacter aerogenes* FMCC-10 υπό αναερόβιες συνθήκες κύριος μεταβολίτης ήταν η αιθανόλη, όμως με την παροχή αέρα στο μέσο της καλλιέργειας η παραγωγή της περιορίστηκε και κυρίαρχος μεταβολίτης ήταν η 2,3-βουτανοδιόλη.

Τα κυριότερα στελέχη τόσο για την κατανάλωση του υποστρώματος όσο και για την σύνθεση μεταβολικών προϊόντων κρίθηκαν τα *Cl. butyricum* NRLL B-23495, *C. freundii* FMCC-B 294 (VK-19), *K. oxytoca* FMCC-197 για την παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης, καθώς και τα *C. freundii* FMCC-207 και *E. aerogenes* FMCC-10 για τον σχηματισμό 2,3-βουτανοδιόλης και αιθανόλης. Στον Πίνακα IV-1 παρουσιάζονται συνοπτικά οι μέγιστες τιμές των μεταβολικών προϊόντων, κατά την αύξηση των εν λόγω στελεχών σε υποστρώματα βιομηχανικής γλυκερόλης και εμπορικής γλυκόζης, στις διάφορες πειραματικές συνθήκες που εφαρμόστηκαν. Η μέγιστη συγκέντρωση 1,3-προπανοδιόλης (PD_{max}) 68,1 g/L, σημειώθηκε σε αναερόβια ημι-συνεχή καλλιέργεια του στελέχους *C. freundii* FMCC-B 294 (VK-19), με τον αντίστοιχο συντελεστή απόδοσης να λαμβάνει τιμή $Y_{PD/Gly}=0,40$ g/g και η παραγωγικότητα 0,79 g/L/h. Αναφορικά με την μέγιστη συγκέντρωση 2,3-βουτανοδιόλης σε υπόστρωμα ακατέργαστης γλυκερόλης (BD_{max}) 78,2 g/L, καταγράφηκε κατά την αύξηση του στελέχους *E. aerogenes* FMCC-10 σε ημι-συνεχή καλλιέργεια υπό αερόβιες συνθήκες και διακυμαινόμενου pH.

Δεδομένης της αδυναμίας δύο στελεχών (*C. freundii* FMCC-207 και *K. oxytoca* FMCC-197) να αφομοιώσουν ικανοποιητικές ποσότητες γλυκερόλης, έγινε προσθήκη εμπορικής γλυκόζης στο μέσο της καλλιέργειας, με σκοπό την βελτίωση της κυτταρικής αύξησης και πιθανή ενίσχυση του μεταβολισμού της γλυκερόλης. Και στις δύο περιπτώσεις η παρουσία της γλυκόζης στο μέσο της καλλιέργειας δεν φάνηκε να συμβάλει στην καλύτερη αφομοίωση της γλυκερόλης. Παράλληλα πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες με μοναδική πηγή άνθρακα την εμπορική γλυκόζη, με στόχο την βελτίωση της παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης, δεδομένου ότι από το υπόστρωμα αυτό δεν μπορεί να παραχθεί 1,3-προπανοδιόλη. Πράγματι, όταν η εμπορική γλυκόζη χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα για την αύξηση των στελεχών, η μέγιστη συγκέντρωση της 2,3-βουτανοδιόλης ήταν 49,4 g/L στην ημι-συνεχή καλλιέργεια του στελέχους *C. freundii* FMCC-207. Τέλος η μέγιστη παραγόμενη ποσότητα αιθανόλης από βιομηχανική γλυκερόλη ήταν ($EtOH_{max}$) 33,4 g/L και σημειώθηκε στην καλλιέργεια του στελέχους *C. freundii* FMCC-207, κατά την αύξηση του σε ημι-συνεχή καλλιέργεια. Σημειώνεται τέλος, ότι παρά την ικανοποιητική παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης από το στέλεχος *Cl. butyricum* NRLL B-23495 στο αρχικό στάδιο της πειραματικής διαδικασίας, δεν διενεργήθηκαν περαιτέρω μελέτες με το εν λόγω στέλεχος, δεδομένου ότι τα αποτελέσματα αυτών των καλλιεργειών αποτέλεσαν τη βάση σύγκρισης για την κατανάλωση γλυκερόλης και παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης με τα υπόλοιπα στελέχη. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να αξιοποιηθούν προσφάτως απομονωμένα και όχι προηγουμένως μελετημένα στελέχη των συλλογών του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων και όχι ήδη κατατεθειμένοι σε συλλογές μικροοργανισμοί. Για τους λόγους αυτούς το στέλεχος *Cl. butyricum* NRLL B-23495 δεν μελετήθηκε πιο αναλυτικά.

Πίνακας IV-1: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα παρούσας μελέτης.

Στέλεχος	Είδος καλλιέργειας	Συνθήκες καλλιέργειας			Gly _c (g/L)	Μεταβολικά προϊόντα								
		N ₂	Αέρας	pH		PD			BD			EtOH		
						g/L	g/g	g/L/h	g/L	g/g	g/L/h	g/L	g/g	g/L/h
Βιομηχανική Γλυκερόλη														
<i>K. oxytoca</i>	Ασυνεχής	-	-	7,0	~88,0	41,3	0,47	0,28	-	-	-	4,0	0,05	0,04
FMCC-197	Ασυνεχής μη-ασηπτική	-	-	7,0	~40,0	11,2	0,28	0,42	-	-	-	3,9	0,10	0,14
	Ημι-συνεχής	-	-	7,0	~128,0	50,1	0,39	0,55	-	-	-	25,2	0,20	0,28
<i>C. freundii</i>	Ασυνεχής	0,1 LPM	-	7,0	~78,0	-	-	-	1,2	0,03	0,10	26,5	0,34	0,37
FMCC-207	Ημι-συνεχής	0,1 LPM	-	7,0	~84,0	-	-	-	1,1	0,01	0,01	33,4	0,40	0,42
	Ημι-συνεχής μη-ασηπτική	0,1 LPM	-	7,0	~79,0	-	-	-	1,1	0,01	0,01	31,7	0,40	0,37
<i>E. aerogenes</i> FMCC-10	Ασυνεχής (φιάλες)	-	-	pH _{μς}	~70,0	-	-	-	25,7	0,37	0,33	3,4	0,05	0,04
	Ασυνεχής	-	-	pH _{μς}	~60,0	-	-	-	19,7	0,33	0,70	2,3	0,04	0,08
	Ημι-συνεχής	-	-	7,0	~55,0	0,7	-	-	0,3	-	-	20,9	0,38	0,39
	Ημι-συνεχής	-	0,8 LPM	pH _δ	~217,0	1,5	-	-	78,2	0,36	0,52	4,5	0,02	0,04
	Ημι-συνεχής μη-ασηπτική	-	0,8 LPM	pH _δ	~207,0	1,5	-	-	72,5	0,35	0,65	0,5	-	-
<i>C. freundii</i>	Ασυνεχής	0,1 LPM	-	7,0	~98,0	45,9	0,47	1,21	-	-	-	7,5	0,08	0,08
FMCC-B 294 (VK-19)	Ημι-συνεχής	0,1 LPM	-	7,0	~170,0	68,1	0,40	0,79	-	-	-	5,5	0,03	0,06
	Ημι-συνεχής μη-ασηπτική	0,1 LPM	-	7,0	~174,0	66,3	0,38	0,71	-	-	-	8,3	0,05	0,09
<i>Cl. butyricum</i> NRRL B- 23495	Ασυνεχής	0,1 LPM	-	6,8	~55,0	32,2	0,58	0,85	-	-	-	-	-	-

Στέλεχος	Είδος καλλιέργειας	Συνθήκες καλλιέργειας			Glu _c (g/L)	Μεταβολικά προϊόντα								
		N ₂	Αέρας	pH		PD			BD			EtOH		
						g/L	g/g	g/L/h	g/L	g/g	g/L/h	g/L	g/g	g/L/h
Εμπορική Γλυκόζη														
<i>K. oxytoca</i> FMCC-197	Ασυνεχής (φιάλες Duran)	-	-	7,0 μσ	~75,0	-	-	-	32,1	0,43	0,67	6,7	0,09	0,14
<i>C. freundii</i> FMCC-207	Ασυνεχής Ημι-συνεχής	0,1 LPM	-	6,2	~79,0	-	-	-	33,3	0,42	1,28	2,7	0,03	0,10
		0,1 LPM	-	6,2	~135,0	-	-	-	49,4	0,37	0,93	16,2	0,12	0,30

Gly_c: καταναλωθείσα γλυκερόλη, Glu_c: καταναλωθείσα γλυκόζη

Συνθήκες καλλιέργειας: α) οι ασυνεχείς καλλιέργειες σε κωνικές φιάλες πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες των 250 mL

β) οι ασυνεχείς καλλιέργειες σε κωνικές φιάλες πραγματοποιήθηκαν σε φιάλες τύπου Duran 1-L, με ενεργό όγκο 0,8 L

γ) οι ημι-συνεχείς καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε βιοαντιδραστήρα 1,2-L, με ενεργό όγκο 0,9L

δ) οι συνθήκες καλλιέργειας χωρίς παροχή αζώτου ή αέρα χαρακτηρίστηκαν ως αυτό-παραγόμενης αναερόβιωσης

IV.1 Παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης

Η ζύμωση της γλυκερόλης προς παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης σε ικανοποιητικές αποδόσεις είναι μέχρι σήμερα γνωστή μόνο από βακτήρια κυρίως των ειδών *K. pneumoniae* και *Cl. butyricum* (Petitdemange et al., 1995; Barbirato et al., 1998; Chen et al., 2003; Gonzalez-Pajuelo et al., 2004; Papanikolaou et al., 2004; Hirschmann et al., 2005; Mu et al., 2006; Ji et al., 2009; Ma et al., 2009; Otte et al., 2009; Xu et al., 2009; Gungormusler et al., 2010; Jun et al., 2010; Chatzifragkou et al., 2011a; Hiremath et al., 2011; Ringel et al., 2011; Rossi et al., 2011; Sattayasamithsathit et al., 2011; Wilkens et al., 2011). Εν τω μεταξύ, ένας μικρός αριθμός μελετών σχετίζεται με την προπανοδιολική ζύμωση από στελέχη του είδους *C. freundii* (Homann et al., 1990; Boenigk et al., 1993; Barbirato et al., 1998; Anand & Saxena, 2011) και *K. oxytoca* (Homann et al., 1990; Yang et al., 2007; Zhang et al., 2011). Ακόμη λιγότερες είναι οι μελέτες εκείνες που αφορούν την χρήση βιομηχανικής γλυκερόλης ως υπόστρωμα της εν λόγω ζύμωσης, με εμπλοκή μικροοργανισμών των ανωτέρω στελεχών.

Με βάση την διεθνή βιβλιογραφία οι υψηλότερες τιμές συγκέντρωσης 1,3-προπανοδιόλης από καθαρή γλυκερόλη κυμαίνονται από 70,0 έως 100,0 g/L, ενώ από βιομηχανική οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις φτάνουν τα 58,0 έως 80,0 g/L. Σημειώνεται ότι στην περίπτωση του υποστρώματος της καθαρής γλυκερόλης οι μέγιστες συγκεντρώσεις παρατηρήθηκαν σε καλλιέργειες ανασυνδυασμένων μικροοργανισμών (mutant ή genetically modified microorganisms). Στον Πίνακα IV-2 παρουσιάζονται τα κυριότερα βακτηριακά στελέχη που έχουν ερευνηθεί στη διεθνή βιβλιογραφία για την ικανότητα τους να μεταβολίζουν καθαρή και βιομηχανική γλυκερόλη προς παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης, οι συνθήκες καλλιέργειας και η μέγιστη συγκέντρωση του μεταβολίτη στην εκάστοτε καλλιέργεια. Στην παρούσα μελέτη κατά την διάρκεια ημι-συνεχών καλλιεργειών οι μέγιστες συγκεντρώσεις της διόλης έφτασαν τα 68,1 g/L στην ζύμωση του στελέχους *C. freundii* FMCC-B 294 (VK-19) και τα 50,1 g/L στην καλλιέργεια του στελέχους *K. oxytoca* FMCC-197. Και οι δύο τιμές αποτελούν τις μέγιστες συγκεντρώσεις της βιβλιογραφίας για φυσικά στελέχη (wild type strains) των ανωτέρω ειδών και συγκαταλέγονται στις υψηλότερες τιμές παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης από βιομηχανική γλυκερόλη. Με βάση τα όσα είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε, είναι η πρώτη φορά που πραγματοποιείται αύξηση του είδους *K. oxytoca* σε ακατέργαστη γλυκερόλη. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι κατά την διάρκεια των συνεχών και ημι-συνεχών καλλιεργειών των ανωτέρω στελεχών, η σύνθεση της διόλης συνοδεύτηκε από τον σχηματισμό γαλακτικού οξέος, ενώ μικρότερες ποσότητες αιθανόλης οξικού ή/και μυρμηκικού οξέος επίσης εκκρίθηκαν στο μέσο της καλλιέργειας. Σύμφωνα με τους Zeng et al. (1993) ο ρόλος της σύνθεσης 1,3-προπανοδιόλης κατά τον μεταβολισμό της γλυκερόλης, θεωρείται η αναγέννηση αναγωγικών ισοδυνάμων NADH_2 , ενώ η σύνθεση των υπολοίπων μεταβολικών προϊόντων, κυρίως

του οξικού οξέος ή/και της αιθανόλης, είναι αναγκαία για την παραγωγή ενέργειας υπό τη μορφή μορίων ATP, καθώς το μεταβολικό μονοπάτι πυροσταφυλικό οξύ \longrightarrow οξικό οξύ παρέχει τα αναγκαία αναγωγικά ισοδύναμα NADH_2 . Στην υποθετική περίπτωση που εκτός από 1,3-προπανοδιόλη, το μοναδικό μεταβολικό προϊόν είναι το οξικό οξύ τότε, ο μέγιστος θεωρητικός συντελεστής 1,3-προπανοδιόλης προς αναλωθείσα γλυκερόλη έχει τιμή $Y_{\text{PD/Gly}} = 0,67 \text{ mol/mol}$ ή $0,55 \text{ g/g}$, ενώ λαμβάνοντας υπόψη και τη παραγόμενη βιομάζα η τιμή μειώνεται στα $0,64 \text{ mol/mol}$ ή $0,53 \text{ g/g}$ (Zeng et al., 1993). Στην περίπτωση που η ζύμωση συνοδεύεται από την παραγωγή και άλλων προϊόντων, η τιμή του $Y_{\text{PD/Gly}}$ είναι αρκετά χαμηλότερη. Συγκεκριμένα ο σχηματισμός του γαλακτικού οξέος ως το μοναδικό παρα-προϊόν έχει σαν αποτέλεσμα την μείωση της μέγιστης θεωρητικής τιμής στα $0,50 \text{ mol}$ διόλης / mol γλυκερόλης (Zeng et al., 1993). Στην παρούσα μελέτη η παραγωγή του γαλακτικού οξέος αποτέλεσε σχεδόν το 44% της τελικής τιμής της 1,3-προπανοδιόλης στην ημι-συνεχή καλλιέργεια του *C. freundii* FMCC-B 294 (VK-19) και το 33% στο αντίστοιχο πείραμα του στελέχους *K. oxytoca* FMCC-197. Κατά συνέπεια οι συντελεστές απόδοσης $Y_{\text{PD/Gly}}$ ήταν χαμηλότεροι από τον μέγιστο θεωρητικό. Παρόλα αυτά οι τιμές $0,40 \text{ g/g}$ και $0,39 \text{ g/g}$ που επιτεύχθηκαν στα εν λόγω πειράματα κρίνονται ικανοποιητικές.

Καθώς αποδείχτηκε στην παρούσα μελέτη, η βιομηχανική γλυκερόλη αποτέλεσε ένα κατάλληλο υπόστρωμα για την παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης από τα στελέχη *C. freundii* FMCC-B 294 (VK-19) και *K. oxytoca* FMCC-197. Στην διεθνή βιβλιογραφία επικρατούν διαφορετικές απόψεις σχετικά με το την επίδραση της καθαρής και της ακατέργαστης γλυκερόλης στην αύξηση των μικροοργανισμών και στην σύνθεση της διόλης. Σε αρκετές μελέτες η μέγιστη συγκέντρωση παρατηρήθηκε σε καλλιέργειες καθαρής γλυκερόλης, ενώ σε άλλες έρευνες η βιομηχανική γλυκερόλη κρίθηκε πιο ευεργετική για τον σχηματισμό του μεταβολίτη. Μεταξύ των φυσικών στελεχών η υψηλότερη τιμή φτάνει τα $\sim 94 \text{ g/L}$, κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Cl. butyricum* AKR 102a σε υπόστρωμα καθαρής γλυκερόλης, ωστόσο η αντίστοιχη τιμή για την ζύμωση βιομηχανικής γλυκερόλης ήταν αξιοσημείωτα χαμηλότερη ($\sim 76 \text{ g/L}$) (Wilkens et al., 2011). Σε μελέτη των Mu et al. (2006) σε ημι-συνεχείς καλλιέργειες του στελέχους *K. pneumoniae* DSM 2026 οι μέγιστες συγκεντρώσεις 1,3-προπανοδιόλης ήταν $61,9 \text{ g/L}$ και $53,0 \text{ g/L}$, όταν καθαρή και ακατέργαστη γλυκερόλη, αντίστοιχα, χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα. Ομοίως και οι Hirschmann et al. (2005) ανέφεραν μέγιστες παραγόμενες ποσότητες διόλης $87,7 \text{ g/L}$ και $80,1 \text{ g/L}$ από το στέλεχος *Clostridium* sp. IK 124, όταν ο μικροοργανισμός καλλιεργήθηκε σε ημι-συνεχή πειράματα χρησιμοποιώντας καθαρή και την ακατέργαστη γλυκερόλη, αντίστοιχα, ως πηγές άνθρακα. Αντιθέτως, οι Jun et al. (2010) αποκάλυψαν ότι η παραγωγή της διόλης ήταν πιο αποτελεσματική κατά τον μεταβολισμό βιομηχανικής γλυκερόλης συγκριτικά με την καθαρή. Έτσι, $80,2$ και $63,3 \text{ g/L}$ διόλης σχηματίστηκαν, αντίστοιχα, κατά την διάρκεια ημι-συνεχών καλλιεργειών του στελέχους *K. pneumoniae* DSM 4799. Η τιμή αυτή αποτελεί, μέχρι στιγμής, την υψηλότερη

που έχει επιτευχθεί από υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης. Κατά τις ημι-συνεχείς καλλιέργειες από τους Hiremath et al. (2011) παρόμοιες ποσότητες 1,3-προπανοδιόλης παράχθηκαν στις περιπτώσεις καθαρής και ακατέργαστης γλυκερόλης (58,0 και 56,0 g/L, αντίστοιχα), ωστόσο ο χρόνος της ζύμωσης αυξήθηκε κατά 20 ώρες κατά την χρήση της βιομηχανικής γλυκερόλης. Από την άλλη πλευρά, σε έρευνα των Petitdemange et al. (1995) πραγματοποιήθηκαν απομονώσεις στελεχών του είδους *Cl. butyricum*, και αρκετοί από τους μικροοργανισμούς δεν κατάφεραν να αναπτυχθούν σε θρεπτικό υπόστρωμα με την ακατέργαστη γλυκερόλη ως πηγή άνθρακα.

Πίνακας IV-2: Παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης από προκαρυωτικούς μικροοργανισμούς, σε υποστρώματα καθαρής και βιομηχανικής γλυκερόλης.

Μικροοργανισμός	Στέλεχος	PD (g/L)	$Y_{PD/Gly}$ (g/g)	Pr (g/L/h)	Αναερόβιες συνθήκες	Αερόβιες συνθήκες	Είδος καλλιέργειας	Αναφορά
Καθαρή γλυκερόλη								
<i>Citrobacter freundii</i>	- ^a	25,4	0,51	- ^a	CO ₂	-	Ασυνεχής σε φιάλες	Anand & Saxena (2011)
	ATCC 8090	30,8	0,44	0,34	N ₂ ^β	-	Ασυνεχής	Barbirato et al. (1998)
	DSM 30040	41,4	0,50	1,74	N ₂ ^β	-	Συνεχής (Διβάθμια)	Boeningk et al. (1993)
	DSM Zu	28,1	0,53	1,33	N ₂ ^β	-	Ασυνεχής	Homann et al. (1990)
	DSM 30040	16,4	0,47	8,20	- ^a	- ^a	Συνεχής ακινητοποιημένα κύτταρα	Pflugmacher & Gottschalk (1994)
<i>Clostridium</i>	AKR 102a	93,7	0,52	2,98	N ₂ 0,6 L/h	-	Ημι-συνεχής	Wilkens et al. (2011)
<i>butyricum</i>	CNCM 12111	67,0	0,52	- ^a	N ₂ ^β	-	Ασυνεχής	Himmi et al. (1999)
	E5	65,6	54,0	1,4	- ^a	- ^a	Ημι-συνεχής	Petitdimanche et al. (1995)
	DSM 5431	58,0	0,56	2,7	N ₂ 0,1 vvm	-	Ημι-συνεχής	Gunzel et al. (1991)
	DSM 5431	56,0	0,51	2,2	N ₂ ^β	-	Ασυνεχής	Biebl et al. (1992)
	VPI 3266	29,7	0,51	3,0	N ₂ ^β	-	Συνεχής	Gonzalez-Pajuelo et al. (2004)
	DSM 5431	25,6	0,51	1,8	N ₂ ^β	-	Ασυνεχής	Rehman et al. (2008)
<i>Clostridium diolis</i>	GSHM 4 ^γ	84,6	0,50	2,74	N ₂ ^β	-	Ημι-συνεχής	Otte et al. (2009)
	DSM 15410	48,8	0,54	2,14	N ₂ ^β	-	Ημι-συνεχής	Otte et al. (2009)
<i>Clostridium</i> sp.	IK 124	87,7	0,54	1,9	N ₂ ^β	-	Ημι-συνεχής	Hirschmann et al. (2005)
<i>Enterobacter agglomerans</i>	CNCM 1210	18,1	0,46	0,70	N ₂ ^β	-	Ασυνεχής	Barbirato et al. (1995)

Μικροοργανισμός	Στέλεχος	PD (g/L)	$Y_{PD/Gly}$ (g/g)	Pr (g/L/h)	Αναερόβιες συνθήκες	Αερόβιες συνθήκες	Είδος καλλιέργειας	Αναφορά
<i>Escherichia coli</i>	K-12 ER 2925 ^γ	104,4	0,90	2,61	2 ^ο στάδιο: N ₂ ^β	1 ^ο στάδιο: Αέρας 2,0 LPM	Ημι-συνεχής (Διβάθμια)	Tang et al. (2009)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	LDH3 ^γ	62,6	0,41	1,04	-	Αέρας 1,6 LPM	Ημι-συνεχής	Yang et al. (2007)
		56,7	0,44	0,83	N ₂ 0,5 LPM	-	Ημι-συνεχής	Yang et al. (2007)
	M5al	43,3	0,30	0,86	-	Αέρας 1,6 LPM	Ημι-συνεχής	Yang et al. (2007)
		39,1	0,34	0,63	N ₂ 0,5 LPM	-	Ημι-συνεχής	Yang et al. (2007)
	ZG36	27,1	0,28	0,28	-	Αέρας 1,5 LPM	Ημι-συνεχής	Zhang et al. (2011)
	M5al	24,0	0,17	0,41	-	Αέρας 1,5 LPM	Ημι-συνεχής	Zhang et al. (2011)
	Lin	18,2	0,36	0,91	N ₂ ^β	-	Ασυνεχής	Homann et al. (1990)
	NRCC 3006	16,9	0,34	0,68	N ₂ ^β	-	Ασυνεχής	Homann et al. (1990)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	LDH 56 ^γ	102,0	0,43	2,13	-	Αέρας 0,5 vvm	Ημι-συνεχής	Xu et al. (2009)
	HR 526	95,4	0,40	1,98	-	Αέρας 0,5 vvm	Ημι-συνεχής	Xu et al. (2009)
	ME-308	70,0	0,58	0,97	-	Αέρας 0,1 vvm (5 πρώτες ώρες)	Ημι-συνεχής	Ji et al. (2009c)
	XJPD-Li	65,2	0,46	1,36	-	Αέρας 0,4 vvm	Ημι-συνεχής	Ma et al. (2009)
		60,8	0,50	1,27	N ₂ 0,4 vvm	-	Ημι-συνεχής	Ma et al. (2009)
	DSM 4799	63,3	0,53	0,92	-	-	Ημι-συνεχής με ακινητοποιημένα κύτταρα	Jun et al. (2010)
	DSM 2026	61,9	0,40	2,00	N ₂ 0,04 vvm	-	Ημι-συνεχής	Mu et al. (2009)
	DSM 2026	59,5	0,44	1,57	-	Αέρας 0,4 vvm	Ημι-συνεχής	Chen et al. (2003a)
56,0		0,44	0,80	N ₂ 0,4 vvm	-	Ημι-συνεχής	Chen et al. (2003a)	

Μικροοργανισμός	Στέλεχος	PD (g/L)	Y _{PD/Gly} (g/g)	Pr (g/L/h)	Αναερόβιες συνθήκες	Αερόβιες συνθήκες	Είδος καλλιέργειας	Αναφορά
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	M5al	58,8	0,32	0,86	N ₂ 0,2 vvm	-	Ημι-συνεχής	Cheng et al. (2004)
		53,6	0,54	0,67	-	Αέρας 0,2 vvm	Ημι-συνεχής	Cheng et al. (2004)
	ATCC 15380	58,0	- ^a	0,81	-	Αέρας 1,8 vvm	Ημι-συνεχής	Hiremath et al. (2011)
	LX3	57,8	0,24	3,43	N ₂ 0,4 vvm	-	Ημι-συνεχής	Xue et al. (2010)
	G31	52,9	0,34	1,15	-	-	Ημι-συνεχής	Petrov & Stoyanov. (2011)
Βιομηχανική Γλυκερόλη								
<i>Citrobacter freundii</i>	-	25,6	0,51	- ^a	CO ₂	-	Ασυνεχής σε φιάλες	Anand & Saxena, (2011)
	FMCC-B 294 (VK-19)	68,1	0,40	0,79	N₂ 0,1 LPM	-	Ημι-συνεχής	Παρούσα μελέτη
<i>Clostridium butyricum</i>	AKR102a	76,2	0,51	2,3	N ₂ 0,6 LPM	-	Ημι-συνεχής	Wilkens et al. (2011)
	VPI 1718	67,9	0,55		N ₂ 0,1 vvm	-	Ημι-συνεχής	Chatzifragkou et al. (2011a)
	E5	58,4	0,54	1,2	- ^a	- ^a	Ημι-συνεχής	Petitdimanche et al. (1995)
	F2b	48,1	0,55	- ^a	N ₂ 0,5 vvm	-	Συνεχής	Papanikolaou et al. (2000)
	AKR 91b	38,0	- ^a	- ^a	ΑΣ ^δ	-	DWP	Ringel et al. (2011)
	VPI 3266	31,5	0,50	3,15	N ₂	-	Συνεχής	Gonzalez-Pajuelo et al. (2004)
	DSM 5431	25,0	0,50	-	N ₂ ^β	-	Ασυνεχής	Rehman et al. (2008)
	NRRL B-23495	32,2	0,58	0,85	N₂ 0,1 LPM	-	Ασυνεχής	Παρούσα μελέτη
<i>Clostridium</i> sp.	IK 124	80,1	0,56	-	N ₂ ^β	-	Ημι-συνεχής	Hirshman et al. (2005)

Μικροοργανισμός	Στέλεχος	PD (g/L)	$Y_{PD/Gly}$ (g/g)	Pr (g/L/h)	Αναερόβιες συνθήκες	Αερόβιες συνθήκες	Είδος καλλιέργειας	Αναφορά
<i>Klebsiella oxytoca</i>	FMCC-197	50,1	0,39	0,55	-	-	Ημι-συνεχής	Παρούσα μελέτη
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	DSM 4799	80,2	0,45	1,2	-	-	Ημι-συνεχής με ακινητοποιημένα κύτταρα	Jun et al. (2010)
	ATCC 15380	56,0	0,70	0,61	-	Αέρας 1,8 vvm	Ημι-συνεχής	Hiremath et al. (2011)
	DSM 2026	53,0	0,38	1,7	N ₂ 0,04 vvm	-	Ημι-συνεχής	Mu et al. (2006)
	SU6	25,0	0,12 ^γ	- ^α	-	Αέρας ^ε	-	Sattayasamitsathit et al. (2011)

-^α : δεν αναφέρεται στην μελέτη

N₂^β: αναερόβιες καλλιέργειες, χωρίς να δίνονται περισσότερα στοιχεία για την ροή του αζώτου

^γ: ανασυνδυασμένο στέλεχος

ΑΣ^δ: η επώαση πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο αναερόβιωσης

Αέρας^ε: αερόβιες καλλιέργειες, χωρίς να δίνονται περισσότερα στοιχεία για την ροή του αέρα

DWP: Deep Well Plate ($V_w=1$ mL)

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον στην παρούσα μελέτη, παρουσίασε η καλλιέργεια του στελέχους *C. freundii* FMCC-207 κατά την οποία παραδόξως δεν ανιχνεύθηκε 1,3-προπανοδιόλη στο υγρό της ζύμωσης, μολονότι οι καλλιέργειες διενεργήθηκαν υπό αναερόβιες συνθήκες. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία όταν η καλλιέργεια τελείται υπό αναερόβιες συνθήκες, υπό την απουσία διαθέσιμου εξωτερικού δέκτη ηλεκτρονίων, όπως φουμαρικό ή νιτρικό οξύ, τότε ο καταβολισμός της γλυκερόλης γίνεται μέσω ενός διαφορετικού μηχανισμού από αυτόν του συμπλέγματος-*dha* (*dha-regulon*) ο οποίος οδηγεί στην σύνθεση 1,3-προπανοδιόλης (Paranikolaou, 2009). Το εύρημα της παρούσας μελέτης είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον και υποδεικνύει την εμπλοκή του συμπλόκου-*glp* κατά τον αναερόβιο μεταβολισμό της γλυκερόλης, χωρίς την παρουσία εξωγενούς αποδέκτη ηλεκτρονίων.

Ένα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό της προπανοδιολικής ζύμωσης από τα στελέχη *C. freundii* FMCC-B 294 (VK-19) και *K. oxytoca* FMCC-197, στην παρούσα μελέτη, ήταν οι εξαιρετικά υψηλές αρχικές συγκεντρώσεις βιομηχανικής γλυκερόλης ($Gly_0 = 170$ g/L), στις οποίες και τα δύο στελέχη μπόρεσαν να αυξηθούν. Κατά τις ασυνεχείς καλλιέργειες του στελέχους *C. freundii* FMCC-B 294 (VK-19), αν και παρατηρήθηκε σημαντική παράταση του χρόνου προσαρμογής, ο μικροοργανισμός κατάφερε να προσαρμοστεί στις προσμίξεις του υποστρώματος, ανεξάρτητα από την Gly_0 . Ωστόσο, οι υψηλές αρχικές συγκεντρώσεις του υποστρώματος πιθανότατα παρεμπόδισαν την κυτταρική αύξηση και την αφομοίωση της γλυκερόλης, και κατά συνέπεια στην σύνθεση της διόλης, εξαιτίας της συσσώρευσης των προσμίξεων στο μέσο της καλλιέργειας στην αρχή της εκθετικής φάσης του αυξητικού κύκλου. Αντίθετα, σε χαμηλές Gly_0 , όπως 20 g/L, το στέλεχος προσαρμόστηκε αρκετά γρήγορα στις διάφορες προσμίξεις του υποστρώματος και έτσι δεν σημειώθηκαν διαφορές στην συνολική διάρκεια των καλλιεργειών, μεταξύ καθαρής και βιομηχανικής γλυκερόλης. Όμως, η σταδιακή αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης οδήγησε σε προοδευτική αύξηση του χρόνου προσαρμογής. Ιδίως, όταν η Gly_0 ξεπέρασε τα 100 g/L, παρατηρήθηκε σημαντική παρεμπόδιση τόσο στην αύξηση του μικροοργανισμού όσο και στην σύνθεση της 1,3-προπανοδιόλης. Από την άλλη πλευρά όταν η γλυκερόλη προστίθετο σταδιακά στο μέσο της καλλιέργειας (στην περίπτωση των ημι-συνεχών καλλιεργειών) το στέλεχος προσαρμόστηκε καλύτερα στις προσμίξεις, με αποτέλεσμα η συνολική κατανάλωση της γλυκερόλης να ανέλθει στα ~174 g/L. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στις ασυνεχείς καλλιέργειες του στελέχους *K. oxytoca* FMCC-197. Στα πειράματα που διενεργήθηκαν η αύξηση της Gly_0 οδήγησε σε σημαντική αύξηση του ποσοστού της γλυκερόλης που παρέμενε ακατανάλωτο. Και εδώ το πρόβλημα ξεπεράστηκε με την σταδιακή προσθήκη γλυκερόλης στο μέσο της καλλιέργειας, έτσι ώστε στο τέλος της ημι-συνεχούς ζύμωσης ο μικροοργανισμός μπόρεσε να μεταβολίσει ~128 g/L ακατέργαστης γλυκερόλης.

Από την άλλη πλευρά, οι ασυνεχείς καλλιέργειες του στελέχους *K. pneumoniae* DSM 4799 με $Gly_0=100$ g/L παρεμποδίστηκαν, πιθανότατα από την παρουσία προσμίξεων, καθώς κατά τις πρώτες 24 ώρες της ζύμωσης δεν παρατηρήθηκε παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης (Jun et al., 2010). Οι ερευνητές ανέφεραν επίσης ότι για αρχική συγκέντρωση βιομηχανικής γλυκερόλης υψηλότερη από 60 g/L, η προστιθέμενη γλυκερόλη δεν καταναλώθηκε πλήρως μετά από 48 ώρες της ζύμωσης. Αυτό το αποτέλεσμα συμφωνεί με τα πορίσματα των Biebl et al. (1991) που θεωρούν ότι σε αυξανόμενες ποσότητες υποστρώματος (συγκεντρώσεις της τάξης του 9-11% w/v) δεν είναι δυνατή η αποτελεσματική κυτταρική αύξηση. Εν τω μεταξύ, οι Ringel et al. (2011) αναφέρουν ότι το στέλεχος *Cl. butyricum* AKR92a δεν ήταν σε θέση να ανεχθεί περισσότερο από 150 g/L αρχικής συγκέντρωσης ακατέργαστης γλυκερόλης, αν και ικανοποιητικά αποτελέσματα επιτεύχθηκαν σε 100 g/L.

Η επίδραση των διαφορετικών ποιοτήτων ακατέργαστης γλυκερόλης εξετάστηκε επίσης στη μελέτη μας. Τρεις διαφορετικές γλυκερόλες παραπροϊόντα παραγωγής βιοντίζελ (περιεκτικότητας σε γλυκερόλη 81,0%, 85,5% και 90,0% w/w) χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα. Στις περιπτώσεις των γλυκερολών περιεκτικότητας 81,0 %, και 85,5%το υλικό εκκίνησης για την παραγωγή του βιοκαυσίμου ήταν φυτικά έλαια, ενώ στην περίπτωση της γλυκερόλης 90,0%,, χρησιμοποιούμενα μαγειρικά έλαια, όπως τηγανέλαια. Στις ασυνεχείς καλλιέργειες που διενεργήθηκαν επιλέχθηκε χαμηλή αρχική συγκέντρωση πηγής άνθρακα ($Gly_0=20$ g/L), ούτως ώστε να αποφευχθεί φαινόμενο παρεμπόδισης εξαιτίας του υποστρώματος. Τόσο το στέλεχος *C. freundii* FMCC-B 294 (VK-19), όσο και το *K. oxytoca* FMCC-197 ήταν σε θέση να αναπτυχθούν σε όλες τις καλλιέργειες και συγχρόνως οι τελικές συγκεντρώσεις της παραγόμενης 1,3-προπανοδιόλης δεν παρουσίασαν σημαντικές διακυμάνσεις. Φαίνεται ότι, σε αυτή την χαμηλή αρχική συγκέντρωση υποστρώματος ($Gly_0=20$ g/L), τα στελέχη εμφάνισαν την ίδια ικανότητα προσαρμογής σε διαφορετικές ποιότητες της ακατέργαστης γλυκερόλης. Ωστόσο, σε πειράματα του στελέχους *C. freundii* FMCC-B 294 (VK-19) όταν η Gly_0 αυξήθηκε στα 80 g/L, μια ήπια διαφοροποίηση παρατηρήθηκε στις καλλιέργειες με περιεκτικότητα 81,0% και 90,0% w/w. Παρόλο που αναμενόταν ότι η πρώτη ύλη με την υψηλότερη περιεκτικότητα θα μπορούσε να ενισχύσει την παραγωγικότητα, καθώς περιέχει χαμηλότερο ποσοστό προσμίξεων, τα αντίθετα αποτελέσματα ελήφθησαν στη μελέτη μας. Έτσι, 39,9 g/L 1,3-προπανοδιόλης σχηματίστηκαν στην ζύμωση με περιεκτικότητα 81,0% w/w, σε αντίθεση με 36,5 g/L στην καλλιέργεια με καθαρότητα 90,0% w/w, παρά το γεγονός ότι η κυτταρική αύξηση ήταν παρόμοια και στα δύο πειράματα. Συγχρόνως, παρατηρήθηκε παράταση της διάρκειας της ζύμωσης όταν το μέσο περιείχε βιομηχανική γλυκερόλη, περιεκτικότητας 90,0% w/w, ανεξάρτητα από την τιμή της Gly_0 . Αυτή η διαφοροποίηση, τόσο στην τελική συγκέντρωση της 1,3-προπανοδιόλης, όσο και στην διάρκεια της ζύμωσης, θα μπορούσε να οφείλεται στην παρουσία διαφορετικών τύπων προσμίξεων που

υπάρχουν στην ακατέργαστη γλυκερόλη προερχόμενη από θερμικώς κατεργασμένα έλαια, όπως βενζοπυρένια και άλλοι κυκλικοί υδρογονάνθρακες, τα οποία να επηρεάζουν αρνητικά την προπανοδιολική ζύμωση. Τα προαναφερθέντα αποτελέσματα δείχνουν ότι στην περίπτωση του στελέχους *C. freundii* FMCC-B 294 (VK-19) η προέλευση της γλυκερόλης και το είδος των προσμίξεων έχουν μεγαλύτερη επίδραση επί της παραγωγής της 1,3-προπανοδιόλης, από ότι η περιεκτικότητα του υποστρώματος σε γλυκερόλη.

Οι Gonzalez-Pajuelo et al. (2004) επίσης μελέτησαν την επίδραση διαφορετικών ποιοτήτων ακατέργαστης γλυκερόλης (περιεκτικότητας 65,0% και 92,0% w/w) κατά την αύξηση του στελέχους *Cl. butyricum* VPI 3266 σε ασυνεχείς καλλιέργειες, υπολογίζοντας την παρεμπόδιση της κυτταρικής αύξησης, με βάση το μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης. Στην μελέτη αυτή έδειξαν ότι η παρεμπόδιση ήταν περισσότερο εμφανής όταν χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα ακατέργαστη γλυκερόλη περιεκτικότητας 65,0% w/w. Έτσι, όταν το μέσο περιείχε 100 g/L αυτού του τύπου γλυκερίνης, η παρεμπόδιση έφθασε το 86%. Παρόλα αυτά, οι ερευνητές υποστηρίζουν ότι ο τύπος της γλυκερόλης δεν επηρέασε την παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης, καθώς τόσο σε ασυνεχείς όσο και σε ημι-συνεχείς καλλιέργειες παρήχθησαν παρόμοιες συγκεντρώσεις της διόλης.

Σε μελέτη των Chatzifragkou et al. (2010), αναφέρθηκε ότι τα ακόρεστα ελεύθερα λιπαρά οξέα που περιέχονται στην ακατέργαστη γλυκερόλη πιθανόν να έχουν μια αξιοσημείωτη επίδραση στην κυτταρική αύξηση. Οι Anand & Saxena (2011) έδειξαν ότι η ακατέργαστη γλυκερόλη προερχόμενη από την παραγωγή βιοντίτζελ, είχε ισχυρή ανασταλτική δράση στην αύξηση του στελέχους *C. freundii*. Στην μελέτη που πραγματοποίησαν εξετάστηκαν πέντε διαφορετικές ποιότητες γλυκερόλης και η παραγωγή της προπανοδιόλης ελαττώθηκε, σε όλες τις περιπτώσεις. Με σκοπό να ξεπεραστεί η παρεμπόδιση, κατεργάστηκαν την γλυκερόλη με μη-πολικούς διαλύτες, πριν την χρησιμοποίηση ως υπόστρωμα. Έτσι, μετά την αφαίρεση των ελεύθερων λιπαρών οξέων (FFAs) και τους μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων (FAMES) από την βιομηχανική γλυκερόλη, το στέλεχος ήταν σε θέση να παράγει την διόλη σε ποσότητες συγκρίσιμες με την καθαρή γλυκερόλη. Η προ-επεξεργασία της ακατέργαστη γλυκερόλης έχει επίσης προταθεί από τους Moon et al. (2010), προκειμένου να αποφευχθεί η παρεμπόδιση της κυτταρικής αύξησης που οφείλεται σε προσμίξεις. Στην εν λόγω μελέτη, πέντε στελέχη τους γένους *Clostridium* εξετάστηκαν ανεπιτυχώς σε υπόστρωμα ακατέργαστης γλυκερόλης, προερχόμενη από την παραγωγή βιοντίτζελ με υλικό εκκίνησης απόβλητα φυτικών ελαίων. Όταν όμως, προ-επεξεργασμένη ακάθαρτη γλυκερόλη χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα, τόσο η σύνθεση της 1,3-προπανοδιόλης όσο και η παραγωγικότητα βελτιώθηκαν, και παρόμοιες τιμές σημειώθηκαν συγκριτικά με τις καλλιέργειες σε καθαρή γλυκερόλη.

Όπως παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη, κατά την καλλιέργεια του στελέχους *K. oxytoca* FMCC-197, οι κυριότεροι παράγοντες που επηρέασαν τον μεταβολισμό της γλυκερόλης

και την σύνθεση προϊόντων ήταν οι συνθήκες αναεροβίωσης και η εξέλιξη του pH στο μέσο της καλλιέργειας. Έτσι, παρατηρήθηκε εμφανής διαφορά στο προφίλ των μεταβολιτών, ανάλογα με τις πειραματικές συνθήκες που εφαρμόστηκαν και ιδίως της εμφύσησης ή μη του μέσου με άζωτο σε όλη την διάρκεια της ζύμωσης. Πιο συγκεκριμένα, κατά την διάρκεια ασυνεχών καλλιεργειών υπό συνεχή διοχέτευση αζώτου και σταθερό pH, το κύριο μεταβολικό προϊόν ήταν η αιθανόλη, ενώ μικρότερες ποσότητες 1,3-προπανοδιόλης και 2,3-βουτανοδιόλης, επίσης σχηματίστηκαν. Από την άλλη πλευρά όταν πραγματοποιήθηκε εμφύσηση του μέσου με άζωτο μόνο για χρονικό διάστημα είκοσι λεπτών πριν τον εμβολιασμό (δηλαδή αυτό-παραγόμενη αναεροβίωση) η 1,3-προπανοδιόλη έγινε ο κύριος μεταβολίτης. Συγχρόνως κατεστάλη η σύνθεση της 2,3-βουτανοδιόλης και δεν ανιχνεύτηκε στο μέσο καλλιέργειας καθ' όλη την διάρκεια των ζυμώσεων ανεξάρτητα από την αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης. Το τελευταίο αποτέλεσμα ήταν ιδιαίτερα σημαντικό, δεδομένου ότι η απουσία της εμφύσησης αζώτου όχι μόνο εξαλείφει τα παρα-προϊόντα, με αποτέλεσμα υψηλότερο συντελεστή απόδοσης παραχθείσας 1,3-προπανοδιόλης ανά καταναλωθείσα γλυκερόλη, αλλά αποτελείται επίσης μια οικονομικά πιο ελκυστική βιοδιεργασία, μειώνοντας το κόστος λειτουργίας, καθώς και το κόστος εξοπλισμού. Προφανώς, η συνεχής διοχέτευση αζώτου ευνόησε περισσότερο την μεταβολική οδό γλυκερόλης \longrightarrow αιθανόλη, ενώ οι συνθήκες αυτό-παραγόμενης αναεροβίωσης ευνοούσαν την μεταβολική οδό γλυκερόλης \longrightarrow 1,3-προπανοδιόλη. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με τα ευρήματα πρόσφατης μελέτης των Chatzifragkou et al. (2011b), σύμφωνα με την οποία η συνεχής διοχέτευση αζώτου σε καλλιέργεια του στελέχους *Cl. butyricum* VPI 1718 επηρέασε θετικά την βιοσύνθεση της 1,3-προπανοδιόλης. Σύμφωνα με τους συγγραφείς η αυτό-παραγόμενη αναεροβίωση, φάνηκε να επιβάλλει μια μερική 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 αναεροβίωσης/αεροβίωσης, αναφέρουν ότι οι μεγαλύτερες τιμές συγκέντρωσης και παραγωγικότητας της διόλης πραγματοποιήθηκαν στην καλλιέργεια με ροή αζώτου 0,4 vvm, ενώ στις συνθήκες αυτό-παραγόμενης αεροβίωσης η συγκέντρωση του μεταβολίτη μειώθηκε κατά ~2 g/L. Στην ίδια μελέτη σε καλλιέργεια του στελέχους σε αερόβιες συνθήκες, ενισχύθηκε η κυτταρική αύξηση, αλλά αντιθέτως μειώθηκε σημαντικά η παραγωγή της διόλης. Αντίθετα οι Chen et al. (2003) παρατήρησαν ότι στις αερόβιες 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 διόλης. Η μελέτη αυτή έρχεται να αναθεωρήσει την μέχρι τότε άποψη ότι η προπανοδιολική ζύμωση είναι συνδεδεμένη με αυστηρά αναερόβιες

συνθήκες καλλιέργειας. Γενικότερα μπορεί να θεωρηθεί ότι η επίδραση των συνθηκών καλλιέργειας εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τον εκάστοτε μικροοργανισμό.

Τέλος, μια ακόμη παράμετρος που εξετάστηκε στη μελέτη της προπανοδιολικής ζύμωσης ήταν η επίδραση των μη-ασηπτικών συνθηκών καλλιέργειας στην σύνθεση του μεταβολίτη, κατά την διενέργεια ασυνεχών και ημι-συνεχών καλλιέργειών. Σε αμφότερες τις περιπτώσεις, η απουσία στειρών συνθηκών αποδείχθηκε ότι δεν έχει σημαντική επίδραση στον μεταβολισμό της γλυκερόλης από τα στελέχη *C. freundii* FMCC-B 294 (VK-19) και *K. oxytoca* FMCC-197. Σημειώνεται ότι σε όλα τα πειράματα που διενεργήθηκαν υπό μη-ασηπτικές συνθήκες, περιοδικές μικροσκοπικές παρατηρήσεις επιβεβαίωσαν ότι οι μικροοργανισμοί *C. freundii* και *K. oxytoca* ήταν οι κυρίαρχοι στο μέσο της ζυμώσεως. Περαιτέρω, κανένα άλλο μεταβολικό προϊόν, που θα μπορούσε να υποδηλώνει την παρουσία άλλων μικροοργανισμών, δεν ανιχνεύτηκε. Σε σύγκριση με τα αποτελέσματα που επιτεύχθηκαν υπό στείρες συνθήκες, μικρές διαφορές παρατηρήθηκαν στις τελικές συγκεντρώσεις της διόλης. Στην μη-ασηπτική καλλιέργεια του στελέχους *K. oxytoca* FMCC-197 η παραγόμενη βιομάζα είχε την ίδια τελική τιμή 2,1 g/L συγκριτικά με ζύμωση υπό ασηπτικές συνθήκες, ενώ στην αναποστείρωτη καλλιέργεια παρουσιάστηκε μείωση στη συγκέντρωση του κύριου μεταβολίτη από τα 12,6 στα 11,2 g/L. Ομοίως, στις καλλιέργειες του στελέχους *C. freundii* FMCC-B 294 (VK-19) η παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης τόσο σε απόλυτες (g/L) όσο και σε σχετικές τιμές (g διόλης /g καταναλωθείσας γλυκερόλης) ήταν παρόμοια και μόνο η αντίστοιχη παραγωγικότητα ήταν ελαφρώς βελτιωμένη στην ασηπτική ημι-συνεχή καλλιέργεια. Η μέγιστη συγκέντρωση του μεταβολίτη, 68,1 g/L, που επιτεύχθηκε στη μελέτη μας, είναι συγκρίσιμη με την τιμή των 67,9 g/L που αναφέρθηκε στην έρευνα των Chatzifragkou et al. (2011a) κατά τη διάρκεια μιας μη-ασηπτικής ημι-συνεχούς καλλιέργειας του στελέχους *Cl. butyricum* VPI 1718. Τα αποτελέσματα και των δύο μελετών αποδεικνύουν ότι η απουσία ασηπτικών συνθηκών καλλιέργειας μπορεί να αποτελέσει μια ενδιαφέρουσα παράμετρο για την εφαρμογή της βιοδιεργασίας σε βιομηχανικό επίπεδο, καθώς η εφαρμογή των μη-ασηπτικών συνθηκών ελαχιστοποιεί το κόστος ενέργειας για την αποστείρωση, αλλά και το συνολικό κόστος για τον εξοπλισμό. Μαζί με την αξιοποίηση της χαμηλού κόστους ακατέργαστης γλυκερόλης ως υπόστρωμα, αυτή η εφαρμογή θα βοηθήσει την μικροβιακή μετατροπή της ακατέργαστης γλυκερόλης προς 1,3-προπανοδιόλη, ώστε να γίνει μια οικονομικά ανταγωνιστική βιολογική διεργασία.

IV.2 Παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης

Όπως έχει ήδη αναφερθεί και στην περίπτωση της 1,3-προπανοδιόλης, κατά την βιοτεχνολογική παραγωγή χημικών προϊόντων σε ευρεία κλίμακα, το κόστος του τελικού προϊόντος

εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το κόστος των πρώτων υλών (Willke & Vorlop, 2008). Έτσι η διαθεσιμότητα μίας φθηνής πρώτης ύλης είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη μιας οικονομικής μεθόδου βιοσύνθεσης 2,3-βουτανοδιόλης. Το κυριότερο υπόστρωμα που έχει χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης είναι η γλυκόζη. Παράλληλα έχουν μελετηθεί μονοσακχαρίτες και πολυσακχαρίτες προερχόμενοι από απόβλητα της βιομηχανίας τροφίμων πλούσια σε σάκχαρα, όπως υδρόλυμα αμύλου από την επεξεργασία καλαμποκιού, ακατέργαστη μελάσα και ορός γάλακτος από την τυροκόμιση, καθώς μέρη του φυτού αγκινάρα της Ιερουσαλήμ (Jerusalem artichoke), πλούσια σε ινουλίνη και σουκρόζη (Syu, 2001). Τις προηγούμενες δεκαετίες το σχετικά υψηλό κόστος των σακχαρούχων υποστρωμάτων και του συμβατικού αμύλου, ήταν ένας από τους κυριότερους παράγοντες που επηρέαζαν την οικονομική βιωσιμότητας της βιοδιεργασίας. Η βιομηχανική γλυκερόλη, προερχόμενη από εργοστάσια παραγωγής βιοντίζελ, αν και έχει μελετηθεί κυρίως ως υπόστρωμα για την προπανοδιολική ζύμωση, ανάλογα με τις συνθήκες καλλιέργειας και τα κατάλληλα βακτηριακά στελέχη αποτελεί μία φθηνή εναλλακτική πρώτη ύλη που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί και για την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης. Ήδη καθαρή γλυκερόλη έχει αξιοποιηθεί ως υπόστρωμα για τον σχηματισμό της διόλης από τους Petrov & Petrova (2009, 2010).

Πίνακας IV-3: Παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης από προκαρυωτικούς μικροοργανισμούς, κατά την αύξηση τους σε υποστρώματα με διαφορετικές πηγές άνθρακα.

Μικροοργανισμός	Πηγή άνθρακα	BD (g/L)	$Y_{BD/Gly}$ (g/g)	Pr (g/L/h)	Είδος καλλιέργειας	Αναφορά
<i>K. pneumoniae</i> SDM	Γλυκόζη	150,0	0,43	4,21	Ημι-συνεχής	Ma et al. (2009)/ Ji et al. (2011)
<i>K. oxytoca</i> ME-XJ-8 ^a		130,0	0,48	1,63	Ημι-συνεχής	Ji et al. (2010)
<i>E. aerogenes</i> DSM 30053		110,0	0,49		Ημι-συνεχής	Zeng & Biebl. (1991)
<i>K. oxytoca</i> ME-UD-3 ^a		95,5	0,47	1,71	Ασυνεχής	Ji et al. (2009)
<i>K. pneumoniae</i> CICC 10011		92,4	- ^β	2,10	Ημι-συνεχής	Qin et al. (2006)
<i>K. oxytoca</i> ME-XJ-8 ^a		90,7	0,48	1,51	Ασυνεχής	Ji et al. (2010)
<i>K. oxytoca</i> ME-303		39,0	- ^β	- ^β	Ασυνεχής	Ji et al. (2008)
<i>B. amyloliquefaciens</i>		33,0	0,33	- ^β	Ασυνεχής	Alam et al. (1990)/ Ji et al. (2011)
<i>B. lincheniformis</i>		8,7	0,12	0,47	Ασυνεχής σε φιάλες	Nilegaonkar et al. (1992)
<i>C. freundii</i> FMCC-207		49,4	0,31	0,76	Ημι-συνεχής	Παρούσα μελέτη

<i>K. oxytoca</i> FMCC-197		32,1	0,43	0,67	Ασυνεχής σε φιιάλες	Παρούσα μελέτη
<i>K. oxytoca</i> ME-UD-3 ^a	Γλυκόζη/ Ξυλόζη	23,2	0,43	-	Ασυνεχής	Ji et al. (2009b)
<i>Serratia marcescens</i> H30 ^a	Σουκρόζη	139,9	0,41	3,49	Ημι-συνεχής	Zhang et al. (2010)
<i>K. oxytoca</i>	Μελάσα	118,0	0,42	2,40	Ανακύκλωση κυττάρων	Afschar et al. (1993)
<i>K. pneumoniae</i> CICC 10011	Αγκινάρα της Ιερουσαλήμ	84,0	0,32	2,29	Ημι-συνεχής	Sun et al. (2009)
<i>K. pneumoniae</i>		67,4	- ^β	1,18	Ημι-συνεχής	Li et al. (2010)/ Ji et al. (2011)
<i>Paenibacillus polymyxa</i> ZJ-9		36,9	0,50	0,88	Ημι-συνεχής	Gao et al. (2010)/ Ji et al. (2011)
<i>K. oxytoca</i> ACCC 10370	Αμυλο αραβόσιτου	35,7	0,50	0,59	Ημι-συνεχής	Cheng et al. (2010)
<i>K. pneumoniae</i> G31	Καθαρή γλυκερόλη	70,0	0,53	0,47	Ημι-συνεχής	Petrov & Petrova. (2010)
<i>E. aerogenes</i> FMCC-10	Βιομηχανική γλυκερόλη	78,2	0,36	0,52	Ημι-συνεχής	Παρούσα μελέτη

α: ανασυνδυασμένο στέλεχος

β: δεν δίνονται στοιχεία στην αντίστοιχη δημοσίευση

Αρκετοί προκαρυωτικοί μικροοργανισμοί που έχουν μέχρι σήμερα μελετηθεί για την ικανότητα τους να συνθέτουν 2,3-βουτανοδιόλη. Τα στελέχη με τις ικανοποιητικότερες αποδόσεις ανήκουν στα είδη *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Paenibacillus polymyxa* (προηγούμενη ονομασία *Bacillus polymyxa*), ενώ και τα στελέχη του είδους *E. aerogenes* παρουσιάζουν ενδιαφέρον για αυτή την εφαρμογή. Στον Πίνακα IV-3 παρουσιάζονται τα κυριότερα βακτηριακά στελέχη που έχουν ερευνηθεί στη διεθνή βιβλιογραφία για την ικανότητα τους να παράγουν 2,3-βουτανοδιόλη, καθώς και η μέγιστη συγκέντρωση του μεταβολίτη στην εκάστοτε καλλιέργεια. Με βάση την διεθνή βιβλιογραφία οι υψηλότερες τιμές συγκέντρωσης 2,3-βουτανοδιόλης κυμαίνονται από 90,0 έως 150,0 g/L σε καλλιέργειες σε υπόστρωμα γλυκόζης. Ιδιαίτερα υψηλή (~140,0 g/L) είναι η παραγωγή της διόλης σε υπόστρωμα σουκρόζης, από το στέλεχος *Serratia marcescens* H30 (Zhang et al., 2010), καθώς και σε υπόστρωμα μελάσας από το στέλεχος *K. oxytoca* (Afschar et al., 1993). Αξίζει να σημειωθεί ότι συγκριτικά μεγάλος αριθμός μικροοργανισμών που έχουν έως σήμερα μελετηθεί είναι γενετικά τροποποιημένα στελέχη. Η παραγωγή της διόλης σε υπόστρωμα γλυκερόλης είναι χαμηλότερη συγκριτικά με το υπόστρωμα της γλυκόζης. Μέχρι στιγμής ως κύριο μεταβολικό της ζύμωσης της γλυκερόλης έχει εξεταστεί από τους Petrov & Petrova (2009, 2010) και η μέγιστη συγκέντρωση ανήλθε στα 70,0 g/L. Στην παρούσα μελέτη η υψηλότερη

συγκέντρωση της διόλης ήταν 78,2 g/L και σημειώθηκε σε υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης κατά την καλλιέργεια του στελέχους *E. aerogenes* FMCC-10. Με βάση τα όσα είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε είναι η πρώτη φορά που μελετήθηκε η παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης ως το κύριο προϊόν ζύμωσης από ακατέργαστη γλυκερόλη, καθώς το υπόστρωμα αυτό έχει συνδεθεί στενά με την προπανοδιολική ζύμωση, κατά την οποία η 2,3-βουτανοδιόλη αποτελεί παραπροϊόν της ζύμωσης και παράγεται σε αρκετά μικρότερες ποσότητες. Ως εκ τούτου, η τιμή αυτή αποτελεί την μέγιστη της βιβλιογραφίας σε υπόστρωμα (καθαρής και βιομηχανικής) γλυκερόλης. Αναφορικά με την σύνθεση της διόλης σε γλυκόζη στην παρούσα μελέτη οι υψηλότερες συγκεντρώσεις ήταν 49,4 g/L στην καλλιέργεια του στελέχους *C. freundii* FMCC-207 και 32,1 g/L στην καλλιέργεια του στελέχους *K. oxytoca* FMCC-197. Οι τιμές αυτές αν και σχετικά χαμηλότερες συγκριτικά με τις αντίστοιχες της βιβλιογραφίας, κρίνονται ικανοποιητικές, δεδομένου ότι πρόκειται για φυσικά στελέχη και μη αριστοποιημένες συνθήκες καλλιέργειας.

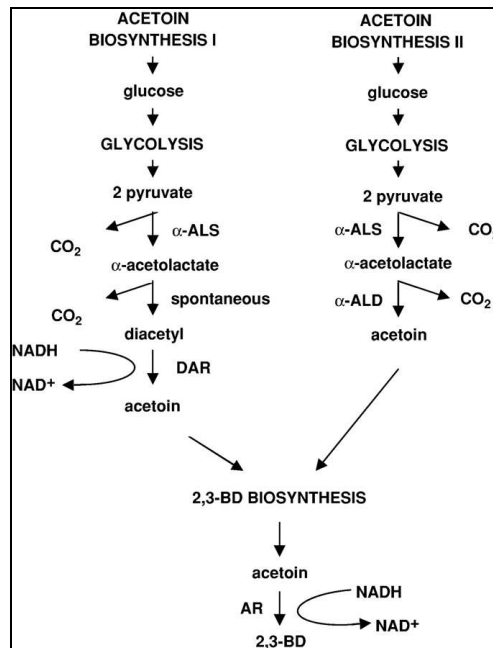
Η επίδραση των διαφορετικών ποιοτήτων ακατέργαστης γλυκερόλης εξετάστηκε επίσης για την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης από το στέλεχος *E. aerogenes* FMCC-10 στη μελέτη μας. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα τρεις διαφορετικές γλυκερόλες παραπροϊόντα της παραγωγής βιοντίζελ (περιεκτικότητας σε γλυκερόλη 81,0%, 85,5% και 90,0% w/w). Στις περιπτώσεις των γλυκερολών περιεκτικότητας 81,0 %, και 90,0%, το υλικό εκκίνησης για την παραγωγή του βιοκαυσίμου ήταν φυτικά έλαια, ενώ στην περίπτωση της γλυκερόλης 85,5%, χρησιμοποιούμενα μαγειρικά έλαια, όπως τηγανέλαια. Αρχικά διενεργήθηκαν ασυνεχείς καλλιέργειες με χαμηλή αρχική συγκέντρωση πηγής άνθρακα ($Gly_0=20$ g/L), ούτως ώστε να αποφευχθεί ενδεχόμενο παρεμπόδισης εξαιτίας των διαφορετικών προσμίξεων που περιέχονταν στο εκάστοτε υπόστρωμα. Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων φάνηκε ότι όταν η αρχική συγκέντρωση του υποστρώματος διατηρήθηκε σε χαμηλό επίπεδο ($Gly_0=20$ g/L), το στέλεχος εμφάνισε την ίδια ικανότητα προσαρμογής σε διαφορετικές ποιότητες της ακατέργαστης γλυκερόλης, καθώς εμφάνισε την ίδια κυτταρική αύξηση και συγχρόνως οι τελικές συγκεντρώσεις της παραγόμενης διόλης δεν παρουσίασαν σημαντικές διακυμάνσεις. Ωστόσο, όταν η Gly_0 αυξήθηκε στα 80 g/L, μια μικρή διαφοροποίηση παρατηρήθηκε στην τελική συγκέντρωση του μεταβολίτη και στις τρεις καλλιέργειες. Αν και αναμενόταν ότι η πρώτη ύλη με την υψηλότερη περιεκτικότητα θα μπορούσε να ενισχύσει την παραγωγικότητα, καθώς περιέχει χαμηλότερο ποσοστό προσμίξεων, τα αντίθετα αποτελέσματα ελήφθησαν στη μελέτη μας. Πιο συγκεκριμένα, 22,1 g/L 2,3-βουτανοδιόλης σχηματίστηκαν στην ζύμωση με περιεκτικότητα 81,0% w/w, σε αντίθεση με 20,3 g/L στην καλλιέργεια με περιεκτικότητα 90,0% w/w και 19,1 στην καλλιέργεια με περιεκτικότητα 85,5% w/w, παρά το γεγονός ότι η κυτταρική αύξηση και η διάρκεια της ζύμωσης ήταν ίδια και στα τρία πειράματα. Συνεπώς, όπως και στην περίπτωση του στελέχους *C. freundii* FMCC-B 294 (VK-19), μπορεί να υποθεθεί ότι, το είδος των προσμίξεων έχει μεγαλύτερη

επίδραση επί της παραγωγής της διόλης, από ότι η περιεκτικότητα του υποστρώματος σε γλυκερόλη.

Συνοψίζοντας τα στοιχεία τόσο της βιβλιογραφίας όσο και της παρούσας έρευνας, οι πιο σημαντικές παράμετροι που επηρεάζουν τη ζύμωση της γλυκερόλης προς την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης είναι οι συνθήκες αεροβίωσης και το pH της καλλιέργειας. Για το λόγο αυτό αρχικά μελετήθηκε η επίδραση διαφορετικών συνθηκών αεροβίωσης/αναερόβιωσης και διαπιστώθηκε ότι η παροχή αζώτου ή αέρα στο μέσο της καλλιέργειας άλλαζε σημαντικά τις τελικές συγκεντρώσεις των μεταβολικών προϊόντων. Πιο συγκεκριμένα οι αναερόβιες συνθήκες ήταν οδήγησαν τον μεταβολισμό προς παραγωγή γαλακτικού οξέος και αιθανόλης. Αντίθετα η παροχή αέρα περιορίζει την σύνθεση των εν λόγω μεταβολιτών, ευνοώντας συγχρόνως τον σχηματισμό της 2,3-βουτανοδιόλης. Η παρουσία αέρα στο μέσο της καλλιέργειας είχε διττή επίδραση στην παραγωγή της διόλης. Πρώτον βελτίωσε σε μεγάλο βαθμό την κυτταρική αύξηση με αποτέλεσμα τον ταχύτερο μεταβολισμό της γλυκερόλης, αυξάνοντας έτσι την παραγωγικότητα του μεταβολίτη. Κατά δεύτερο τρόπο περιορίστηκε η παραγωγή των υπολοίπων μεταβολιτών (αιθανόλης και γαλακτικού οξέος), με αποτέλεσμα η ροή του άνθρακα να κατευθυνθεί στον σχηματισμό της διόλης. Άλλοι συγγραφείς, επιθυμώντας βελτιστοποίηση της παραγωγικότητας της 1,3-προπανοδιόλης, αναφέρουν επίσης, την ενίσχυση της σύνθεσης 2,3-βουτανοδιόλης από την αυξημένη ροή αέρα (Cheng et al. 2004). Στο συμπέρασμα αυτό κατέληξαν και οι Petrov & Petrova (2010), επισημαίνοντας την ευνοϊκή επίδραση των συνθηκών αεροβίωσης στην παραγωγικότητα της διόλης σε υπόστρωμα γλυκερόλης. Σύμφωνα με την ίδια έρευνα οι αναερόβιες συνθήκες οδηγούν στο σχηματισμό 1,3-προπανοδιόλης, γεγονός που δεν συντελέστηκε στην παρούσα μελέτη. Αν και ο μεταβολισμός της γλυκερόλης πραγματοποιήθηκε κάτω από αναερόβιες συνθήκες, δεν ανιχνεύτηκε όπως αναμενόταν 1,3-προπανοδιόλη στο μέσο της καλλιέργειας.

Μια δεύτερη εξίσου σημαντική παράμετρος που επηρεάζει την σύνθεση της 2,3-βουτανοδιόλης είναι οι συνθήκες pH στο μέσο της καλλιέργειας. Σύμφωνα με τους Biebl et al. (1998), οι βέλτιστες συνθήκες για την μεγιστοποίηση της παραγωγής της διόλης είναι η αύξηση του μικροοργανισμού σε φυσική οξίνιση, με αρχική τιμή pH όχι μικρότερη από 7,0. Ο λόγος που οι ελαφρώς όξινες συνθήκες pH βοηθούν την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης είναι ότι σε αυτό το εύρος pH επάγεται η έκκριση του ενζύμου συνθάσης του α-ακετογαλακτικού (α-acetolactate synthase), που σχετίζεται με την σύνθεση της 2,3-βουτανοδιόλης (Σχήμα IV-1) (Zeng et al., 1990; Ji et al., 2009c). Λαμβάνοντας υπόψη και αυτήν την παράμετρο διενεργήθηκαν πειράματα σε συνθήκες σταθερού και μη pH. Πράγματι, τα αποτελέσματα της μελέτης μας ήταν σε συμφωνία με το συμπέρασμα των προηγούμενων ερευνητών. Ωστόσο, το πρόβλημα που ανέκυψε στις ασυνεχείς και ημι-συνεχείς καλλιέργειες, ήταν μεγάλη πτώση της τιμής του pH, που τελικά παρεμπόδισε τον μεταβολισμό της γλυκερόλης και κατά συνέπεια στην παραγωγή μεταβολικών προϊόντων.

Προκειμένου να ξεπεραστεί αυτό το εμπόδιο εφαρμόστηκε η τεχνική του διακυμαινόμενου pH, σύμφωνα με την οποία μετά από κάθε ανατροφοδότηση στην ημι-συνεχή ζύμωση, το pH αυξάνονταν στην τιμή 7,0, στη συνέχεια έμενε μη σταθερό. Μετά από κάθε διόρθωση η τιμή του pH μειωνόταν σχεδόν ακαριαία, εντούτοις, διατηρήθηκε πάνω από την τιμή 5,0 η οποία αποδείχτηκε κρίσιμη για τον μεταβολισμό της γλυκερόλης.



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

Σε ανάλογο συμπέρασμα κατέληξαν και οι Petron & Petrova (2010) στην μελέτη των οποίων επίσης εφαρμόστηκε η τεχνική της διακύμανσης του pH (forced pH fluctuation). Στα πειράματα που πραγματοποίησαν η διόρθωση του pH γινόταν σε τακτά χρονικά διαστήματα 6, 12 ή 24 ωρών κατά μία, δύο ή τρεις μονάδες pH. Τελικά, η μέγιστη συγκέντρωση της 2,3-βουτανοδιόλης κατά την αύξηση του στελέχους *K. pneumoniae* G31 σε υπόστρωμα γλυκερόλης επιτεύχθηκε στην καλλιέργεια που η διόρθωση του pH γινόταν κάθε 12 ώρες ανά μία μονάδα ($\Delta\text{pH}=1,0/12\text{h}$). Από την άλλη πλευρά οι Ji et al. (2009c) βελτιστοποιώντας την προπανοδιολική ζύμωση από το στέλεχος *K. pneumoniae* ME-308 διαπίστωσαν ότι η διατήρηση του pH της καλλιέργειας σε σταθερή τιμή σε ένα εύρος τιμών 5,0-6,5 ευνοούσε την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης, ως το κύριο μεταβολικό προϊόν της ζύμωσης, ενώ σε ελαφρώς αλκαλικές περιοχές του pH ενισχύονταν η σύνθεση του γαλακτικού οξέος, εις βάρος πάντοτε του σχηματισμού της 1,3-προπανοδιόλης. Έτσι μεταβάλλοντας το pH από την τιμή 6,3 στην τιμή 7,3 κάθε 16 ώρες, κατάφεραν να περιορίσουν την παραγωγή των παραπροϊόντων, σε συγκέντρωση μικρότερη από 5 g/L. Σύμφωνα με τους ερευνητές η αιτία ότι η 2,3-βουτανοδιόλη σε ασθενώς όξινο pH είναι το

κύριο παραπροϊόν αντί του γαλακτικού οξέος, ενδεχομένως να οφείλεται είτε στο ότι η διόλη είναι λιγότερο τοξική για το μικροβιακό κύτταρο από ότι το γαλακτικό οξύ, είτε στην επαγωγή της συνθάσης του α-ακετογαλακτικού. Φαίνεται, λοιπόν, ότι η κυριότερη παράμετρος για τον σύνθεση της 2,3-βουτανοδιόλης είναι η διατήρηση του pH σε ελαφρώς όξινο εύρος, είτε σταθερές ή μη συνθήκες.

Τέλος, μια ακόμη παράμετρος που εξετάστηκε και στη μελέτη της παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης από ακατέργαστη γλυκερόλη ήταν η επίδραση των μη-ασηπτικών συνθηκών καλλιέργειας στην σύνθεση του μεταβολίτη Στην ημι-συνεχή καλλιέργεια που διενεργήθηκε, η απουσία στείρων συνθηκών αποδείχθηκε ότι δεν έχει σημαντική επίδραση στον μεταβολισμό της γλυκερόλης από το στέλεχος *E. aerogenes* FMCC-10. Συγκρίνοντας τις ημι-συνεχείς καλλιέργειες υπό ασηπτικές και μη συνθήκες, προκύπτει ότι η κυτταρική αύξηση, η κατανάλωση γλυκερόλης, καθώς και η παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης δεν επηρεάστηκαν σημαντικά από την εφαρμογή των μη-ασηπτικών συνθηκών. Πιο συγκεκριμένα, η παραγόμενη βιομάζα είχε την ίδια τελική τιμή και στις δύο καλλιέργειες, ενώ στην αναποστείρωτη καλλιέργεια παρουσιάστηκε μείωση στη συγκέντρωση του μεταβολίτη κατά 5,7 g/L, που αντιστοιχεί σε ποσοστό 7% επί της παραγόμενης διόλης. Το αποτέλεσμα αυτό φανερώνει ότι η απουσία ασηπτικών συνθηκών καλλιέργειας μπορεί να αποτελέσει μια ενδιαφέρουσα παράμετρο για την εφαρμογή της βιοδιεργασίας σε βιομηχανικό επίπεδο, καθώς η εφαρμογή των μη-ασηπτικών συνθηκών ελαχιστοποιεί το κόστος ενέργειας για την αποστείρωση, αλλά και το συνολικό κόστος για τον εξοπλισμό. Ο συνδυασμός ενός χαμηλού κόστους υποστρώματος, όπως η βιομηχανική γλυκερόλη και μίας οικονομικά συμφέρουσας βιοδιεργασίας, δημιουργούν ελπιδοφόρες προοπτικές για την παραγωγή του μεταβολίτη σε ευρεία κλίμακα.

IV.3 Παραγωγή αιθανόλης

Σε βιομηχανικό επίπεδο η παραγωγή της αιθανόλης πραγματοποιείται με τη ζύμωση φυτικής ύλης που περιέχει σάκχαρα ή μπορεί να μετατραπεί σε σάκχαρα, καθώς και με τη ζύμωση βιομηχανικών και αστικών αποβλήτων πλουσίων σε σάκχαρα, γεγονός που δίνει λύση στο πρόβλημα της απομάκρυνσης αυτών από το περιβάλλον. Οι κύριοι παραγωγοί αιθανόλης σε βιομηχανική κλίμακα είναι οι μικροοργανισμοί *S. cerevisiae* και *Z. mobilis*, οι οποίοι διασπών τη γλυκόζη μέσω των γλυκολύσεων Embden-Meyerhof-Parnas και Entner-Dudoroff, αντίστοιχα (Βλέπε Εισαγωγή Σχήματα I-12 και I-13). Μολονότι η γλυκερόλη χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα κυρίως για την παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης, αρκετά ενθαρρυντικά είναι τα αποτελέσματα των ερευνών για την χρήση της και στην βιοσύνθεση αιθανόλης σε εργαστηριακή κλίμακα, με τις μέγιστες τιμές στη διεθνή βιβλιογραφία από προκαρυωτικούς μικροοργανισμούς να ανέρχονται στα

21-27 g/L όπως δίνεται και στον Πίνακα IV-3. Αν και οι παραγόμενες ποσότητες βιοαιθανόλης από γλυκερόλη είναι αρκετά χαμηλότερες, συγκριτικά με τις αντίστοιχες τιμές που λαμβάνονται από την ζύμωση σακχάρων, αξίζει να σημειωθεί ότι κόστος παραγωγής από γλυκερόλη είναι έως και 40% χαμηλότερο (Oh et al., 2011). Έτσι, ενώ η ανάπτυξη βιοδιεργασιών για την παραγωγή αιθανόλης έχει σχεδόν κορεστεί, θα μπορούσε να υπάρξει μια εξειδικευμένη αγορά για την βιοσύνθεση της από γλυκερόλη, λαμβάνοντας υπόψη το παγκόσμιο πλεόνασμα της ακατέργαστης γλυκερόλης και την συνεπακόλουθη μείωση της τιμής της (Choi et al., 2011). Με την ανάπτυξη νέων τεχνολογιών και την βοήθεια της γενετικής μηχανικής για την δημιουργία βελτιωμένων στελεχών, η παραγωγή αιθανόλης από γλυκερόλη είναι μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική διεργασία για την προμήθεια του βιοκαυσίμου.

Πίνακας IV-3: Παραγωγή αιθανόλης από προκαρυωτικούς μικροοργανισμούς, κατά την αύξηση τους σε υποστρώματα γλυκερόλης.

Μικροοργανισμός	EtOH (g/L)	$Y_{EtOH/Gly}$ (g/g)	Pr (g/L/h)	Είδος γλυκερόλης	Είδος καλλιέργειας	Αναφορά
<i>Kluyvera cryocrescens</i> S26	27,0	0,40	0,61	Ακατέργαστη	Ασυνεχής	Choi et al. (2011)
<i>K. pneumoniae</i> GEM 167/pBR-pdc-adh ^a	25,0	- ^β	0,78	Καθαρή	Ημι-συνεχής	Oh et al. (2011)
<i>K. pneumoniae</i> GEM 167/pBR-pdc-adh ^a	24,6	- ^β	0,51 ^γ	Ακατέργαστη	Ημι-συνεχής	Oh et al. (2011)
<i>K. pneumoniae</i> GEM 167	21,5	- ^β	0,93	Ακατέργαστη	Ημι-συνεχής	Oh et al. (2011)
<i>K. oxytoca</i> LDH3 ^a	15,9	0,12 ^γ	0,23 ^γ	Καθαρή	Ημι-συνεχής	Yang et al. (2007)
<i>K. oxytoca</i> M5al	12,3	0,10 ^γ	0,20 ^γ	Καθαρή	Ημι-συνεχής	Yang et al. (2007)
<i>Klebsiella</i> sp. HE1	12,2	0,24 ^γ	- ^β	Καθαρή	Ασυνεχής	Wu et al. (2011)
<i>K. pneumoniae</i> DSM 2026	11,9	- ^β	0,50	Ακατέργαστη	Ημι-συνεχής	Mu et al. (2006)
<i>E. aerogenes</i> HU-101	10,0	- ^β	- ^β	Ακατέργαστη	Ασυνεχής	Ito et al. (2005)
<i>K. pneumoniae</i> BLH-1	4,9	0,07	0,15 ^γ	Ακατέργαστη	Ασυνεχής	Rossi et al. (2012)
<i>C. freundii</i> FMCC-207	33,4	0,40	0,42	Ακατέργαστη	Ημι-συνεχής	Παρούσα μελέτη
<i>K. oxytoca</i> FMCC-197	25,2	0,20	0,28	Ακατέργαστη	Ημι-συνεχής	Παρούσα μελέτη
<i>E. aerogenes</i> FMCC-10	20,9	0,38	0,39	Ακατέργαστη	Ημι-συνεχής	Παρούσα

α: ανασυνδυασμένο στέλεχος

β: δεν δίνονται στοιχεία στην αντίστοιχη δημοσίευση

γ: οι υπολογισμοί έγιναν με βάση τα δεδομένα της αντίστοιχης δημοσίευσης

Με βάση την διεθνή βιβλιογραφία η μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης (27,0 g/L) σημειώθηκε σε ασυνεχή καλλιέργεια του στελέχους *Kluyvera cryocrescens* S26, υπό μικροαερόφιλες συνθήκες (Choi et al., 2011). Οι Oh et al., 2011 έλαβαν σχεδόν την ίδια συγκέντρωση αιθανόλης (~25,0 g/L) κατά την αύξηση του στελέχους *Klebsiella pneumoniae* GEM 167/pBR-pdc-adh σε καθαρή και βιομηχανική γλυκερόλη. Σημειώνεται ότι το στέλεχος είχαν εισαχθεί τα γονίδια *pdc* και *adhIII*, από το βακτήριο *Zymomonas mobilis*, τα οποία είναι υπεύθυνα για την κωδικοποίηση των ενζύμων πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση [PDC] και αλδεύδη αφυδρογονάση [ADH], αντίστοιχα. Αρκετά υψηλή παραγωγή αιθανόλης (15,9 g/L) επιτεύχθηκε σε ημι-συνεχή καλλιέργεια του ανασυνδυασμένου στελέχους *Klebsiella oxytoca* LDH3, από το οποίο είχε προηγουμένως είχε αφαιρεθεί το γονίδιο *ldhA* που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή της γαλακτικής αφυδρογονάσης. Η παραγόμενη αιθανόλη έλαβε μεγαλύτερη τιμή συγκριτικά με την αντίστοιχη καλλιέργεια του μητρικού στελέχους *Klebsiella oxytoca* M5al (Yang et al., 2007). Όπως φαίνεται και από τα στοιχεία του Πίνακα IV-3 οι υψηλότερες συγκεντρώσεις αιθανόλης έχουν επιτευχθεί από γενετικά τροποποιημένα στελέχη, ώστε να βελτιωθεί η ικανότητα σύνθεσης αιθανόλης. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν φυσικά στελέχη και η μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης ήταν 33,4 g/L και σημειώθηκε σε υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης κατά την καλλιέργεια του στελέχους *C. freundii* FMCC-207. Η συγκέντρωση αυτή αποτελεί και την υψηλότερη τιμή της βιβλιογραφίας τόσο από φυσικά όσο και από ανασυνδυασμένα στελέχη. Επίσης, υψηλές ποσότητες σχηματίστηκαν και στις ημι-συνεχείς καλλιέργειες των στελεχών *K. oxytoca* FMCC-197 και *E. aerogenes* FMCC-10 (25,2 και 20,9 g/L, αντίστοιχα).

Ανάλογα με το εξεταζόμενο στέλεχος, οι κυριότερες παράμετροι που επέδρασαν στην παραγωγή της αιθανόλης από βιομηχανική γλυκερόλη στην παρούσα μελέτη, ήταν οι συνθήκες αναεροβίωσης και το pH της καλλιέργειας. Αναλυτικότερα, η αύξηση του στελέχους *K. oxytoca* FMCC-197 μελετήθηκε υπό συνθήκες αναεροβίωσης (παροχή αζώτου σε όλη την διάρκεια της καλλιέργειας) και αυτό-παραγόμενης αναεροβίωσης (παροχή αζώτου για χρονικό διάστημα 20 λεπτών πριν τον εμβολιασμό). Από τα πειράματα που διενεργήθηκε βρέθηκε ότι για το εν λόγω στέλεχος οι συνθήκες αναεροβίωσης διευκόλυναν την σύνθεση της διόλης. Προφανώς όταν στο μέσο της καλλιέργειας εισάγεται άζωτο και απομακρύνονται τα αέρια προϊόντα του μεταβολισμού, τότε ευνοείται κυρίως το μεταβολικό μονοπάτι ακετύλο-CoA \longrightarrow αιθανόλη. Από την άλλη πλευρά, για το στέλεχος *E. aerogenes* FMCC-10 οι βέλτιστες συνθήκες για την παραγωγή αιθανόλης ήταν αυτές της αυτό-παραγόμενης αναεροβίωσης, χωρίς ωστόσο η παρουσία του

αζώτου ή αέρα να δρουν παρεμποδιστικά στην σύνθεση του μεταβολίτη. Έτσι η παραγωγή της αιθανόλης πραγματοποιήθηκε σε ικανοποιητικό βαθμό σε όλες τις συνθήκες (αερόβιες/αναερόβιες/αυτό-παραγόμενη αναεροβίωση), ωστόσο όταν το pH της καλλιέργειας διατηρήθηκε σταθερό και τα αέρια προϊόντα του μεταβολισμού (CO_2 και πιθανόν H_2) παρέμειναν στο μέσο της καλλιέργειας (στην περίπτωση των πειραμάτων της αυτό-παραγόμενης αεροβίωσης) ευνόησαν την σύνθεση του μεταβολίτη και κατά συνέπεια, το μεταβολικό μονοπάτι ακέτυλο-CoA \longrightarrow αιθανόλη. Ωστόσο, φαίνεται ότι η επίδραση των συνθηκών αναεροβίωσης/αεροβίωσης στην παραγωγή της αιθανόλης, εξαρτώνται από το εκάστοτε στέλεχος. Έτσι, οι Choi et al. (2011) μελετώντας την παραγωγή του μεταβολίτη κατά την αύξηση του στελέχους *Kluivera cryocrescens* S26, αναφέρουν ότι στην διάρκεια των αναερόβιων καλλιεργειών η συγκέντρωση της αιθανόλης έφτασε μόλις τα 7,0 g/L, ενώ στη ζύμωση υπό μικρο-αερόφιλες συνθήκες η συγκέντρωση ανήλθε στα 27,0 g/L. Ομοίως και οι Oh et al. (2011) παρατήρησαν αύξηση στην παραγωγή της αιθανόλης με την παροχή στο μέσο της καλλιέργειας 0,5 vvm αέρα. Εντούτοις, υποστηρίζουν ότι η περαιτέρω αύξηση της ροής αέρα (1,0, 2,0 ή 3,0 vvm) έδρασε παρεμποδιστικά στην σύνθεση του μεταβολίτη. Αντίθετα, οι Yang et al. (2007) κατά την μελέτη της προπανοδιολικής ζύμωσης από τα στελέχη *K. oxytoca* LDH3 και M5a1, παρατήρησαν μικρή αύξηση της σύνθεσης της αιθανόλης υπό αναερόβιες συνθήκες συγκριτικά με τις αερόβιες.

Αναφορικά με την επίδραση των συνθηκών pH στην σύνθεση της αιθανόλης, από τα πειράματα που διενεργήθηκαν και με τα τρία στελέχη, φάνηκε ότι οι συνθήκες σταθερού pH, είναι εκείνες που ευνόησαν τον σχηματισμό του μεταβολίτη. Έτσι στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε φιάλες, όπου το pH της καλλιέργειας ήταν μη-σταθερό η παραγόμενη συγκέντρωση ήταν αμελητέα, συγκριτικά με τις τιμές που επετεύχθησαν στις καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα υπό σταθερό pH. Από όσα είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε οι μελέτες που έχουν μέχρι τώρα διενεργηθεί στη διεθνή βιβλιογραφία για την παραγωγή του μεταβολίτη από γλυκερόλη, ήταν υπό συνθήκες σταθερού pH, και ως εκ τούτου δεν υπάρχουν αρκετά δεδομένα προς σύγκριση.

Τέλος, μια ακόμη παράμετρος που εξετάστηκε και στη μελέτη της παραγωγής αιθανόλης από ακατέργαστη γλυκερόλη ήταν η επίδραση των μη-ασηπτικών συνθηκών καλλιέργειας στην σύνθεση του μεταβολίτη Στην ημι-συνεχή καλλιέργεια του στελέχους *C. freundii* FMCC-207, η απουσία στειρών συνθηκών αποδείχθηκε ότι δεν έχει σημαντική επίδραση στον μεταβολισμό της γλυκερόλης. Συγκρίνοντας τις ημι-συνεχείς καλλιέργειες υπό ασηπτικές και μη συνθήκες, προκύπτει ότι η κυτταρική αύξηση, η κατανάλωση γλυκερόλης, καθώς και η παραγωγή της αιθανόλης δεν επηρεάστηκαν σημαντικά από την εφαρμογή των μη-ασηπτικών συνθηκών. Πιο συγκεκριμένα, η παραγόμενη βιομάζα είχε την ίδια τελική τιμή και στις δύο καλλιέργειες, ενώ στην αναποστείρωτη καλλιέργεια παρουσιάστηκε μικρή μείωση στη συγκέντρωση του μεταβολίτη κατά

5%. Το αποτέλεσμα αυτό φανερώνουν ότι η απουσία ασηπτικών συνθηκών καλλιέργειας μπορεί να αποτελέσει μια ενδιαφέρουσα παράμετρο για την εφαρμογή της βιοδιεργασίας σε βιομηχανικό επίπεδο, καθώς όπως έχει ήδη αναφερθεί η εφαρμογή των μη-ασηπτικών συνθηκών ελαχιστοποιεί το κόστος ενέργειας για την αποστείρωση, αλλά και το συνολικό κόστος για τον εξοπλισμό.

V. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Η βιομηχανική γλυκερόλη αποτελεί το κύριο παραπροϊόν της παραγωγής του βιολογικού πετρελαίου (βιοντίζελ). Η στροφή της παγκόσμιας οικονομίας στην χρήση βιοντίζελ, κυρίως για τις μεταφορές, οδήγησε στην ραγδαία αύξηση της ετήσιας παραγωγής του, με αποτέλεσμα την συσσώρευση αντίστοιχα μεγάλων ποσοτήτων βιομηχανικής γλυκερόλης. Παρόλο που στο παρελθόν αποτέλεσε ένα χρήσιμο και οικονομικά συμφέρον παραπροϊόν, τα τελευταία χρόνια η σημαντική αύξηση των παραγόμενων ποσοτήτων και η συνεπακόλουθη μείωση των τιμών της, κατέστησαν την βιομηχανική γλυκερόλη απόβλητο. Συγχρόνως, το είδος των προσμίξεων που περιέχονται περιορίζουν την χρήση της από την χημική και φαρμακευτική βιομηχανία. Συνεπώς, η ανάγκη εξεύρεσης εναλλακτικών τρόπων για την αξιοποίηση της βιομηχανικής γλυκερόλης είναι περισσότερο επιτακτική παρά ποτέ. Μια από τις πλέον ελπιδοφόρες και συμφέρουσες, οικονομικά και οικολογικά, λύσεις είναι η μετατροπή της σε προϊόντα υψηλότερης αξίας μέσω των μικροβιακών ζυμώσεων.

Η αξιοποίηση της βιομηχανικής γλυκερόλης μέσω των μικροβιακών ζυμώσεων αποτέλεσε το αντικείμενο της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Σκοπός ήταν να μελετηθούν φυσικά στελέχη που ανήκουν σε συλλογές του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, για την ικανότητα τους να μεταβολίζουν τη βιομηχανική γλυκερόλη προς παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης, 2,3-βουτανοδιόλης και αιθανόλης. Σημειώνεται ότι στο σύνολο τους τα 83 αυτά στελέχη μελετήθηκαν πρώτη φορά σε υποστρώματα ακατέργαστης γλυκερόλης. Μετά την αρχική φάση των πειραμάτων επιλέχθηκαν τέσσερα στελέχη τα *Citrobacter freundii* FMCC-B 294 (VK-19), *C. freundii* FMCC-207, *Klebsiella oxytoca* FMCC-197 και *Enterobacter aerogenes* FMCC-10, και στις καλλιέργειες που πραγματοποιήθηκαν διερευνήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης υποστρώματος και των συνθηκών καλλιέργειας, στον μεταβολισμό της γλυκερόλης και στην παραγωγή των μεταβολικών προϊόντων. Με βάση τα αποτελέσματα των πειραμάτων, αξιοποιήθηκαν υψηλές ποσότητες βιομηχανικής γλυκερόλης, με την μέγιστη συγκέντρωση καταναλωθέντος υποστρώματος να φτάνει τα ~217,0 g/L. Αναφορικά με την σύνθεση των τριών κύριων μεταβολικών προϊόντων, οι συγκεντρώσεις που επιτεύχθηκαν αποτελούν σε πολλές περιπτώσεις από τις μέγιστες τιμές στην διεθνή βιβλιογραφία για τα εξεταζόμενα είδη μικροοργανισμών, αλλά και την σύνθεση τους σε υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης. Πιο αναλυτικά, η μέγιστη συγκέντρωση (PD_{max}) 68,1 g/L, σημειώθηκε σε αναερόβια ημι-συνεχή καλλιέργεια του στελέχους *C. freundii* FMCC-B 294 (VK-19), με τον αντίστοιχο συντελεστή απόδοσης να λαμβάνει τιμή $Y_{PD/Gly}=0,40$ g/g και η παραγωγικότητα 0,79 g/L/h. Παράλληλα σημαντική ποσότητα της διόλης (50,1 g/L) σχηματίστηκε κατά την ημι-συνεχή καλλιέργεια του στελέχους *K. oxytoca* FMCC-197, υπό συνθήκες αυτό-παραγόμενης αναεροβίωσης. Η απουσία εμφύσησης αζώτου στο μέσο της καλλιέργειας, για την

επίτευξη αναερόβιων συνθηκών, εξάλειψε την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης, με αποτέλεσμα αφενός μεν να περιοριστεί η σύνθεση των παραπροϊόντων, οδηγώντας σε υψηλότερο συντελεστή απόδοσης παραχθείσας 1,3-προπανοδιόλης ανά καταναλωθείσα γλυκερόλη, αφετέρου δε αποτέλεσε μια οικονομικά πιο ελκυστική βιοδιεργασία, μειώνοντας το κόστος λειτουργίας, καθώς και το κόστος εξοπλισμού. Και στις δύο καλλιέργειες οι συγκεντρώσεις της 1,3-προπανοδιόλης αποτελούν τις μέγιστες συγκεντρώσεις της βιβλιογραφίας για τα φυσικά στελέχη του είδους και συγκαταλέγονται στις υψηλότερες τιμές παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης από βιομηχανική γλυκερόλη. Με βάση τα όσα είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε, είναι η πρώτη φορά που πραγματοποιείται αύξηση του είδους *K. oxytoca* σε ακατέργαστη γλυκερόλη. Αναφορικά με την μέγιστη συγκέντρωση 2,3-βουτανοδιόλης σε υπόστρωμα ακατέργαστης γλυκερόλης (BD_{max}) 78,2 g/L, καταγράφηκε κατά την αύξηση του στελέχους *E. aerogenes* FMCC-10 σε ημι-συνεχή καλλιέργεια υπό αερόβιες συνθήκες και διακυμαινόμενου pH. Με βάση την διεθνή βιβλιογραφία, οι βέλτιστες συνθήκες για την μεγιστοποίηση της παραγωγής της διόλης είναι η αύξηση των μικροοργανισμών σε φυσική οξίνιση, με αρχική τιμή pH όχι μικρότερη από 7,0, καθώς σε αυτό το εύρος pH επάγεται η έκκριση του ενζύμου συνθάσης του α-ακετογαλακτικού, που σχετίζεται με την σύνθεση της 2,3-βουτανοδιόλης. Έτσι, προτάθηκε στην παρούσα διατριβή η τεχνική του διακυμαινόμενου pH, σύμφωνα με την οποία μετά από κάθε ανατροφοδότηση στην ημι-συνεχή ζύμωση, το pH αυξάνονταν στην τιμή 7,0 και στη συνέχεια έμενε μη σταθερό, ώστε να μην ξεπερνά μια κατώτατη τιμή pH που είναι παρεμποδιστική για τον μεταβολισμό της γλυκερόλης. Με βάση τα όσα είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε είναι η πρώτη φορά που μελετήθηκε η παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης ως το κύριο προϊόν ζύμωσης από ακατέργαστη γλυκερόλη, καθώς το υπόστρωμα αυτό έχει συνδεθεί στενά με την προπανοδιολική ζύμωση, κατά την οποία η 2,3-βουτανοδιόλη αποτελεί παραπροϊόν της ζύμωσης και παράγεται σε αρκετά μικρότερες ποσότητες. Ως εκ τούτου, η τιμή αυτή αποτελεί την μέγιστη της βιβλιογραφίας σε υπόστρωμα καθαρής και βιομηχανικής γλυκερόλης. Ιδιαίτερα υψηλή ήταν και η μέγιστη παραγόμενη ποσότητα αιθανόλης από βιομηχανική γλυκερόλη ήταν ($EtOH_{max}$) 33,4 g/L και σημειώθηκε στην καλλιέργεια του στελέχους *C. freundii* FMCC-207, κατά την αύξηση του σε ημι-συνεχή καλλιέργεια. Η συγκέντρωση αυτή αποτελεί και την υψηλότερη τιμή της βιβλιογραφίας τόσο από φυσικά όσο και από ανασυνδυασμένα στελέχη. Εξίσου υψηλές ποσότητες σχηματίστηκαν και στις ημι-συνεχείς καλλιέργειες των στελεχών *K. oxytoca* FMCC-197 και *E. aerogenes* FMCC-10 (25,2 και 20,9 g/L, αντίστοιχα). Οι τιμές αυτές αν και είναι αρκετά χαμηλότερες, συγκριτικά με τις αντίστοιχες τιμές που λαμβάνονται από την ζύμωση σακχάρων είναι ιδιαίτερες ελπιδοφόρες για την αξιοποίηση της βιομηχανικής γλυκερόλης και προς την παραγωγή αιθανόλης, δεδομένου ότι παραγωγής από γλυκερόλη είναι έως και 40% χαμηλότερο.

Μια ενδιαφέρουσα παράμετρος που διερευνήθηκε κατά την σύνθεση και των τριών κύριων μεταβολιτών ήταν η εφαρμογή μη-ασηπτικών συνθηκών καλλιέργειας. Σε όλες τις περιπτώσεις, η απουσία στειρών συνθηκών αποδείχθηκε ότι μείωσε σε μικρό βαθμό της τελική συγκέντρωση των μεταβολιτών, χωρίς ωστόσο να έχει σημαντική επίδραση στον μεταβολισμό της γλυκερόλης και από τα 4 εξεταζόμενα στελέχη. Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν ότι η απουσία ασηπτικών συνθηκών καλλιέργειας μπορεί να αποτελέσει μια ενδιαφέρουσα παράμετρο για την εφαρμογή της βιοδιεργασίας σε βιομηχανικό επίπεδο, καθώς η εφαρμογή των μη-ασηπτικών συνθηκών ελαχιστοποιεί το κόστος ενέργειας για την αποστείρωση, αλλά και το συνολικό κόστος για τον εξοπλισμό. Μαζί με την αξιοποίηση της χαμηλού κόστους ακατέργαστης γλυκερόλης ως υπόστρωμα, αυτή η εφαρμογή θα βοηθήσει την μικροβιακή μετατροπή της ακατέργαστης γλυκερόλης προς 1,3-προπανοδιόλη, 2,3-βουτανοδιόλη ή αιθανόλη ώστε να γίνει μια οικονομικά ανταγωνιστική βιολογική διεργασία.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή αποτέλεσε την βάση για την βιοτεχνολογική αξιοποίηση υψηλών ποσοτήτων βιομηχανικής γλυκερόλης, από τέσσερα φυσικά στελέχη (*C. freundii* FMCC-B 294 (VK-19), *C. freundii* FMCC-207, *Kl. oxytoca* FMCC-197 και *E. aerogenes* FMCC-10), ενώ ταυτόχρονα σημειώθηκε αξιόλογη παραγωγή μεταβολικών προϊόντων με ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τη βιομηχανία, όπως είναι η 1,3-προπανοδιόλη, η 2,3-βουτανοδιόλη και η αιθανόλη. Με βάση τα ευρήματα αυτά, οι προοπτικές που ανοίγονται για την συνέχιση των ερευνών θα μπορούσαν να επικεντρωθούν στα εξής αντικείμενα:

- Πραγματοποίηση συνεχών καλλιιεργειών (continuous cultures) των εν λόγω στελεχών, με στόχο την μελέτη της επίδρασης των συνθηκών καλλιέργειας στον μεταβολισμό του υποστρώματος, την μικροβιακή αύξηση και την σύνθεση πρωτογενών μεταβολικών προϊόντων, στην κατάσταση δυναμικής ισορροπίας.
- Διενέργεια καλλιιεργειών σε μεγάλης κλίμακας βιοαντιδραστήρες (scale up of the process), με στόχο την αύξηση της συγκέντρωσης των τριών μεταβολιτών, τη μελέτη των συνθηκών καλλιέργειας σε συστήματα μεγάλου όγκο και την πιθανή εφαρμογή των βιοδιεργασιών σε βιομηχανικό επίπεδο.
- Μελέτη της επίδρασης των συνθηκών αύξησης (συνθήκες pH και συνθήκες αναεροβίωσης/αυτό-παραγόμενης αεροβίωσης και αεροβίωσης) στην ενεργότητα των ενζύμων που σχετίζονται με την σύνθεση τόσο των κύριων όσο και των δευτερογενών μεταβολικών προϊόντων.
- Εφαρμογή μαθηματικών μοντέλων για την πρόβλεψη της κινητικής συμπεριφοράς των εν λόγω στελεχών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

-Α-

- Abad S, Turon X.** (2012) Valorization of biodiesel derived glycerol as a carbon source to obtain added-value metabolites: Focus on polyunsaturated fatty acids. *Biotechnology Advances*, 30:733–741.
- Abbad-Andaloussi S, Manginot-Durr 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 61:4413–4417.
- Abbad-Andaloussi S, Guedon E, Spiesser E, Petitdemange H.** (1996) Glycerol dehydratase activity: the limiting step for 1,3-propanediol production by *Clostridium butyricum* DSM 5431. *Letters of Applied Microbiology*, 22:311–314.
- Abbad-Andaloussi S, Amne J, Ferard P, Petitdemange H.** (1998) Effect of glucose on glycerol metabolism by *Clostridium butyricum*. *Journal of Applied Microbiology*, 84:515–522.
- Afschar AS, Vaz Rossell CE, Jonas R, Quesada Chanto A, Schaller K.** (1993) Microbial production and downstream processing of 2,3-butanediol. *Journal of Biotechnology*, 27:317–329.
- Agarwal GP.** (1990) Glycerol. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 41:95–127.
- Alam S, Capit F, Weigand WA, Hong J.** (1990) Kinetics of 2,3-butanediol fermentation by *Bacillus amyloliquefaciens*: effect of initial substrate concentration and aeration. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 47:71–84.
- Amaral PFF, Ferreira TF, Fontes GC, Coelho MAZ.** (2009) Glycerol valorization: New biotechnological routes. *Food and Bioproducts Processing*, 87:179–186.
- Anand P, Saxena RK.** (2012) A comparative study of solvent-assisted pretreatment of biodiesel derived crude glycerol on growth and 1,3-propanediol production from *Citrobacter freundii*. *New Biotechnology* 29:199–205.
- Andrade JC, Vasconcelos I.** (2003) Continuous culture of *Clostridium acetobutylicum*: culture stability and low grade glycerol utilization. *Biotechnology Letters*, 25:121–125.
- Αγγελής Γ.** (2007). Μικροβιολογία και Μικροβιακή Τεχνολογία. 1^η έκδοση. Εκδόσεις Σταμούλης Α.Ε., Αθήνα.

-Β-

- Balat M, Balat H, Oz C.** (2008) Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science*, 34: 551–573.
- Barbirato F, Bories A.** (1997) Relationship between the physiology of *Enterobacter agglomerans* CNCM 1210 grown anaerobically on glycerol and the culture conditions. *Research in Microbiology*, 148:475–484.
- Barbirato F, Camarasa C, Claret Grivet JP, Bories A.** (1995) Glycerol fermentation of 1,3-propanediol producing microorganism: *Enterobacter agglomerans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43:786–793.
- 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. *Industrial Crops Products*, 7:281–289.
- Barbirato F, Soucaille P, Bories A.** (1996) Physiologic mechanisms involved in accumulation of 3-hydroxypropionaldehyde during fermentation of glycerol by *Enterobacter agglomerans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62:4405–4409.
- Barret EL, Collins EB, Hall BJ, Matoi SH.** (1983) Production of 2,3-butylene glycol from whey by *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter aerogenes*. *Journal of Dairy Science*, 66:2507–2514.

- Behr A, Eilting J, Irawadi K, Leschinski J, Lindner F.** (2008) Improved utilisation of renewable resources: New important derivatives of glycerol. In: RSC Publishing. Green Chemistry 10(1) p:1-140.
- Beijer L, Rutberg L.** (1992) Utilization of glycerol and glycerol 3-P is differently affected by the phosphotransferase system in *Bacillus subtilis*. FEMS Microbiology Letters, 100: 217–220.
- 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.** (1991) Glycerol fermentation to 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. Measurement of product inhibition by use of a pH-auxostat. Applied Microbiology and Biotechnology 35: 701-705.
- Biebl H.** (2001) Fermentation of glycerol by *Clostridium pasteurianum* - batch and continuous culture studies. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 27: 18 – 26.
- Biebl H, Marten S.** (1995) Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol: use of cosubstrates. Applied Microbiology and Biotechnology, 44:15–19.
- Biebl H, Marten S, Hippe H, Deckwer.** (1992) Glycerol conversion to 1,3-propanediol by newly isolated clostridia. Applied Microbiology and Biotechnology, 36:592–597.
- Biebl H, Zeng AP, Menzel K, Deckwer WD.** (1998) Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol and 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. Applied Microbiology and Biotechnology, 50:24–29.
- Biebl H, Menzel K, Zeng AP, Deckwer WD.** (1999) Microbial production of 1,3-propanediol. Applied Microbiology and Biotechnology, 52:289–297.
- Biebl H, Spröer C** (2002) Taxonomy of the glycerol fermenting Clostridia and description of *Clostridium diolis* sp. nov. Systematic and Applied Microbiology, 25:491-497.
- Boenigk R, Bowien S, Gottschalk G.** (1993) Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol in continuous cultures of *Citrobacter freundii*. Applied Microbiology and Biotechnology, 38:453–457.
- Bryn K, Ulstrup JC, Stormer FC.** (1973) Effect of acetate upon the formation of acetoin in *Klebsiella* and *Enterobacter* and its possible practical application in a rapid Voges-Proskauer test. Applied Microbiology, 25:511–512.
- Byun TG, Zeng AP, Deckwer WD.** (1994) Reactor comparison and scale-up for the microaerobic production of 2,3-butanediol by *Enterobacter aerogenes* at constant oxygen transfer rate. Bioprocess Engineering, 11:167–175.
- C-
- Cameron DC, Altaras NE, Hoffman ML, Shaw AJ.** (1998) Metabolic engineering of propanediol pathways. Biotechnology in Progress, 14:116–125.
- Carr F.J., Chill D. & Maida N.** (2002). The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. Critical Reviews in Microbiology 28 (4): 281-370.
- Celińska E, Grajek W.** (2009) Biotechnological production of 2,3-butanediol-Current state and prospects. Biotechnology Advances, 27:715-725.
- Chatzifragkou A, Papanikolaou S, Dietz D, Doulgeraki AI, Nychas GJE, Zeng AP.** (2011a) Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* growing on biodiesel-derived crude glycerol through a non-sterilized fermentation process. Applied Microbiology and Biotechnology, 91:101-112.
- Chatzifragkou A, Aggelis G, Komaitis M, Zeng AP, Papanikolaou S.** (2011b) Impact of anaerobiosis strategy and bioreactor geometry on the biochemical response of *Clostridium butyricum* VPI 1718 during 1,3-propanediol fermentation. Bioresource Technology, 102:10625–10632.

- Chen X, Zhang D, Qi W, Gao S, Xiu Z, Xu P.** (2003a) Microbial fed-batch production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* under micro-aerobic conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63:143–146.
- Chen X, Xiu Z, Wang J, Zhang D, Xu P.** (2003b) Stoichiometric analysis and experimental investigation of glycerol bioconversion to 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* under microaerobic conditions. *Enzyme Microbiology and Technology*, 33(4):386–394.
- Cheng KK, Liu DH, Sun Y, Liu WB.** (2004) 1,3-Propanediol production by *Klebsiella pneumoniae* under different aeration strategies. *Biotechnology Letters*, 26:911–915.
- Cheng KK, Zhang JA, Liu DH, Sun Y, Yang MD, Xu JM.** (2006) Production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* from glycerol broth. *Biotechnology Letters*, 28:1817–1821.
- Cheng KK, Zhang JA, Liu DH, Sun Y, Liu HJ, Yang MD, et al.** (2007) Pilot-scale production of 1,3-propanediol using *Klebsiella pneumoniae*. *Process Biochemistry*, 42:740–744.
- Cheng KK, Liu Q, Zhang JA, Li JP, Xu JM, Wang GH.** (2010) Improved 2,3-butanediol production from corn cob acid hydrolysate by fed-batch fermentation using *Klebsiella oxytoca*. *Process Biochemistry*, 45:613–616.
- Choi WJ, Hartono MR, Chan WH, Yeo SS.** (2011) Ethanol production from biodiesel-derived crude glycerol by newly isolated *Kluyvera cryocrescens*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98:1255-1264.
- 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) Research of new outlets for glycerol—recent developments in France. *Fett/Lipid* 101(3):101–104.
- Claus D. and Berkeley RCW.** (1986) Genus *Bacillus* Cohn 1872, 174^{AL}. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2, pp. 1105–1139. Edited by PHA Sneath, NS Mair, ME Sharpe and JG Holt. Baltimore: Williams and Wilkins.
- Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML.** (2001) Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology* 71:1–20.
- Colin T, Bories A, Moulin G.** (2000) Inhibition of *Clostridium butyricum* by 1,3-propanediol and diols during glycerol fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54:201–205.
- Colin T, Bories A, Lavigne C, Moulin G.** (2001) Effects of acetate and butyrate during glycerol fermentation by *Clostridium butyricum*. *Current Microbiology*, 43:238–243.
- Collins MD, Lawson PA, Willens A, Cordoba JJ, Hippe H, Farrow JAE.** (1994) The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven species combinations. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44:812-826.
- Converti A, Perego P.** (2002) Use of carbon and energy balances in the study of the anaerobic metabolism of *Enterobacter aerogenes* at variable starting glucose concentrations *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59:303–9.
- Converti A, Perego P, Del Borghi M.** (2003) Effect of specific oxygen uptake rate on *Enterobacter aerogenes* energetics: carbon and reduction degree balances in batch cultivations. *Biotechnology and Bioengineering*, 82:370–377.
- Costa JAV, de Morais MG.** (2011) The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. *Bioresource Technology*, 102: 2-9.

-D-

- Daniel R, Boenigk R, Gottschalk G.** (1995) Purification of 1,3-propanediol dehydrogenase from *Citrobacter freundii* and cloning, sequencing, and overexpression of the corresponding gene in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 177:2151–2156.
- Damartzis T, Zabaniotou A.** (2011) Thermochemical conversion of biomass to second generation biofuels through integrated process design—A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15:366-378.
- Darbon E, Ito K, Huang HS, Yoshimoto T, Poncet S, Deutscher J.** (1999) Glycerol transport and phosphoenolpyruvate-dependent enzyme I- and Hpr-catalyzed phosphorylation of glycerol kinase in *Thermus flavus*. *Microbiology*, 145:3205–3212.
- Dasari M.** (2007) Crude glycerol potential described. *Feedstuffs*, 79(43):1-3.
- da Silva GP, Mack M, Contiero J.** (2009) Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances*, 27:30-39.
- Davis L, Rogers P, Pearce J, Peiris P.** (2006) Evaluation of *Zymomonas*-based ethanol production from hydrolysed waste starch stream. *Biomass Bioengineering*, 30:809–814.
- de Mas C, Jansen NB, Tsao T.** (1988) Production of optically active 2,3-butanediol by *Bacillus polymyxa*. *Biotechnology and Bioengineering*, 31:366–77.
- de Valdez GF, Ragout A, Bruno-Bárcena JM, Diekmann H, Siñeriz F.** (1997) Shifts in pH affect the maltose/glycerol co-fermentation by *Lactobacillus reuteri*. *Biotechnology Letters* 19:645-649.
- Deckwer WD.** (1995) Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol. *FEMS Microbiology Reviews*, 16:143–9.
- Dharmadi Y, Murarka A, Gonzalez R.** (2006) Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: a new platform for metabolic engineering. *Biotechnology and Bioengineering*, 94:821–829.
- Dobson R, Gray V, Rumbold K.** (2011) Microbial utilization of crude glycerol for the production of value-added products. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39(2):217-226.
- Doulgeraki AI, Paramithiotis S, Nychas GJE.** (2011) Characterization of the *Enterobacteriaceae* community that developed during storage of minced beef under aerobic or modified atmosphere packaging conditions *International Journal of Food Microbiology*, 145:77-83.
- Drosinos EH, Paramithiotis S, Kolovos G, Tsikouras I, Metaxopoulos I.** (2007) Phenotypic and technological diversity of lactic acid bacteria and staphylococci isolated from traditionally fermented sausages in Southern Greece. *Food Microbiology*, 24:260-270.
- Du CY, Zhang YP, Li Y, Cao ZA.** (2007) Novel redox potential-based screening strategy for rapid isolation of *Klebsiella pneumoniae* mutants with enhanced 1,3-propanediol-producing capability. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(14): 4515–4521.

-E-

- EBB — European Biodiesel Board. Press release.** (2006) EU biodiesel production growth hits record high in 2005. EBB publishes annual biodiesel production statistics. Available in [http://www.ebb-eu.org/EBBpressreleases/EBB%20press%20release%202005%20statistics%20\(final\).pdf](http://www.ebb-eu.org/EBBpressreleases/EBB%20press%20release%202005%20statistics%20(final).pdf).
- El-Ziney MG, Arneborg N, Uyttendaele M, Debevere J, Jakobsen M.** (1998) Characterization of growth and metabolite production of *Lactobacillus reuteri* during glucose/glycerol cofermentation in batch and continuous cultures. *Biotechnology Letters* 20:913–916.

-F-

- Fan X, Burton R, Zhou Y.** (2010) Glycerol (Byproduct of Biodiesel Production) as a Source for Fuels and Chemicals – Mini Review. *The Open Fuels and Energy Science Journal*, 3: 17-22.

- Fiorese G, Catenacci M, Verdolini E, Bosetti V.** (2013) Advanced biofuels: Future perspectives from an expert elicitation survey. *Energy Policy* In Press DOI.org/10.1016/j.enpol.2012.12.061.
- Flickinger MC.** (1980) Current biological research in conversion of cellulosic carbohydrates into liquid fuels: how far have we come? *Biotechnology and Bioengineering*, 22:27–48.
- Forage RG, Foster AM.** (1979) Resolution of the coenzyme B-12 dependent dehydratases of *Klebsiella* sp. and *Citrobacter freundii*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 569:249-258.
- Forage RG, Foster AM.** (1982) Glycerol fermentation in *Klebsiella pneumoniae*: functions of the coenzyme B12-dependent glycerol and diol dehydratases. *Journal of Bacteriology*, 149:413–419.
- Foteinis S, kouloumpis V, Tsoutsos T.** (2011) Life cycle analysis for bioethanol production from sugar beet crops in Greece. *Energy Policy*, 39:4834-4841.
- Fountoulakis MS, Manios T.** (2009) Enhanced methane and hydrogen production from municipal solid waste and agro-industrial by-products co-digested with crude glycerol. *Bioresource Technology*, 100:3043–3047.
- Freund A.** (1881) Über die Bildung und Darstellung von Trimethylenalkohol aus Glycerin. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft Berlin* 10:636–641.
- Fukuda H, Kondo A, Tamalampudi S.** (2009) Bioenergy: Sustainable fuels from biomass by yeast and fungal whole-cell biocatalysts. *Biochemical Engineering Journal*, 44:2-12.
- Fulmer EI, Christensen LM, Kendall AR.** (1933) Production of 2,3-butylene glycol by fermentation. *Industrial and Engineering Chemistry*, 25:798-800.

-G-

- Garai-Ibabe G, Ibarburu I, Berregi I, Claisse O, Lonvaud-Funel A, Irastorza A, Dueñas MT.** (2008) Glycerol metabolism and bitterness producing lactic acid bacteria in cidermaking. *International Journal of Food Microbiology*, 121:253-261.
- Garg SK, Jain A.** (1995) Fermentative production of 2,3-butanediol: a review. *Bioresource Technology*, 51:103–109.
- Gao J, Xu H, Li QJ, Feng XH, Li S.** (2010) Optimization of medium for one-step fermentation of inulin extract from Jerusalem artichoke tubers using *Paenibacillus polymyxa* ZJ-9 to produce R,R-2,3-butanediol. *Bioresource Technology*, 101:7087–7093.
- Ge L, Wu X, Chen J, Wu J.** (2011) A New Method for Industrial Production of 2,3-Butanediol. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 2:335-336.
- Ghosh S, Swaminathan T.** (2003) Optimization of process variables for the extractive fermentation of 2,3-butanediol by *Klebsiella oxytoca* in aqueous two-phase system using response surface methodology. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 17(4):319–325
- Gray KA, Zhao L, Emptage M.** (2006) Bioethanol. *Current Opinion in Chemical Biology* 10: 141-146.
- Gonzalez-Pajuelo M, Andrade JC, Vasconcelos I.** (2004) Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 using a synthetic medium and raw glycerol. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34:442–446.
- Gonzalez-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. *Metabolic Engineering*, 7:329–336.
- Gonzalez-Pajuelo M, Meynial-Salles I, Mendes F, Soucaille P, Vasconcelos I.** (2006) Microbial Conversion of Glycerol to 1,3-Propanediol: Physiological Comparison of a Natural Producer, *Clostridium butyricum* VPI 3266, and an Engineered Strain, *Clostridium acetobutylicum* DG1(pSPD5). *Applied and Environmental Microbiology* 72:96-101.

- Gungormusler M, Gonen C, Ozdemir G, Azbar N.** (2010) 1,3-Propanediol production potential of *Clostridium saccharobutylicum* NRRL B-643. *New Biotechnology*, 27:782-728.
- Gungormusler M, Gonen C, Azbar N.** (2011a) 1,3-Propanediol production potential by a Locally isolated strain of *Klebsiella pneumoniae* in comparison to *Clostridium beijerinckii* NRRL B593 from waste glycerol. *Journal of Polymers and the Environment*, 19:812-817.
- Gungormusler M, Gonen C, Azbar N.** (2011b) Continuous production of 1,3-propanediol using raw glycerol with immobilized *Clostridium beijerinckii* NRRL B-593 in comparison to suspended culture. *Bioprocess and Biosystem Engineering*, 34:727-733.
- Gunzel B, Yonsel S, Deckwer WD.** (1991) Fermentative production of 1, 3-propanediol from glycerol by *Clostridium butyricum* up to a scale of 2 m³. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36:289-294.
- Gupta M, Kumar N.** (2012) Scope and opportunities of using glycerol as an energy source. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16:4551-4556.

-H-

- Hao J, Lin L, Zheng Z, Liu H, Liu D.** (2008) Isolation and characterization of microorganisms able to produce 1,3-propanediol under aerobic conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(9):1731-1740.
- Heller KB, Lin ECC, Wilson TH.** (1980) Substrate specificity and transport properties of the glycerol facilitator of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 144:274-278.
- Himmi EH, Bories A, Barbirato F.** (1999) Nutrient requirements for glycerol conversion to 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. *Bioresource Technology*, 67(2):123-128.
- Hiremath A, Kannabiran M, Rangaswamy V.** (2011) 1,3-Propanediol production from crude glycerol from jatropha biodiesel process. *New Biotechnology*, 28(1):19-23.
- Hirschmann S, Baganz K, Koschik I, Vorlop KD.** (2005) Development of an integrated bioconversion process for the production of 1, 3-propanediol from raw glycerol waters. *Landbauforschung Völkenrode*, 55:261-267.
- Homann T, Tag C, Biebl H, Deckwer WD, Schink B.** (1990) Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella* and *Citrobacter* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 33:121-126.
- Hong A, Cheng K, Peng F, Zhou S, Sun Y, Lui C, Lui D.** (2009) Strain isolation and optimization of process parameters for bioconversion of glycerol to lactic acid. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 84:1576-1581.
- Huang H, Gong CS, Tsao GT.** (2002) Production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 98-100:687-698.

-I-

- Ito T, Nakashimada Y, Senba K, Matsui T, Nishio N.** (2005). Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100:260-265.

-J-

- Jarvis GN, Moore ERB, Thiele JH.** (1997) Formate and ethanol are the major products of glycerol fermentation produced by a *Klebsiella planticola* strain isolated from red deer. *Journal of Applied Microbiology* 83:166-174.
- Jay JM.** (1982) Antimicrobial properties of diacetyl. *Applied and Environmental Microbiology* 44: 525-532.
- Ji XJ, Huang H, Li S, Du J, Lian M.** (2008) Enhanced 2,3-butanediol production by altering the mixed acid fermentation pathway in *Klebsiella oxytoca*. *Biotechnology Letters*, 30:731-734.

- Ji XJ, Huang H, Du J, Zhu JG, Ren LJ, Hu N, et al.** (2009a) Enhanced 2,3-butanediol production by *Klebsiella oxytoca* using a two-stage agitation speed control strategy. *Bioresource Technology*, 100:3410–3414.
- Ji XJ, Huang H, Du J, Zhu JG, Ren LJ, Li S, et al.** (2009b) Development of an industrial medium for economical 2,3-butanediol production through co-fermentation of glucose and xylose by *Klebsiella oxytoca*. *Bioresource Technology*, 100: 5214–5218.
- Ji XJ, Huang H, Zhu JG, Hu N, Li S.** (2009c) Efficient 1,3-propanediol Production by Fed-Batch Culture of *Klebsiella pneumoniae*: The Role of pH Fluctuation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 159:605–613.
- Ji XJ, Huang H, Zhu JG, Ren LJ, Nie ZK, Du J, et al.** (2010) Engineering *Klebsiella oxytoca* for efficient 2,3-butanediol production through insertional inactivation of acetaldehyde dehydrogenase gene. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85:1751–1758.
- Ji XJ, Huang H, Ouyang PK** (2011) Microbial 2,3-butanediol production: A state-of-the-art review. *Biotechnology Advances*, 29(3):351-364.
- Jin LH, Lee JH.** (2008). Change in proteomic profiles of genetically modified 1,3-propanediol-producing recombinant *E. coli*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18:1439-1444.
- Jin P, Lu S, Huang H, Luo F, Li S.** (2011) Enhanced Reducing Equivalent Generation for 1,3-Propanediol Production Through Co-fermentation of Glycerol and Xylose by *Klebsiella pneumoniae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 165:1532–1542.
- Johnson DT and Taconi KA.** (2007). The Glycerin Glut: Options for the value added conversion of crude glycerol resulting from biodiesel production. *Environmental Progress*, 26(4):338-348.
- Jun SA, Moon C, Kang CH, Kong SW, Sang BI, Um Y.** (2010) Microbial fed-batch production of 1,3-propanediol using raw glycerol with suspended and immobilized *Klebsiella pneumoniae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 161:491-501.

-K-

- Kaur G, Srivastava AK, Chand S.** (2012a). Advances in biotechnological production of 1,3-propanediol. *Biochemical Engineering Journal*, 64:106-118.
- Kaur G, Srivastava AK, Chand S.** (2012b). Mathematical modelling approach for concentration and productivity enhancement of 1,3-propanediol using *Clostridium diolis*. *Biochemical Engineering Journal*, 68:34-41.
- Kaur G, Srivastava AK, Chand S.** (2012c). Determination of kinetic parameters of 1,3-propanediol fermentation by *Clostridium diolis* using statistically optimized medium. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35:1147-1156.
- Kivistö A, Santala V, Karp M.** (2012). 1,3-Propanediol production and tolerance of a halophilic fermentative bacterium, *Halanaerobium saccharolyticum* subsp. *saccharolyticum*. *Journal of Biotechnology*, 158:242-247.
- Koutinas A, Wang RH, Binn C.** (2007). The biochemurgist - Bioconversion of agricultural raw materials for chemical production. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 1:24–38.

-L-

- Lam MK, Lee KT** (2012) Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward. *Biotechnology Advances*, 30:673-690.
- Lee PC, Lee WG, Lee SY, Chang HN.** (2001) Succinic acid production with reduced by-product formation in the fermentation of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* using glycerol as a carbon source. *Biotechnology and Bioengineering*, 72:41–48.
- Lee SJ, Kim SB, Kang SW, Han SO, Park C, Kim AW.** (2012) Effect of crude glycerol-derived inhibitors on ethanol production by *Enterobacter aerogenes*. *Bioprocess and Biostystem Engineering*, 35:85-92.

- Leoneti AB, Aragao-Leoneti V, de Oliveira SVB.** (2012). Glycerol as a by-product of biodiesel production in Brazil: Alternatives for the use of unrefined glycerol. *Renewable energy*, 45:138-145.
- Liang Q, Zhang H, Li S, Qi Q** (2011) Construction of stress-induced metabolic pathway from glucose to 1,3-propanediol in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89:57-62.
- Li D, Dai JY, Xiu ZL.** (2010) A novel strategy for integrated utilization of Jerusalem artichoke stalk and tuber for production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. *Bioresource Technology*, 101:8342–8347.
- Limsowtin GKY, Broome MC, Powell IB.** (2002) Lactic Acid Bacteria, Taxonomy. In: *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Rogisnski H, Fuquay J, Fox P (Eds.), Academic Press, Reino Unido, p:1470-1478.
- Lin R, Liu H, Hao J, Cheng K, Liu D.** (2005) Enhancement of 1,3-propanediol production by *Klebsiella pneumoniae* with fumarate addition. *Biotechnology Letters*, 27:1755–1759.
- Lin Y, Tanaka S.** (2006) Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69: 627-642.
- Liu X, Jensen PR, Workman M.** (2012) Bioconversion of crude glycerol feedstocks into ethanol by *Pachysolen tannophilus*. *Bioresource Technology*, 104:579-586.
- Liu H, Ou X, Zhou S, Liu D.** (2010) Microbial 1,3-Propanediol, Its Copolymerization with Terephthalate, and Applications, in: Chen, G.Q., (Ed.), *Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications*. *Microbiology Monographs*, Vol. 14, Berlin Heidelberg, pp. 405-425.
- Liu HJ, Zhang DJ, Xu YH, Mu Y, Sun YQ, Xiu ZL.** (2007) Microbial production of 1,3-propanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* under micro-aerobic conditions up to a pilot scale. *Biotechnology Letters*, 29:1281–1285.
- Long SK, Patrick R.** (1963) The present status of the 2,3-butylene glycol fermentation. *Advances in Applied Microbiology*, 5:135–155.
- Luers F, Seyfried M, Daniel R, Gottschalk G.** (1997). Glycerol conversion to 1,3-propanediol by *Clostridium pasteurianum*: cloning and expression of the gene encoding 1,3-propanediol dehydrogenase. *FEMS Microbiology Letters*, 154:337–345.
- Lüthi-Peng Q, Dileme FB, Puhan Z.** (2002) Effect of glucose on glycerol bioconversion by *Lactobacillus reuteri*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59:289–296.
- M-
- Ma BB, Xu XL, Zhang GL, Wang LW, Wu M, Li C.** (2009) Microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* XJPD-Li under different aeration strategies. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 152(1):127–134.
- Maddox IS.** (1996) Microbial production of 2,3-butanediol. In: Rehm HJ, Reed G, Pühler A, Stadler P, editors. *Biotechnology*. 2nd Edition. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft, p. 269–291.
- Magee RJ, Kosaric N.** (1987) The microbial production of 2,3-butanediol. *Advances in Applied Microbiology*, 32:89-161.
- Malaoui H, Marczak R.** (2000) Purification and characterization of the 1-3-propanediol dehydrogenase of *Clostridium butyricum* E5. *Enzyme and Microbial Technology*, 27:399–405
- Malaoui H, Marczak R.** (2001) Influence of glucose metabolism by wild-type and mutant strains of *Clostridium butyricum* E5 grown in chemostatic culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55:226–233.
- Mamma D, Koullas D, Fountoukidis G, Kekos D, Macris BJ, Koukios E.** (1996) Bioethanol from Sweet Sorghum: Simultaneous Saccharification and Fermentation of Carbohydrates by a Mixed Microbial Culture. *Process Biochemistry*, 31 (4): 377-381.

- Mangayil R, Karp M, Santala V.** (2012) Bioconversion of crude glycerol from biodiesel production to hydrogen. International Journal of hydrogen energy In press
- Maervoet VET, Beauprez J, De Maeseire SL, Soetaert W, De Mey M.** (2012). *Citrobacter werkmanii*, a new candidate for the production of 1,3-propanediol: strain selection and carbon source optimization. Green Chemistry, 14:2168-2178.
- McCowen SM, Phibbs PV, Feary TW.** (1981) Glycerol catabolism in wild-type and mutant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Current Microbiology 5:191–196.
- McCoy M** (2006) An unlikely impact. Chemical and Engineering News, 83:24-26.
- Menzel K, Zeng AP, Deckwer WD.** (1997). High concentration and productivity of 1,3-propanediol from continuous fermentation of glycerol by *Klebsiella pneumoniae*. Enzyme and Microbial Technology, 20:82–86.
- Moon C, Ahn JH, Kim SW, Sang BI, Um Y.** (2010) Effect of Biodiesel-derived Raw Glycerol on 1,3-Propanediol Production by Different Microorganisms. Applied Biochemistry and Biotechnology, 161:502–510.
- Mu Y, Teng H, Zhang DJ, Wang W, Xiu ZL.** (2006) Microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* using crude glycerol from biodiesel preparation. Biotechnology Letters, 28:1755-1759.
- Mu Y, Xiu ZL, Zhang DJ.** (2008) A combined bioprocess of biodiesel production by lipase with microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae*. Biochemistry Engineering Journal, 40:537–41.
- Muraka A, Dharmadi Y, Yazdani SS, Gonzalez R.** (2007) Fermentative Utilization of Glycerol by *Escherichia coli* and Its Implications for the Production of Fuels and Chemicals. Applied and Environmental Microbiology, 74: 1124-1135.
- N-
- Naik SN, Goud VV, Rout PK., Dalai AK.** (2010) Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 14:578-597.
- Nakamura CE, Whited GM** (2003) Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol. Current Opinion in Biotechnology 14:454-459.
- Nakashimada Y, Marwoto B, Kashiwamura T, Kakizono T, Nishio N.** (2000) Enhanced 2,3-butanediol production by addition of acetic acid in *Paenibacillus polymyxa*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 90:661–664.
- Németh A, Kupcsulik B, Sevelle B.** (2003). 1,3-Propanediol oxidoreductase production with *Klebsiella pneumoniae* DSM2026. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 19:659–663.
- Nemeth A, Sevelle B.** (2008) Development of a new Bioprocess for production of 1,3-propanediol I.: modeling of glycerol bioconversion to 1,3-propanediol with *Klebsiella pneumoniae* enzymes. Applied Biochemistry and Biotechnology, 144:47–58.
- Nicholson WL.** (2008) The *Bacillus subtilis* ydjL (bdhA) gene encodes acetoin reductase/2,3-butanediol dehydrogenase. Applied and Environmental Microbiology, 74:6832–6838.
- Nilegaonkar SS, Bhosale SB, Kshirsagar DC, Kapadi AH.** (1992) Production of 2,3-butanediol from glucose by *Bacillus licheniformis*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 8:378–381.
- O-
- Oh BR, Seo JW, Heo SY, Hong WK, Luo LH, Joe MH, Park DH, Kim CH.** (2011) Efficient production of ethanol from crude glycerol by a *Klebsiella pneumoniae* mutant strain. Bioresource Technology, 102:3918-3922.
- Ohta K, Beall DS, Mejia JP, Shanmugam KT, Ingram LO.** (1991) Metabolic Engineering of *Klebsiella oxytoca* M5A1 for Ethanol Production from Xylose and Glucose. Applied and Environmental Microbiology, 57: 2810-2815.

- O'Sullivan L, Ross R P, Hill C.** (2002). Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie* 84: 593–604.
- Otte B, Gruwalt E, Mahmoud O, Jennewein S.** (2009) Genome Shuffling in *Clostridium diolis* DSM 15410 for Improved 1,3-Propanediol Production. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(24):7610-7616.

-P-

- Pagliari M, Ciriminna R, Kimura H, Rossi M, Della Pina C.** (2007). From Glycerol to Value-added Products. *Angewandte Chemie International Edition*, 46:4434-4440.
- Pagliari M, Rossi M.** (2008). The Future of glycerol: New Uses of a Versatile Raw Material. In: *RSC Green Chemistry Book Series Chapters: 1-2*, p:1-35.
- Pandey A, Josi V, Nigam P, Soccol C.** (1999) Enterobacteriaceae, Coliforms and *E. coli*. In: *Encyclopedia of Microbiology*, Richard RK, Batt CA and Patel PD, (Eds.). American Press, New York, p:604-610.
- 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 (Editor) Microbial Conversions of Raw Glycerol*, Nova Science Publishers Inc, p:137-168.
- Papanikolaou S, Aggelis G.** (2003) Modelling aspects of the biotechnological valorization of raw glycerol: production of citric acid by *Yarrowia lipolytica* and 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 78:542–547.
- 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 Technology*, 21(4):83–87.
- 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. *Journal of Biotechnology*, 77:191-208.
- Papanikolaou S, Fick M, Aggelis G.** (2004) The effect of raw glycerol concentration on the production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 79:1189–1196.
- Papanikolaou S, Fakas S, Fick M, Chealot I, Galiotou-Panayotou M, Komaitis M, Marc I, Aggelis G.** (2008) Biotechnological valorization of raw glycerol discharged after biodiesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: production of 1, 3-propanediol, citric acid and single cell oil. *Biomass and Bioenergy*, 32:60–71.
- Paramithiotis S, Tsiasiotou S, Drosinos EH.** (2010) Comparative study of spontaneously fermented sourdoughs originating from two regions of Greece: Peloponnesus and Thessaly. *European Food Research Technology*, 231:883-890.
- Pasteris SE, Strasser de Saad AM.** (2005) Aerobic glycerol catabolism by *Pediococcus pentosaceus* isolated from wine. *Food Microbiology*, 22:39-407.
- Perego P, Converti A, Del Borghi A, Canepa P.** (2000) 2,3-Butanediol production by *Enterobacter aerogenes*: selection of the optimal conditions and application to food industry residues. *Bioprocess Engineering*, 23:613–620.
- Peters D.** (2007) Raw Materials. *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*, 105: 1–30.
- Pettdemange H, Cherrier C, Raval G, Gay R.** (1976) Regulation of the NADH-ferredoxin oxidoreductase in *Clostridia* of the butyric group. *Biochimica et Biophysica Acta*, 421: 334-347.
- Pettdemange E, Dürr C, Abbad-Andaloussi S, Raval G.** (1995) Fermentation of raw glycerol to 1,3-propanediol by new strains of *Clostridium butyricum*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 15:498-502.
- Petrini P, De Ponti S, Farea S, Tanzi MC.** (1999) Polyurethane-maleamides for cardiovascular applications: synthesis and properties. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 10:711–4.

- Petrov K, Petrova P.** (2009) High production of 2,3-butanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* G31. Applied Microbiology and Biotechnology, 84:659–665.
- Petrov K, Petrova P.** (2010) Enhanced production of 2,3-butanediol from glycerol by forced pH fluctuations. Applied Microbiology and Biotechnology, 87:943-949.
- Petrov K, Stoyanov A.** (2012) Accelerated production of 1,3-propanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* using the method of forced pH fluctuations. Bioprocess and Biosystem Engineering, In press DOI: 10.1007/s00449-011-0569-0.
- Pflugmacher U, Gottschalk G.** (1994) Development of an immobilized cell reactor for the production of 1,3-propanediol by *Citrobacter freundii*. Applied Microbiology and Biotechnology, 41:313–6.
- Posada JA, Cardona CA.** (2010) Design and analysis of fuel ethanol production from raw glycerol. Energy, 35:5285-5293.
- Posada JA, Rincón LE, Cardona CA.** (2012) Design and analysis of biorefineries based on raw glycerol: Addressing the glycerol problem. Bioresource Technology 111: 282–293.
- Q-
- Qin JY, Xiao ZJ, Ma CQ, Xie NZ, Liu PH, Xu P.** (2006) Production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae* using glucose and ammonium phosphate. Chinese Journal of Chemical Engineering, 14:132–136.
- R-
- Ragout A, Sineriz F, Diekmann H, de Valdez GF.** (1996) Shift in the fermentation balance of *Lactobacillus reuteri* in the presence of glycerol. Fermentation Biotechnology Letters, 18:1105–1108.
- Rehm H.** (1996) Microbial production of glycerol and other polyols. In: Biotechnology. Weinheim: VCH, p. 205–27.
- Rehman A, Matsumura M, Nomura N, Sato S.** (2008a) Growth and 1,3-propanediol production on pre-treated sunflower oil bio-diesel raw glycerol using a strict anaerobe *Clostridium butyricum*. Current Research in Bacteriology, 1(1):7-16.
- Rehman A, Wijesekara SRG, Nomura N, Sato S, Matsumura M.** (2008b) Pre-treatment and utilization of raw glycerol from sunflower oil biodiesel for growth and 1,3-propanediol production by *Clostridium butyricum*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 83(7):1072-1080.
- Reimann A, Biebl H.** (1996) Production of 1, 3-propanediol by *Clostridium butyricum* DSM 5431 and product tolerant mutants in fed-batch culture: feeding strategy for glycerol and ammonium. Biotechnology Letters, 18:827–832.
- Reimann A, Abbad-Andaloussi S, Biebl H, Petitdemange H.** (1998) 1,3-Propanediol formation with product-tolerant mutants of *Clostridium butyricum* DSM 5431 in continuous culture: productivity, carbon and electron flow. Journal of Applied Microbiology, 84:1125–1130.
- Ringel AK, Wilkens E, Hortig D, Willke T, Vorlop KD.** (2012) An improved screening method for microorganisms able to convert crude glycerol to 1,3-propanediol and to tolerate high product concentrations. Applied Microbiology and Biotechnology, 93(3):1049-1056.
- Rossi DM, de Costa JB, de Souza EA, do Carmo Ruaro Peralba M, Ayub MAZ.** (2012) Bioconversion of residual glycerol from biodiesel synthesis into 1,3-propanediol and ethanol by isolated bacteria from environmental consortia. Renewable Energy, 39:223-227.

-S-

- Saha BC.** (2003) Hemocellulose bioconversion. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 30:279–291.
- 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. Biotechnology Letters, 16:832–836.

- Sakai S, Yagishita T.** (2007) Microbial Production of Hydrogen and Ethanol From Glycerol-Containing Wastes Discharged From a Biodiesel Fuel Production Plant in a Bioelectrochemical Reactor With Thionine. *Biotechnology and Bioengineering*, 98(2): 340-348.
- Sarkar N, Ghosh SK, Bannerjee S, Aikat K.** (2012) Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renewable Energy*, 37: 19-27.
- Sarris D, Kotseridis Y, Linga M, Galiotou-Panayotou M, Papanikolaou S.** (2009) Enhanced ethanol production, volatile compound biosynthesis and fungicide removal during growth of a newly isolated *Saccharomyces cerevisiae* strain on enriched pasteurized grape musts. *Engineering in Life Science*, 9:29-37.
- Sattayasamitsathit S, Prasertsana P, Methacanon P.** (2011) Statistical optimization for simultaneous production of 1,3-propanediol and 2,3-butanediol using crude glycerol by newly bacterial isolate. *Process Biochemistry*, 46: 608–614.
- Saxena RK, Anand P, Saran S, Isar J.** (2009) Microbial production of 1,3-propanediol: Recent developments and emerging opportunities. *Biotechnology Advances*, 27:895-913.
- Schutz H, Radler F.** (1984) Anaerobic reduction of glycerol to 1,3 –propanediol by *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus buchneri*. *Systematic and Applied Microbiology* 5:169–178.
- Sims REH, Mabee W, Saddler JN, Taylor M.** (2010) An overview of second generation biofuel technologies. *Bioresource Technology*, 101:1570-1580.
- Slininger PJ, Bothast RJ.** (1985) Optimizing aerobic conversion of glycerol to 3 hydroxypropionaldehyde. *Applied and Environmental Microbiology* 50:1444–50.
- Stephanopoulos GN, Aristidou AA, Nielsen J** (1998). *Metabolic engineering: principles and methodologies*. Elsevier Science: Academic Press.
- Stormer FC.** (1968) Evidence for induction of the 2,3-butanediol-forming enzymes in *Aerobacter aerogenes*. *FEBS Letters*, 2:36–38.
- Stryer L.**(1997) Βιοχημεία. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
- Sun J, van den Heuvel J, Soucaille P, Qu Y, Zeng A-P.** (2003) Comparative Genomic Analysis of dha Regulon and Related Genes for Anaerobic Glycerol Metabolism in Bacteria. *Biotechnology in Progress*, 19:263-272.
- Sun LH, Wang XD, Dai JY, Xiu ZL.** (2009) Microbial production of 2,3-butanediol from Jerusalem artichoke tubers by *Klebsiella pneumoniae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82: 847–852.
- Sun LH, Song ZY, Sun YQ, Xiu ZL.** (2010) Dynamic behavior of glycerol–glucose co-fermentation for 1,3-propanediol production by *Klebsiella pneumoniae* DSM 2026 under micro-aerobic conditions. *World Journal of Microbiology Biotechnology*, 26:1401–1407.
- Syu MJ.** (2001) Biological production of 2,3-butanediol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55:10–18.
- T-
- Taherzadeh M, Adler L, Liden G.** (2002) Strategies for enhancing fermentative production of glycerol-a review. *Enzyme and Microbial Technology*, 31:53–66.
- Tag JR, Dajani AS, Wannamaker LW.** (1976) Bacteriocines of gram-positive bacteria. *Bacterial Reviews* 40:722-756.
- Talarico TL, Axelsson LT, Novotny J, Fiuzat M, Dobrogosz WJ.** (1990) Utilization of glycerol as a hydrogen acceptor by *Lactobacillus reuteri* – purification of propanediol-NAD⁺ oxidoreductase. *Applied and Environmental Microbiology*, 56:943–948.
- Talarico TL, Casas IA, Chung TC, Dobrogosz WJ.** (1988) Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 32:1854–1858.

- Talarico TL, Dobrogosz WJ.** (1990) Purification and characterization of glycerol dehydratase from *Lactobacillus reuteri*. Applied and Environmental Microbiology, 56:1195–1197.
- Tang IC, Okos MR, Yang ST.** (1989) Effect of pH and acetic acid on homoacetic fermentation of lactate by *Clostridium formicoaceticum*. Biotechnology and Bioengineering, 34:1063–1074.
- Tang X, Tan Y, Zhu H, Zhao K, Shen W.** (2009) Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol by an engineered strain of *Escherichia coli*. Applied and Environmental Microbiology, 75(6):1628–1634.
- Tao F, Miao JY, Shi GY, Zhang KC.** (2005) Ethanol fermentation by an acid-tolerant *Zymomonas mobilis* under nonsterilized condition. Process Biochemistry, 40:183–187.
- Tao J, Wang X, Shen Y, Wei D.** (2005) Strategy for the improvement of prodigiosin production by a *Serratia marcescens* mutant through fed-batch fermentation. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 21:969–72.
- Tong IT, Liao HH, Cameron DC.** (1991) 1,3-propanediol production by *Escherichia coli* expressing genes from the *Klebsiella pneumoniae* dha regulon. Applied and Environmental Microbiology, 57:3541–3546.
- U-
- Underkofler LA and Hickey RJ** (1954). Industrial Fermentations. Chemical Publishing Company, New York, Vol. 2, pp. 27-94.
- V-
- Vandenbergh PA.** (1993). Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. FEEMS Microbiology Reviews 12:221-238.
- Van Houdt R, Aertsen A, Michiels CW.** (2007) Quorum-sensing-dependent switch to butanediol fermentation prevents lethal medium acidification in *Aeromonas hydrophila* AH-1N. Research in Microbiology, 158:379–385.
- Vanhooren PT, de Baets S, Bruggeman G, Vandamme EJ.** (1999) *Klebsiella*. In: Encyclopedia of Food Microbiology, Robinson RK, Batt CA, Patel P, (Eds.), Academic Press, San Diego, p: 1107-1115.
- Veiga da Cunha M, Foster MA.** (1992) 1,3-Propanediol-NAD⁺ oxidoreductase of *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus buchneri*. Applied and Environmental Microbiology 58:2005–2010.
- Verdugo C, Luna D, Posadillo A, Sancho ED, Rodríguez S, Bautista F, Luque R, Marinas JM, Romero AA.** (2012) Production of a new second generation biodiesel with a low cost lipase derived from *Thermomyces lanuginosus*: Optimization by response surface methodology. Catalysis Today, 167:107-112.
- Vijaikishore P, Karanth N.** (1986) Glycerol production by fermentation—a review. Process Biochemistry, 21:54–57.
- Vizoso Pinto MG, Pasteris SE, Strasser de Saad AM.** (2004) Glycerol catabolism by *Pediococcus pentosaceus* isolated from beer. Food Microbiology 21:111-118.
- Vlysidis A, Binns M, Webb C, Theodoropoulos C.** (2011a) A techno-economic analysis of biodiesel biorefineries: Assessment of intergraded designs for the co-production of fuels and chemicals. Energy, 36:4671-4683.
- Vlysidis A, Binns M, Webb C, Theodoropoulos C.** (2011b) Glycerol utilisation for the production of chemicals: Conversion to succinic acid, a combined experimental and computational study. Biochemical Engineering Journal, 58– 59: 1– 11.
- Voegele RT, Sweet GD, Boos W.** (1993) Glycerol kinase of *Escherichia coli* is activated by interaction with the glycerol facilitator. Journal of Bacteriology, 175:1087–94.
- W-
- Wang ZX, Zhugea J, Fanga H, Prior BA.** (2001) Glycerol production by microbial fermentation: A review. Biotechnology Advances, 19:201–223.

- Wang Y, Teng H, Xiu Z.** (2011) Effect of aeration strategy on the metabolic flux of *Klebsiella pneumoniae* producing 1,3-propanediol in continuous cultures at different glycerol concentrations. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38(6):705-715.
- Willke TH, Vorlop KD.** (2004). Industrial bioconversion of renewable resources as an alternative to conventional chemistry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66:131–142.
- Willke TH, Vorlop KD.** (2008) Biotransformation of glycerol into 1,3-propanediol. *European Journal of Lipid Science Technology*, 110: 831-840.
- Wilkens E, Ringel AK, Hortig D, Willke T, Vorlop KD.** (2012) High-level production of 1,3-propanediol from crude glycerol by *Clostridium butyricum* AKR102a. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93:1057–1063.
- Wolfson A, Litvak G, Dlugy C, Tavor D.** (2009). Employing crude glycerol from biodiesel production as an alternative green reaction medium. *Industrial Crops Products*, 30:78-81.
- Wu KJ, Lin YH, Lo Y-C, Chen C-Y, Chen W-M, Chang J-S.** (2011) *Journal of Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 42: 20-25.

-X-

- Xiu ZL, Song BH, Wang ZT, Sun LH, Feng EM, Zeng AP.** (2004) Optimization of dissimilation of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* in one- and two-stage anaerobic cultures. *Biochemistry Engineering Journal*, 19:189–97.
- Xiu ZL, Chen X, Sun YQ, Zhang DJ.** (2007) Stoichiometric analysis and experimental investigation of glycerol–glucose cofermentation in *Klebsiella pneumoniae* under microaerobic conditions. *Biochemistry Engineering Journal*, 33:42–52.
- Xiu ZL, Zeng AP.** (2008) Present state and perspective of downstream processing of biologically produced 1,3-propanediol and 2,3-butanediol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78:917–926.
- Xu XL, Zhang GL, Wang LW, Ma BB, Li C.** (2009a) Quantitative analysis on inactivation and reactivation of recombinant glycerol dehydratase from *Klebsiella pneumoniae* XJPD-Li. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 56:108–14.
- Xu YZ, Guo NN, Zheng ZM, Ou XJ, Liu XJ, Liu DH.** (2009b) Metabolism in 1,3-propanediol fed-batch fermentation by a D-lactate deficient mutant of *Klebsiella pneumoniae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 104: 965-972.
- Xu YZ, Wu RC, Zheng ZM, Liu DH.** (2010) Influence of dhaT mutation of *K. pneumoniae* on 1,3-propanediol fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(6):1491-1497.
- Xue X, Li W, Li Z, Xia Y, YE Q.** (2010) Enhanced 1,3-propanediol production by supply of organic acids and repeated fed-batch culture. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37:681–687.

-Y-

- Yang G, Tian J, Li J.** (2007) Fermentation of 1, 3-propanediol by a lactate deficient mutant of *Klebsiella oxytoca* under microaerobic conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73:1017-1024.
- Yazdani SS, Gonzalez R.** (2007) Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Current Opinion in Biotechnology* 18:213-219.
- Yazdani SS, Gonzalez R.** (2008) Engineering *Escherichia coli* for the efficient conversion of glycerol to ethanol and co-products. *Metabolic Engineering*, 10:340-351.
- Yu KO, Kim SW, Han SO.** (2010a) Engineering of glycerol utilization pathway for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*, 101:4157-4161.
- Yu KO, Kim SW, Han SO.** (2010b) Reduction of glycerol production to improve ethanol yield in an engineered *Saccharomyces cerevisiae* using glycerol as a substrate. *Journal of Biotechnology*, 150:209–214.

Yuste AJ, Dorado MP. (2006) A neural network approach to simulate biodiesel production from waste olive oil. *Energy and Fuels*, 20:399–402.

-Z-

Zeng AP, Biebl H. (2002). Bulk chemicals from biotechnology: the case of 1,3-propanediol production and the new trends. In: Scheper T, editor. *Advances in biochemical engineering and biotechnology*, vol. 74. Heidelberg: Springer Berlin, p. 239–259.

Zeng AP, Biebl H, Deckwer WD. (1990a) Effect of pH and acetic acid on growth and 2,3-butanediol production of *Enterobacter aerogenes* in continuous culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 33:485–489.

Zeng AP, Biebl H, Deckwer WD. (1990b) 2,3-Butanediol production by *Enterobacter aerogenes* in continuous culture: role of oxygen supply. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 33:264–268.

Zeng AP, Biebl H, Deckwer WD. (1991) Production of 2,3-butanediol in a membrane bioreactor with cell recycle. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 34:463–468.

Zeng AP, Biebl H, Schlieker H, Decker WD. (1993) Pathway analysis of glycerol fermentation by *Klebsiella pneumoniae*: Regulation of reducing equivalent balance and product formation. *Enzyme Microbiology and Technology*, 15:770-779.

Zeng AP, Byun T-G, Posten C, Deckwer W-D (1994a) Use of the respiratory quotient as a control parameter for optimum oxygen supply and scale-up of 2,3-butanediol production under microaerobic conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 44:1107–1114.

Zeng AP, Ross A, Hibel H, Tag C, Günzel B, Decker WD. (1994b) Multiple product inhibition and growth modeling of *Clostridium butyricum* and *Klebsiella pneumoniae* in glycerol fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 44:902–911.

Zeng AP, Sabra W. (2011) Microbial production of diols as platform chemicals: Recent progress. *Current Opinion in Biotechnology* 22:749-757.

Zhang G, Yang G, Wang X, Guo Q, Li Y, Li J. (2012) Influence of Blocking of 2,3-Butanediol Pathway on Glycerol Metabolism for 1,3-Propanediol Production by *Klebsiella oxytoca*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* In press DOI 10.1007/s12010-011-9363-3.

Zhang Y, Huang Z, Dua C, Li, Cao Z. (2009) Introduction of an NADH regeneration system into *Klebsiella oxytoca* leads to an enhanced oxidative and reductive metabolism of glycerol. *Metabolic Engineering* 11:101–106.

Zhang X, Li Y, Zhuge B, Tang X, Shen W, Rao Z, Fang H, Zhuge J. (2006a) Construction of a novel recombinant *Escherichia coli* strain capable of producing 1,3-propanediol and optimization of fermentation parameters by statistical design. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22:945–952.

Zhang Z, Li Y, Du C, Liu M, Cao Z. (2006b) Inactivation of aldehyde dehydrogenase: a key factor for engineering 1, 3-propanediol production by *Klebsiella pneumoniae*. *Metabolic Engineering*, 8:578–86.

Zhang GL, Ma BB, Xu XL, Li C, Wang L. (2007) Fast conversion of glycerol to 1,3-propanediol by a new strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Biochemistry Engineering Journal*, 37:256–260.

Zhao YN, Chen G, Yao SJ. (2006) Microbial production of 1,3-propanediol from glycerol by encapsulated *Klebsiella pneumoniae*. *Biochemistry Engineering Journal*, 32:93–99.

Zheng Y, Cao Y, Fang B. (2004) Cloning and sequence analysis of the dhaT gene of the 1,3-propanediol regulon from *Klebsiella pneumoniae*. *Biotechnology Letters*, 26:251–255.

Zheng P, Wereath K, Sun J, van den Heuvel J, An-Ping Zeng A-P. (2006) Overexpression of genes of the dha regulon and its effects on cell growth, glycerol fermentation to 1,3-propanediol and plasmid stability in *Klebsiella pneumoniae*. *Process Biochemistry*, 4:2160–2169.

- Zheng P, Wereath K, Sun J, van den Heuvel J, Zeng AP.** (2006) Overexpression of genes of the dha regulon and its effects on cell growth, glycerol fermentation to 1,3-propanediol and plasmid stability in *Klebsiella pneumoniae*. *Process Biochemistry*, 41:2160–2169.
- Zheng ZM, Cheng KK, Hu QL, Liu HJ, Guo NN, Liu D.** (2008a) Effect of culture conditions on 3-hydroxypropionaldehyde detoxification in 1,3-propanediol fermentation by *Klebsiella pneumoniae*. *Biochemistry Engineering Journal*, 39(2):305–10.
- Zheng ZM, Xu YZ, Liu HJ, Guo NN, Cai ZZ, Liu DH.** (2008b) Physiological mechanism of sequential products synthesis in 1,3-propanediol fed-batch fermentation by *Klebsiella pneumoniae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 100(5):923–932.
- Zhu MM, Lawman PD, Cameron DC.** (2002) Improving 1,3-propanediol production from glycerol in a metabolically engineered *Escherichia coli* by reducing accumulation of sn-glycerol-3-phosphate. *Biotechnology in Progress*, 18:694–699.