

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ  
Π.Μ.Σ. «ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»  
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ «ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ»  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

## ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Μεταπτυχιακή φοιτήτρια: Σοφία Ν. Κοντογιάννη

Επιβλέπων καθηγητής: Μάριος Ματαράγκας, Επίκουρος καθηγητής

«Μελέτη και βελτιστοποίηση παραγωγής ενώσεων, οι οποίες  
λειτουργούν ως βελτιωτικά αρώματος, από βακτηριακά στελέχη»

---

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ  
Π.Μ.Σ. «ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»  
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ «ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ»  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

## ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Μεταπτυχιακή φοιτήτρια: Σοφία Ν. Κοντογιάννη  
Επιβλέπων καθηγητής: Μάριος Ματαράγκας, Επίκουρος καθηγητής

Μεταπτυχιακή φοιτήτρια: Σοφία Ν. Κοντογιάννη

Επιβλέπων καθηγητής: Μάριος Ματαράγκας, Επίκουρος καθηγητής

Αθήνα, 2016

## ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

«Μελέτη και βελτιστοποίηση παραγωγής ενώσεων, οι οποίες λειτουργούν ως βελτιωτικά αρώματος, από βακτηριακά στελέχη»

Μεταπτυχιακή φοιτήτρια: Σοφία Ν. Κοντογιάννη

Επιβλέπων καθηγητής: Μάριος Ματαράγκας, Επίκουρος καθηγητής

Τριμελής επιτροπή:

Μάριος Ματαράγκας, Επίκουρος καθηγητής

Σεραφείμ Παπανικολάου, Αναπληρωτής καθηγητής

Ελευθέριος Δροσινός, Καθηγητής

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της δυνατότητας παραγωγής ακετοΐνης, 2,3-βουτανοδιόλης και βουτυρικού οξέος, ενώσεων δηλαδή που λειτουργούν σαν βελτιωτικά αρώματος, από βακτηριακά στελέχη, που δεν διακρίνονται για την παθογένειά τους, κατά την ανάπτυξή τους σε διαφορετικά υποστρώματα. Εν συνεχεία επόμενος στόχος ήταν η μελέτη της δυνατότητας βελτιστοποίησης της παραγωγής ακετοΐνης, 2,3-βουτανοδιόλης και βουτυρικού οξέος, για τα στελέχη εκείνα τα οποία παρουσίασαν τη μεγαλύτερη ικανότητα παραγωγής.

Η δυνατότητα παραγωγής ακετοΐνης και 2,3-βουτανοδιόλης εξετάστηκε για τα βακτηριακά στελέχη LQC 1405, LQC 1407, LQC 1522, LQC 1523, LQC 1549 και LQC 1553 του είδους *Bacillus thuringiensis*. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε υπό αερόβιες συνθήκες.

Στη μελέτη, η αύξηση των στελεχών πραγματοποιήθηκε σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες υγρής ζύμωσης με χρήση των θρεπτικών υποστρωμάτων Brain-Heart Infusion (BHI) εμπλουτισμένο με σουκρόζη και BHI εμπλουτισμένο με γλυκόζη. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης μελετήθηκε η δυνατότητα παραγωγής ακετοΐνης και 2,3-βουτανοδιόλης. Διαπιστώθηκε πως το καταλληλότερο θρεπτικό υπόστρωμα για την παραγωγή ακετοΐνης και 2,3-βουτανοδιόλης, ήταν το BHI εμπλουτισμένο με γλυκόζη, ενώ το βακτηριακό στέλεχος που παρουσίασε τη μεγαλύτερη απόδοση παραγωγής ήταν το LQC 1522, το οποίο παρήγαγε τη μεγαλύτερη συγκέντρωση ακετοΐνης (6.56 g/L) και 2,3-βουτανοδιόλης (3.44 g/L) στη ζύμωση που διήρκεσε 48 h. Για το ίδιο βακτηριακό στέλεχος, LQC 1522, ακολούθησε βελτιστοποίηση της παραγωγής σε βιοαντιδραστήρα 1.2-L, με εφαρμογή καλλιέργειας ημι-συνεχούς λειτουργίας, με την κατάλληλη ρύθμιση των συνθηκών ανάπτυξης. Οι καταλληλότερες συνθήκες ήταν με θερμοκρασία 35°C, ρυθμό ανάδευσης 150 rpm, αερισμό 0.1 LPM και διατήρηση της τιμής του pH ίση με 6.5. Στις συνθήκες αυτές το στέλεχος LQC 1522 παρήγαγε ακετοΐνη (1.13 g/L) και 2,3-βουτανοδιόλη (7.89 g/L), στη ζύμωση που διήρκεσε 45 h.

Η δυνατότητα παραγωγής βουτυρικού οξέος εξετάστηκε για το βακτηριακό στέλεχος E5 του είδους *Clostridium butyricum*. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε αναερόβια, καθώς το είδος *C. butyricum* είναι αποκλειστικά αναερόβιο.

Συγκεκριμένα, η ανάπτυξη του στελέχους πραγματοποιήθηκε σε στατικές φιάλες αναεροβίωσης, στις οποίες έγινε εμφύσηση αζώτου και ακολούθως έκλεισαν αεροστεγώς, με χρήση του θρεπτικού υποστρώματος Reinforced Clostridial Medium (RCM) εμπλουτισμένο με γλυκόζη. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, υπό αναερόβιες συνθήκες, μελετήθηκε η δυνατότητα παραγωγής βουτυρικού οξέος. Διαπιστώθηκε παραγωγή μικρής ποσότητας βουτυρικού οξέος (0.39 g/L) στη ζύμωση που διήρκησε 31 h. Η χαμηλή συγκέντρωση του τελικού προϊόντος οφείλεται στη δυσκολία υπολογισμού, λόγω δημιουργίας συσσωματώματος. Ακολούθησε λοιπόν βελτιστοποίηση της παραγωγής σε βιοαντιδραστήρα 3-L, με εφαρμογή καλλιιεργειών ημι-συνεχούς λειτουργίας, με την κατάλληλη ρύθμιση των συνθηκών ανάπτυξης. Οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν ήταν αναερόβιες, με θερμοκρασία 35°C, ρυθμό ανάδευσης 180 rpm, ροή αζώτου 0.5 LPM και διατήρηση της τιμής του pH ίση με 6.8. Στις συνθήκες αυτές το στέλεχος E5 παράγαγε μεγάλη ποσότητα βουτυρικού οξέος (9.04 g/L), στη ζύμωση που διήρκησε 54 h.

Λέξεις κλειδιά: ακετοΐνη, 2,3-βουτανοδιόλη, βουτυρικό οξύ, *Bacillus thuringiensis*, Brain-Heart Infusion (BHI), σουκρόζη, γλυκόζη, *Clostridium butyricum*, Reinforced Clostridial Medium (RCM).

## “Study and optimization of production of compounds, which can be used as flavor enhancers, using newly isolated bacterial strains”

### ABSTRACT

Aim of the present study was to investigate the ability of producing acetoin, 2,3-butanediol and butyric acid, which are compounds that can be used as flavor enhancers, from newly isolated bacterial strains, not known for their pathogenicity, as they grow in different substrates. Then, next goal was to study the ability of optimizing the production of acetoin, 2,3-butanediol and butyric acid, for those strains which had the highest production capacity.

The ability of production of acetoin and 2,3-butanediol was examined for bacterial strains LQC 1405, LQC 1407, LQC 1522, LQC 1523, LQC 1549 και LQC 1553 of the species *Bacillus thuringiensis*. The study was conducted under aerobic conditions.

In the study, the growth of the strains was performed in shake flasks, used for liquid fermentation, with the use of nutrient substrates Brain-Heart Infusion (BHI) enriched with sucrose and BHI enriched with glucose. The ability of production of acetoin and 2,3-butanediol was studied during the fermentation. It was found that the most suitable nutrient medium for the production of acetoin and 2,3-butanediol was the BHI enriched with glucose, and the strain showing the highest production yield was LQC 1522, which produced the greatest acetoin (6.56 g/L) and 2,3-butanediol (3.44 g/L) concentration, during the fermentation that lasted 48 h. For the same strain, LQC 1522, optimization of the production was followed in bioreactor 1.2-L, by applying fed-batch cultures, with suitable adjustment of the growth conditions. The most relevant conditions were with temperature 35°C, stirring rate 150 rpm, aeration 0.1 LPM and pH value kept equal to 6.5. In these conditions the strain LQC 1522 produced acetoin (1.13 g/L) and 2,3-butanediol (7.89 g/L), during the fermentation that lasted 45 h.

The ability of butyric acid production was examined for the bacterial strain E5 of the species *Clostridium butyricum*. The study was carried out anaerobically, because the species *C. butyricum* is exclusively anaerobic.

More specifically, the growth of the strain was performed in stationary anaerobiosis flasks, which were sparged with nitrogen and then closed tightly, using the nutrient substrate Reinforced Clostridial Medium (RCM) enriched with glucose. The ability of butyric acid production was studied during the fermentation, under anaerobic conditions. Production of small quantity of butyric acid (0.39 g/L) was found during the fermentation that lasted 31 h. Butyric acid created agglomerations and as a result the final measured concentration was low. Then, optimization of the production was followed in bioreactor 3-L, by applying fed-batch cultures, with suitable adjustment of the growth conditions. The applied conditions were anaerobic, with temperature 35°C, stirring rate 180 rpm, nitrogen flow 0.5 LPM and pH value kept equal to 6.8. In these conditions the strain E5 produced high concentration of butyric acid (9.04 g/L), during the fermentation that lasted 54 h.

Key words: acetoin, 2,3-butanediol, butyric acid, *Bacillus thuringiensis*, Brain-Heart Infusion (BHI), sucrose, glucose, *Clostridium butyricum*, Reinforced Clostridial Medium (RCM).

*Στους γονείς μου Χρυσούλα και Νίκο που με στηρίζουν,  
στο φίλο μου Δρόσο που είναι δίπλα μου κάθε στιγμή,  
στη Ράνια και όλους τους φίλους που μου συμπαραστάθηκαν.*



*Once we accept our limits, we go beyond them.*

***Albert Einstein***

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της παρούσας μεταπτυχιακής ερευνητικής μελέτης, η εκπόνηση της οποίας πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του Ανθρώπου», οφείλω να ευχαριστήσω όλους εκείνους που συμμετείχαν στην πραγματοποίηση αυτού μου του στόχου.

Καταρχήν θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επίκουρο καθηγητή και επιβλέποντα κ. Ματαράγκα για την επίβλεψη και τη βοήθειά του, κάθε στιγμή που τη χρειάστηκα, κατά τη διάρκεια εκπόνησης της μελέτης. Ακόμη θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον αναπληρωτή καθηγητή κ. Παπανικολάου για τις πολύτιμες συμβουλές του και τις αποτελεσματικές λύσεις που πρότεινε σε όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Επιπλέον θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον καθηγητή κ. Δροσινό, για τη στήριξη και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε από την αρχή μέχρι το τέλος του μεταπτυχιακού προγράμματος. Επιπροσθέτως, ένα ευχαριστώ οφείλω στο μέλος του εργαστηριακού διδακτικού προσωπικού κ. Παραμυθιώτη, για την καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.

Ένα ιδιαίτερο και ξεχωριστό ευχαριστώ οφείλω στην υποψήφια διδάκτορα Α. Παλαιογεώργου για τη βοήθεια, την υπομονή, τη συνεχή καθοδήγηση και τις ευρηματικές ιδέες της κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Με μεγάλη εκτίμηση θέλω να αναφερθώ και σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, και να τους ευχαριστήσω για τη συνεργασία.

Κυρίως, το μεγαλύτερο ευχαριστώ θέλω να το πω σε όλους μου τους φίλους, με ξεχωριστή αναφορά στη Ράνια, για την υπομονή, την κατανόηση και τη συμπαράστασή τους.

Για το τέλος άφησα τους δικούς μου ανθρώπους, τους γονείς μου Νίκο και Χρυσούλα, που ευχαριστώ θερμά για την αμέριστη συμπαράσταση και την υποστήριξή τους, δίνοντάς μου κουράγιο σε κάθε δύσκολη στιγμή και τον αγαπημένο μου Δρόσο για τη στήριξη και την παρουσία του δίπλα μου παντού και πάντα.

Σοφία Κοντογιάννη, Αθήνα, 2016

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	3
“Study and optimization of production of compounds, which can be used as flavor enhancers, using newly isolated bacterial strains” .....	5
ABSTRACT.....	5
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	14
1.1. Τα σάκχαρα ως ανανεώσιμες πηγές άνθρακα .....	14
1.1.1. Τα γεωργο-βιομηχανικά παραπροϊόντα και απόβλητα.....	14
1.1.2. Ανανεώσιμοι υδατάνθρακες ως πηγή άνθρακα.....	17
1.2. Σύσταση των θρεπτικών υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη .....	20
1.3. Παραγόμενες ουσίες βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος της παρούσας μελέτης.....	22
1.3.1. Ακετοΐνη .....	22
1.3.1.1. Χαρακτηριστικά και βιομηχανικές εφαρμογές ακετοΐνης .....	23
1.3.2. 2,3-βουτανοδιόλη.....	24
1.3.2.1. Χαρακτηριστικά και βιομηχανικές εφαρμογές 2,3-βουτανοδιόλης .....	25
1.3.3. Βιοχημεία σύνθεσης ακετοΐνης και 2,3-βουτανοδιόλης .....	26
1.3.4. Μικροοργανισμοί-παραγωγοί ακετοΐνης και 2,3-βουτανοδιόλης .....	28
1.3.5. Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή ακετοΐνης και 2,3-βουτανοδιόλης .....	29
1.3.6. Βουτυρικό οξύ.....	30
1.3.6.1. Χαρακτηριστικά και βιομηχανικές εφαρμογές βουτυρικού οξέος .....	31
1.3.7. Βιοχημεία σύνθεσης βουτυρικού οξέος .....	32
1.3.8. Μικροοργανισμοί παραγωγοί βουτυρικού οξέος .....	33
1.3.9. Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή βουτυρικού οξέος.....	34
1.4. Το γένος <i>Bacillus</i> .....	35
1.5. Το γένος <i>Clostridium</i> .....	37
1.6. Στόχος της μεταπτυχιακής ερευνητικής μελέτης.....	40
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	41
2.1. Βιολογικό υλικό .....	42
2.2. Συνθήκες καλλιέργειας των βακτηριακών στελεχών του είδους <i>B. thuringiensis</i> ....	43
2.3. Συνθήκες καλλιέργειας του βακτηριακού στελέχους του είδους <i>C. butyricum</i> .....	46
2.4. Συνθήκες λειτουργίας του βιοαντιδραστήρα για τη μελέτη βακτηριακού στελέχους του είδους <i>B. thuringiensis</i> .....	50

2.5.	Συνθήκες λειτουργίας του βιοαντιδραστήρα για τη μελέτη του βακτηριακού στελέχους του είδους <i>C. butyricum</i> .....	52
2.6.	Αναλύσεις .....	53
2.6.1.	Προσδιορισμός pH.....	53
2.6.2.	Προσδιορισμός βιομάζας.....	53
2.6.3.	Προσδιορισμός σακχάρου, ακετοΐνης, 2,3-βουτανοδιόλης, βουτυρικού οξέος και λοιπών οργανικών οξέων .....	54
2.6.4.	Έλεγχος καθαρότητας των μικροβιακών καλλιιεργειών.....	58
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	59
3.1.	Μελέτη βακτηριακών στελεχών του είδους <i>Bacillus thuringiensis</i> σε υγρές καλλιέργειες σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες, με υπόστρωμα εμπλουτισμένο με σουκρόζη, για την παραγωγή ακετοΐνης και 2,3-βουτανοδιόλης .....	59
3.1.1.	Γενική παρουσίαση αποτελεσμάτων.....	59
3.2.	Μελέτη βακτηριακών στελεχών του είδους <i>Bacillus thuringiensis</i> σε υγρές καλλιέργειες σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες, με υπόστρωμα εμπλουτισμένο με γλυκόζη, για την παραγωγή ακετοΐνης και 2,3-βουτανοδιόλης .....	62
3.2.1.	Γενική παρουσίαση αποτελεσμάτων .....	62
3.3.	Μελέτη επιλεγμένου στελέχους του είδους <i>Bacillus thuringiensis</i> σε βιοαντιδραστήρα, με υπόστρωμα εμπλουτισμένο με γλυκόζη, για τη βελτιστοποίηση της παραγωγής ακετοΐνης και 2,3-βουτανοδιόλης.....	65
3.3.1.	Γενική παρουσίαση αποτελεσμάτων.....	66
3.4.	Μελέτη του βακτηριακού στελέχους του είδους <i>Clostridium butyricum</i> σε υγρές καλλιέργειες σε στατικές φιάλες αναεροβίωσης, με υπόστρωμα εμπλουτισμένο με γλυκόζη, για την παραγωγή βουτυρικού οξέος.....	73
3.4.1.	Γενική παρουσίαση αποτελεσμάτων.....	73
3.5.	Μελέτη του βακτηριακού στελέχους του είδους <i>Clostridium butyricum</i> σε βιοαντιδραστήρα, με υπόστρωμα εμπλουτισμένο με γλυκόζη, με εφαρμογή καλλιέργειας ημι-συνεχούς λειτουργίας, για τη βελτιστοποίηση της παραγωγής βουτυρικού οξέος.....	76
3.5.1.	Γενική παρουσίαση αποτελεσμάτων.....	77
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	80
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	93

## Συντομογραφίες

---

**BHI:** Brain-Heart Infusion

**RCM:** Reinforced Clostridial Medium

**A-ALS:** συνθετάση του α-ακετογαλακτικού

**A-ALD:** αποκαρβοξυλάση του α-ακετογαλακτικού

**BDH:** αφυδρογονάση της 2,3-βουτανοδιόλης

**TPP:** πυροφωσφορική θειαμίνη

**Y<sub>Ace/Glu</sub>:** μέγιστος θεωρητικός συντελεστής παραχθείσας ακετοΐνης ανά καταναλωθείσα γλυκόζη (g/g)

**Y<sub>2,3-BDO/Glu</sub>:** μέγιστος θεωρητικός συντελεστής παραχθείσας 2,3-βουτανοδιόλης ανά καταναλωθείσα γλυκόζη (g/)

**Y<sub>Ace/Suc</sub>:** μέγιστος θεωρητικός συντελεστής παραχθείσας ακετοΐνης ανά καταναλωθείσα σουκρόζη (g/G)

**Y<sub>2,3-BDO/Suc</sub>:** μέγιστος θεωρητικός συντελεστής παραχθείσας 2,3-βουτανοδιόλης ανά καταναλωθείσα σουκρόζη (g/g)

**Y<sub>Bui/Glu</sub>:** μέγιστος θεωρητικός συντελεστής παραχθέντος βουτυρικού οξέος ανά καταναλωθείσα γλυκόζη (g/g)

**T:** θερμοκρασία (°C)

**t:** η χρονική στιγμή της ζύμωσης (h)

**Suc<sub>0</sub>:** αρχική συγκέντρωση σουκρόζης (g/L)

**Suc<sub>f</sub>:** τελική συγκέντρωση σουκρόζης (g/L)

**Suc<sub>c</sub>:** καταναλωθείσα σουκρόζη (g/L)

**Ace:** συγκέντρωση της ακετοΐνης (g/L)

**2,3-BDO:** συγκέντρωση της 2,3-βουτανοδιόλης (g/L)

**Act:** συγκέντρωση του οξικού οξέος (g/L)

**Lac:** συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος (g/L)

**X<sub>max</sub>:** μέγιστη παραγόμενη βιομάζα (g/L)

**Y<sub>Ace</sub>:** συντελεστής απόδοσης παραγωγής ακετοΐνης προς καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g)

**Y<sub>2,3-BDO</sub>:** συντελεστής απόδοσης παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης προς καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g)

**Y<sub>t</sub>:** συνολικός συντελεστής απόδοσης προς καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g)

**Glu<sub>0</sub>:** αρχική συγκέντρωση γλυκόζης (g/L)

**Glu<sub>f</sub>:** τελική συγκέντρωση γλυκόζης (g/L)

**Glu<sub>c</sub>:** καταναλωθείσα γλυκόζη (g/L)

**Meso-2,3-BDO:** συγκέντρωση της meso-2,3-βουτανοδιόλης (g/L)

**X:** παραγόμενη βιομάζα (g/L)

**Glu:** συγκέντρωση γλυκόζης (g/L)

**But:** συγκέντρωση βουτυρικού οξέος (g/L)

**Y<sub>But</sub>:** συντελεστής απόδοσης παραγωγής βουτυρικού οξέος προς καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g)

**S<sub>0</sub>:** αρχική συγκέντρωση υποστρώματος (g/L)

**S<sub>f</sub>:** τελική συγκέντρωση υποστρώματος (g/L)

**S<sub>c</sub>:** καταναλωθέν υπόστρωμα (g/L)

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

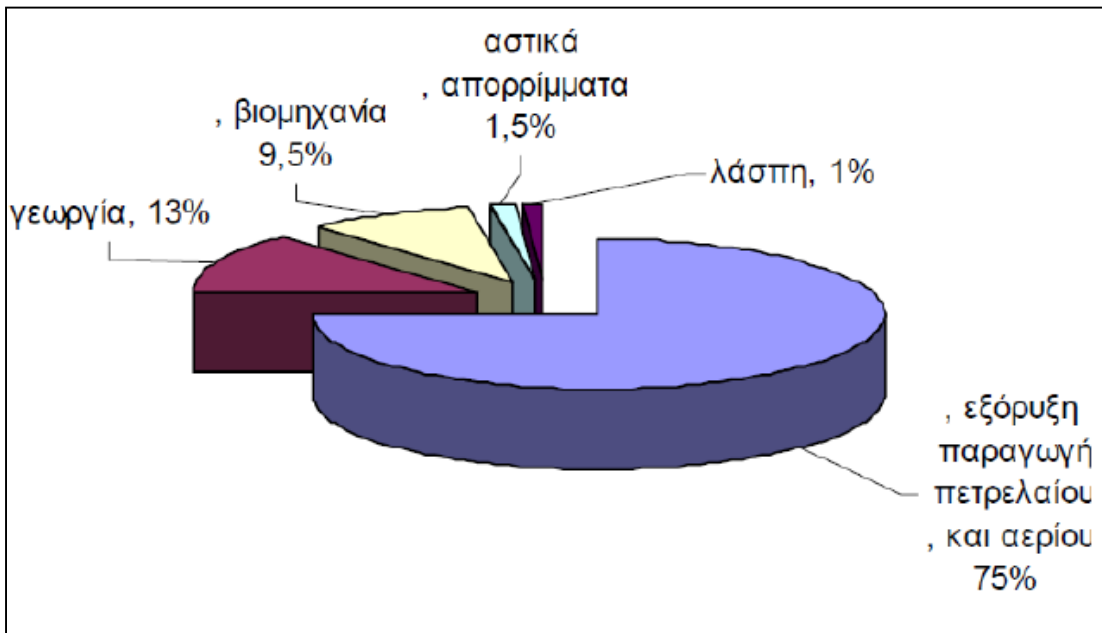
### 1.1. Τα σάκχαρα ως ανανεώσιμες πηγές άνθρακα

#### 1.1.1. Τα γεωργο-βιομηχανικά παραπροϊόντα και απόβλητα

Τα γεωργο-βιομηχανικά παραπροϊόντα και απόβλητα προέρχονται από τη δραστηριότητα των Γεωργικών Βιομηχανιών και Επιχειρήσεων Επεξεργασίας Τροφίμων και Γεωργικών Προϊόντων, αλλά και από τις διάφορες Γεωργικές εκμεταλλεύσεις. Όσο εντατικοποιούνται οι γεωργικές πρακτικές, τόσο αυξάνεται ο όγκος αυτών των παραπροϊόντων και αποβλήτων, και μάλιστα με ταχύτατους ρυθμούς. Στις ανεπτυγμένες χώρες, τα δύο τρίτα των οργανικών αυτών αποβλήτων και παραπροϊόντων παράγονται από τις γεωργικές και βιομηχανικές εκμεταλλεύσεις. Συνήθως τα βιομηχανικά απόβλητα είναι παραπροϊόντα της παραγωγικής διαδικασίας, ακαθαρσίες της πρώτης ύλης και λάσπες που παράγονται σε κάποιο σημείο της διεργασίας.

Στις ΗΠΑ, που αποτελούν χαρακτηριστικό παράδειγμα ανεπτυγμένης βιομηχανικά χώρας, παράγονται 10 δις τόνοι στερεών αποβλήτων ετησίως. Εξάλλου παράγονται περίπου 700 κιλά αστικών απορριμμάτων ανά κάτοικο ετησίως, δηλαδή δύο με τρεις φορές περισσότερα από όσα στις υπόλοιπες ανεπτυγμένες χώρες (Miller and Spoolman, 2007). Σε ετήσια βάση συσσωρεύονται 800.000.000 τόνοι στερεών παραπροϊόντων, τα οποία παράγονται κατά την επεξεργασία του φυτικού υλικού, που πραγματοποιείται με την αποφλοιώση, αποχύμωση, διήθηση, καθώς και με την πλύση, κατεργασία σε υψηλή θερμοκρασία και την παστερίωση (Miller and Spoolman, 2007). Στην Εικόνα 1.1.1.1. παρουσιάζεται η κατανομή των στερεών αποβλήτων στις ΗΠΑ ανά τομέα παραγωγής.

Τα στερεά απόβλητα μπορεί να είναι απόβλητα τύπου «ημι-κυτταρίνης» που προέρχονται από το φυτικό υλικό, και στερεά απόβλητα τύπου «ευαφομοιώτων» σακχάρων όπως τα προερχόμενα από ληγμένα προϊόντα (παιδικές τροφές, αστοχίες κατά την παραγωγή, απόβλητα ζάχαρης, ψωμιά και άλλα). Για τα «ευαφομοιώτου» τύπου απόβλητα, η βιομηχανία πληρώνει από 0.1-0.5 ευρώ ανά κιλό αποβλήτου για να απαχθούν αυτά τα απόβλητα, που συνήθως σε επόμενο στάδιο υφίστανται διεργασία κομποστοποίησης (Chen *et al.*, 2013).



Εικόνα 1.1.1. 1. Κατανομή των στερεών αποβλήτων στις ΗΠΑ ανά τομέα παραγωγής (Miller and Spoolman, 2007)

Οι ποσότητες των υγρών ή ημιστερεών αποβλήτων, που παράγονται κατά τη γεωργική πρακτική, είναι επίσης τεράστιες. Τα υγρά ή ημιστερεά απόβλητα μπορεί να είναι:

- πλούσια σε υδατάνθρακες (σάκχαρα απλά ή σύνθετα)
- πλούσια σε λίπος (βιομηχανικά λίπη και έλαια), που μπορεί να προέρχονται από σφαγεία, εστιατόρια, fast-foods, τηγανισμένα/ψημένα/ θερμικώς επεξεργασμένα λίπη
- υγρά απόβλητα ελαιουργείων, τα οποία είναι πλούσια σε σάκχαρα, οργανικά οξέα, άλατα και φαινολικά συστατικά

Ο σύγχρονος βιομηχανικός τρόπος ζωής έχει οδηγήσει στην αύξηση των παραγόμενων λυμάτων και αποβλήτων, ιδιαίτερα εκείνων που δεν έχουν υποστεί επεξεργασία, με σοβαρές επιπτώσεις για το οικοσύστημα (Jacobus and van Wyk, 2001). Φυσικά, η ανεξέλεγκτη διάθεση των αποβλήτων αποτελεί σοβαρή απειλή για το περιβάλλον, το έδαφος, τους υδάτινους πόρους και γενικότερα τη δημόσια υγεία. Όταν τα απόβλητα και τα παραπροϊόντα παραμένουν, αποσυντίθενται αρκετά γρήγορα, παράγοντας οργανικά οξέα και διάφορα δύσοσμα συστατικά, καθιστώντας ιδιαίτερος δύσκολη την αποθήκευση και τη χρήση τους. Τα λύματα είναι πλούσια σε οργανικά θρεπτικά συστατικά, και έτσι όταν αποβάλλονται στους υδάτινους αποδέκτες (θάλασσα, λίμνες, ποτάμια), δημιουργούν μεγάλες απαιτήσεις σε οξυγόνο προκειμένου να διασπαστούν αερόβια από μύκητες ή



βακτήρια. Οι υδάτινοι αποδέκτες των λυμάτων μπορεί να είναι επιφανειακοί ή υπόγειοι. Η διαρροή των στοιχείων αυτών προκαλεί το φαινόμενο του ευτροφισμού με άμεση συνέπεια τη διατάραξη της ισορροπίας του οικοσυστήματος. Αξίζει να σημειωθεί πως η διαρροή αζώτου προς τα υπόγεια ύδατα, τα καθιστά ακατάλληλα για πόση. Ένα ακόμα πρόβλημα που δημιουργείται είναι η έκλυση αερίων όπως η αμμωνία και το μεθάνιο, τα οποία ρυπαίνουν την ατμόσφαιρα (Miller and Spoolman, 2007).

Είναι ιδιαιτέρως σημαντικό λοιπόν να βρεθεί λύση για τη μόλυνση που προκαλείται από τις βιομηχανίες τροφίμων και τα απόβλητά τους (Arvanitoyannis *et al.*, 2008). Τα τελευταία χρόνια που το πρόβλημα της ρύπανσης του περιβάλλοντος έχει γίνει εμφανές, και σε συνδυασμό μάλιστα με τα διάφορα οικονομικά κίνητρα και την ανάγκη για τη διατήρηση της ενέργειας, έχουν προταθεί καινούριες μέθοδοι και πολιτικές για την βιομετατροπή και τη χρησιμοποίηση των θρεπτικών συστατικών των αποβλήτων της επεξεργασίας τροφίμων. Ουσιαστικά η επεξεργασία των αποβλήτων και των παραπροϊόντων αποβλέπει στην ανακύκλωσή τους, στην χρησιμοποίησή τους από βιομηχανίες, τη μετατροπή τους σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας ή ακόμα και τη χρήση τους ως ζωοτροφές μετά από βιολογική επεξεργασία. Ειδικότερα η βιομετατροπή των αποβλήτων έχει τραβήξει την προσοχή, καθώς αποτελούν ένα δυνατό πόρο για τη μετατροπή σε χρήσιμα προϊόντα (Bampidis *et al.*, 2006).

Έχουν αναπτυχθεί πολλές βιοτεχνολογικές διεργασίες για την αξιοποίηση των παραπροϊόντων, με σπουδαιότερες τις μικροβιακές ζυμώσεις. Τα παραπροϊόντα μπορούν να αντικαταστήσουν τα καθαρά σάκχαρα ως πρώτη ύλη στις μικροβιακές ζυμώσεις, συμβάλλοντας στη μείωση του κόστους των βιοδιεργασιών (Peters, 2007). Αυτό οφείλεται στα υψηλής αξίας συστατικά τους, όπως είναι τα σάκχαρα, οι πρωτεΐνες, τα λίπη κλπ., που μπορούν να βιομετατραπούν σε πρωτεΐνη, λίπασμα, οργανικά οξέα, βιοπλαστικά και πληθώρα άλλων προϊόντων (Galanakis, 2012)

### 1.1.2. Ανανεώσιμοι υδατάνθρακες ως πηγή άνθρακα

Οι βιομηχανικές ζυμώσεις έχουν μεγάλο εύρος εφαρμογών στη διαχείριση των αποβλήτων και των παραπροϊόντων. Τα οργανικά απόβλητα μπορούν να ζυμωθούν με ταυτόχρονη παραγωγή μεθανίου, υδρογόνου και οργανικών οξέων (Karadag *et al.*, 2010). Η βιοτεχνολογική αξιοποίηση ανανεώσιμων σακχαρούχων πρώτων υλών σχετίζεται με τη ζύμωση φυτικής ύλης που περιέχει σάκχαρα, καθώς και με τη ζύμωση βιομηχανικών και αστικών αποβλήτων, γεγονός που μπορεί να δώσει λύση στο πρόβλημα της απομάκρυνσης αυτών από το περιβάλλον (Chen *et al.*, 2013).

Η φυτική βιομάζα, όπως τα διάφορα λιγνοκυτταρινικά ή αμυλούχα υλικά, θεωρείται η καταλληλότερη επιλογή πρώτης ύλης για τις ζυμωτικές διεργασίες, δεδομένου ότι πρόκειται για μια φυσική, ανανεώσιμη οργανική ύλη, η οποία υπάρχει σε αφθονία στη φύση. Οι υδατάνθρακες είναι συστατικά των τροφίμων καθώς αποτελούν πηγή ενέργειας, αλλά και στοιχεία δομής (άμυλο, κυτταρίνη, γλυκογόνο). Τα κύρια συστατικά της φυτικής βιομάζας είναι η γλυκόζη και η ξυλόζη. Τα μίγμα αυτών των σακχάρων δεν απαντάται πάντα αυτούσιο μέσα στην οργανική ύλη. Σε πολλές περιπτώσεις απαιτείται μια προεργασία ανάκτησης των σακχάρων η οποία επιτυγχάνεται μέσω ενζυματικής υδρόλυσης ή υδρόλυσης με οξέα (Kovanda and Weinzettel, 2013; Frazer and McCaskey, 1991). Γενικά οι πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται σαν πηγή σακχαρούχων υλικών, τα οποία μπορούν να αξιοποιηθούν μέσω της βιοτεχνολογικής οδού, ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες:

- Άμεσα ζυμώσιμες πρώτες ύλες: Τα απλά σάκχαρα ή ολιγοσακχαρίδια (πχ. γλυκόζη, φρουκτόζη, σουκρόζη, λακτόζη κλπ.) ζυμώνονται απευθείας ή διασπώνται πριν τη ζύμωση με τη βοήθεια απλών υδρολυτικών διεργασιών. Στην κατηγορία των άμεσα ζυμώσιμων πρώτων υλών κατατάσσονται κάποια φρούτα πλούσια σε φρουκτόζη και σουκρόζη, το σακχαροκάλαμο, τα σακχαρότευτλα, καθώς και τα προϊόντα επεξεργασίας τους, όπως η μελάσα (Chandra *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010).

Η γλυκόζη αποτελεί δομικό συστατικό διάφορων ολιγοσακχαριτών, όπως της σουκρόζης, της λακτόζης και της μαλτόζης, καθώς επίσης και πολυσακχαριτών όπως το άμυλο, το γλυκογόνο και η κυτταρίνη. Μπορεί να παρασκευαστεί βιομηχανικά με όξινη ή ενζυμική υδρόλυση του αμύλου και με όξινη υδρόλυση της κυτταρίνης. Η γλυκόζη

αποτελεί ζυμώσιμο σάκχαρο τόσο με αερόβιους μικροοργανισμούς όσο και με αναερόβιους (παραγωγή αιθανόλης) (Godbole, 2002).

Η σουκρόζη (ή απλά ζάχαρη) είναι ευρύτατα διαδεδομένη στη φύση, ιδιαίτερα στο σακχαροκάλαμο και τα σακχαρότευτλα (περιέχουν 16-20% σουκρόζη) και αποτελούν τις δύο κυριότερες πηγές από τις οποίες παραλαμβάνεται βιομηχανικά η σουκρόζη με την εμπορική ονομασία ζάχαρη. Αποτελείται από μόρια γλυκόζης και φρουκτόζης ενωμένα μεταξύ τους με α-D-γλυκοζιτικό δεσμό και δεν είναι ζυμώσιμη απευθείας αλλά μόνο μετά την υδρόλυσή της. Η υδρόλυση της σουκρόζης μπορεί να γίνει τόσο με οξέα, όσο και με ένζυμα. Η ενζυμική υδρόλυση γίνεται με το ένζυμο ιμπερτάση και η αντίδραση καλείται ιμπερτοποίηση (Baruah *et al.*, 1993; Combes and Monsan, 1983).

- Αμυλούχες πρώτες ύλες: Τα περισσότερα αμυλούχα προϊόντα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν υπόστρωμα για τις διάφορες ζυμωτικές διεργασίες. Γενικά η ζύμωση του αμύλου αποτελεί περίπλοκη διαδικασία σε σύγκριση με τη ζύμωση των σακχάρων. Το άμυλο είναι πολυμερές της γλυκόζης και αποτελείται από δύο τύπους μορίων, την αμυλόζη και την αμυλοπηκτίνη. Η βιομετατροπή του αμύλου σε προϊόντα υψηλής αξίας (πχ. κιτρικό οξύ, αιθανόλη κλπ.) είναι μια διαδικασία που ολοκληρώνεται σε δύο στάδια. Σε πρώτο στάδιο γίνεται η υδρόλυση του αμύλου, το οποίο μετατρέπεται σε σάκχαρα είτε με τη χρήση ενός αμυλολυτικού μικροοργανισμού, είτε με την προσθήκη ενζύμων (Alam *et al.*, 1990). Κατά την ενζυμική υδρόλυση του αμύλου (α-αμυλάση, β-αμυλάση) σχηματίζονται ανάλογα με την περίπτωση μαλτόζη, γλυκόζη και οριοδεξτρίνες. Κατά την υδρόλυση του αμύλου με οξέα λαμβάνεται ως τελικό προϊόν σχεδόν ποσοτικά η γλυκόζη, που αποτελεί και το απλούστερο δομικό τμήμα του αμύλου. Κατά την όξινη υδρόλυση του αμύλου σχηματίζονται μερικά ενδιάμεσα προϊόντα χωρίς καθορισμένη σύνθεση, που ονομάζονται δεξτρίνες. Με πλήρη υδρόλυση, οι δεξτρίνες μετατρέπονται σε γλυκόζη. Στο δεύτερο στάδιο γίνεται η ζύμωση όπου τα σάκχαρα μετατρέπονται στα τελικά προϊόντα (Alam *et al.*, 1990).

- Κυτταρινούχα υλικά: Τα λιγνοκυτταρινούχα υλικά (ξύλο, καλάμια, άχυρα) αποτελούν την πιο άφθονη ανανεώσιμη πηγή ενέργειας σε βιομηχανικό επίπεδο. Μπορεί η παγκόσμια παραγωγή φυτικής βιομάζας να είναι ιδιαίτερα υψηλή, όμως η χρήση των κυτταρινούχων υλικών δεν είναι πάντοτε πρακτική λόγω της εποχιακής διαθεσιμότητάς

τους, του υψηλού κόστους μεταφοράς και αποθήκευσης, αλλά και λόγω των δυσκολιών που προκύπτουν κατά την κατεργασία της λιγνοκυτταρίνης. Η λιγνοκυτταρίνη είναι ένα αρκετά πολύπλοκο υπόστρωμα που αποτελείται από μίγμα υδατανθράκων (κυτταρίνη και ημικυτταρίνη) και λιγνίνης. Για την αποσύνθεσή της απαιτούνται διάφορες προεργασίες (μηχανικές, χημικές κλπ.) (Zahari *et al.*, 2012). Για την αξιοποίηση του συγκεκριμένου υποστρώματος είναι απαραίτητη η υδρόλυσή του, η οποία γίνεται κυρίως με ένζυμα (Saha, 2003). Η τεχνολογία της υδρόλυσης μπορεί να περιλαμβάνει φυσικές διεργασίες (καύση με αμμωνία, ζεστό νερό, θερμοϋδρόλυση υπό πίεση), χημικές μεθόδους, όπως υδρόλυση με συμπυκνωμένο και αραιωμένο οξύ, ακόμα και ενζυμικές μεθόδους οι οποίες συχνά συνδυάζονται με τη χημική υδρόλυση. Το προϊόν που προκύπτει από την υδρόλυση είναι ένα μίγμα σακχάρων που αποτελείται από γλυκόζη και ξυλόζη. Τα υγρά υδρολύματα που παραλαμβάνονται από κάθε στάδιο και περιέχουν τα σάκχαρα, καθαρίζονται για να αξιοποιηθούν στη συνέχεια ως πηγή άνθρακα στις διάφορες ζυμώσεις. Η όλη διαδικασία βέβαια απαιτεί υψηλό κόστος σακχάρων, σωστή μεταχείριση των λυμάτων και φυσικά υποστήριξη των βιοτεχνολογικών μεθόδων (Zahari *et al.*, 2012).

## 1.2. Σύσταση των θρεπτικών υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη

Στα πλαίσια της παρούσας πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα για να διαπιστωθεί ποιο είναι το κατάλληλο για παραγωγή ακετοΐνης, 2,3-βουτανοδιόλης και βουτυρικού οξέος, από τα βακτηριακά στελέχη.

Τα θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή ακετοΐνης και 2,3-βουτανοδιόλης είναι τα MRS και Brain-Heart Infusion (BHI), που είναι συνθετικά υποστρώματα, με την παρουσία πηγής άνθρακα, σουκρόζης ή γλυκόζης, για να υποβοηθηθεί η έναρξη της ζύμωσης (Acumedia, 2010).

Το MRS είναι ένα επιλεκτικό υπόστρωμα για τους γαλακτοβάκιλους, που περιέχει:

- πεπτόνη και εκχύλισμα ζύμης, που είναι πηγές αζώτου και βιταμινών απαραίτητων για να καλυφθούν οι γενικές απαιτήσεις για ανάπτυξη
- δισόξινο φωσφορικό κάλιο ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), που είναι ρυθμιστικός παράγοντας
- οξικό νάτριο ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ), που είναι ανασταλτικός παράγοντας
- θειϊκό μαγνήσιο ( $\text{MgSO}_4$ ), που παρέχει κατιόντα που χρησιμοποιούνται στο μεταβολισμό

Να σημειωθεί πως τα τρία τελευταία αποτελούν επίσης πηγή ιχνοστοιχείων.

Το BHI είναι ένα γενικό υπόστρωμα που περιέχει:

- brain heart infusion και ενζυματική πέψη ζελατίνης, που είναι πηγές αζώτου, βιταμινών και άνθρακα
- δεξτρόζη, που είναι πηγή άνθρακα
- χλωριούχο νάτριο ( $\text{NaCl}$ ), που διατηρεί την ωσμωτική ισορροπία
- όξινο φωσφορικό δινάτριο ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), που είναι ρυθμιστικός παράγοντας

Το θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή βουτυρικού οξέος είναι το Reinforced Clostridial Medium (RCM), που είναι συνθετικό υπόστρωμα, με την παρουσία πηγής άνθρακα, γλυκόζης, για να υποβοηθηθεί η έναρξη της ζύμωσης (Acumedia, 2010).

Το RCM είναι ένα επιλεκτικό υπόστρωμα για τα κλωστρίδια που περιέχει:

- πεπτόνη καζεΐνης, πεπτόνη και εκχύλισμα ζύμης, που είναι πηγές αζώτου, βιταμινών και αμινοξέων.
- χλωριούχο νάτριο (NaCl), που διατηρεί την ωσμωτική ισορροπία
- άμυλο, που αποτοξινώνει τα μεταβολικά παραπροϊόντα
- υδροχλωρική κυστεΐνη, που είναι αναγωγικό μέσο
- οξικό νάτριο (CH<sub>3</sub>COONa), που δρα σαν ρυθμιστής

### 1.3. Παραγόμενες ουσίες βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος της παρούσας μελέτης

#### 1.3.1. Ακετοΐνη

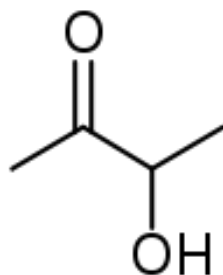
Η ακετοΐνη, η οποία είναι γνωστή και ως 3-υδροξυβουτανόνη, είναι μια χημική ένωση με μοριακό τύπο  $C_4H_8O_2$  και δομή  $CH_3(CO)CH(OH)CH_3$ . Πρόκειται για ένα άχρωμο ή ελαφρώς κίτρινο προς πρασινοκίτρινο υγρό, με ευχάριστη οσμή βουτύρου.

Η ακετοΐνη είναι ένα ουδέτερο μόριο με τέσσερις άνθρακες, που χρησιμοποιείται σαν εξωτερική αποθήκη ενέργειας από μεγάλο αριθμό ειδών βακτηρίων. Παράγεται από την αποκαρβοξυλίωση του  $\alpha$ -ακετογαλακτικού, μιας κοινής πρόδρομης ένωσης κατά τη βιοσύνθεση των αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας.

Η μορφή της ακετοΐνης που παράγεται από τα βακτήρια είναι η (R)-ακετοΐνη. Μάλιστα σε ορισμένα βακτήρια η ακετοΐνη μπορεί να μετατραπεί επίσης σε 2,3-βουτανοδιόλη από την ρεδοκτάση της ακετοΐνης ή τη δεϋδρογενάση της 2,3-βουτανοδιόλης (Xiao *et al.*, 2009).

### 1.3.1.1. Χαρακτηριστικά και βιομηχανικές εφαρμογές ακετοΐνης

Γενικά Χαρακτηριστικά	
Όνομασία (κατά IUPAC)	3-υδροξυβουταν-2-όνη
Μοριακός τύπος	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>
Μοριακή μάζα	88.11 g/mol
Χημικά χαρακτηριστικά	
Πυκνότητα	1.012 g/ml
Σημείο βρασμού	148°C
Σημείο τήξης	15°C
Δομή	



Πίνακας 1.3.1.1. 1. Χαρακτηριστικά της ακετοΐνης (Xiao and Lu, 2014)

Η ακετοΐνη υπάρχει ευρέως στη φύση, και μάλιστα η εμπορική ακετοΐνη χρησιμοποιείται στα τρόφιμα σαν προσθετικό για να βελτιώσει τη γεύση των προϊόντων. Το διακετύλιο, που παράγεται εύκολα κατά την οξείδωση της ακετοΐνης, μαζί με την ίδια την ακετοΐνη, είναι από τις ενώσεις που δίνουν στο βούτυρο τη χαρακτηριστική του γεύση. Λόγω αυτού του γεγονότος οι κατασκευαστές των μερικώς υδρογονωμένων ελαίων συνήθως προσθέτουν ακετοΐνη και διακετύλιο στο τελικό προϊόν, το οποίο διαφορετικά θα ήταν άγευστο. Επιπλέον η ακετοΐνη χρησιμοποιείται ευρέως στα καλλυντικά, τα σαπούνια και τις κρέμες, ώστε να προκύψει η επιθυμητή ευωδία των προϊόντων αυτών (Xiao and Lu, 2014).

Η ακετοΐνη, ως προσθετικό γεύσης και αρώματος, αναγνωρίζεται γενικότερα σαν ασφαλής. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται σε προϊόντα όπως οι φράουλες, η βανίλια, τα καρύδια, το ρούμι, το βούτυρο, η καραμέλα, η καρύδα και ο καφές. Προστίθεται επίσης



στα ψημένα προϊόντα, τα γλυκά, τα λίπη, τα έλαια, τα γαλακτοκομικά και τα αναψυκτικά (Belitz *et al.*, 2004).

Λόγω του μέτριου σημείο βρασμού της, η ακετοΐνη βρίσκει εφαρμογή στη βιομηχανία, όπου χρησιμοποιείται ως πρόσθετο κατά την παρασκευή των τσιγάρων από τις καπνοβιομηχανίες (Belitz *et al.*, 2004).

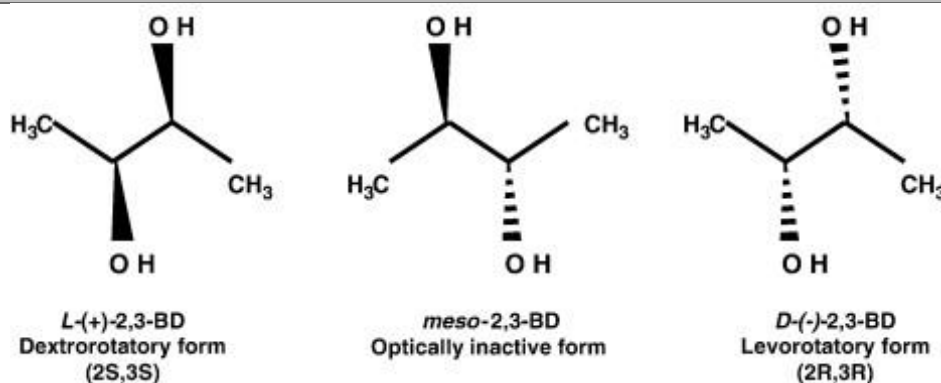
### 1.3.2. 2,3-βουτανοδιόλη

Η 2,3-βουτανοδιόλη, γνωστή και ως διμέθυλο γλυκόλη, είναι μια οργανική ένωση με μοριακό τύπο  $C_4H_{10}O_2$  και δομή  $(CH_3)_2(CHOH)_2$ . Εμφανίζεται με τρία στερεοϊσομερή, D-(-)-, L-(+)- και μέσο-, τα οποία είναι και τα τρία άχρωμα, ιξώδη υγρά. Από τα τρία στερεοϊσομερή, τα δύο είναι εναντιομερή και το τρίτο είναι μια meso-ένωση. Το ζευγάρι των εναντιομερών εμφανίζει (2R,3R) και (2S,3S) διαμορφώσεις στους άνθρακες 2 και 3, ενώ η meso-ένωση έχει διαμόρφωση (2R,3S) (ή ισοδύναμα (2S,3R)) (Afschar *et al.*, 1993).

Το στερεοϊσομερές (2R,3R) της 2,3-βουτανοδιόλης παράγεται από ποικιλία μικροοργανισμών, μέσω μιας διαδικασίας που καλείται ζύμωση βουτανοδιόλης (Afschar *et al.*, 1993).

### 1.3.2.1. Χαρακτηριστικά και βιομηχανικές εφαρμογές 2,3-βουτανοδιόλης

Γενικά Χαρακτηριστικά	
Όνομασία (κατά IUPAC)	2,3-βουτανοδιόλη
Μοριακός τύπος	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>
Μοριακή μάζα	90.121 g/mol
Χημικά χαρακτηριστικά	
Πυκνότητα	0.987 g/ml
Σημείο βρασμού	180-184°C
Σημείο τήξης	-60°C
Στερεοϊσομερή	



Πίνακας 1.3.2.1. 1. Χαρακτηριστικά της 2,3-βουτανοδιόλης (Celinska and Grajek, 2009)

Η 2,3-βουτανοδιόλη είναι από τα σημαντικότερα προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας με πληθώρα εφαρμογών και χρήσεων (Celinska and Grajek, 2009). Παρασκευάζεται με υδρόλυση του οξειδίου του 2,3-βουτενίου, σύμφωνα με την εξίσωση:

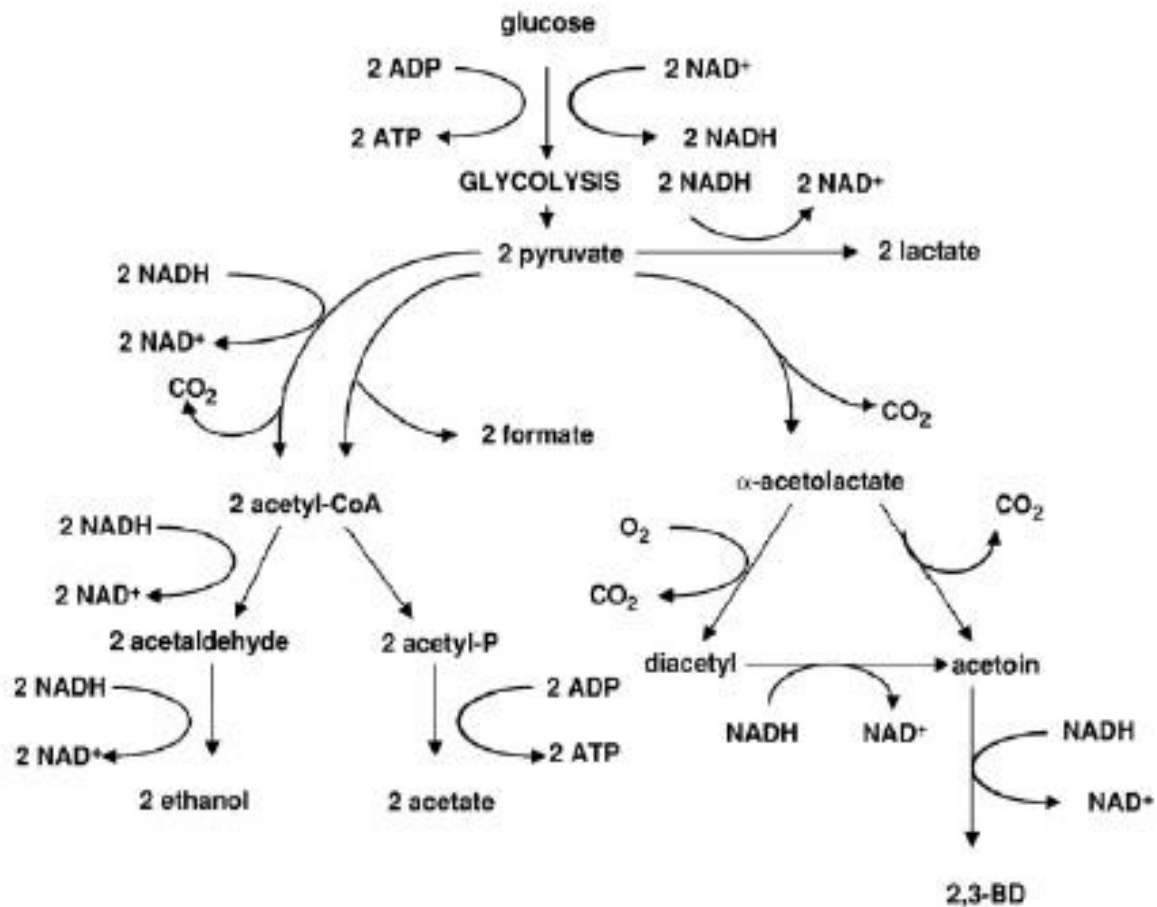


Μία από τις πιο σημαντικές εφαρμογές της 2,3-βουτανοδιόλης είναι η μετατροπή της σε 1,3-βουταδιένιο, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην παραγωγή συνθετικού καουτσούκ. Η 2,3-βουτανοδιόλη μπορεί να προστεθεί και σαν αρωματικό πρόσθετο στην βιομηχανία των τροφίμων, καθώς δίνει μια βουτυρώδη γεύση όταν μετατραπεί σε διακετύλιο με αφυδρογόνωση (Saksinchai *et al.*, 2001). Μάλιστα, λόγω της βακτηριοστατικής της δράσης η 2,3-βουτανοδιόλη μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί και ως συντηρητικό. Η εστεροποίηση της 2,3-βουτανοδιόλης έχει σαν αποτέλεσμα την

παραγωγή προϊόντων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη βιομηχανία φαρμάκων και καλλυντικών. Επίσης λόγω του χαμηλού σημείου τήξης της μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αντιψυκτικό. Γενικά η 2,3-βουτανοδιόλη και τα παράγωγά της βρίσκουν εφαρμογές στα πολυμερή και στα πλαστικά (Garg and Jain, 1995).

### 1.3.3. Βιοχημεία σύνθεσης ακετοΐνης και 2,3-βουτανοδιόλης

Η χημική μέθοδος παραγωγής ακετοΐνης και 2,3-βουτανοδιόλης παρουσιάζει αυξημένο κόστος. Για το λόγο αυτό θεωρήθηκε απαραίτητο να στραφεί το ενδιαφέρον στη μικροβιακή παραγωγή (Li *et al.*, 2011). Ο βασικός και κυριότερος τρόπος παραγωγής της ακετοΐνης και της 2,3-βουτανοδιόλης μέσω της βιοτεχνολογικής οδού είναι μέσω διαφόρων μικροβιακών ζυμώσεων (Afschar *et al.*, 1993; Xiao and Lu, 2014). Ανάλογα με το είδος του μικροοργανισμού οι ζυμώσεις πραγματοποιούνται είτε υπό αναερόβιες, είτε υπό μικρό-αερόφιλες, είτε υπό αερόβιες συνθήκες (Hespell, 1996; Celinska and Grajek, 2009). Το κύριο υπόστρωμα που χρησιμοποιείται είναι η γλυκόζη και το μεταβολικό μονοπάτι παρουσιάζεται στην εικόνα 1.3.3.1.



Εικόνα 1.3.3. 1. Βιοχημικό μονοπάτι σύνθεσης 2,3-βουτανοδιόλης και ακετοΐνης (Celinska and Grajek, 2009)

Πολλοί μονοσακχαρίτες (εξόζες ή πεντόζες) είναι ικανοί να ζυμωθούν προς παραγωγή ακετοΐνης και 2,3-βουτανοδιόλης (Syu, 2001). Στο βακτηριακό μεταβολισμό, αρχικά οι μονοσακχαρίτες πρέπει να μετατραπούν σε πυροσταφυλικό οξύ, το οποίο σχηματίζεται μέσω της οδού Emben-Meyerhof-Pamas (γλυκόλυση) ώστε στη συνέχεια να παραχθούν η ακετοΐνη και η 2,3-βουτανοδιόλη, αλλά και διάφορα άλλα μεταβολικά προϊόντα όπως το οξικό, το γαλακτικό, το μυρμηκικό και το ηλεκτρικό οξύ, αλλά και η αιθανόλη (Maddox, 1996). Η φύση, όπως επίσης και η συγκέντρωση των μεταβολικών προϊόντων που θα παραχθούν εξαρτάται από τον εκάστοτε μικροοργανισμό και τις συνθήκες καλλιέργειας (Celinska and Grajek, 2009).

Για τη βιοσύνθεση της ακετοΐνης και της 2,3-βουτανοδιόλης από το πυροσταφυλικό οξύ εμπλέκονται τρία βασικά ένζυμα, η συνθετάση του α-ακετογαλακτικού (α-ALS), η αποκαρβοξυλάση του α-ακετογαλακτικού (α-ALD) και η αφυδρογονάση της 2,3-βουτανοδιόλης (BDH). Το ένζυμο α-ALS δρα καλύτερα σε ελαφρώς όξινες συνθήκες, και

διεξάγει μια αντίδραση δύο σταδίων: στο πρώτο στάδιο, το πυροσταφυλικό οξύ συμπλέκεται με την πυροφωσφορική θειαμίνη (TPP) για το σχηματισμό του ακετύλο-TPP, το οποίο στη συνέχεια συμπυκνώνεται με ένα δεύτερο μόριο πυροσταφυλικού οξέος για το σχηματισμό του α-ακετογαλακτικού (Gottshalk, 1986; Qi *et al.*, 2014).

Το πυροσταφυλικό οξύ από τη γλυκόλυση μπορεί να μετατραπεί είτε σε γαλακτικό οξύ, που απαιτεί NADH, είτε σε α-ακετογαλακτικό (α-acetolactate) από την α-ALS, η οποία παράγεται σε συνθήκες χαμηλής διαθεσιμότητας NADH. Ακολούθως το α-ακετογαλακτικό, υπό αναερόβιες συνθήκες μπορεί να μετατραπεί σε ακετοΐνη, ενώ με την παρουσία οξυγόνου, υφίσταται αποκαρβοξυλίωση και παράγεται διακετύλιο. Στη συνέχεια με την αφυδρογονάση της ακετοΐνης, το διακετύλιο μετατρέπεται σε ακετοΐνη. Τέλος, η αφυδρογονάση της 2,3-βουτανοδιόλης μετατρέπει την ακετοΐνη σε 2,3-βουτανοδιόλη (Celinska and Grajek, 2009).

Ο μέγιστος θεωρητικός συντελεστής  $Y_{Ace/Glu}$  παραχθείσας ακετοΐνης ανά καταναλωθείσα γλυκόζη είναι 0.49 g/g, και ο μέγιστος θεωρητικός συντελεστής  $Y_{2,3-BDO/Glu}$  παραχθείσας 2,3-βουτανοδιόλης ανά καταναλωθείσα γλυκόζη είναι 0.50 g/g. Ενώ, ο μέγιστος θεωρητικός συντελεστής  $Y_{Ace/Suc}$  παραχθείσας ακετοΐνης ανά καταναλωθείσα σουκρόζη είναι 0.52 g/g, και ο μέγιστος θεωρητικός συντελεστής  $Y_{2,3-BDO/Suc}$  παραχθείσας 2,3-βουτανοδιόλης ανά καταναλωθείσα σουκρόζη είναι 0.52 g/g (Nilegaonkar *et al.*, 1992).

#### 1.3.4. Μικροοργανισμοί-παραγωγοί ακετοΐνης και 2,3-βουτανοδιόλης

Ένας μεγάλος αριθμός διαφορετικών ειδών βακτηρίων είναι ικανός να καταναλώνει μονο- και δι- σακχαρίτες, παράγοντας μεγάλες ποσότητες ακετοΐνης και 2,3-βουτανοδιόλης. Ανάμεσα τους διαφορετικά στελέχη του είδους *Klebsiella pneumoniae* και *Klebsiella oxytoca*, καθώς επίσης και στελέχη του είδους *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis* και *Bacillus polymyxa*. Να σημειωθεί πως τα περισσότερα στελέχη που αναφέρονται στη βιβλιογραφία για την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης είναι ικανά να παράγουν κυρίως δυο ισομερή, τα L-(+)- και μέσο-. Ωστόσο ιδιαίτερο ενδιαφέρον

παρουσιάζει η συμπεριφορά των ειδών *Bacillus subtilis* και *Bacillus polymyxa* που είναι ικανά να παράγουν το σπάνιο ισομερές D-(-)- (Garg and Jain, 1995; Metsoviti *et al.*, 2012).

### 1.3.5. Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή ακετοΐνης και 2,3-βουτανοδιόλης

Η έρευνα έχει επικεντρωθεί στην μελέτη διαφόρων παραγόντων που επηρεάζουν τη σύνθεση της ακετοΐνης και της 2,3-βουτανοδιόλης με στόχο τη βελτιστοποίηση της διαδικασίας για την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων με ικανοποιητικές αποδόσεις και παραγωγικότητα (Xiu and Zeng, 2008). Φαίνεται πως οι τρεις κυριότεροι παράγοντες που επηρεάζουν τη σύνθεση είναι ο αερισμός, το pH και η θερμοκρασία (Voloch *et al.*, 1985; Garg and Jain, 1995; Peters, 2007).

Η παροχή οξυγόνου είναι ο σημαντικότερος παράγοντας, αφού η ακετοΐνη και η 2,3-βουτανοδιόλη παράγονται γενικά κάτω από χαμηλή παροχή O<sub>2</sub>. Πιο συγκεκριμένα, η απόδοση μιας ζύμωσης μπορεί να βελτιστοποιηθεί ελαχιστοποιώντας την παροχή O<sub>2</sub> (Zeng *et al.*, 1990b). Ωστόσο, όταν η παροχή O<sub>2</sub> είναι χαμηλότερη μιας συγκεκριμένης τιμής, που εξαρτάται από τη ζύμωση, η παραγωγή βιομάζας είναι πολύ χαμηλή με αποτέλεσμα τελικά να μειώνεται και η τελική συγκέντρωση της ακετοΐνης ή της 2,3-βουτανοδιόλης (Converti *et al.*, 2003).

Όσον αφορά το pH, που αποτελεί τον δεύτερο σημαντικότερο παράγοντα, φαίνεται πως η βέλτιστη τιμή εξαρτάται κάθε φορά από τον μικροοργανισμό, αλλά και από το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται στην εκάστοτε ζύμωση (de Mas *et al.*, 1988; Karadag *et al.*, 2010). Σε γενικές γραμμές, φαίνεται πως το αλκαλικό περιβάλλον ευνοεί τη σύνθεση οργανικών οξέων, ενώ περιορίζει την παραγωγή ακετοΐνης και 2,3-βουτανοδιόλης. Αντιθέτως, κάτω από όξινες συνθήκες ο μεταβολισμός των βακτηρίων στρέφεται προς την παραγωγή τους. Στην περίπτωση του στελέχους *Klebsiella oxytoca*, η βέλτιστη τιμή pH κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 5 και 6. Για το στέλεχος *Bacillus polymyxa* φαίνεται πως η βέλτιστη τιμή του pH είναι λίγο παραπάνω, 6.3 με 6.8 (Cheng *et al.*, 2010; de Mas *et al.*, 1988).

Η σημασία της θερμοκρασίας που επιλέγεται για τη ζύμωση είναι καθοριστική, καθώς η ενεργότητα των ενζύμων που λαμβάνουν χώρα στην παραγωγή της ακετοΐνης και της 2,3-βουτανодиόλης, εξαρτάται άμεσα από αυτή. Σύμφωνα με την μέχρι τώρα έρευνα, τιμές μεταξύ 30 και 35°C είναι οι καταλληλότερες για την ανάπτυξη των περισσότερων βακτηρίων. Μάλιστα η αλλαγή από αερόβιες σε μικρο-αερόφιλες συνθήκες κάτω από αυτό το εύρος θερμοκρασιών, ευνοεί την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων παρά της βιομάζας (Petrov and Petrova, 2009).

### 1.3.6. Βουτυρικό οξύ

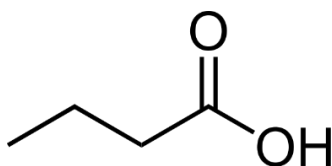
Το βουτυρικό οξύ, από την ελληνική λέξη βούτυρο, γνωστό επίσης και με την ονομασία βουτανοϊκό οξύ, είναι μια χημική ένωση με μοριακό τύπο  $C_4H_8O_2$  και δομή  $CH_3CH_2CH_2-COOH$ . Πρόκειται για μια καρβοξυλική ένωση με δυσάρεστη οσμή και έντονη γεύση, που αφήνει μια γλυκιά επίγευση.

Το βουτυρικό οξύ παράγεται σαν τελικό προϊόν κατά τη διαδικασία της ζύμωσης, όπως αυτή πραγματοποιείται από τα υποχρεωτικά αναερόβια βακτήρια. Είναι ένα λιπαρό οξύ που προκύπτει κατά το σχηματισμό των εστέρων στα ζωϊκά λίπη. Το τριγλυκερίδιο του βουτυρικού οξέος παρασκευάζει το 3-4% του βουτύρου. Όταν το βούτυρο ταγγίζει, το βουτυρικό οξύ ελευθερώνεται από το γλυκερίδιο μέσω της υδρόλυσης, και προκύπτει έτσι μια αρκετά δυσάρεστη οσμή. Το βουτυρικό οξύ είναι σημαντικό μέλος της ομάδας των λιπαρών οξέων βραχείας αλυσίδας, μάλιστα αποτελεί ένα μέτριας ισχύος οξύ, που αντιδρά με τις βάσεις και τα ισχυρά οξειδωτικά και επηρεάζει πολλά μέταλλα (Ledenbach and Marshall, 2009).

Το βουτυρικό οξύ είναι ένα λιπαρό, άχρωμο υγρό, το οποίο είναι εύκολα διαλυτό σε νερό και αιθανόλη, και μπορεί να διαχωριστεί από την υδατική φάση με κορεσμό με άλας, όπως π.χ. χλωριούχο ασβέστιο. Μάλιστα, το άλας του βουτυρικού οξέος με ασβέστιο είναι λιγότερο διαλυτό σε ζεστό, παρά σε κρύο νερό (Ledenbach and Marshall, 2009).

### 1.3.6.1. Χαρακτηριστικά και βιομηχανικές εφαρμογές βουτυρικού οξέος

Γενικά Χαρακτηριστικά	
Όνομασία (κατά IUPAC)	Βουτανοϊκό οξύ
Μοριακός τύπος	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> COOH
Μοριακή μάζα	88.11 g/mol
Χημικά χαρακτηριστικά	
Πυκνότητα	1.135 g/ml
Σημείο βρασμού	163.75°C
Σημείο τήξης	-5.1°C
Δομή	



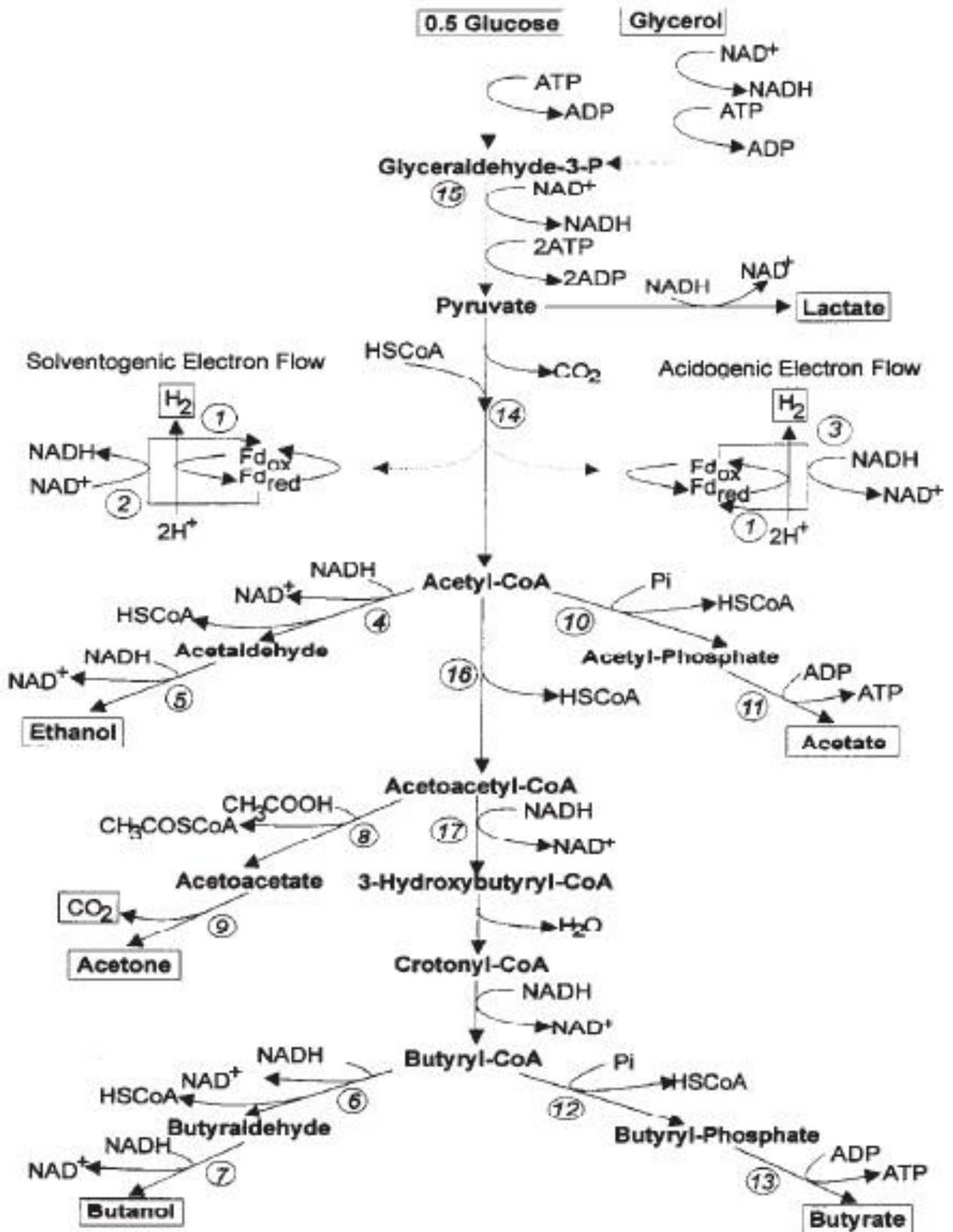
Πίνακας 1.3.6.1. 1. Χαρακτηριστικά του βουτυρικού οξέος (Prasad, 1980)

Το βουτυρικό οξύ ανιχνεύεται στο γάλα, κυρίως το κατσικίσιο, το πρόβειο και το βουβαλίσιο, το βούτυρο, την παρμεζάνα και σαν προϊόν κατά την αναερόβια ζύμωση. Εντοπίζεται από θηλαστικά με καλή ικανότητα όσφρησης όπως τα σκυλιά, ακόμα και όταν βρίσκεται σε απειροελάχιστες ποσότητες (Prasad, 1980).

Το βουτυρικό οξύ χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία. Συγκεκριμένα χρησιμοποιείται σε προϊόντα όπως τα τρόφιμα και τα αναψυκτικά. Το αμιγές οξύ χρησιμοποιείται στα γαλακτοκομικά, ενώ η εστεροποιημένη μορφή του χρησιμοποιείται σαν πρόσθετο για να βελτιώσει την φρουτώδη ευωδία. Σημαντικές είναι οι εφαρμογές του βουτυρικού οξέος στη χημική και φαρμακευτική βιομηχανία. Επίσης το βουτυρικό οξύ και τα παράγωγά του χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία πλαστικών και υφασμάτων. Λόγω της βακτηριοστατικής του δράσης χρησιμοποιείται και ως συμπλήρωμα διατροφής των ζώων, για να επιτευχθεί μείωση του παθογόνου βακτηριακού πληθυσμού (Belitz *et al.*, 2004).



1.3.7. Βιοχημεία σύνθεσης βουτυρικού οξέος



Εικόνα 1.3.7. 1. Βιοχημικό μονοπάτι σύνθεσης βουτυρικού οξέος (Zigova and Sturdik, 2000)

Τόσο η γλυκόζη, όσο και η γλυκερόλη αποτελούν υπόστρωμα κατάλληλο για την παραγωγή βουτυρικού οξέος. Στο βακτηριακό μεταβολισμό, αρχικά γίνεται μετατροπή σε πυροσταφυλικό οξύ, μέσω της οδού Emben-Meyerhof-Pamas (γλυκόλυση), ώστε ακολούθως να παραχθεί το βουτυρικό οξύ, αλλά και διάφορα άλλα μεταβολικά προϊόντα όπως το οξικό οξύ, το γαλακτικό οξύ, καθώς επίσης η ακετόνη, η αιθανόλη και η βουτανόλη. Η φύση, όπως επίσης και η συγκέντρωση των μεταβολικών προϊόντων που θα παραχθούν εξαρτάται από τον εκάστοτε μικροοργανισμό και τις συνθήκες καλλιέργειας (Papanikolaou, 2009; Chatzifragkou and Papanikolaou, 2012).

Για τη βιοσύνθεση του βουτυρικού οξέος από το πυροσταφυλικό οξύ εμπλέκονται επτά διαφορετικά ένζυμα, η οξειδοοξειδάση της πυροσταφυλικής φερεδοξίνης, η θειολάση, η 3-υδροξυβουτύρυλο-CoA-δεϋδρογενάση, η κροτονάση, η βουτύρυλο-CoA-δεϋδρογενάση, η φωσφοτρανσβουτυρυλάση και η βουτυρική κινάση (Zigova and Sturdik, 2000).

Το πυροσταφυλικό οξύ από τη γλυκόλυση μπορεί να μετατραπεί και σε γαλακτικό οξύ, που απαιτεί NADH. Το ακέτυλο-CoA μπορεί να μετατραπεί είτε σε οξικό οξύ μέσω της δράσης της φωσφοτρανσακετυλάσης και της οξικής κινάσης, είτε σε αιθανόλη μέσω της δράσης της δεϋδρογενάσης της ακεταλδεΐδης και της δεϋδρογενάσης της αιθανόλης. Για τη μετατροπή όμως σε αιθανόλη απαιτείται NADH. Ακολούθως το ακετοακέτυλο-CoA μπορεί να μετατραπεί σε ακετόνη μέσω της δράσης της CoA-τρανσφεράσης και της ακετοξικής αποκαρβοξυλάσης. Τέλος το βουτύρυλο-CoA μπορεί να μετατραπεί είτε σε βουτυρικό οξύ τελικά, είτε σε βουτανόλη μέσω της δράσης της δεϋδρογενάσης της βουτυραλδεΐδης και της δεϋδρογενάσης της βουτανόλης. Για τη μετατροπή όμως σε βουτανόλη απαιτείται NADH (Zigova and Sturdik, 2000).

Ο μέγιστος θεωρητικός συντελεστής  $Y_{But/Glu}$  παραχθέντος βουτυρικού οξέος ανά καταναλωθείσα γλυκόζη είναι 0.49 g/g.

### 1.3.8. Μικροοργανισμοί παραγωγοί βουτυρικού οξέος

Πολλά αναερόβια βακτήρια είναι ικανά να παράγουν βουτυρικό οξύ. Τα πιο ευρέως διαδεδομένα στελέχη που χρησιμοποιούνται σε αναερόβιες ζυμώσεις είναι τα

*Clostridium butyricum*, *Clostridium acetylobutyricum* και *Clostridium tyrobutyricum* (Papanikolaou *et al.*, 2004; Papanikolaou and Aggelis, 2003; Petitdemange *et al.*, 1995; Papanikolaou, 2009; Chatzifragkou and Papanikolaou, 2012). Κατά την αναερόβια ζύμωση τα βακτήρια παράγουν εκτός από βουτυρικό οξύ και άλλες ενώσεις, όπως είναι οι βουτανικοί εστέρες (Jones, 2001).

### 1.3.9. Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή βουτυρικού οξέος

Εκτεταμένες έρευνες έχουν δείξει πως στην πλειοψηφία των ζυμώσεων, τρεις είναι οι κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν τη σύνθεση των μεταβολικών προϊόντων. Αντίστοιχα και στην περίπτωση του βουτυρικού οξέος, οι τρεις κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν τη σύνθεσή του είναι ο αερισμός, το pH και η θερμοκρασία (Jones, 2001).

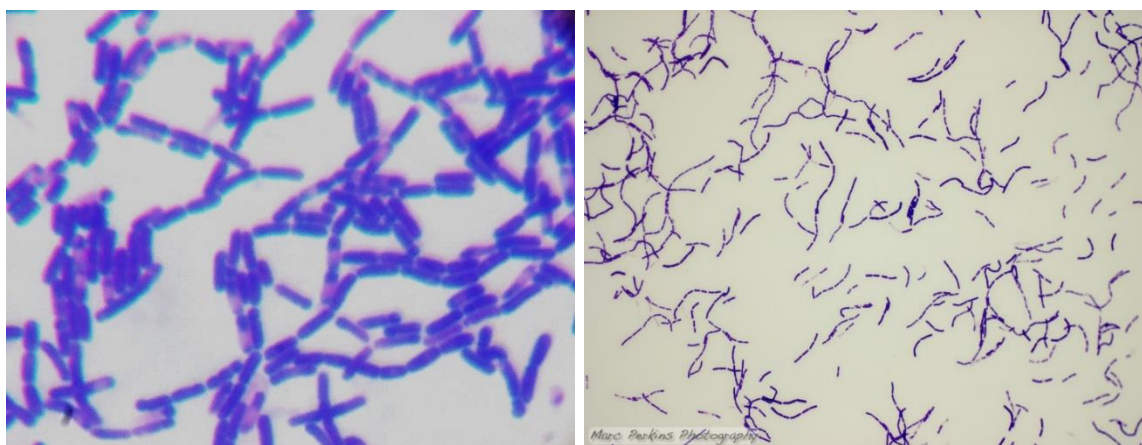
Η παροχή οξυγόνου είναι ο σημαντικότερος παράγοντας, αφού το βουτυρικό οξύ παράγεται μόνο υπό αναερόβιες συνθήκες, δηλαδή απουσία O<sub>2</sub>. Αντιθέτως στην περίπτωση παρουσίας O<sub>2</sub> η ζύμωση δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί αποτρέποντας έτσι το σχηματισμό βουτυρικού οξέος (van Andel *et al.*, 1985).

Το pH, αποτελεί τον δεύτερο σημαντικότερο παράγοντα για την παραγωγή βουτυρικού οξέος. Αν και η βέλτιστη τιμή εξαρτάται κάθε φορά από τον μικροοργανισμό, αλλά και από το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται στην εκάστοτε ζύμωση, καταλληλότερες είναι οι όξινες συνθήκες. Συγκεκριμένα σε χαμηλές τιμές pH ο μεταβολισμός στρέφεται προς την παραγωγή βουτυρικού οξέος, παράγοντας μάλιστα μεγάλες ποσότητες αυτού (Petitdemange *et al.*, 1995).

Η θερμοκρασία που επιλέγεται για τη ζύμωση είναι επίσης καθοριστικός παράγοντας, καθώς η ενεργότητα των ενζύμων που λαμβάνουν χώρα στην παραγωγή του βουτυρικού οξέος, όπως συμβαίνει δηλαδή και στην πλειοψηφία των ζυμώσεων, εξαρτάται άμεσα από αυτή. Μέχρι στιγμής, τιμές μεταξύ 30 και 35°C είναι οι καταλληλότερες για την ανάπτυξη των περισσότερων βακτηρίων (Petitdemange *et al.*, 1995).

#### 1.4. Το γένος *Bacillus*

Το γένος *Bacillus* περιλαμβάνει βακτήρια που χαρακτηρίζονται ως Gram-θετικά, είναι υποχρεωτικά ή προαιρετικά αναερόβια και το σχήμα τους είναι ροπαλοειδές (Mitchell, 2001). Η ονομασία δόθηκε το 1835 από τον Christian Gottfried Ehrenberg, για να περιγραφούν τα βακτήρια ροπαλοειδούς σχήματος (βάκιλοι). Το γένος *Bacillus* ανήκει στην οικογένεια των *Bacillaceae*, του φύλου *Firmicutes*, του βασιλείου των *Bacteria*. Στη φύση, το γένος *Bacillus* περιλαμβάνει βακτήρια μη παρασιτικά, αλλά και παρασιτικά παθογόνα βακτήρια (Αγγελής, 2007).



Εικόνα 1.4. 1. και Εικόνα 1.4. 2. Μορφολογία γένους *Bacillus*

<b>Βασίλειο</b>	<i>Bacteria</i>
<b>Φύλο</b>	<i>Firmicutes</i>
<b>Κλάση</b>	<i>Bacilli</i>
<b>Τάξη</b>	<i>Bacillales</i>
<b>Οικογένεια</b>	<i>Bacillaceae</i>
<b>Γένος</b>	<i>Bacillus</i>
<b>Είδη</b>	<i>aerius, aerophilus, agaradhaerens, alcalophilus, altitudinis, alvei, amyloliquefaciens, anthracis, arseniciselenatis, arsenicus, atrophaeus, azotoformans, badius, boroniphilus, cereus, circulans, clarkia, clausii, coagulans, coahuilensis, fastidiosus, firmus, fumarioli, fusiformis, gibsonii, globisporus, halmapalus, halodurans, horikoshii, horti, infernus, larvae, lentimorbus, licheniformis, marinus, megaterium, mojavensis, mycoides, nealsonii, odyssey, oleronius, pasteurii, polymyxa, popilliae, pseudalcalophilus, pseudofirmus, pseudomycoides, pumilus, safensis, schlegelii, selenitireducens, sonorensis, sphaericus, sporothermodurans, stearothermophilus, stratosphericus, subtilis, thermophilus, thuringiensis, vallismortis, weihenstephanensis</i>

Πίνακας 1.4. 1. Ταξινόμηση του γένους *Bacillus* (Mitchell, 2001)

Οι βάκιλλοι παρουσιάζουν διάφορες ιδιότητες. Αρχικά, βακτήρια του γένους *Bacillus* είναι θετικά στο τεστ του ενζύμου καταλάσης υπό την παρουσία οξυγόνου. Επίσης, σε συνθήκες στρες, τα βακτήρια μπορεί να παράγουν ενδοσπόρια οβάλ σχήματος, στα οποία τα βακτήρια μπορούν να προφυλαχθούν και να παραμείνουν σε σταθερή κατάσταση για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Τέλος, το κυτταρικό τοίχωμα των βακίλων είναι μία δομή στο εξωτερικό του κυττάρου που αποτελεί το δεύτερο εμπόδιο ανάμεσα στο βακτήριο και το περιβάλλον του, βοηθώντας ταυτόχρονα στη διατήρηση του ροπαλοειδούς σχήματος (Saksinchai *et al.*, 2001).

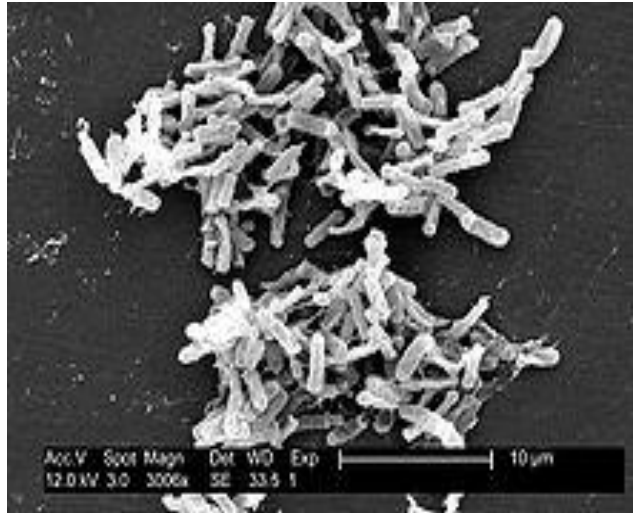
Πολλά από τα βακτήρια του γένους *Bacillus* μπορούν να παράγουν σημαντικές ποσότητες ενζύμων, τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία. Ορισμένα είδη, όπως το *B. subtilis*, έχουν αποδειχθεί αξιόλογα από πλευράς έρευνας, ενώ άλλα είδη είναι εξαιρετικά παθογόνα, προκαλώντας άνθρακα και τροφικές δηλητηριάσεις (Benoit *et al.*, 1990; Saksinchai *et al.*, 2001). Συγκεκριμένα, ο μικροοργανισμός *B. subtilis* είναι από τους πιο καλά μελετημένους προκαρυωτικούς οργανισμούς από πλευράς μοριακής και κυτταρικής βιολογίας. Η μελέτη του έχει βοηθήσει στην κατανόηση της μοριακής βιολογίας και κυτταρολογίας των βακτηρίων, και ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός έχει γίνει μοντέλο για τη διαφοροποίηση, τη γενετική και πρωτεϊνική ρύθμιση και των όσων λαμβάνουν χώρα κατά τον κυτταρικό κύκλο (Alam *et al.*, 1990).

Οι βάκιλλοι είναι σχεδόν πανταχού παρόντες στη φύση, κυρίως στο χώμα, αλλά ορισμένα είδη υπάρχουν επίσης και σε ιδιαίτερα περιβάλλοντα, όπως το είδος *B. alcalophilus* σε υψηλά pH, το είδος *B. thermophilus* σε υψηλές θερμοκρασίες, και το είδος *B. Halodurans* σε υψηλή περιεκτικότητα αλατιού. Ο μικροοργανισμός *B. thuringiensis* παράγει μια τοξίνη που μπορεί να σκοτώσει έντομα και για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται στην τεχνολογία του ανασυνδρασμένου DNA σαν εντομοκτόνο (Rowe, 1990; de Mas CD *et al.*, 1988).

Στον τομέα της ιατρικής μικροβιολογίας τα δύο είδη που θεωρούνται σημαντικότερα είναι το είδος *B. anthracis*, που είναι η αιτία για τον άνθρακα, και το είδος *B. Cereus*, που προκαλεί τροφικές δηλητηριάσεις παρόμοιες με αυτές που προκαλούνται από το μικροοργανισμό *Staphylococcus* (Rowe, 1990).

## 1.5. Το γένος *Clostridium*

Το γένος *Clostridium* περιλαμβάνει βακτήρια που χαρακτηρίζονται ως σποριογόνα και αυστηρώς αναερόβια, με σημαντικό ρόλο στην ανθρώπινη υγεία (Mitchell, 2001). Η πρώτη περιγραφή του γένους *Clostridium* πραγματοποιήθηκε στα μέσα του 1800 από τον L. Pasteur (Andreesen *et al.*, 1989). Το γένος *Clostridium* ανήκει στην οικογένεια των *Clostridiaceae*, του



Εικόνα 1.5. 1. Μορφολογία γένους *Clostridium*

φύλου *Firmicutes*, του βασιλείου των *Bacteria* (Johnson, 2009). Παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια, ενώ αν ληφθεί υπ' όψη ότι συγκροτείται από περίπου 200 είδη, δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι αντιπροσωπεύει ένα από τα μεγαλύτερα γένη εκ του συνόλου των προκαρυωτικών μικροοργανισμών (Jones, 2001).

<b>Βασίλειο</b>	<i>Bacteria</i>
<b>Φύλο</b>	<i>Firmicutes</i>
<b>Κλάση</b>	<i>Clostridia</i>
<b>Τάξη</b>	<i>Clostridiales</i>
<b>Οικογένεια</b>	<i>Clostridiaceae</i>
<b>Γένος</b>	<i>Clostridium</i>
<b>Είδη</b>	<i>acetobutylicum, aerotolerans, aminophilum, argentinense, baratii, beijerinckii, bifermens, botulinum, butyricum, cadaveris, cellobioparum, cellulolyticum, cellulovorans, chauvoei, clostridioforme, colicanis, difficile, estertheticum, fallax, formicaceticum, haemolyticum, histolyticum, indolis, innocuum, kluyveri, lavalense, leptum, ljungdahlii, novyi, paradoxum, paraputrificum, pasteurianum, perfringens, phytofermentans, piliforme, ramosum, saccharobutylicum, saccharoperbutylaceticum, scatologenes, septicum, sordellii, sporogenes, stercorarium, sticklandii, straminisolvens, tertium, tetani, thermocellum, thermosaccharolyticum, tyrobutyricum, uliginosum</i>

Πίνακας 1.5. 1. Ταξινόμηση του γένους *Clostridium* (Johnson, 2009)

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

Το γένος *Clostridium* είναι μεγάλης σπουδαιότητας για τη βιομηχανία και την ασφάλεια των τροφίμων. Είδη όπως τα *C. tyrobutyricum* και *C. butyricum* είναι αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί των τυριών, ενώ η φυσιολογία τους ως αυστηρά αναερόβια και συγχρόνως σποριογόνα, καθιστά ορισμένα βακτήρια του εν λόγω γένους, όπως το *C. botulinum*, υπεύθυνα για δηλητηριάσεις από κονσερβοποιημένα τρόφιμα (Αγγελής, 2007). Τα είδη *C. botulinum* και *C. perfringens* είναι γνωστά για την παραγωγή ισχυρών νευροτοξινών και εντεροτοξινών αντίστοιχα, προσβάλλοντας συνήθως κονσερβοποιημένα τρόφιμα, λαχανικά, κρέας ή γάλα και είναι υπεύθυνα για πλήθος κρουσμάτων τροφικής δηλητηρίασης ανά τον κόσμο. Μάλιστα η περίπτωση της εκδήλωσης κρούσματος βουτυλισμού, γνωστού και ως αλλαντίαση, συνοδεύεται και από αυξημένα ποσοστά θνησιμότητας (25-67%) αν δεν αντιμετωπιστεί εγκαίρως και σε συνάρτηση με την εν γένει κατάσταση της υγείας του παθόντος (Midura and Arnon, 1976).

Στον τομέα της ιατρικής μικροβιολογίας, χαρακτηριστική είναι η περίπτωση της βουτυλικής τοξίνης που παράγεται από το βακτήριο *C. botulinum*, αποτελώντας ένα εξαιρετικά σημαντικό φαρμακευτικό προϊόν για την θεραπεία κινητικών διαταραχών, συνδρόμων πόνου και πλήθος άλλων νευρολογικών παθήσεων. Σημαντική είναι επίσης η χρήση της εν λόγω τοξίνης και στην επιστήμη της κοσμετολογίας. Οι ιδιότητες της βουτυλικής τοξίνης οφείλονται κυρίως στην εξειδίκευση της δράσης της στα νευρικά κύτταρα και την μακρά διάρκεια της επίδρασης που ασκεί στην περιοχή-στόχο της θεραπείας (Midura and Arnon, 1976).

Αναφορικά με τη βιομηχανική χρήση μικροοργανισμών που ανήκουν στο γένος *Clostridium*, μεγάλης ιστορικής και οικονομικής σημασίας για την βιομηχανική ανάπτυξη της Γερμανίας και της Μεγάλης Βρετανίας τις πρώτες δεκαετίες του περασμένου αιώνα, θεωρείται η παραγωγή οργανικών διαλυτών κατά την ζύμωση ακετόνης-βουτανόλης από βακτήρια του είδους *C. butyricum*, *C. acetobutylicum*, *C. pasteurianum* και *C. Beijerinckii* (Jones 2001; Αγγελής, 2007). Ως πηγές άνθρακα για την εν λόγω βιοδιεργασία έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα παραπροϊόντα και απόβλητα (Lenz and Mogerla, 1980; Jones and Woods, 1986; Marlatt and Datta, 2008). Ακόμη, ορισμένα θερμοφιλα στελέχη κλωστριδίων χρησιμοποιούνται για την βιομηχανική παραγωγή ενζύμων, που έχουν τη δυνατότητα να αποικοδομούν επιλεκτικά φθηνά υποστρώματα όπως κυτταρίνη, πηκτίνη, άμυλο ή κολλαγόνο. Τα εν λόγω ένζυμα βρίσκουν εφαρμογή μεταξύ άλλων, στην βιομηχανία παραγωγής και επεξεργασίας τροφίμων (Belitz *et al.*, 2004). Επίσης, αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι ορισμένα είδη κλωστριδίων είναι ικανά να βιοαποικοδομούν αναερόβια ρυπογόνες, αλλά και ξενοβιοτικές ουσίες, όπως φυτοφάρμακα ή εντομοκτόνα, μέσω ενός ενζυμικού συστήματος των κυττάρων τους (Ahmad *et al.*, 2005).

Όσον αφορά στο είδος *C. butyricum*, στελέχη του εν λόγω μικροοργανισμού χρησιμοποιούνται για την παραγωγή βιολογικού υδρογόνου, αλλά και βουτυρικού οξέος (Kong *et al.*, 2006; Zigova *et al.*, 1999).



## 1.6. Στόχος της μεταπτυχιακής ερευνητικής μελέτης

Η παρούσα μελέτη είχε ως στόχο τη διερεύνηση παραγωγής ακετοΐνης και 2,3-βουτανοδιόλης από βακτηριακά στελέχη του είδους *B. thuringiensis* σε θρεπτικά υποστρώματα εμπλουτισμένα με σουκρόζη και γλυκόζη και τη διερεύνηση της δυνατότητας παραγωγής βουτυρικού οξέος, από το βακτήριο *C. butyricum* E5 σε θρεπτικό υπόστρωμα εμπλουτισμένο με γλυκόζη. Εν συνεχεία, επόμενος στόχος ήταν η μελέτη της δυνατότητας βελτιστοποίησης της παραγωγής ακετοΐνης, 2,3-βουτανοδιόλης και βουτυρικού οξέος σε βιοαντιδραστήρα, για τα στελέχη εκείνα τα οποία παρουσίασαν τη μεγαλύτερη ικανότητα παραγωγής.

Αρχικά τα βακτηριακά στελέχη LQC 1405, LQC 1407, LQC 1522, LQC 1523, LQC 1549 και LQC 1553 του είδους *B. thuringiensis* καλλιεργήθηκαν σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες, με χρήση υποστρωμάτων εμπλουτισμένων με σουκρόζη και γλυκόζη. Από τα αποτελέσματα, διαπιστώθηκε πως καταλληλότερο υπόστρωμα ήταν το εμπλουτισμένο με γλυκόζη. Το βακτηριακό στέλεχος LQC 1522, που παρουσίασε τη μεγαλύτερη ικανότητα παραγωγής μελετήθηκε στη συνέχεια σε βιοαντιδραστήρα, με χρήση υποστρώματος εμπλουτισμένου με γλυκόζη, προκειμένου να επιτευχθεί βελτιστοποίηση της παραγωγής ακετοΐνης και 2,3-βουτανοδιόλης.

Επίσης το βακτηριακό στέλεχος E5 του είδους *C. butyricum* καλλιεργήθηκε σε φιάλες αναεροβίωσης, με χρήση υποστρώματος εμπλουτισμένου με γλυκόζη. Ακολούθως μελετήθηκε σε βιοαντιδραστήρα, με χρήση ενός πλούσιου θρεπτικού υποστρώματος η σύσταση του οποίου φαίνεται στον Πίνακα 2.3.1., και εμπλουτισμένου με γλυκόζη, προκειμένου να επιτευχθεί βελτιστοποίηση της παραγωγής βουτυρικού οξέος.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζεται συνοπτικά η σύσταση των θρεπτικών μέσων που χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα για τη μικροβιακή αύξηση, το βιολογικό υλικό και οι συνθήκες καλλιέργειας που εφαρμόστηκαν στην παρούσα μελέτη. Επίσης, γίνεται αναφορά στις διαδικασίες προσδιορισμού της μικροβιακής αύξησης και των παραγώγων αυτής. Τέλος, περιλαμβάνονται πληροφορίες σχετικά με τις συνθήκες λειτουργίας των συσκευών και του εξοπλισμού που χρησιμοποιήθηκε για τους σκοπούς της παρούσας μελέτης.

## 2.1. Βιολογικό υλικό

Στην παρούσα ερευνητική μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα βακτηριακά στελέχη LQC 1405, LQC 1407, LQC 1522, LQC 1523, LQC 1549 και LQC 1553 του είδους *Bacillus thuringiensis* και το βακτηριακό στέλεχος E5 του είδους *Clostridium butyricum*. Τα στελέχη LQC 1405 και LQC 1407 απομονώθηκαν από γλυκάνισο, ενώ τα στελέχη LQC 1522 και LQC 1523 από πελαργόνιο (αρμπαρόριζα). Ο γλυκάνισος και το πελαργόνιο είναι οι πρώτες ύλες για την παρασκευή του εφτάζυμου ψωμιού. Τα στελέχη LQC 1549 και LQC 1553 απομονώθηκαν από το ζυμάρι που φτιάχτηκε. Το βακτηριακό στέλεχος E5 απομονώθηκε από υπολείμματα στάσιμων υδάτων σε γέφυρες της Γαλλίας (Petitdemange *et al.*, 1995). Τα στελέχη του είδους *B. thuringiensis* ανήκουν στη συλλογή του εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, και το στέλεχος του είδους *C. butyricum* στη συλλογή του εργαστηρίου Βιοχημείας, της Σχολής Θετικών Επιστημών στην περιοχή Nancy της Γαλλίας.

Τα βακτηριακά στελέχη του είδους *B. thuringiensis* διατηρήθηκαν σε falcon των 15 ml, πεπληρωμένα με 7 ml θρεπτικού μέσου MRS και εμπλουτισμένου με 10 g/L γλυκόζης, στους 4°C. Το θρεπτικό μέσο MRS είχε την εξής σύσταση (σε g/L): peptone, 5; meat extract, 5; yeast extract, 2,5; dipotassium phosphate ( $K_2HPO_4$ ), 2; sodium acetate ( $CH_3COONa$ ), 5; magnesium sulfate ( $MgSO_4$ ), 0.41. Η διαδικασία παρασκευής του θρεπτικού μέσου περιλάμβανε πλήρωση των falcon με MRS και αποστείρωσή τους σε αυτόκλειστο ( $T=121^\circ C/20 \text{ min}$ ). Η τιμή του pH μετά την αποστείρωση ήταν  $6.5 \pm 0.2$ .

Το υποχρεωτικά αναερόβιο, σποριογόνο βακτήριο *C. butyricum* E5, διατηρήθηκε σε φιάλες αναεροβίωσης των 50 ml, πεπληρωμένες με 20 ml θρεπτικού μέσου RCM (Reinforced Clostridia Medium) και εμπλουτισμένου με 5 g/L γλυκόζης, στους 4°C. Το θρεπτικό μέσο RCM είχε την εξής σύσταση (σε g/L): casein peptone, 5; peptone, 5; meat extract, 10; yeast extract, 3; sodium chloride ( $NaCl$ ), 5; starch, 1; HCl-cysteine, 0.5; sodium acetate, 3. Η διαδικασία παρασκευής του θρεπτικού μέσου περιλάμβανε πλήρωση των φιαλών αναεροβίωσης με RCM, απομάκρυνση του οξυγόνου με εμφύσηση αερίου αζώτου εντός του θρεπτικού μέσου για 15 min, πωματισμό των φιαλών με πάμα βουτυλίου, σφράγιση τους με δακτύλιο αλουμινίου, και τέλος αποστείρωσή τους σε αυτόκλειστο ( $T=121^\circ C/20 \text{ min}$ ). Η τιμή του pH μετά την αποστείρωση ήταν  $6.8 \pm 0.2$ .

## 2.2. Συνθήκες καλλιέργειας των βακτηριακών στελεχών του είδους *B. thuringiensis*

Οι ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας ήταν ζυμώσεις βυθού κλειστού τύπου, σε κωνικές φιάλες των 250 mL, πεπληρωμένες με 70 mL θρεπτικού υλικού BHI και εμπλουτισμένου με 25 g/L γλυκόζης ή σουκρόζης (Benoit *et al.*, 1989; Rowe, 1990; Yousten and Rogoff, 1969). Το θρεπτικό μέσο BHI είχε την εξής σύσταση (σε g/L): brain heart infusion, 17.5; enzymatic digest of gelatin, 10; dextrose, 2; sodium chloride, 5; disodium phosphate, 2.5. Η διαδικασία παρασκευής του θρεπτικού μέσου περιλάμβανε την πλήρωση των κωνικών φιαλών με BHI, και την αποστείρωσή τους σε αυτόκλειστο (T=121°C/20 min). Η τιμή pH μετά την αποστείρωση ήταν 7.4±0.2.

Η παρασκευή της προκαλλιέργειας πραγματοποιούνταν σε falcon των 15 mL, στα οποία προστίθετο 7 mL από το θρεπτικό μέσο της προκαλλιέργειας (MRS). Σημειώνεται πως το θρεπτικό μέσο της προκαλλιέργειας εμπλουτιζόταν με 10 g/L γλυκόζης ως πηγή άνθρακα και ενέργειας. Τέλος, τα falcon οδηγούνταν προς αποστείρωση σε αυτόκλειστο (T=121°C/20 min).

Ο εμβολιασμός της προκαλλιέργειας πραγματοποιούνταν υπό στείρες συνθήκες στον θάλαμο νηματικής ροής, όπου με την βοήθεια πιπέτας και αποστειρωμένων tips λαμβάνονταν 500 μL εναιωρήματος βακτηριακού στελέχους ευρισκόμενου υπό μορφή κυττάρων και μεταφέρονταν στο αντίστοιχο falcon με το θρεπτικό μέσο προκαλλιέργειας. Το εν λόγω falcon τοποθετούνταν σε ανακινούμενο θάλαμο επώασης (T=35°C/180 rpm), για 12 ώρες, χρονικό σημείο στο οποίο ο μικροοργανισμός βρισκόταν στην εκθετική φάση αύξησης. Μετά τις 12 ώρες, γινόταν εμβολιασμός της κύριας καλλιέργειας εντός των κωνικών φιαλών, υπό ασηπτικές συνθήκες, με 700 μL (1%) εμβολίου.

Στόχος αυτής της διαδικασίας ήταν να διαπιστωθεί ποιο από τα βακτηριακά στελέχη του είδους *B. thuringiensis* είχε τη μεγαλύτερη απόδοση σε παραγωγή ακετοΐνης και 2,3-βουτανοδιόλης, ώστε ακολούθως να βελτιστοποιηθεί η παραγωγή σε βιοαντιδραστήρα, με την κατάλληλη ρύθμιση των συνθηκών ανάπτυξης.



Εικόνα 2.2. 1. Προκαλλιέργειες των στελεχών *B. thuringiensis* σε falcon με MRS και γλυκόζη (παρούσα μελέτη)



Εικόνα 2.2.2. Κύρια καλλιέργεια στελέχους του είδους *B. thuringiensis* σε κωνική φιάλη με BHI και γλυκόζη (παρούσα μελέτη)

Εκτός λοιπόν από τις ζυμώσεις βυθού σε κωνικές φιάλες έλαβαν χώρα και ζυμώσεις σε βιοαντιδραστήρα, όγκου 1.2-L, πεπληρωμένου με 0.8 L θρεπτικού υλικού BHI και εμπλουτισμένου με 30 g/L γλυκόζης. Η διαδικασία παρασκευής του θρεπτικού μέσου περιλάμβανε την πλήρωση του βιοαντιδραστήρα με BHI, και την αποστείρωσή του σε αυτόκλειστο ( $T=121^{\circ}\text{C}/20\text{ min}$ ).

Η παρασκευή της προκαλλιέργειας πραγματοποιούνταν σε κωνική φιάλη των 250 ml, στην οποία προστίθετο 80 ml από το θρεπτικό μέσο της προκαλλιέργειας (MRS). Σημειώνεται πως το θρεπτικό μέσο προκαλλιέργειας εμπλουτιζόταν με 10 g/L γλυκόζης ως πηγή άνθρακα και ενέργειας. Τέλος η κωνική φιάλη οδηγούνταν προς αποστείρωση σε αυτόκλειστο ( $T=121^{\circ}\text{C}/20\text{ min}$ ).

Ο εμβολιασμός της προκαλλιέργειας πραγματοποιούνταν υπό στείρες συνθήκες στον θάλαμο νηματικής ροής όπου με την βοήθεια πιπέτας και αποστειρωμένων tips λαμβάνονταν 2 mL εναιωρήματος βακτηριακού στελέχους ευρισκόμενου υπό μορφή

κυττάρων και μεταφέρονταν στην αντίστοιχη κωνική φιάλη με την προκαλλιέργεια. Η εν λόγω κωνική φιάλη τοποθετούνταν σε ανακινούμενο θάλαμο επώασης ( $T=35^{\circ}\text{C}/180\text{ rpm}$ ), για 12 ώρες. Μετά τις 12 ώρες, γινόταν εμβολιασμός της κύριας καλλιέργειας εντός του βιοαντιδραστήρα, υπό ασηπτικές συνθήκες, με 80 mL (10%) εμβολίου.



Εικόνα 2.2. 3. Προκαλλιέργεια στελέχους του είδους *B. thuringiensis* σε κωνική φιάλη με MRS και γλυκόζη (παρούσα μελέτη)



Εικόνα 2.2. 4. Βιοαντιδραστήρας συνολικού όγκου 1.2-L (New Brunswick Scientific, USA) (παρούσα μελέτη)

### 2.3. Συνθήκες καλλιέργειας του βακτηριακού στελέχους του είδους *C. butyricum*

Οι ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας έγιναν σε φιάλες αναεροβίωσης των 150 mL, πεπληρωμένες με 100 mL θρεπτικού υλικού RCM εμπλουτισμένου με 25 g/L γλυκόζης. Η διαδικασία παρασκευής του θρεπτικού μέσου περιλάμβανε πλήρωση των φιαλών αναεροβίωσης με RCM, απομάκρυνση του οξυγόνου με εμφύσηση αερίου αζώτου εντός του θρεπτικού μέσου για 15 min, πωματισμό των φιαλών με πώμα βουτυλίου, σφράγιση τους με δακτύλιο αλουμινίου, και τέλος αποστείρωσή τους σε αυτόκλειστο (T=121°C/20 min).

Η παρασκευή της προκαλλιέργειας πραγματοποιούνταν σε φιάλες αναεροβίωσης των 50 ml, στις οποίες προστίθετο 20 ml από το θρεπτικό μέσο της προκαλλιέργειας (RCM). Σημειώνεται ότι το θρεπτικό μέσο προκαλλιέργειας εμπλουτιζόταν με 5 g/L γλυκόζης ως πηγή άνθρακα και ενέργειας. Στη συνέχεια στις φιάλες πραγματοποιούνταν εμφύσηση αερίου αζώτου για 15 min, προκειμένου να απομακρυνθεί το οξυγόνο, και κλείνονταν αμέσως με πώμα βουτυλίου και δακτύλιο αλουμινίου. Τέλος οι φιάλες αναεροβίωσης οδηγούνταν προς αποστείρωση σε αυτόκλειστο (T=121°C/20 min).

Ο εμβολιασμός της προκαλλιέργειας πραγματοποιούνταν υπό στείρες συνθήκες στον θάλαμο νηματικής ροής όπου με την βοήθεια αποστειρωμένης σύριγγας των 5 ml λαμβάνονταν 2-3 mL εναιωρήματος βακτηρίου ευρισκόμενου υπό μορφή κυττάρων και μεταφέρονταν στη φιάλη αναεροβίωσης με το θρεπτικό μέσο προκαλλιέργειας. Η εν λόγω φιάλη αναεροβίωσης τοποθετούνταν σε θάλαμο επώασης (T=35°C/χωρίς ανάδευση), για 12 ώρες, χρονικό σημείο στο οποίο ο μικροοργανισμός βρισκόταν στην εκθετική φάση αύξησης. Μετά τις 12 ώρες, γινόταν εμβολιασμός της κύριας καλλιέργειας εντός των φιαλών αναεροβίωσης, υπό ασηπτικές συνθήκες, με 10 mL (10%) εμβολίου.

Στόχος αυτής της διαδικασίας ήταν να επιβεβαιωθεί ότι το βακτηριακό στέλεχος του είδους *C. butyricum* είχε τη δυνατότητα παραγωγής βουτυρικού οξέος, ώστε ακολούθως να βελτιστοποιηθεί η παραγωγή σε βιοαντιδραστήρα, με εφαρμογή καλλιέργειας ημι-συνεχούς λειτουργίας, με την κατάλληλη ρύθμιση των συνθηκών ανάπτυξης.



Εικόνα 2.3. 1. Προκαλλιέργεια του στελέχους E5 του είδους *C. butyricum* σε φιάλη αναεροβίωσης με RCM και γλυκόζη (παρούσα μελέτη)



Εικόνα 2.3. 2. Κύρια καλλιέργεια του στελέχους E5 του είδους *C. butyricum* σε φιάλη αναεροβίωσης με RCM και γλυκόζη (παρούσα μελέτη)

Εκτός λοιπόν από τις ζυμώσεις σε φιάλες αναεροβίωσης έλαβε χώρα και ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα, όγκου 3-L, πεπληρωμένου με 1.5 L θρεπτικού μέσου, η σύσταση του οποίου φαίνεται στον πίνακα 2.3.1., και εμπλουτισμένου με 30 g/L γλυκόζης. Η διαδικασία παρασκευής του θρεπτικού μέσου περιλάμβανε την πλήρωση του βιοαντιδραστήρα με το θρεπτικό μέσο, και την αποστείρωσή του σε αυτόκλειστο ( $T=121^{\circ}\text{C}/20\text{ min}$ ).

Η παρασκευή της προκαλλιέργειας πραγματοποιούνταν σε φιάλη αναεροβίωσης των 200 mL, στην οποία προστίθετο 150 ml από το θρεπτικό μέσο, η σύσταση του οποίου φαίνεται στον Πίνακα 2.3.1. (Chatzifragkou *et al.*, 2011; Malaoui and Marczak, 2001; 2000; Petitdemange *et al.*, 1995; van Andel *et al.*, 1985). Σημειώνεται πως το θρεπτικό μέσο προκαλλιέργειας εμπλουτιζόταν με 10 g/L γλυκόζης ως πηγή άνθρακα και ενέργειας. Στη συνέχεια στη φιάλη πραγματοποιούνταν εμφύσηση αερίου αζώτου για 15 min, προκειμένου να απομακρυνθεί το οξυγόνο, και κλεινόταν αμέσως με πώμα βουτυλίου και δακτύλιο αλουμινίου. Τέλος η φιάλη αναεροβίωσης οδηγούνταν προς αποστείρωση σε αυτόκλειστο ( $T=121^{\circ}\text{C}/20\text{ min}$ ).



Ο εμβολιασμός της προκαλλιέργειας πραγματοποιούνταν υπό στείρες συνθήκες στον θάλαμο νηματικής ροής, όπου με την βοήθεια αποστειρωμένης σύριγγας λαμβάνονταν 2-3 mL εναιωρήματος βακτηρίου ευρισκόμενου υπό μορφή κυττάρων και μεταφέρονταν στη φιάλη αναεροβίωσης με το θρεπτικό μέσο προκαλλιέργειας. Η εν λόγω φιάλη αναεροβίωσης τοποθετούνταν σε θάλαμο επώασης ( $T=35^{\circ}\text{C}$ /χωρίς ανάδευση), για 48 ώρες. Μετά τις 48 ώρες, γινόταν εμβολιασμός της κύριας καλλιέργειας εντός του βιοαντιδραστήρα, υπό ασηπτικές συνθήκες, με 150 mL (10%) εμβολίου.



Εικόνα 2.3. 3. Προκαλλιέργεια του στελέχους E5 του είδους *C. butyricum* σε φιάλη αναεροβίωσης με θρεπτικό μέσο, η σύσταση του οποίου φαίνεται στον πίνακα 2.3.1., και γλυκόζη (παρούσα μελέτη)



Εικόνα 2.3. 4. Βιοαντιδραστήρας συνολικού όγκου 3-L (New Brunswick Scientific, USA) (παρούσα μελέτη)

<b>Συστατικά</b>	<b>Συγκέντρωση (g/L)</b>
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	1
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	0.5
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	2
<b>MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</b>	0.2
<b>CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O</b>	0.015
<b>FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</b>	0.005
<b>CaCO<sub>3</sub></b>	2
<b>Yeast extract</b>	1

*Πίνακας 2.3. 1. Σύσταση θρεπτικού μέσου (Chatzifragkou et al., 2011; Malaoui and Marczak, 2001; 2000; Petitdemange et al., 1995; van Andel et al., 1985)*

#### 2.4. Συνθήκες λειτουργίας του βιοαντιδραστήρα για τη μελέτη βακτηριακού στελέχους του είδους *B. thuringiensis*

Για τη μελέτη της αύξησης του βακτηριακού στελέχους του είδους *B. thuringiensis* με τη μεγαλύτερη απόδοση σε παραγωγή ακετοΐνης και 2,3-βουτανοδιόλης, χρησιμοποιήθηκε βιοαντιδραστήρας όγκου 1.2-L με ενεργό όγκο 0.8 L. Για τους σκοπούς των πειραμάτων, ο βιοαντιδραστήρας ήταν εξοπλισμένος με ηλεκτρόδιο μέτρησης της τιμής του pH, εξωτερικό μανδύα θέρμανσης, αισθητήρα θερμοκρασίας, δειγματολήπτη, φίλτρα εισόδου-εξόδου αερίων και σωλήνες ποικίλων διαμέτρων χρησιμοποιούμενοι κατά περίπτωση για την εισαγωγή θρεπτικών μέσων, αέρα, διαλύματος βάσης και οξέος για τη ρύθμιση της τιμής του pH και την έξοδο θρεπτικού μέσου από τον βιοαντιδραστήρα. Ο βιοαντιδραστήρας, αφού είχε εξοπλιστεί με τα απαραίτητα εξαρτήματα, όπως αυτά παρατέθηκαν προηγουμένως, αποστειρωνόταν σε αυτόκλειστο, και μετά το πέρας της αποστείρωσης αφήνονταν σε ηρεμία, προκειμένου να αποκτήσει θερμοκρασία περιβάλλοντος (Matthews, 2008).

Στη συνέχεια πραγματοποιούνταν η σύνδεση των εξαρτημάτων με την κεντρική μονάδα λειτουργίας του βιοαντιδραστήρα, στην οποία καταχωρούνταν και όλες οι τιμές των παραμέτρων της καλλιέργειας που κάθε φορά επιθυμείτο να παραμένουν σταθερές. Πριν τον εμβολιασμό γινόταν εμφύσηση αέρα, η οποία συνεχιζόταν σε όλη τη διάρκεια της βιοδιεργασίας (Matthews, 2008).

Ο εμβολιασμός πραγματοποιούνταν μέσω ενός σωλήνα του βιοαντιδραστήρα, με τη χρήση ενός ειδικού οργάνου, υπό ασηπτικές συνθήκες κοντά σε φλόγα. Η μελέτη στον βιοαντιδραστήρα, περιλάμβανε και εφαρμογή καλλιέργειας ημι-συνεχούς λειτουργίας. Στην περίπτωση αυτή, η ζύμωση ελάμβανε χώρα αρχικά υπό τις επιθυμητές συνθήκες και γινόταν χειρονακτικά προσθήκη πυκνού διαλύματος γλυκόζης, μέσω ενός διαφράγματος βουτυλίου, τοποθετημένου σε μία θύρα εισόδου στην κεφαλή του βιοαντιδραστήρα, με αποστειρωμένη σύριγγα των 20 mL, υπό ασηπτικές συνθήκες, κοντά σε φλόγα.

Πραγματοποιήθηκαν δύο πειράματα στο βιοαντιδραστήρα, επιλέγοντας σε κάθε πείραμα και διαφορετικές συνθήκες, προκειμένου να γίνει βελτιστοποίηση της παραγωγής ακετοΐνης και 2,3-βουτανοδιόλης.

Στο πρώτο πείραμα στο βιοαντιδραστήρα, οι συνθήκες λειτουργίας του οργάνου περιλάμβαναν θερμοκρασία καλλιέργειας  $T=35^{\circ}\text{C}$ , ρυθμό ανάδευσης 400 rpm, αερισμό 2 LPM, και τέλος διατήρηση της τιμής του pH ίση με 6.5 με αυτόματη προσθήκη διαλύματος καυστικού νατρίου (NaOH) 5 M και διαλύματος υδροχλωρίου (HCl) 5 M.

Στο δεύτερο πείραμα στο βιοαντιδραστήρα, οι συνθήκες λειτουργίας του οργάνου περιλάμβαναν θερμοκρασία καλλιέργειας  $T=35^{\circ}\text{C}$ , ρυθμό ανάδευσης 150 rpm, αερισμό 0.1 LPM, και τέλος διατήρηση της τιμής του pH ίση με 6.5 με αυτόματη προσθήκη διαλύματος καυστικού νατρίου (NaOH) 5 M και διαλύματος υδροχλωρίου (HCl) 5 M.

Η διαφορά λοιπόν μεταξύ των δύο πειραμάτων για το βακτηριακό στέλεχος του είδους *B. thuringiensis*, για το οποίο παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη παραγωγή ακετοΐνης και 2,3-βουτανοδιόλης σε σύγκριση με τα υπόλοιπα, έγκειται στον αερισμό που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας. Πιο συγκεκριμένα στο πρώτο πείραμα οι συνθήκες περιλάμβαναν υψηλό αερισμό και μεγάλη ανάδευση, και θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν αερόβιες, ενώ στο δεύτερο πείραμα περιλάμβαναν χαμηλό αερισμό και μέτρια ανάδευση, και θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν μικρο-αερόφιλες.

## 2.5. Συνθήκες λειτουργίας του βιοαντιδραστήρα για τη μελέτη του βακτηριακού στελέχους του είδους *C. butyricum*

Για τη μελέτη της αύξησης του βακτηριακού στελέχους του είδους *C. butyricum* χρησιμοποιήθηκε βιοαντιδραστήρας όγκου 3 L με ενεργό όγκο 1.5 L. Η σύνδεση των εξαρτημάτων στο βιοαντιδραστήρα περιγράφεται στην προηγούμενη παράγραφο.

Με το δεδομένο ότι ο μικροοργανισμός που χρησιμοποιήθηκε είναι υποχρεωτικά αναερόβιος, πριν τον εμβολιασμό πραγματοποιούνταν εμφύσηση αερίου αζώτου υψηλής καθαρότητας εντός του βιοαντιδραστήρα, για την απομάκρυνση του οξυγόνου από το περιβάλλον της καλλιέργειας, με ροή 1 LPM για 30 min. Η εμφύσηση αζώτου συνεχιζόταν καθ' όλη τη διάρκεια της βιοδιεργασίας με ροή 0.5 LPM (Chatzifragkou *et al.*, 2011; Malaoui and Marczak, 2001;2000; Petitdemange *et al.*, 1995; van Andel *et al.*, 1985).

Ο εμβολιασμός πραγματοποιούνταν μέσω ενός διαφράγματος βουτυλίου τοποθετημένου σε μία θύρα εισόδου στην κεφαλή του βιοαντιδραστήρα, με αποστειρωμένη σύριγγα των 20 mL, υπό ασηπτικές συνθήκες, κοντά σε φλόγα.

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων στο βιοαντιδραστήρα, οι συνθήκες λειτουργίας του οργάνου περιλάμβαναν θερμοκρασία καλλιέργειας  $T=35^{\circ}\text{C}$ , ρυθμό ανάδευσης 180 rpm, εμφύσηση αερίου αζώτου με ροή 0.5 LPM, και τέλος διατήρηση της τιμής του pH ίση με 6.8 με αυτόματη προσθήκη διαλύματος καυστικού νατρίου (NaOH) 5 M.

Η μελέτη στον βιοαντιδραστήρα, περιλάμβανε εφαρμογή καλλιέργειας ημι-συνεχούς λειτουργίας. Στην περίπτωση αυτή, η ζύμωση λάμβανε χώρα αρχικά υπό τις επιθυμητές συνθήκες και γινόταν χειρονακτικά προσθήκη πυκνού διαλύματος γλυκόζης, μέσω του ίδιου διαφράγματος βουτυλίου, με αποστειρωμένη σύριγγα των 20 mL, υπό ασηπτικές συνθήκες, κοντά σε φλόγα.

## 2.6. Αναλύσεις

### 2.6.1. Προσδιορισμός pH

Το pH της εκάστοτε καλλιέργειας μετρήθηκε με pH-μετρο τύπου Checker by Hanna Instruments. Κατά τη μελέτη στο βιοαντιδραστήρα, πραγματοποιείται αυτόματη διόρθωση του pH στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας, όπου ήταν αναγκαίο, έτσι ώστε η τιμή του pH να επιστρέφει στην επιθυμητή τιμή του. Η διόρθωση του pH γινόταν με προσθήκη διαλύματος καυστικού νατρίου (NaOH) 5 M και διαλύματος υδροχλωρίου (HCl) 5 M.



Εικόνα 2.6.1. 1. pH-μετρο τύπου Checker by Hanna Instruments (παρούσα μελέτη)

### 2.6.2. Προσδιορισμός βιομάζας

Ο προσδιορισμός της βιομάζας, τόσο στις κωνικές φιάλες, τις φιάλες αναεροβίωσης, όσο και στον βιοαντιδραστήρα, πραγματοποιούνταν με μέτρηση του ξηρού βάρους. Η παραλαβή της βιομάζας γινόταν με φυγοκέντρηση του εκάστοτε δείγματος σε φυγόκεντρο τύπου Hettich Universal Mikro 12-24 type 2070-01 Centrifuge w/24-Well Fixed Angle Rotor (8000 rpm, 5 min). Κατά την πρώτη φυγοκέντρηση το υπερκείμενο συλλεγόταν σε eppendorf των 2 mL για να γίνουν οι περαιτέρω αναλύσεις. Ακολουθούσε έκπλυση των κυττάρων με απιονισμένο νερό και δεύτερη φυγοκέντρηση κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Στη συνέχεια η βιομάζα μεταφερόταν σε προζυγισμένα φιαλίδια BIZOU, τα οποία τοποθετούνταν στον φούρνο προς ξήρανση ( $90 \pm 5^\circ\text{C}$ ) μέχρι τη σταθεροποίηση του βάρους. Το ξηρό υπόλειμμα ζυγιζόταν τελικά σε ζυγό ακριβείας τύπου Sartorius basic, με ακρίβεια τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων και εκφραζόταν σε g/L.



Εικόνα 2.6.2. 2. Φυγόκεντρος τύπου Hettich Universal Mikro 12-24 type 2070-01 Centrifuge w/24-Well Fixed Angle Rotor (παρούσα μελέτη)



Εικόνα 2.6.2. 1. Ζυγός ακριβείας τύπου Sartorius basic (παρούσα μελέτη)

### 2.6.3. Προσδιορισμός σακχάρου, ακετοΐνης, 2,3-βουτανοδιόλης, βουτυρικού οξέος και λοιπών οργανικών οξέων

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του εναπομείναντος σακχάρου, είτε πρόκειται για γλυκόζη είτε για σουκρόζη, της ακετοΐνης, της 2,3-βουτανοδιόλης, του βουτυρικού οξέος και των λοιπών μεταβολικών προϊόντων-οργανικών οξέων, πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, H.P.L.C.) σε σύστημα Waters 600E (Waters, Milford, MA, USA). Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της σουκρόζης, της γλυκόζης, της ακετοΐνης και της 2,3-βουτανοδιόλης πραγματοποιήθηκε μέσω ανιχνευτή διαφορικού διαθλασιμέτρου (RI Waters 410), ενώ η ανίχνευση των οργανικών οξέων έγινε μέσω ανιχνευτή απορρόφησης υπεριώδους ακτινοβολίας σε μήκος κύματος  $\lambda=210$  nm (UV Waters 486). Η ταυτοποίηση των μεταβολικών προϊόντων βασίστηκε στο χρόνο κατακράτησης, ο οποίος συγκρίθηκε με γνωστά δείγματα αυτών. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε υδατικό διάλυμα  $H_2SO_4$

(0.005 M) και η ροή της ρυθμίστηκε στα 0.6 mL/min. Η στήλη με την οποία έγινε ο διαχωρισμός του μίγματος ήταν τύπου Aminex HPX-87H (300 mm x 7.8 mm, Bio-Rad, California, USA) και θερμοκρασίας 65° C. Από τη στήλη περνούσαν 20 μL δείγματος και η διάρκεια της ανάλυσης ήταν 20 min.

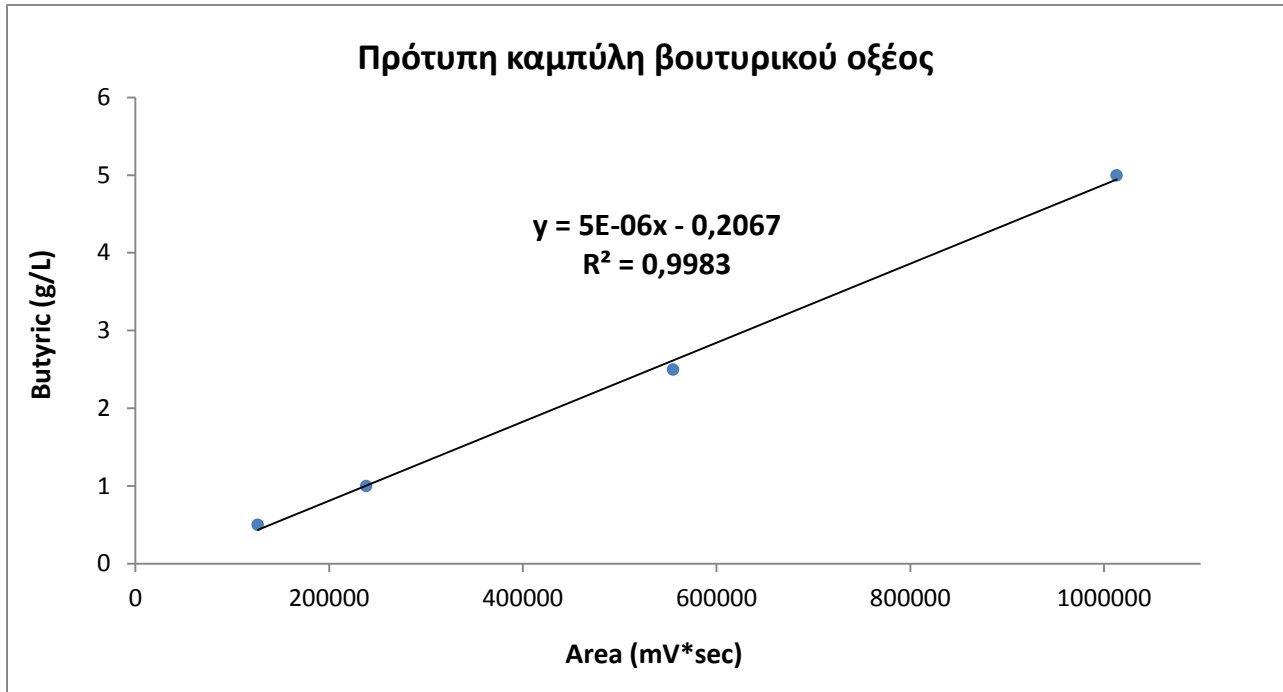
Με τη χρήση πρότυπων διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης προέκυψαν οι εξισώσεις που παρουσιάζονται στον πίνακα 2.6.3.1.. Με τη βοήθεια των εξισώσεων αυτών υπολογίστηκε η συγκέντρωση των μεταβολικών προϊόντων. Στις εξισώσεις με C συμβολίζεται η συγκέντρωση σε g/L και με E συμβολίζεται το εμβαδό (area).

Συστατικό	Εξίσωση
Γλυκόζη (Glucose)	$C=(4*10^{(-6)})*E-0.0152$
Σουκρόζη (Sucrose)	$C=(3*10^{(-6)})*E-0.028$
Ακετοΐνη (Acetoin)	$C=(6.4891*(10^{(-6)}))*E$
2,3-βουτανοδιόλη (2,3-butanediol)	$C=(5.2231*(10^{(-6)}))*E$
Meso-2,3-βουτανοδιόλη (Meso-2,3-butanediol)	$C=(4.4134*(10^{(-6)}))*E$
Βουτυρικό οξύ (Butyric)	$C=(5*10^{(-6)})*E-0.2067$
Οξικό οξύ (Acetic)	$C=(8*(10^{(-7)}))*E-0.0218$
Γαλακτικό οξύ (Lactic) (1 κορυφή)	$C=(8*(10^{(-7)}))*E-0.0018$
Γαλακτικό οξύ (Lactic) (2 κορυφές)	$C=(5*(10^{(-7)}))*E-0.0064$

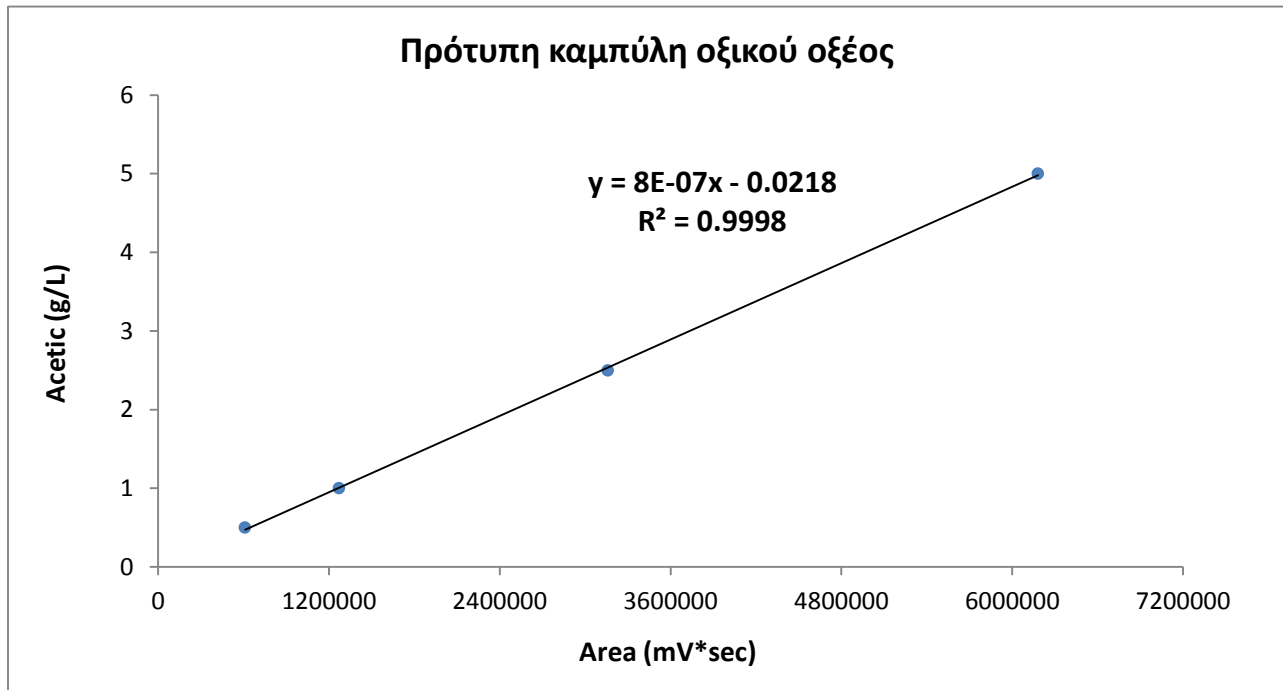
*Πίνακας 2.6.3. 1. Εξισώσεις HPLC όπως προέκυψαν με τη χρήση των αντίστοιχων πρότυπων διαλυμάτων*

Οι καμπύλες αναφοράς με βάση τις οποίες υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις του βουτυρικού, του οξικού και του γαλακτικού οξέος παρουσιάζονται στα γραφήματα που ακολουθούν.

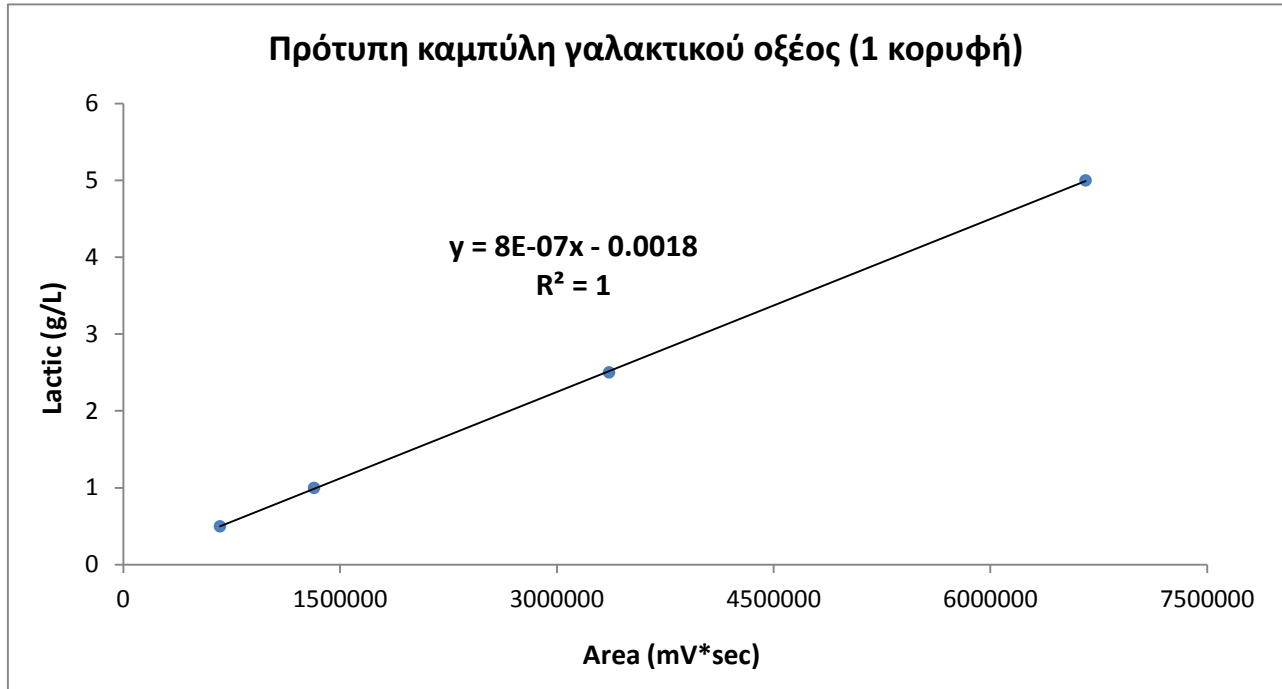




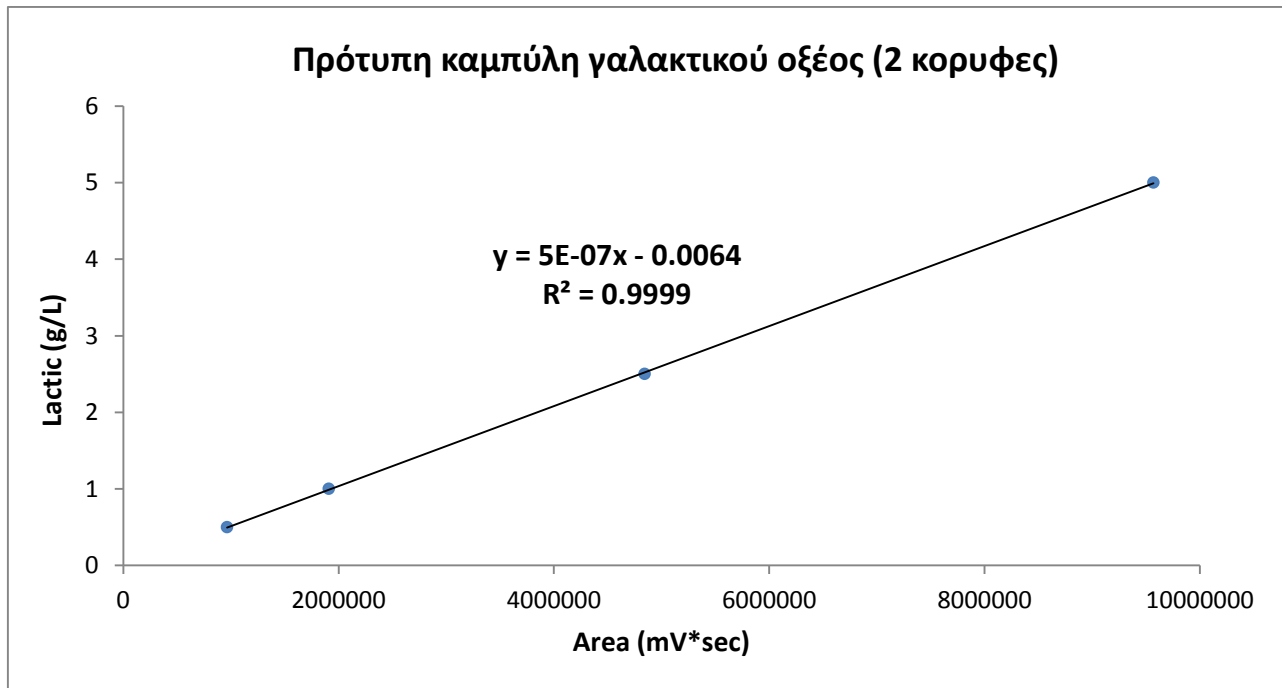
Γράφημα 2.6.3. 1. Πρότυπη καμπύλη βουτυρικού οξέος



Γράφημα 2.6.3. 2. Πρότυπη καμπύλη οξικού οξέος



Γράφημα 2.6.3. 3. Πρότυπη καμπύλη γαλακτικού οξέος (1 κορυφή)



Γράφημα 2.6.3. 4. Πρότυπη καμπύλη γαλακτικού οξέος (2 κορυφές)

#### 2.6.4. Έλεγχος καθαρότητας των μικροβιακών καλλιιεργειών

Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων, πραγματοποιούνταν περιοδικά έλεγχος της καθαρότητας της μικροβιακής καλλιέργειας. Αυτό ήταν δυνατό με τη λήψη δείγματος από την εκάστοτε καλλιέργεια και την παρατήρηση του σε οπτικό μικροσκόπιο τύπου Zeiss (Germany).



Εικόνα 2.6.4. 1. Στέλεχος 1522 του είδους *B. thuringiensis* όπως φαίνεται στο μικροσκόπιο σε μεγέθυνση Χ1000 (παρούσα μελέτη)



Εικόνα 2.6.4. 2. Στέλεχος E5 του είδους *C. butyricum* όπως φαίνεται στο μικροσκόπιο σε μεγέθυνση Χ1000 (παρούσα μελέτη)



Εικόνα 2.6.4. 3. Μικροσκόπιο τύπου Zeiss (Germany) (παρούσα μελέτη)

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

#### 3.1. Μελέτη βακτηριακών στελεχών του είδους *Bacillus thuringiensis* σε υγρές καλλιέργειες σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες, με υπόστρωμα εμπλουτισμένο με σουκρόζη, για την παραγωγή ακετοΐνης και 2,3-βουτανοδιόλης

Το πρώτο στάδιο της παρούσας μελέτης είχε ως στόχο τη διερεύνηση των βιοχημικών δυνατοτήτων έξι βακτηριακών στελεχών του είδους *B. thuringiensis*, προς παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης και ακετοΐνης. Συγκεκριμένα τα στελέχη που μελετήθηκαν ήταν τα LQC 1405, LQC 1407, LQC 1522, LQC 1523, LQC 1549 και LQC 1553. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις βυθού κλειστού τύπου, σε κωνικές φιάλες, υπό ανάδευση 180 rpm. Η πηγή άνθρακα που χρησιμοποιήθηκε ήταν σουκρόζη σε αρχική συγκέντρωση 25 g/L και η θερμοκρασία επώασης ήταν 35°C. Στον Πίνακα 3.1.1.1. παρουσιάζεται η κατανάλωση της σουκρόζης και η παραγωγή των μεταβολικών προϊόντων και της βιομάζας μετά το πέρας της ζύμωσης.

##### 3.1.1. Γενική παρουσίαση αποτελεσμάτων

Στέλεχος	t (h)	Suc <sub>0</sub> (g/L)	Suc <sub>f</sub> (g/L)	Suc <sub>c</sub> (g/L)	Ace (g/L)	2,3-BDO (g/L)	Act (g/L)	Lac (g/L)	X <sub>max</sub> (g/L)
1405	48	19.38	10.87	8.51	1.76	1.70	3.43	0.70	2.21
1407	48	25.31	11.41	13.90	2.01	1.53	3.74	0.85	3.15
1522	48	20.22	10.80	9.42	2.03	1.96	4.03	2.25	2.73
1523	48	19.80	11.16	8.64	1.97	1.19	3.99	2.23	2.01
1549	48	25.42	11.79	13.63	1.21	1.88	2.93	1.54	3.27
1553	48	18.27	9.29	8.98	1.49	1.80	3.00	2.89	2.44

Πίνακας 3.1.1. 1. Κατανάλωση σουκρόζης (Suc, g/L) και παραγωγή μεταβολικών προϊόντων και βιομάζας κατά τη διεργασία ζυμώσεων βακτηριακών στελεχών του είδους *B. thuringiensis* σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχείς καλλιέργειες σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες, υπό ανάδευση 180 rpm και θερμοκρασία επώασης 35°C

**t**: η χρονική στιγμή της ζύμωσης (h), **Suc<sub>0</sub>**: η αρχική συγκέντρωση σουκρόζης (g/L), **Suc<sub>t</sub>**: η τελική συγκέντρωση σουκρόζης (g/L), **Suc<sub>c</sub>**: η καταναλωθείσα σουκρόζη (g/L), **Ace**: η συγκέντρωση της ακετοΐνης (g/L), **2,3-BDO**: η συγκέντρωση της 2,3-βουτανοδιόλης (g/L), **Act**: η συγκέντρωση του οξικού οξέος (g/L), **Lac**: η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος (g/L), **X<sub>max</sub>**: η μέγιστη παραγόμενη βιομάζα (g/L)

Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 3.1.1.1., από τα έξι βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν, το στέλεχος *B. thuringiensis* LQC 1522 κατανάλωσε τη σουκρόζη στο χρονικό διάστημα των 48 h και παράγαγε τη μεγαλύτερη συγκέντρωση ακετοΐνης (2.03 g/L) και 2,3-βουτανοδιόλης (1.96 g/L) συγκριτικά με τα υπόλοιπα στελέχη. Επίσης για το συγκεκριμένο στέλεχος υπήρξε παραγωγή οξικού οξέος (4.03 g/L), γαλακτικού οξέος (2.25 g/L) και βιομάζας (2.73 g/L)

Κατά τη βιοδιεργασία υπολογίστηκαν οι εξής παράμετροι της μικροβιακής αύξησης:

- Ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής ακετοΐνης  $Y_{Ace}$  (g παραχθείσας ακετοΐνης ανά g καταναλωθέντος υποστρώματος)
- Ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης  $Y_{2,3-BDO}$  (g παραχθείσας 2,3-βουτανοδιόλης ανά g καταναλωθέντος υποστρώματος)

Στέλεχος	Suc <sub>c</sub> (g/L)	Ace (g/L)	2,3-BDO (g/L)	Y <sub>Ace</sub> (g/g)	Y <sub>2,3-BDO</sub> (g/g)	Y <sub>t</sub> (g/g)
1405	8.51	1.76	1.70	0.21	0.20	0.41
1407	13.90	2.01	1.53	0.14	0.11	0.25
1522	9.42	2.03	1.96	0.22	0.21	0.43
1523	8.64	1.97	1.19	0.23	0.14	0.37
1549	13.63	1.21	1.88	0.09	0.14	0.23
1553	8.98	1.49	1.80	0.17	0.20	0.37

Πίνακας 3.1.1. 2. Συγκεντρωτικός πίνακας καταγραφής της απόδοσης παραγωγής ακετοΐνης (Ace, g/L) και 2,3-βουτανοδιόλης (2,3-BDO, g/L) κατά τη διεργασία ζυμώσεων βακτηριακών στελεχών του είδους *B. thuringiensis* σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες

*Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχείς καλλιέργειες σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες, υπό ανάδευση 180 rpm και θερμοκρασία επώασης 35°C*

**Suc<sub>c</sub>**: η καταναλωθείσα σουκρόζη (g/L), **Ace**: η συγκέντρωση της ακετοΐνης (g/L), **2,3-BDO**: η συγκέντρωση της 2,3-βουτανοδιόλης (g/L), **Y<sub>Ace</sub>**: ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής ακετοΐνης προς καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g), **Y<sub>2,3-BDO</sub>**: ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης προς καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g), **Y<sub>t</sub>**: ο συνολικός συντελεστής απόδοσης προς καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g)

Από τον Πίνακα 3.1.1.2. φαίνεται πως ο συνολικός συντελεστής απόδοσης για τα περισσότερα από τα στελέχη που μελετήθηκαν ήταν ικανοποιητικός. Χαρακτηριστικά για το στέλεχος LQC 1522, που εμφάνισε τις μεγαλύτερες αποδόσεις στην παραγωγή ακετοΐνης (0.22 g/g) και 2,3-βουτανοδιόλης (0.21 g/g), ο συντελεστής απόδοσης άγγιξε αξιόλογη τιμή (0.43 g/g).

Η ζύμωση διήρκησε 48 h, ενώ ένα μέρος της σουκρόζης παρέμεινε ακατανάλωτο. Για το λόγο αυτό σε επόμενο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας, χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα εμπλουτισμένο με γλυκόζη, ώστε να παρατηρηθεί ο ρυθμός κατανάλωσης και αυτού του υποστρώματος.

### 3.2. Μελέτη βακτηριακών στελεχών του είδους *Bacillus thuringiensis* σε υγρές καλλιέργειες σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες, με υπόστρωμα εμπλουτισμένο με γλυκόζη, για την παραγωγή ακετοΐνης και 2,3-βουτανοδιόλης

Στο επόμενο στάδιο της μελέτης το εμπλουτισμένο με σουκρόζη υπόστρωμα αντικαταστάθηκε από υπόστρωμα εμπλουτισμένο με γλυκόζη, προκειμένου να παρατηρηθεί αν καταναλώνεται με μεγαλύτερη ευκολία. Πραγματοποιήθηκαν λοιπόν εκ νέου ζυμώσεις βυθού κλειστού τύπου, σε κωνικές φιάλες, υπό ανάδευση 180 rpm. Η πηγή άνθρακα που χρησιμοποιήθηκε ήταν γλυκόζη σε αρχική συγκέντρωση 25 g/L και η θερμοκρασία επώασης ήταν 35°C. Στον Πίνακα 3.2.1.1. παρουσιάζεται η κατανάλωση της γλυκόζης και η παραγωγή των μεταβολικών προϊόντων και της βιομάζας μετά το πέρας της ζύμωσης.

#### 3.2.1. Γενική παρουσίαση αποτελεσμάτων

Στέλεχος	t (h)	Glu <sub>0</sub> (g/L)	Glu <sub>f</sub> (g/L)	Glu <sub>c</sub> (g/L)	Ace (g/L)	2,3-BDO (g/L)	Meso-2,3-BDO (g/L)	Act (g/L)	Lac (g/L)	X <sub>max</sub> (g/L)
1405	48	25.46	0.21	25.25	6.29	3.12	0.00	2.79	0.15	4.00
1407	48	22.81	0.20	22.61	4.67	3.40	0.00	2.84	0.40	4.25
1522	48	22.38	0.00	22.38	6.56	3.44	0.00	2.62	0.00	3.70
1523	48	25.08	1.04	24.04	6.47	3.07	0.21	2.95	0.49	3.35
1549	48	26.71	0.14	26.57	3.03	3.23	0.00	2.69	0.47	4.45
1553	48	26.69	0.26	26.43	2.14	3.34	0.00	2.85	0.77	5.25

Πίνακας 3.2.1. 1. Κατανάλωση γλυκόζης (Glu, g/L) και παραγωγή μεταβολικών προϊόντων και βιομάζας κατά τη διεργασία ζυμώσεων βακτηριακών στελεχών του είδους *B. thuringiensis* σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχείς καλλιέργειες σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες, υπό ανάδευση 180 rpm και θερμοκρασία επώασης 35°C

t: η χρονική στιγμή της ζύμωσης (h), **Glu<sub>0</sub>**: η αρχική συγκέντρωση γλυκόζης (g/L), **Glu<sub>f</sub>**: η τελική συγκέντρωση γλυκόζης (g/L), **Glu<sub>c</sub>**: η καταναλωθείσα γλυκόζη (g/L), **Ace**: η συγκέντρωση της ακετοΐνης (g/L), **2,3-BDO**: η συγκέντρωση της 2,3-βουτανοδιόλης (g/L), **Meso-2,3-BDO**: η συγκέντρωση της meso-2,3-βουτανοδιόλης (g/L), **Act**: η

συγκέντρωση του οξικού οξέος (g/L), **Lac**: η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος (g/L), **X<sub>max</sub>**: η μέγιστη παραγόμενη βιομάζα (g/L)

Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 3.2.1.1., από τα έξι βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν, το στέλεχος *B. thuringiensis* LQC 1522 κατανάλωσε τη γλυκόζη στο χρονικό διάστημα των 48 h και παράγαγε τη μεγαλύτερη συγκέντρωση ακετοΐνης (6.56 g/L) και 2,3-βουτανودیολης (3.44 g/L) συγκριτικά με τα υπόλοιπα στελέχη. Επίσης για το συγκεκριμένο στέλεχος υπήρξε παραγωγή οξικού οξέος (2.62 g/L) και βιομάζας (3.70 g/L). Αξίζει να αναφερθεί πως κατά τη μελέτη του στελέχους *B. thuringiensis* LQC 1522 δεν παράχθηκε καθόλου γαλακτικό οξύ, όπως επίσης ότι η συγκέντρωση ακετοΐνης, που παράχθηκε από τα στελέχη *B. thuringiensis* LQC 1549 και *B. thuringiensis* LQC 1553 ήταν κατά 3-4 g/L μικρότερη σε σχέση με το στέλεχος *B. thuringiensis* LQC 1522.

Μετά τον υπολογισμό ορισμένων παραμέτρων της μικροβιακής αύξησης προκύπτει ο ακόλουθος Πίνακας 3.2.1.2..

Στέλεχος	<b>Gluc</b> (g/L)	<b>Ace</b> (g/L)	<b>2,3-BDO</b> (g/L)	<b>Y<sub>Ace</sub></b> (g/g)	<b>Y<sub>2,3-BDO</sub></b> (g/g)	<b>Y<sub>t</sub></b> (g/g)
<b>1405</b>	25.25	6.29	3.12	0.25	0.12	0.37
<b>1407</b>	22.61	4.67	3.40	0.21	0.15	0.36
<b>1522</b>	22.38	6.56	3.44	0.29	0.15	0.45
<b>1523</b>	24.04	6.47	3.07	0.27	0.13	0.40
<b>1549</b>	26.57	3.03	3.43	0.11	0.13	0.24
<b>1553</b>	26.43	2.14	3.34	0.08	0.13	0.21

Πίνακας 3.2.1. 2. Συγκεντρωτικός πίνακας καταγραφής της απόδοσης παραγωγής ακετοΐνης (Ace, g/L) και 2,3-βουτανودیολης (2,3-BDO, g/L) κατά τη διεργασία ζυμώνσεων βακτηριακών στελεχών του είδους *B. thuringiensis* σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχείς καλλιέργειες σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες, υπό ανάδευση 180 rpm και θερμοκρασία επώασης 35°C

**Gluc**: η καταναλωθείσα γλυκόζη (g/L), **Ace**: η συγκέντρωση της ακετοΐνης (g/L), **2,3-BDO**: η συγκέντρωση της 2,3-βουτανودیολης (g/L), **Y<sub>ACE</sub>**: ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής ακετοΐνης προς καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g), **Y<sub>2,3-BDO</sub>**: ο συντελεστής



απόδοσης παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης προς καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g), Υι: ο συνολικός συντελεστής απόδοσης προς καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g)

Σχεδόν όλα τα στελέχη του είδους *B. thuringiensis* που μελετήθηκαν, φαίνεται ότι είχαν σχετικά καλές αποδόσεις. Ιδιαίτερα ενδιαφέρον είναι το γεγονός πως το στέλεχος 1522 εμφάνισε τις μεγαλύτερες αποδόσεις στην παραγωγή ακετοΐνης (0.29 g/g) και 2,3-βουτανοδιόλης (0.15 g/g) και επομένως τη μεγαλύτερη συνολική απόδοση (0.45 g/g).

Η ζύμωση στο εμπλουτισμένο με γλυκόζη υπόστρωμα διήρκησε αντίστοιχα 48 h, όπως και στην περίπτωση της σουκρόζης. Μια παρατήρηση που προκύπτει με σύγκριση της κατανάλωσης της σουκρόζης και της κατανάλωσης της γλυκόζης, όπως αυτές παρουσιάζονται στους Πίνακες 3.1.1.2 και 3.2.1.2. αντίστοιχα, είναι πως το εμπλουτισμένο με γλυκόζη υπόστρωμα καταναλώθηκε εξ' ολοκλήρου στις 48 h της ζύμωσης. Η γλυκόζη είναι συνεπώς ευκολότερα αφομοιώσιμη σε σχέση με τη σουκρόζη, όπου για όλα τα στελέχη παρατηρήθηκε χαμηλός ρυθμός διάσπασης και κατανάλωσής της.

Αφού συνεκτιμήθηκε τόσο η κατανάλωση της γλυκόζης όσο και η παραγωγή ακετοΐνης και 2,3-βουτανοδιόλης, επιλέχθηκε για τη συνέχεια της πειραματικής διαδικασίας το στέλεχος *B. thuringiensis* LQC 1522. Συγκεκριμένα ακολουθήθηκε μελέτη σε βιοαντιδραστήρα, με την κατάλληλη ρύθμιση των συνθηκών ανάπτυξης, προκειμένου να γίνει βελτιστοποίηση της παραγωγής.

### 3.3. Μελέτη επιλεγμένου στελέχους του είδους *Bacillus thuringiensis* σε βιοαντιδραστήρα, με υπόστρωμα εμπλουτισμένο με γλυκόζη, για τη βελτιστοποίηση της παραγωγής ακετοΐνης και 2,3-βουτανοδιόλης

Το επόμενο μέρος της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η καλλιέργεια του μικροοργανισμού *Bacillus thuringiensis* LQC 1522 και η πραγματοποίηση κινητικών σε βιοαντιδραστήρα, με υπόστρωμα εμπλουτισμένο με γλυκόζη σε αρχική συγκέντρωση 30 g/L. Συγκεκριμένα στο βιοαντιδραστήρα μπορεί να γίνει εφαρμογή ημι-συνεχούς καλλιέργειας, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η ανάπτυξη υπό ελεγχόμενες συνθήκες, ώστε να μεγιστοποιηθεί η παραγωγή ακετοΐνης και 2,3-βουτανοδιόλης. Για την επίτευξη των κατάλληλων συνθηκών απαιτείται συνεχής ροή αέρα.

Στο πρώτο πείραμα που πραγματοποιήθηκε στο βιοαντιδραστήρα για το βακτηριακό στέλεχος LQC 1522 του είδους *B. thuringiensis*, έγινε καλλιέργεια του στελέχους σε βιοαντιδραστήρα 1.2-L (new Brunswick Scientific, USA) με ενεργό όγκο 0.8 L, θερμοκρασία καλλιέργειας  $T=35^{\circ}\text{C}$ , ρυθμό ανάδευσης 400 rpm, αερισμό 2 LPM (υψηλός αερισμός), και τέλος διατήρηση της τιμής του pH ίση με 6.5 με αυτόματη προσθήκη διαλύματος καυστικού νατρίου (NaOH) 5 M και διαλύματος υδροχλωρίου (HCl) 5 M. Το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν εμπλουτισμένο με γλυκόζη 30 g/L. Στον Πίνακα 3.3.1.1. παρουσιάζεται η κατανάλωση της γλυκόζης και η παραγωγή των μεταβολικών προϊόντων και της βιομάζας κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.

Στο δεύτερο πείραμα που πραγματοποιήθηκε στο βιοαντιδραστήρα για το βακτηριακό στέλεχος LQC 1522 του είδους *B. thuringiensis*, έγινε καλλιέργεια του στελέχους σε βιοαντιδραστήρα 1.2-L (new Brunswick Scientific, USA) με ενεργό όγκο 0.8 L, θερμοκρασία καλλιέργειας  $T=35^{\circ}\text{C}$ , ρυθμό ανάδευσης 150 rpm, αερισμό 0.1 LPM (χαμηλός αερισμός), και τέλος διατήρηση της τιμής του pH ίση με 6.5 με αυτόματη προσθήκη διαλύματος καυστικού νατρίου (NaOH) 5 M και διαλύματος υδροχλωρίου (HCl) 5 M. Το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν εμπλουτισμένο με γλυκόζη 30 g/L. Στον Πίνακα 3.3.1.2. παρουσιάζεται η κατανάλωση της γλυκόζης και η παραγωγή των μεταβολικών προϊόντων και της βιομάζας κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.

### 3.3.1. Γενική παρουσίαση αποτελεσμάτων

<b>t</b> <b>(h)</b>	<b>Glu</b> <b>(g/L)</b>	<b>Ace</b> <b>(g/L)</b>	<b>2,3-BDO</b> <b>(g/L)</b>	<b>Act</b> <b>(g/L)</b>	<b>Lac</b> <b>(g/L)</b>	<b>X</b> <b>(g/L)</b>
<b>0</b>	23.95	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05
<b>3</b>	21.47	0.94	0.00	0.80	0.00	0.20
<b>5</b>	18.80	0.99	0.00	0.89	0.00	1.45
<b>7</b>	16.54	1.47	0.35	1.49	3.47	2.05
<b>24</b>	0.00*	2.42	2.48	3.67	6.10	5.30

Πίνακας 3.3.1 1. Κατανάλωση γλυκόζης (Glu, g/L) και παραγωγή μεταβολικών προϊόντων και βιομάζας κατά τη διεργασία ζυμώσεως του βακτηριακού στελέχους *B. thuringiensis* LQC 1522 σε βιοαντιδραστήρα, υπό υψηλό αερισμό

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα 1.2-L, με ενεργό όγκο 0.8 L, θερμοκρασία καλλιέργειας  $T=35^{\circ}\text{C}$ , ρυθμό ανάδευσης 400 rpm, αερισμό 2 LPM, και τέλος διατήρηση της τιμής του pH ίση με 6.5. Υπόστρωμα εμπλουτισμένο με γλυκόζη σε αρχική συγκέντρωση 30 g/L

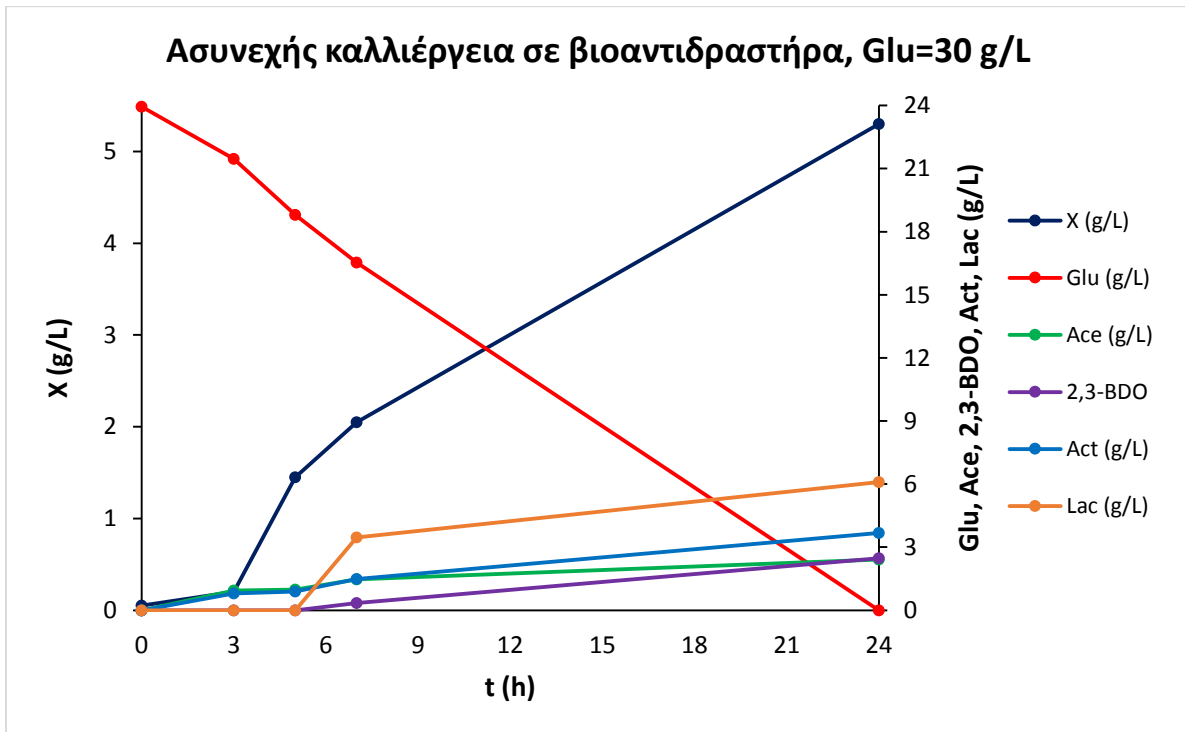
t: η χρονική στιγμή της ζύμωσης (h), **Glu**: η συγκέντρωση γλυκόζης (g/L), **Ace**: η συγκέντρωση της ακετοΐνης (g/L), **2,3-BDO**: η συγκέντρωση της 2,3-βουτανοδιόλης (g/L), **Act**: η συγκέντρωση του οξικού οξέος (g/L), **Lac**: η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος (g/L), **X**: η παραγόμενη βιομάζα (g/L)

\*Η ποσότητα της γλυκόζης που καταναλώθηκε συνολικά ήταν 23.95 g/L.

Με το πέρας της πρώτης ζύμωσης που πραγματοποιήθηκε στον βιοαντιδραστήρα για το βακτηριακό στέλεχος *B. thuringiensis* LQC 1522 και διήρκησε 24 h, φαίνεται από τα αποτελέσματα που προέκυψαν πως υπήρξε κατανάλωση ολόκληρης της ποσότητας της γλυκόζης (23.95 g/L) και παραγωγή ακετοΐνης (2.42 g/L) και 2,3-βουτανοδιόλης (2.48 g/L). Οπότε, ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής ακετοΐνης είναι  $Y_{\text{Ace}}=0.10$  g/g, ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης είναι  $Y_{2,3\text{-BDO}}=0.10$  g/g και επομένως ο συνολικός συντελεστής απόδοσης είναι  $Y_t=0.20$  g/g. Επίσης υπήρξε παραγωγή οξικού οξέος (3.67 g/L), γαλακτικού οξέος (6.10 g/L) και βιομάζας (5.30 g/L).

Από τον Πίνακα 3.3.1.1. φαίνεται πως κατά τη ζύμωση στο βιοαντιδραστήρα υπό υψηλό αερισμό, το βακτηριακό στέλεχος *B. thuringiensis* LQC 1522 μπορεί να καταναλώνει τη γλυκόζη, αλλά στρέφει το μεταβολισμό του προς την παραγωγή γαλακτικού οξέος και βιομάζας.

Στο Γράφημα 3.3.1.1. παρουσιάζεται η κινητική αύξησης του βακτηρίου *B. thuringiensis* LQC 1522 σε ασυνεχή καλλιέργεια στο βιοαντιδραστήρα, υπό υψηλό αερισμό, με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 30 g/L.



Γράφημα 3.3.1. 1. Κινητική αύξησης της βιομάζας (X), παραγωγής της ακετοΐνης (Ace), της 2,3-βουτανιοδιόλης (2,3-BDO), του οξικού οξέος (Act) και του γαλακτικού οξέος (Lac) κατά την καλλιέργεια του βακτηρίου *B. thuringiensis* LQC 1522 σε βιοαντιδραστήρα, υπό υψηλό αερισμό

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα 1.2-L, με ενεργό όγκο 0.8 L, θερμοκρασία καλλιέργειας  $T=35^{\circ}\text{C}$ , ρυθμό ανάδευσης 400 rpm, αερισμό 2 LPM, και τέλος διατήρηση της τιμής του pH ίση με 6.5. Υπόστρωμα εμπλουτισμένο με γλυκόζη σε αρχική συγκέντρωση 30 g/L

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, κατά τη ζύμωση στο βιοαντιδραστήρα υπό συνθήκες υψηλού αερισμού, το στέλεχος LQC 1522 του είδους *B. thuringiensis* στρέφει το μεταβολισμό του κυρίως προς την παραγωγή γαλακτικού οξέος και βιομάζας.

Σε επόμενη φάση λοιπόν η ζύμωση επαναλήφθηκε στο βιοαντιδραστήρα υπό χαμηλό αερισμό, προκειμένου να παρατηρηθεί πως συμπεριφέρεται το βακτηριακό στέλεχος. Τα αποτελέσματα αυτής της ζύμωσης υπό χαμηλό αερισμό παρουσιάζονται στον ακόλουθο Πίνακα 3.3.1.2.

<b>t</b> <b>(h)</b>	<b>Glu</b> <b>(g/L)</b>	<b>Ace</b> <b>(g/L)</b>	<b>2,3-BDO</b> <b>(g/L)</b>	<b>Act</b> <b>(g/L)</b>	<b>Lac</b> <b>(g/L)</b>	<b>X</b> <b>(g/L)</b>
<b>0</b>	33.39	0.45	0.25	0.77	2.62	0.10
<b>3</b>	26.18	0.29	0.12	0.82	1.03	0.65
<b>7</b>	22.50	0.69	1.28	1.75	4.34	1.65
<b>7.33</b>	49.85	0.50	1.42	0.89	4.63	1.65
<b>16.50</b>	37.40	0.37	2.97	1.46	12.93	2.25
<b>18.50</b>	35.55	0.45	3.56	1.17	11.01	2.40
<b>20.50</b>	33.14	0.58	3.50	0.94	10.39	2.45
<b>24</b>	30.12	0.41	3.92	0.95	11.11	2.55
<b>27</b>	27.47	0.54	4.53	0.73	12.29	2.56
<b>45</b>	18.27*	1.13	7.89	1.10	16.10	2.60

Πίνακας 3.3.1 2. Κατανάλωση γλυκόζης (Glu, g/L) και παραγωγή μεταβολικών προϊόντων και βιομάζας κατά τη διεργασία ζυμώσεως του βακτηριακού στελέχους *B. thuringiensis* LQC 1522 σε βιοαντιδραστήρα, υπό χαμηλό αερισμό

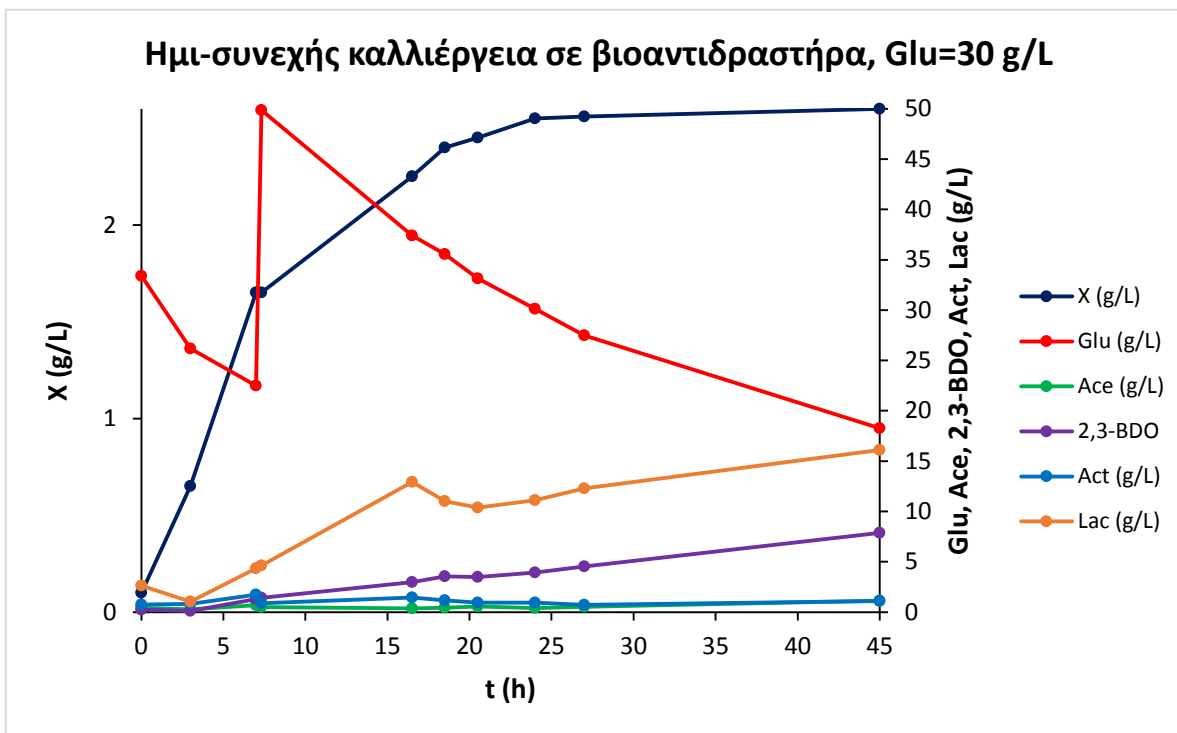
Συνθήκες καλλιέργειας: ημι-συνεχής καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα 1.2-L, με ενεργό όγκο 0.8 L, θερμοκρασία καλλιέργειας  $T=35^{\circ}\text{C}$ , ρυθμό ανάδευσης 150 rpm, αερισμό 0.1 LPM, και τέλος διατήρηση της τιμής του pH ίση με 6.5. Υπόστρωμα εμπλουτισμένο με γλυκόζη σε αρχική συγκέντρωση 30 g/L

**t**: η χρονική στιγμή της ζύμωσης (h), **Glu**: η συγκέντρωση γλυκόζης (g/L), **Ace**: η συγκέντρωση της ακετοΐνης (g/L), **2,3-BDO**: η συγκέντρωση της 2,3-βουτανοδιόλης (g/L), **Act**: η συγκέντρωση του οξικού οξέος (g/L), **Lac**: η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος (g/L), **X**: η παραγόμενη βιομάζα (g/L)

**\*Η ποσότητα της γλυκόζης που καταναλώθηκε συνολικά ήταν 42.47 g/L.**

Για τις ανάγκες του δεύτερου πειράματος που πραγματοποιήθηκε στο βιοαντιδραστήρα, έγινε τροποποίηση των συνθηκών σε αερισμό 0.1 LPM και ανάδευση στις 150 rpm, προκειμένου να επιτευχθούν οι συνθήκες χαμηλού αερισμού. Η συγκεκριμένη ζύμωση πραγματοποιήθηκε στο βιοαντιδραστήρα σε ημι-συνεχή καλλιέργεια και η διάρκειά της ήταν 45 h. Φαίνεται πως υπήρξε κατανάλωση γλυκόζης (42.47 g/L) και παραγωγή ακετοΐνης (1.13 g/L) και 2,3-βουτανοδιόλης (7.89 g/L). Ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής ακετοΐνης λοιπόν, είναι  $Y_{\text{Ace}}=0.03$  g/g, ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης είναι  $Y_{2,3\text{-BDO}}=0.19$  g/g και επομένως ο συνολικός συντελεστής απόδοσης είναι  $Y_t=0.22$  g/g. Επίσης υπήρξε παραγωγή οξικού οξέος (1.10 g/L), γαλακτικού οξέος (16.10 g/L) και βιομάζας (2.60 g/L).

Στο Γράφημα 3.3.1.2. παρουσιάζεται η κινητική αύξησης του βακτηρίου *B. thuringiensis* 1522 σε ημι-συνεχή καλλιέργεια στο βιοαντιδραστήρα, υπό χαμηλό αερισμό, με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 30 g/L.



Γράφημα 3.3.1. 2. Κινητική αύξησης της βιομάζας (X), παραγωγής της ακετοΐνης (Ace), της 2,3-βουτανιοδιόλης (2,3-BDO), του οξικού οξέος (Act) και του γαλακτικού οξέος (Lac) κατά την ημι-συνεχή καλλιέργεια του βακτηρίου *B. thuringiensis* LQC 1522 σε βιοαντιδραστήρα, υπό χαμηλό αερισμό

Συνθήκες καλλιέργειας: ημι-συνεχής καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα 1.2-L, με ενεργό όγκο 0.8 L, θερμοκρασία καλλιέργειας  $T=35^{\circ}\text{C}$ , ρυθμό ανάδευσης 150 rpm, αερισμό 0.1 LPM, και τέλος διατήρηση της τιμής του pH ίση με 6.5. Υπόστρωμα εμπλουτισμένο με γλυκόζη σε αρχική συγκέντρωση 30 g/L

Ανάμεσα στις δύο ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν στο βιοαντιδραστήρα υπάρχουν ορισμένες διαφορές, οι οποίες αξίζει να αναφερθούν.

Αρχικά, πρέπει να σημειωθεί πως στην περίπτωση της ζύμωσης υπό χαμηλό αερισμό έγινε μία φορά προσθήκη πυκνού διαλύματος γλυκόζης. Η προσθήκη αυτή δικαιολογείται παρατηρώντας τον Πίνακα 3.3.1.2., όπου φαίνεται πως η γλυκόζη καταναλωνόταν με γρήγορο ρυθμό και αντιστοίχως παράγονταν ακετοΐνη, 2,3-βουτανιοδιόλη και τα λοιπά μεταβολικά προϊόντα. Για να αποφευχθεί λοιπόν η λήξη της ζύμωσης λόγω εξάντλησης του υποστρώματος γλυκόζης, και προκειμένου να της επιτραπεί να παραχθεί μεγαλύτερη

ποσότητα τελικού προϊόντος, έγινε η προσθήκη του πυκνού διαλύματος γλυκόζης. Αντιθέτως κατά τη ζύμωση υπό υψηλό αερισμό μπορεί να υπήρχε κατανάλωση της γλυκόζης, αλλά ο μεταβολισμός στρέφεται προς την παραγωγή γαλακτικού οξέος και βιομάζας.

Μία ακόμα διαφορά είναι ότι η ζύμωση που γίνεται υπό χαμηλό αερισμό ολοκληρώθηκε σε διπλάσιο σχεδόν χρόνο (45 h) από τη ζύμωση που πραγματοποιήθηκε υπό υψηλό αερισμό (24 h), πράγμα που οφείλεται και στο γεγονός της προσθήκης πυκνού διαλύματος γλυκόζης

Κυριότερη όμως διαφορά είναι το ότι στη ζύμωση υπό χαμηλό αερισμό, η συγκέντρωση της 2,3-βουτανοδιόλης που παράχθηκε ήταν 4 g/L μεγαλύτερη σε σχέση με τη ζύμωση υπό υψηλό αερισμό. Για το λόγο αυτό, οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στην χαμηλού αερισμού ζύμωση που πραγματοποιήθηκε στο βιοαντιδραστήρα, μπορούν να θεωρηθούν καταλληλότερες για τη βιοτεχνολογική παραγωγή ακετοΐνης και 2,3-βουτανοδιόλης χρησιμοποιώντας το συγκεκριμένο στέλεχος.

Πρέπει να σημειωθεί ότι συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της ζύμωσης που πραγματοποιήθηκε στις ανακινούμενες κωνικές φιάλες και της χαμηλού αερισμού ζύμωσης που πραγματοποιήθηκε στο βιοαντιδραστήρα, παρατηρούνται επίσης ορισμένες ουσιαστικές διαφορές. Εξετάζοντας τις συγκεντρώσεις ακετοΐνης και 2,3-βουτανοδιόλης βλέπουμε ότι είναι 6.56 g/L και 3.44 g/L στην μία και 1.13 g/L και 7.89 g/L στην άλλη περίπτωση αντίστοιχα. Διαπιστώνεται δηλαδή ότι στο πείραμα που έγινε υπό ελεγχόμενες συνθήκες στο βιοαντιδραστήρα αυξάνεται η συγκέντρωση της 2,3-βουτανοδιόλης που παράγεται, αλλά αντιθέτως η συγκέντρωση της ακετοΐνης φαίνεται ότι μειώνεται. Στη ζύμωση που πραγματοποιήθηκε στο βιοαντιδραστήρα λαμβάνονταν συχνά δείγματα σε όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, οπότε ήταν δυνατόν να διαπιστωθεί τότε ακριβώς ολοκληρώθηκε η ζύμωση. Αντιθέτως στη ζύμωση που έγινε στις κωνικές φιάλες πραγματοποιήθηκαν δύο μετρήσεις, στις 0 h και τις 48 h. Η ζύμωση, άρα και το σάκχαρο, σε αυτή την περίπτωση τελείωσαν πριν τις 48 h. Στην περίπτωση αυτή ο μικροοργανισμός, όπως αναφέρεται και στη βιβλιογραφία, μπορεί να χρησιμοποιήσει την αντίστροφη αντίδραση βιοσύνθεσης ακετοΐνης και 2,3-βουτανοδιόλης, προκειμένου να μετατρέψει την 2,3-βουτανοδιόλη σε ακετοΐνη και άρα να απελευθερωθεί NADH που είναι μονάδα



ενέργειας (Liu *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2012c; Zhang *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013, Johansen *et al.*, 1973; Juni and Heym, 1955). Σε αυτήν ακριβώς την ιδιότητα των μικροοργανισμών πιθανόν οφείλεται το ότι η συγκέντρωση της ακετοΐνης που παρατηρήθηκε κατά τη ζύμωση στις ανακινούμενες κωνικές είναι μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση της ακετοΐνης που παράχθηκε κατά τη χαμηλού αερισμού ζύμωση στο βιοαντιδραστήρα.

### 3.4. Μελέτη του βακτηριακού στελέχους του είδους *Clostridium butyricum* σε υγρές καλλιέργειες σε στατικές φιάλες αναερόβιωσης, με υπόστρωμα εμπλουτισμένο με γλυκόζη, για την παραγωγή βουτυρικού οξέος

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης έγινε επίσης διερεύνηση των βιοχημικών δυνατοτήτων του βακτηριακού στελέχους E5 του είδους *C. butyricum*, προς παραγωγή βουτυρικού οξέος. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις σε στατικές φιάλες αναερόβιωσης, υπό αναερόβιες συνθήκες. Η πηγή άνθρακα που χρησιμοποιήθηκε ήταν γλυκόζη σε αρχική συγκέντρωση 25 g/L και η θερμοκρασία επώασης ήταν 35°C. Στον Πίνακα 3.4.1.1. παρουσιάζεται η κατανάλωση της γλυκόζης και η παραγωγή των μεταβολικών προϊόντων και της βιομάζας κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, υπό αναερόβιες συνθήκες.

#### 3.4.1. Γενική παρουσίαση αποτελεσμάτων

<b>t</b> <b>(h)</b>	<b>Glu</b> <b>(g/L)</b>	<b>But</b> <b>(g/L)</b>	<b>Act</b> <b>(g/L)</b>	<b>Lac</b> <b>(g/L)</b>	<b>X</b> <b>(g/L)</b>
<b>0</b>	23.35	0.00	2.23	0.11	0.40
<b>3</b>	23.26	0.00	2.44	0.21	1.00
<b>7</b>	20.36	0.00	2.31	0.65	1.30
<b>24</b>	16.40	0.27	2.00	0.65	1.40
<b>27</b>	16.31	0.29	1.49	0.69	1.50
<b>31</b>	16.29*	0.39	1.87	0.97	1.60

Πίνακας 3.4.1. 1. Κατανάλωση γλυκόζης (Glu, g/L) και παραγωγή μεταβολικών προϊόντων και βιομάζας κατά τη διεργασία ζυμώσεως του βακτηριακού στελέχους *C. butyricum* E5 σε στατικές φιάλες αναερόβιωσης

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής καλλιέργεια σε στατικές φιάλες αναερόβιωσης, υπό αναερόβιες συνθήκες και θερμοκρασία καλλιέργειας  $T=35^{\circ}\text{C}$

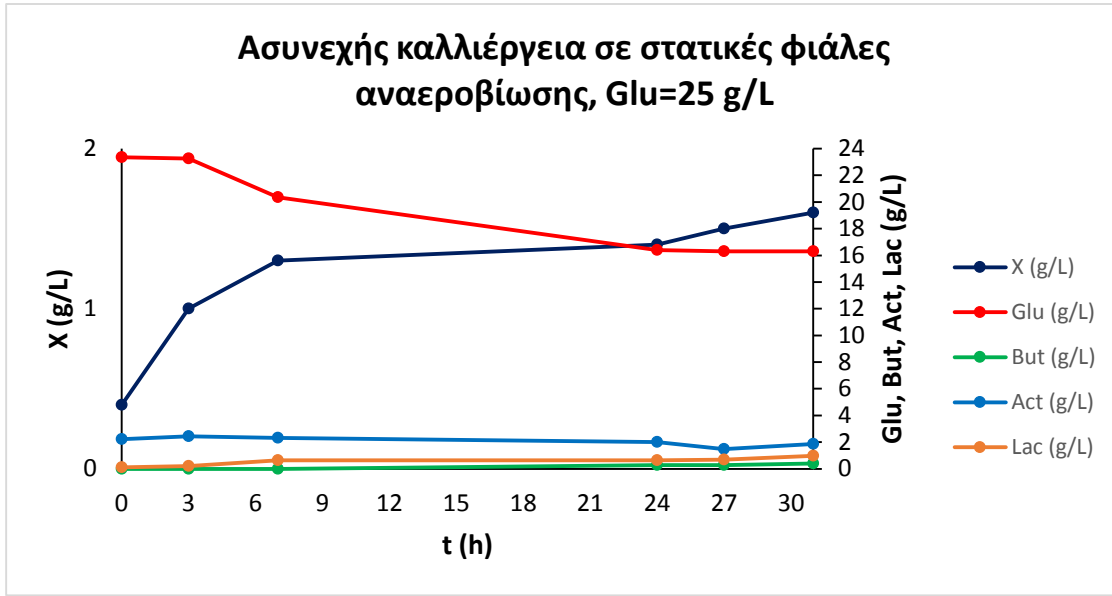
**t**: η χρονική στιγμή της ζύμωσης (h), **Glu**: η συγκέντρωση γλυκόζης (g/L), **But**: η συγκέντρωση του βουτυρικού οξέος (g/L), **Act**: η συγκέντρωση του οξικού οξέος (g/L), **Lac**: η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος (g/L), **X**: η παραγόμενη βιομάζα (g/L),

\*Η ποσότητα της γλυκόζης που καταναλώθηκε συνολικά ήταν 7.06 g/L.

Από τα αποτελέσματα φαίνεται καθαρά πως στο πέρας της ζύμωσης του βακτηριακού στελέχους *C. butyricum* E5, που διήρκησε 31 h, υπήρξε κατανάλωση της γλυκόζης (7.06 g/L) και παραγωγή βουτυρικού οξέος (0.39 g/L). Άρα ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής βουτυρικού οξέος είναι  $Y_{But}=0.06$  g/g. Επίσης υπήρξε παραγωγή οξικού οξέος (1.87 g/L), γαλακτικού οξέος (0.97 g/L) και βιομάζας 1.60 (g/L).

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα στον Πίνακα 3.4.1.1., φαίνεται πως το μεταβολικό προϊόν που μας ενδιαφέρει, δηλαδή το βουτυρικό οξύ, παράχθηκε σε σχετικά χαμηλή ποσότητα. Αυτό ίσως οφείλεται στο γεγονός ότι κατά τη ζύμωση στις στατικές φιάλες αναεροβίωσης προέκυψε σχηματισμός κολλοειδούς συσσωματώματος, γεγονός που πιθανότατα απέτρεψε το σωστό υπολογισμό του βουτυρικού οξέος. Για το λόγο αυτό σε επόμενο βήμα έγινε μελέτη σε βιοαντιδραστήρα, με εφαρμογή καλλιέργειας ημι-συνεχούς λειτουργίας, με την κατάλληλη ρύθμιση των συνθηκών ανάπτυξης, προκειμένου να γίνει βελτιστοποίηση της παραγωγής.

Στο Γράφημα 3.4.1.1. παρουσιάζεται η κινητική αύξησης του βακτηρίου *C. butyricum* E5 σε ασυνεχή καλλιέργεια σε στατικές φιάλες αναεροβίωσης, υπό αναερόβιες συνθήκες, με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 25 g/L.



Γράφημα 3.4.1. 1. Κινητική αύξησης της βιομάζας ( $X$ ), παραγωγής του βουτυρικού οξέος ( $But$ ), του οξικού οξέος ( $Act$ ) και του γαλακτικού οξέος ( $Lac$ ) κατά την ασυνεχή καλλιέργεια του βακτηρίου *C. butyricum* E5 σε στατικές φιάλες αναεροβίωσης

Συνθήκες καλλιέργεια: ασυνεχής καλλιέργεια σε στατικές φιάλες αναεροβίωσης, υπό αναερόβιες συνθήκες και θερμοκρασία καλλιέργειας  $T=35^{\circ}C$

### 3.5. Μελέτη του βακτηριακού στελέχους του είδους *Clostridium butyricum* σε βιοαντιδραστήρα, με υπόστρωμα εμπλουτισμένο με γλυκόζη, με εφαρμογή καλλιέργειας ημι-συνεχούς λειτουργίας, για τη βελτιστοποίηση της παραγωγής βουτυρικού οξέος

Σε επόμενη φάση της πειραματικής διαδικασίας έγινε καλλιέργεια του μικροοργανισμού *Clostridium butyricum* E5 και πραγματοποίηση κινητικών σε βιοαντιδραστήρα, με υπόστρωμα εμπλουτισμένο με γλυκόζη σε αρχική συγκέντρωση 30 g/L. Στο βιοαντιδραστήρα έγινε εφαρμογή καλλιέργειας ημι-συνεχούς λειτουργίας, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η ανάπτυξη υπό ελεγχόμενες συνθήκες, ώστε να μεγιστοποιηθεί η παραγωγή βουτυρικού οξέος. Για την επίτευξη των κατάλληλων συνθηκών απαιτείται συνεχής ροή αζώτου για να δημιουργηθούν αναερόβιες συνθήκες.

Στο πείραμα που πραγματοποιήθηκε στο βιοαντιδραστήρα για το βακτηριακό στέλεχος E5 του είδους *C. butyricum*, έγινε καλλιέργεια του στελέχους σε βιοαντιδραστήρα 3-L (new Brunswick Scientific, USA) με ενεργό όγκο 1.5 L, θερμοκρασία καλλιέργειας  $T=35^{\circ}\text{C}$ , ρυθμό ανάδευσης 180 rpm, ροή αζώτου 0.5 LPM, και τέλος διατήρηση της τιμής του pH ίση με 6.8 με αυτόματη προσθήκη διαλύματος καυστικού νατρίου (NaOH) 5 M. Το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν εμπλουτισμένο με γλυκόζη 30 g/L. Στον Πίνακα 3.5.1.1. παρουσιάζεται η κατανάλωση της γλυκόζης και η παραγωγή των μεταβολικών προϊόντων και της βιομάζας κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, υπό αναερόβιες συνθήκες.

### 3.5.1. Γενική παρουσίαση αποτελεσμάτων

<b>t</b> <b>(h)</b>	<b>Glu</b> <b>(g/L)</b>	<b>But</b> <b>(g/L)</b>	<b>Act</b> <b>(g/L)</b>	<b>Lac</b> <b>(g/L)</b>	<b>X</b> <b>(g/L)</b>
<b>0</b>	28.17	0.00	0.00	0.03	1.10
<b>2</b>	26.70	0.00	0.00	0.03	1.31
<b>4</b>	26.05	0.00	0.00	0.03	1.45
<b>9</b>	23.17	0.00	0.12	0.05	1.75
<b>21</b>	9.26	1.40	3.33	0.24	2.70
<b>21.25</b>	15.66	1.98	3.01	0.25	2.71
<b>24</b>	12.52	2.92	3.58	0.34	2.85
<b>27</b>	9.29	5.30	4.15	0.33	2.97
<b>29</b>	7.24	5.35	4.40	0.39	3.01
<b>30</b>	28.66	5.43	4.86	0.59	3.03
<b>45</b>	12.06	6.18	5.06	1.90	3.25
<b>45.25</b>	20.77	6.58	5.16	1.84	3.27
<b>48</b>	19.80	6.81	5.22	2.38	3.30
<b>50</b>	17.08	7.57	4.79	1.13	3.33
<b>54</b>	17.00*	9.04	5.45	2.11	3.40

Πίνακας 3.5.1 1. Κατανάλωση γλυκόζης (Glu, g/L) και παραγωγή μεταβολικών προϊόντων και βιομάζας κατά τη διεργασία ζυμώσεως του βακτηριακού στελέχους *C. butyricum* E5 σε βιοαντιδραστήρα

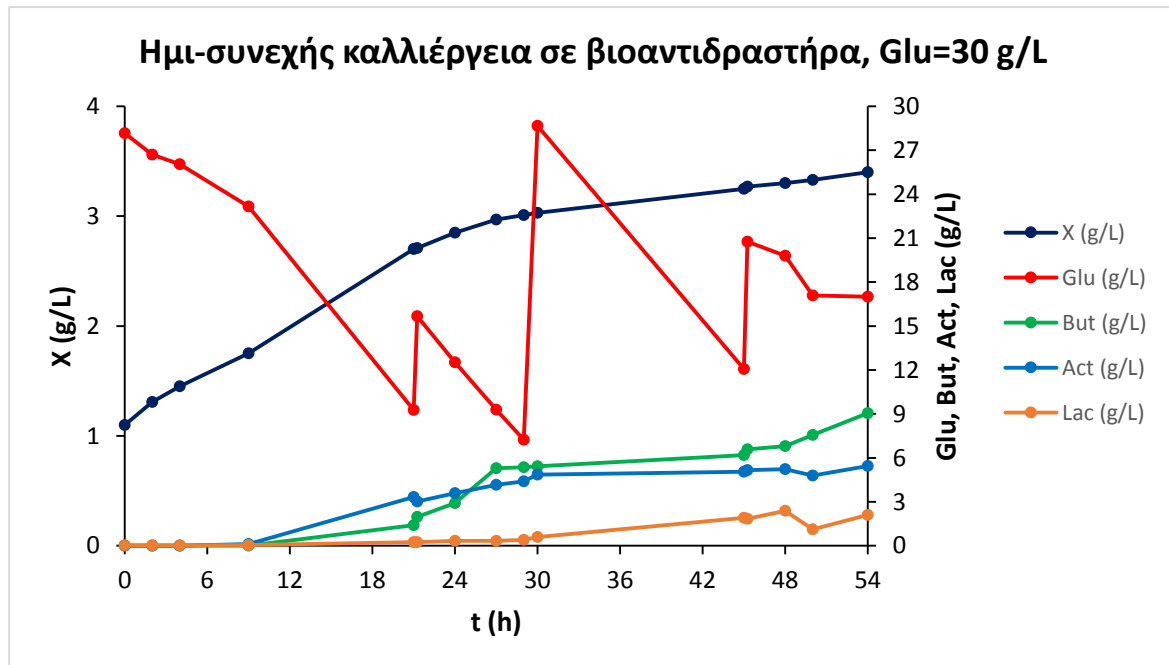
Συνθήκες καλλιέργειας: ημι-συνεχής καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα 3-L, με ενεργό όγκο 1.5 L, υπό αναερόβιες συνθήκες, θερμοκρασία καλλιέργειας  $T=35^{\circ}\text{C}$ , ρυθμό ανάδευσης 180 rpm, ροή αζώτου 0.5 LPM, και τέλος διατήρηση της τιμής του pH ίση με 6.8. Υπόστρωμα εμπλουτισμένο με γλυκόζη σε αρχική συγκέντρωση 30 g/L

**t**: η χρονική στιγμή της ζύμωσης (h), **Glu**: η συγκέντρωση γλυκόζης (g/L), **But**: η συγκέντρωση του βουτυρικού οξέος (g/L), **Act**: η συγκέντρωση του οξικού οξέος (g/L), **Lac**: η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος (g/L), **X**: η παραγόμενη βιομάζα (g/L)

\*Η ποσότητα της γλυκόζης που καταναλώθηκε συνολικά ήταν 47.70 g/L.

Με το πέρας της ζύμωσης που πραγματοποιήθηκε στον βιοαντιδραστήρα για το βακτηριακό στέλεχος *C. butyricum* E5 και διήρκησε 54 h, φαίνεται από τα αποτελέσματα που προέκυψαν πως υπήρξε κατανάλωση γλυκόζης (47.70 g/L) και παραγωγή βουτυρικού οξέος (9.04 g/L). Ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής βουτυρικού οξέος είναι  $Y_{But}=0.19$  g/g. Επίσης υπήρξε παραγωγή οξικού οξέος (5.45 g/L), γαλακτικού οξέος (2.11 g/L) και βιομάζας (3.40 g/L).

Στο Γράφημα 3.5.1.1. παρουσιάζεται η κινητική αύξησης του βακτηρίου *C. butyricum* E5 σε ημι-συνεχή καλλιέργεια στο βιοαντιδραστήρα, υπό αναερόβιες συνθήκες, με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 30 g/L.



Γράφημα 3.5.1. 1. Κινητική αύξησης της βιομάζας (X), παραγωγής του βουτυρικού οξέος (But), του οξικού οξέος (Act) και του γαλακτικού οξέος (Lac) κατά την ημι-συνεχή καλλιέργεια του βακτηρίου *C. butyricum* E5 σε βιοαντιδραστήρα

Συνθήκες καλλιέργειας: ημι-συνεχής καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα 3-L, με ενεργό όγκο 1.5 L, υπό αναερόβιες συνθήκες, θερμοκρασία καλλιέργειας  $T=35^{\circ}\text{C}$ , ρυθμό ανάδευσης 180 rpm, ροή αζώτου 0.5 LPM, και τέλος διατήρηση της τιμής του pH ίση με 6.8. Υπόστρωμα εμπλουτισμένο με γλυκόζη σε αρχική συγκέντρωση 30 g/L

Στον Πίνακα 3.5.1.1. φαίνεται πως όσο προχωρούσε η ζύμωση καταναλωνόταν γλυκόζη και παράγονταν βουτυρικό οξύ και τα λοιπά μεταβολικά προϊόντα. Προκειμένου

να ολοκληρωθεί η ζύμωση και να μην λήξει λόγω εξάντλησης του θρεπτικού υποστρώματος, έγινε προσθήκη πυκνού διαλύματος γλυκόζης.

Παρατηρώντας τη ζύμωση, μπορούμε να ξεχωρίσουμε το πρώτο τμήμα της, το οποίο είναι από τις 0 h μέχρι τις 29 h. Στο χρονικό αυτό διάστημα έγινε μόνο μία προσθήκη πυκνού διαλύματος γλυκόζης. Η καταναλωθείσα γλυκόζη ήταν 27.33 g/L και μέχρι το σημείο αυτό είχαν παραχθεί 5.35 g/L βουτυρικού οξέος, πράγμα που σημαίνει πως ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής βουτυρικού οξέος είναι  $Y_{But}=0.20$  g/L. Επίσης είχαν παραχθεί 4.40 g/L οξικού οξέος, 0.39 g/L γαλακτικού οξέος και 3.01 g/L βιομάζας.

Αν και ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής βουτυρικού οξέος στο πρώτο τμήμα της ζύμωσης είναι ικανοποιητικός, είχε καταναλωθεί δηλαδή γλυκόζη και είχε παραχθεί ικανοποιητική ποσότητα βουτυρικού οξέος, η ζύμωση συνεχίστηκε προκειμένου να ολοκληρωθεί.

Στη συνέχεια λοιπόν, από τις 29 h μέχρι τις 54 h, όπου και ολοκληρώθηκε η ζύμωση, έγιναν δύο ακόμα προσθήκες πυκνού διαλύματος γλυκόζης. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, στο σύνολο η γλυκόζη που καταναλώθηκε ήταν 47.70 g/L και πλέον στο τέλος της ζύμωσης είχαν παραχθεί 9.04 g/L βουτυρικού οξέος, 5.45 g/L οξικού οξέος, 2.11 g/L γαλακτικού οξέος και 3.40 g/L βιομάζας, ενώ ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής βουτυρικού οξέος είναι  $Y_{But}=0.19$  g/g.

Αυτό που πρέπει να σημειωθεί, είναι ότι στη ζύμωση που πραγματοποιήθηκε στο βιοαντιδραστήρα οι συνθήκες ήταν ελεγχόμενες. Είναι λοιπόν αναμενόμενο να βελτιστοποιείται η παραγωγή του βουτυρικού οξέος, και για το λόγο αυτό να παράγεται μεγάλη ποσότητα σε σύγκριση με τη ζύμωση στις στατικές φιάλες αναερόβιωσης.



#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στη σύγχρονη εποχή η διαχείριση και η επεξεργασία των βιομηχανικών παραπροϊόντων και αποβλήτων αποτελεί ένα σημαντικό και δισεπίλυτο πρόβλημα, καθώς ο όγκος τους, ειδικά τα τελευταία χρόνια αυξάνει ραγδαία, με άμεσες δυσμενείς επιπτώσεις στο περιβάλλον και την ανθρώπινη υγεία. Αποτελεί γεγονός πως περίπου το 15% w/w όλων των εδώδιμων προϊόντων της βιομηχανίας τροφίμων καταλήγει τελικά στην κατηγορία των αποβλήτων (Ragauskas *et al.*, 2006).

Εκτός όμως από τις αρνητικές επιπτώσεις τους στο περιβάλλον, τα βιομηχανικά παραπροϊόντα και απόβλητα, δύναται να αποτελούν πηγή πολύτιμων θρεπτικών συστατικών, έχοντας μάλιστα μεγάλες προοπτικές αξιοποίησης (Schieber *et al.*, 2001; Djilas *et al.*, 2009; Parfitt *et al.*, 2010). Οι προοπτικές αυτές αποσκοπούν στην ανάκτηση, την ανακύκλωση και τη βιωσιμότητα των συστατικών των αποβλήτων και των παραπροϊόντων, μέσω της βιομετατροπής τους σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας. Η βιοτεχνολογία προσφέρει πολλούς εναλλακτικούς τρόπους αξιοποίησης των παραπροϊόντων, οι οποίοι είναι γενικώς, ιδιαίτερα φιλικό στο περιβάλλον, εμφανίζοντας μάλιστα μεγάλη εκλεκτική εξειδίκευση. Έχουν αναπτυχθεί πολλές βιοτεχνολογικές διεργασίες, με σπουδαιότερες τις μικροβιακές ζυμώσεις, για την αξιοποίηση των παραπροϊόντων, αφού αυτά δύναται να αντικαταστήσουν τα καθαρά σάκχαρα ως πρώτη ύλη στις μικροβιακές ζυμώσεις, συμβάλλοντας έτσι στη μείωση του κόστους των βιοδιεργασιών. Γίνεται κατανοητό συνεπώς, ότι η χρήση των γεωργο-βιομηχανικών παραπροϊόντων και αποβλήτων ως υποστρώματα για την παραγωγή μικροβιακών προϊόντων προστιθέμενης αξίας παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον, καθώς τα προϊόντα αυτά παράγονται σε πολύ μεγάλες ποσότητες, ενώ η διαχείρισή τους αποτελεί δισεπίλυτο πρόβλημα για τη βιομηχανία (Peters, 2007). Πρέπει να σημειωθεί πως η απαγωγή αποβλήτων της βιομηχανίας τροφίμων (πχ. απόβλητα αρτοποιίας κλπ.) που έχουν υψηλή συγκέντρωση σακχάρων, επιβαρύνουν οικονομικά τη βιομηχανία (0.1-0.7 €/kg αποβλήτων), με αποτέλεσμα να είναι απαραίτητη η εύρεση μέτρων για την μετέπειτα επεξεργασία τους (Willke and Vorlop, 2004).

Η ακετοΐνη είναι μια χημική ουσία υψηλής προστιθέμενης αξίας, η οποία είναι ιδιαίτερος χρήσιμη στη βιομηχανία τροφίμων, τη βιομηχανία καλλυντικών και την καπνοβιομηχανία. (Xiao and Lu, 2014; Belitz *et al.*, 2004).

Η 2,3-βουτανοδιόλη αποτελεί επίσης χημική ουσία προστιθέμενης αξίας, που παράγεται ετησίως σε μεγάλες ποσότητες και μπορεί να χρησιμοποιηθεί αυτούσια, είτε μέσω των παραγώγων της, από τις βιομηχανίες καυσίμων, πλαστικών και τροφίμων. Η 2,3-βουτανοδιόλη συμμετέχει σε πληθώρα εφαρμογών της χημικής βιομηχανίας και της βιομηχανίας τροφίμων (Saksinchai *et al.*, 2001; Garg and Jain, 1995).

Το βουτυρικό οξύ είναι η πλέον χρησιμοποιούμενη χημική ουσία στη βιομηχανία τροφίμων. Χρησιμοποιείται για την παραγωγή ποικιλίας προϊόντων, καθώς επίσης και στη χημική βιομηχανία, τη φαρμακοβιομηχανία και τη βιομηχανία πλαστικών. Αποτελεί υψηλής προστιθέμενης αξίας χημική ουσία, με ιδιαίτερα ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά (Belitz *et al.*, 2004).

Το ενδιαφέρον λοιπόν για τις βιοτεχνολογικές διεργασίες εστιάζεται στη χρήση υποστρωμάτων χαμηλής αξίας, για να μειωθεί έτσι το κόστος παραγωγής, καθώς επίσης και στην εξερεύνηση νέων μη-παθογόνων στελεχών. Κατά συνέπεια, η διαθεσιμότητα μιας φθηνής πηγής άνθρακα είναι ουσιαστική για την ανάπτυξη μιας οικονομικά συμφέρουσας μικροβιακής ζύμωσης. Ιδανική λύση για τη βιομετατροπή αυτή αποτελούν τα παραπροϊόντα και τα απόβλητα που είναι πλούσια σε σάκχαρα. Χαρακτηριστικά για την παραγωγή ακετοΐνης το κυριότερο υπόστρωμα που έχει χρησιμοποιηθεί είναι η γλυκόζη, αλλά έχουν γίνει και ορισμένες εφαρμογές με σουκρόζη (Xiao and Lu, 2014). Για την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης, το κυριότερο υπόστρωμα που έχει χρησιμοποιηθεί είναι η γλυκόζη, ενώ έχουν μελετηθεί και διάφορα άλλα υποστρώματα, παραπροϊόντα και απόβλητα από τις βιομηχανίες τροφίμων που είναι πλούσια σε σάκχαρα (Ji *et al.*, 2011). Για την παραγωγή βουτυρικού οξέος, έχει μελετηθεί η γλυκόζη αλλά και η γλυκερόλη εξίσου ως υπόστρωμα, ενώ έχουν δοκιμαστεί και ορισμένα ακόμα (Yang *et al.*, 2009, 2000; Petitdemange *et al.*, 1995).

Στην παρούσα μελέτη 6 βακτηριακά στελέχη της οικογένειας *Bacillaceae* (το στέλεχος *B. thuringiensis* LQC 1405, το στέλεχος *B. thuringiensis* LQC 1407, το στέλεχος *B. thuringiensis* LQC 1522, το στέλεχος *B. thuringiensis* LQC 1523, το στέλεχος *B.*

*thuringiensis* LQC 1549 και το στέλεχος *B. thuringiensis* LQC 1553) ερευνήθηκαν για την ικανότητά τους να μεταβολίζουν την εμπορική σουκρόζη και την εμπορική γλυκόζη, προς παραγωγή ακετοΐνης και 2,3-βουτανοδιόλης. Στην περίπτωση και των δύο υποστρωμάτων, το στέλεχος LQC 1522, φαίνεται να εμφανίζει τις μεγαλύτερες αποδόσεις σε παραγωγή ακετοΐνης και 2,3-βουτανοδιόλης, και για το λόγο αυτό είναι και το στέλεχος που επιλέχθηκε για τη συνέχεια της πειραματικής διαδικασίας. Όσον αφορά τα υποστρώματα, όλα τα στελέχη της οικογένειας *Bacillaceae* φαίνεται να τα καταναλώνουν, απλά παρατηρείται πως η γλυκόζη καταναλώνεται με μεγαλύτερη ταχύτητα, και μπορεί να θεωρηθεί περισσότερο αφομοιώσιμη. Έτσι η γλυκόζη επιλέγεται ως υπόστρωμα για τη συνέχεια της πειραματικής διαδικασίας. Όλα τα στελέχη της οικογένειας *Bacillaceae* που μελετήθηκαν, ανήκουν στη συλλογή του εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Συγκεκριμένα, τα στελέχη LQC 1405 και LQC 1407 απομονώθηκαν από γλυκάνισο, ενώ τα LQC 1522 και LQC 1523 από πελαργόνιο (αρμπαρόριζα). Ο γλυκάνισος και το πελαργόνιο είναι η πρώτες ύλες για την παρασκευή του εφτάζυμου ψωμιού. Τα στελέχη LQC 1549 και LQC 1553 απομονώθηκαν από το ζυμάρι που φτιάχτηκε. Ο μικροοργανισμός *B. thuringiensis* LQC 1522 παρουσίασε ικανοποιητική αύξηση και παραγωγή μεταβολικών προϊόντων και βιομάζας, και οι μέγιστες τιμές δίνονται στον Πίνακα 4.1.

Είδος καλλιέργειας	t (h)	S <sub>0</sub> (g/L)	S <sub>f</sub> (g/L)	S <sub>c</sub> (g/L)	Ace (g/L)	Y <sub>Ace</sub> (g/g)	2,3-BDO (g/L)	Y <sub>2,3-BDO</sub> (g/g)	Y <sub>t</sub> (g/g)	Act (g/L)	Lac (g/L)	X <sub>max</sub> (g/L)
<b>Εμπορική σουκρόζη</b>												
Ασυνεχής	48	20.22	10.80	9.42	2.03	0.22	1.96	0.21	0.43	4.03	2.25	2.73
<b>Εμπορική γλυκόζη</b>												
Ασυνεχής	48	22.38	0.00	22.38	6.56	0.29	3.44	0.15	0.45	2.62	0.00	3.70

Πίνακας 4. 1. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της παρούσας μελέτης για το μικροοργανισμό *B. thuringiensis* LQC 1522 σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες

$t$ : η χρονική στιγμή της ζύμωσης (h),  $S_0$ : η αρχική συγκέντρωση του υποστρώματος (g/L),  $S_f$ : η τελική συγκέντρωση του υποστρώματος (g/L),  $S_c$ : το καταναλωθέν υπόστρωμα (g/L)  $A_{ce}$ : η συγκέντρωση της ακετοΐνης (g/L),  $Y_{A_{ce}}$ : ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής ακετοΐνης προς καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g) **2,3-BDO**: η συγκέντρωση της 2,3-βουτανودیολης (g/L),  $Y_{2,3-BDO}$ : ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής ακετοΐνης προς καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g),  $Y_t$ : ο συνολικός συντελεστής απόδοσης προς καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g),  $A_{ct}$ : η συγκέντρωση του οξικού οξέος (g/L), **Lac**: η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος (g/L),  $X_{max}$ : η μέγιστη παραγόμενη βιομάζα (g/L)

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως στον Πίνακα 4.1. φαίνεται καθαρά πως στις 48 h της ζύμωσης έχει καταναλωθεί όλη η ποσότητα της γλυκόζης, ενώ η σουκρόζη δεν έχει προλάβει να καταναλωθεί ολόκληρη. Αυτός είναι και ο λόγος που η γλυκόζη μπορεί να θεωρηθεί ευκολότερα αφομοιώσιμη από τον συγκεκριμένο μικροοργανισμό. Έτσι, ακόμα και αν ο συνολικός συντελεστής απόδοσης και στις δύο περιπτώσεις υποστρωμάτων είναι ικανοποιητικός, η γλυκόζη είναι εκείνη που χρησιμοποιείται στη συνέχεια της πειραματικής διαδικασίας.

Σε επόμενο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας λοιπόν, μελετήθηκε η αύξηση του μικροοργανισμού *B. thuringiensis* LQC 1522 σε βιοαντιδραστήρα, υπό όσο το δυνατόν πιο ελεγχόμενες συνθήκες. Η πηγή άνθρακα που χρησιμοποιήθηκε ήταν η γλυκόζη, και δοκιμάστηκαν συνθήκες υψηλού αερισμού και συνθήκες χαμηλού αερισμού για να διαπιστωθεί με ποιον τρόπο συμπεριφέρεται ο μικροοργανισμός.

Ο Πίνακας 4.2. παρουσιάζει την ασυνεχή καλλιέργεια υπό συνθήκες υψηλού αερισμού και την ημι-συνεχή καλλιέργεια υπό συνθήκες χαμηλού αερισμού. Και στις δύο περιπτώσεις η αρχική συγκέντρωση γλυκόζης ήταν 30g/L. Το pH διατηρείται ελαφρώς όξινο, καθώς σύμφωνα με τους Biebl *et al.* (1998) οι ελαφρώς όξινες συνθήκες βοηθούν την παραγωγή ακετοΐνης και 2,3-βουτανودیολης, λόγω της έκκρισης του ενζύμου συνθετάση του α-ακετογαλακτικού. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως σε συνθήκες υψηλού αερισμού το στέλεχος LQC 1522 φαίνεται πως καταναλώνει τη γλυκόζη (23.95 g/L) και παράγει ακετοΐνη (2.42 g/L) και 2,3-βουτανودیολη (2.48 g/L), αλλά κυρίως στρέφει το μεταβολισμό του προς την παραγωγή βιομάζας (5.30 g/L) και γαλακτικού οξέος (6.10 g/L).

Σε συνθήκες χαμηλού αερισμού, το στέλεχος LQC 1522 καταναλώνει τη γλυκόζη (42.47 g/L) και παράγει ακετοΐνη (1.13 g/L) και 2,3-βουτανοδιόλη (7.89 g/L), όπως επίσης και μεγάλη ποσότητα γαλακτικού οξέος (16.10 g/L). Οι μέγιστες τιμές παραγωγής μεταβολικών προϊόντων και βιομάζας από το μικροοργανισμό, δίνονται στον Πίνακα 4.2.

Συνθήκες ζύμωσης	Είδος καλλιέργειας	t (h)	S <sub>c</sub> (g/L)	Ace (g/L)	Y <sub>Ace</sub> (g/g)	2,3-BDO (g/L)	Y <sub>2,3-BDO</sub> (g/g)	Y <sub>t</sub> (g/g)	Act (g/L)	Lac (g/L)	X <sub>max</sub> (g/L)
<b>Εμπορική γλυκόζη</b>											
Υψηλός αερισμός	Ασυνεχής	24	23.95	2.42	0.10	2.48	0.10	0.20	3.67	6.10	5.30
Χαμηλός αερισμός	Ημι-συνεχής	45	42.47	1.13	0.03	7.89	0.19	0.22	1.10	16.10	2.60

Πίνακας 4. 2. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της παρούσας μελέτης για το μικροοργανισμό *B. thuringiensis* LQC 1522 σε βιοαντιδραστήρα

t: η χρονική στιγμή της ζύμωσης (h), S<sub>c</sub>: το καταναλωθέν υπόστρωμα (g/L) Ace: η συγκέντρωση της ακετοΐνης (g/L), Y<sub>Ace</sub>: ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής ακετοΐνης προς καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g) 2,3-BDO: η συγκέντρωση της 2,3-βουτανοδιόλης (g/L), Y<sub>2,3-BDO</sub>: ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής ακετοΐνης προς καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g), Y<sub>t</sub>: ο συνολικός συντελεστής απόδοσης προς καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g), Act: η συγκέντρωση του οξικού οξέος (g/L), Lac: η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος (g/L), X<sub>max</sub>: η μέγιστη παραγόμενη βιομάζα (g/L)

Πρέπει να διευκρινιστεί πως η ζύμωση υπό υψηλό αερισμό ολοκληρώθηκε στις 24 h. Αντιθέτως η ζύμωση υπό χαμηλό αερισμό συνεχιζόταν ακόμη και μετά τις 24 h, και για το λόγο αυτό έγινε προσθήκη πυκνού διαλύματος γλυκόζης, προκειμένου να ολοκληρωθεί και να μην λήξει λόγω εξάντλησης του υποστρώματος.

Στον Πίνακα 4.2. φαίνεται πως στην περίπτωση της χαμηλού αερισμού ζύμωσης, ο συνολικός συντελεστής απόδοσης είναι 0.19 g/L, ο διπλάσιος περίπου από εκείνον της υψηλού αερισμού ζύμωσης. Αυτός είναι και ο λόγος που οι συνθήκες χαμηλού αερισμού

θεωρούνται καταλληλότερες για βιοτεχνολογική παραγωγή ακετοΐνης και 2,3-βουτανοδιόλης.

Σε δεύτερη φάση μελετήθηκε το στέλεχος *C. butyricum* E5 της οικογένειας *Clostridiaceae*, ως προς την ικανότητά του να μεταβολίζει τη γλυκόζη υπό αναερόβιες συνθήκες και να παράγει βουτυρικό οξύ. Στην αρχή το στέλεχος E5, φαίνεται να εμφανίζει σχετικά μικρή απόδοση σε παραγωγή βουτυρικού οξέος, πράγμα που μπορεί να οφείλεται στο ότι κατά τη ζύμωση στις στατικές φιάλες αναεροβίωσης προέκυψε σχηματισμός κολλοειδούς συσσωματώματος, γεγονός που πιθανότατα απέτρεψε το σωστό υπολογισμό του βουτυρικού οξέος. Για το λόγο αυτό ακολούθησε μελέτη σε βιοαντιδραστήρα, με την κατάλληλη ρύθμιση των συνθηκών ανάπτυξης, προκειμένου να γίνει βελτιστοποίηση της παραγωγής.

Το βακτηριακό στέλεχος E5, ανήκει στη συλλογή του εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας, της Σχολής Θετικών Επιστημών στην περιοχή Nancy της Γαλλίας και απομονώθηκε από υπολείμματα στάσιμων υδάτων σε γέφυρες της Γαλλίας (Petitdemange *et al.*, 1995). Οι μέγιστες τιμές παραγωγής μεταβολικών προϊόντων και βιομάζας δίνονται στον ακόλουθο Πίνακα 4.3..

Πηγή άνθρακα	Είδος καλλιέργειας	t (h)	S <sub>c</sub> (g/L)	But (g/L)	Y <sub>But</sub> (g/g)	Act (g/L)	Lac (g/L)	X <sub>max</sub> (g/L)
<b>Φιάλες αναεροβίωσης</b>								
Γλυκόζη	Ασυνεχής	31	7.06	0.39	0.06	1.87	0.97	1.60
<b>Βιοαντιδραστήρας</b>								
Γλυκόζη	Ημι-συνεχής	54	47.70	9.04	0.19	5.45	2.11	3.40

Πίνακας 4. 3. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της παρούσας μελέτης για το μικροοργανισμό *C. butyricum* E5

t: η χρονική στιγμή της ζύμωσης (h), S<sub>c</sub>: το καταναλωθέν υπόστρωμα (g/L) **But**: η συγκέντρωση του βουτυρικού οξέος (g/L), **Y<sub>But</sub>**: ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής βουτυρικού οξέος προς καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g), **Act**: η συγκέντρωση του οξικού

οξέος (g/L), **Lac**: η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος (g/L), **X<sub>max</sub>**: η μέγιστη παραγόμενη βιομάζα (g/L)

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, έγινε μελέτη στο βιοαντιδραστήρα προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η παραγωγή και να μπορέσει να γίνει σωστός υπολογισμός του βουτυρικού οξέος. Το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν και πάλι η γλυκόζη, ενώ οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν ήταν αναερόβιες, μιας και ο ίδιος ο μικροοργανισμός είναι αποκλειστικά αναερόβιος (Malaoui and Marczak, 2001; Petitdemange *et al.*, 1995).

Στον Πίνακα 4.3. παρουσιάζεται και η ημι-συνεχής καλλιέργεια υπό αναερόβιες συνθήκες. Η αρχική συγκέντρωση γλυκόζης ήταν 30 g/L. Το pH διατηρείται ελαφρώς όξινο, καθώς σύμφωνα με τους Petitdemange *et al.* (1995), καταλληλότερες συνθήκες για παραγωγή βουτυρικού οξέος είναι οι ελαφρώς όξινες. Τα αποτελέσματα λοιπόν έδειξαν πως κατά τη ζύμωση του στελέχους *C. butyricum* E5 στο βιοαντιδραστήρα σε αναερόβιες συνθήκες, καταναλώνεται η γλυκόζη (47.70 g/L) και παράγεται βουτυρικό οξύ (9.04 g/L). Πρέπει να σημειωθεί πως κατά τη ζύμωση στο βιοαντιδραστήρα έγινε τρεις φορές προσθήκη πυκνού διαλύματος γλυκόζης, προκειμένου να επιτραπεί στη ζύμωση να ολοκληρωθεί και να μην λήξει λόγω εξάντλησης του θρεπτικού υποστρώματος. Η διάρκεια λοιπόν της ημι-συνεχούς ζύμωσης στο βιοαντιδραστήρα ήταν 54 h.

Στον Πίνακα 4.3. φαίνεται πως κατά την ημι-συνεχή ζύμωση, ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής βουτυρικού οξέος είναι 0.19 g/L, που είναι ικανοποιητικός για βιοτεχνολογική παραγωγή βουτυρικού οξέος.

Διευκρινίζεται πως με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία, αρκετοί μικροοργανισμοί μπορούν να συνθέσουν ακετοΐνη και 2,3-βουτανοδιόλη, αλλά λίγοι μπορούν να παράγουν ικανοποιητικές ποσότητες. Σε αυτούς ανήκουν τα γένη *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Bacillus* και *Serratia*. Τα στελέχη με τις ικανοποιητικότερες αποδόσεις ακετοΐνης ανήκουν στα είδη *Serratia marcescens* και *B. pumilus* (Xiao *et al.*, 2010b; 2012). Αντίστοιχα τα στελέχη με τις μεγαλύτερες αποδόσεις 2,3-βουτανοδιόλης ανήκουν στα είδη *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Paenibacillus polymyxa*, ενώ τα είδη *E. aerogenes* και *Serratia marcescens*

θεωρούνται αρκετά υποσχόμενοι μικροοργανισμοί (Blomqvist *et al.*, 1993, Nakashimada *et al.*, 2000; Perego *et al.*, 2000; Saha and Bothast, 1999). Στους Πίνακες 4.3. και 4.4. παρουσιάζονται τα κυριότερα βακτηριακά στελέχη που έχουν μελετηθεί για παραγωγή ακετοΐνης και 2,3-βουτανοδιόλης.

Μικροοργανισμός	Πηγή άνθρακα	Ace (g/L)	Είδος καλλιέργειας	Αναφορά
<i>S. marcescens</i> H32-nox	Σουκρόζη	75.2	Ημι-συνεχής	Sun <i>et al.</i> (2012c)
<i>B. pumilus</i> XH195	Γλυκόζη	63.0	Ασυνεχής	Xu <i>et al.</i> (2012)
<i>S. marcescens</i> H32	Σουκρόζη	60.5	Ημι-συνεχής	Sun <i>et al.</i> (2012b)
<i>B. subtilis</i> TH-49	Γλυκόζη	56.9	Ασυνεχής	Xu <i>et al.</i> (2011b)
<i>P. polymyxa</i> CS107	Γλυκόζη	55.3	Ημι-συνεχής	Zhang <i>et al.</i> (2012)
<i>B. subtilis</i> JNA-UD-6	Γλυκόζη	53.9	Ημι-συνεχής	Y.F. Zhang <i>et al.</i> (2013)
<i>B. amyloliquefaciens</i> FMME044	Γλυκόζη	51.2	Ασυνεχής	Zhang <i>et al.</i> (2013b)
<i>B. subtilis</i> JNA 3-10	Γλυκόζη	48.2	Ασυνεχής	Zhang <i>et al.</i> (2011)
<i>B. liqueniformis</i> MEL09	Γλυκόζη	41.3	Ασυνεχής	Liu <i>et al.</i> (2011a)
<i>B. subtilis</i> CICC 10025	Μελάσα	37.9	Ασυνεχής	Xiao <i>et al.</i> (2007)

Πίνακας 4. 4. Παραγωγή ακετοΐνης από βακτηριακά στελέχη σε ποικίλες συνθήκες αύξησης με διαφορετικές πηγές άνθρακα.

**Ace:** η συγκέντρωση της ακετοΐνης (g/L)



Μικροοργανισμός	Πηγή άνθρακα	2,3-BDO (g/L)	Είδος καλλιέργειας	Αναφορά
<i>K. pneumoniae</i> SDM	Γλυκόζη	150.0	Ημι-συνεχής	Ma <i>et al.</i> (2009)
<i>S. marcescens</i> H30	Σουκρόζη	139.9	Ημι-συνεχής	Zhang <i>et al.</i> (2010)
<i>K. oxytoca</i> ME-XJ-8	Γλυκόζη	130.0	Ημι-συνεχής	Ji <i>et al.</i> (2010)
<i>E. aerogenes</i> DSM 30053	Μελάσα	110.0	Ημι-συνεχής	Zeng <i>et al.</i> (1991)
<i>K. oxytoca</i> ME-UD-3	Γλυκόζη	95.5	Ασυνεχής	Ji <i>et al.</i> (2009)
<i>K. pneumoniae</i> CICC 10011	Γλυκόζη	92.4	Ημι-συνεχής	Qin <i>et al.</i> (2006)
<i>K. oxytoca</i> ME-XJ-8	Γλυκόζη	90.7	Ασυνεχής	Ji <i>et al.</i> (2010)
<i>K. pneumoniae</i> G31	Καθαρή γλυκερόλη	70.0	Ημι-συνεχής	Petrov & Petrova (2010)
<i>K. oxytoca</i> ME-303	Γλυκόζη	39.0	Ασυνεχής	Ji <i>et al.</i> (2008)
<i>E. aerogenes</i> NCIMB-10102	Γλυκόζη	33.0	Ασυνεχής	Alam <i>et al.</i> (1990) / Ji <i>et al.</i> (2011)
<i>E. aerogenes</i> KCTC 2190	Γλυκόζη	15.9	Ασυνεχής	Jung <i>et al.</i> (2013)

Πίνακας 4. 5. Παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης από βακτηριακά στελέχη σε ποικίλες συνθήκες αύξησης με διαφορετικές πηγές άνθρακα

**2,3-BDO:** η συγκέντρωση της 2,3-βουτανοδιόλης (g/L)

Επίσης με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία, έχουν μελετηθεί μικροοργανισμοί που μπορούν να συνθέσουν βουτυρικό οξύ σε ικανοποιητικές ποσότητες. Σχεδόν όλοι οι μικροοργανισμοί που μπορούν να συνθέσουν βουτυρικό οξύ ανήκουν στο γένος *Clostridium*. Τα στελέχη με τις ικανοποιητικότερες αποδόσεις βουτυρικού οξέος ανήκουν

στο είδος *C. tyrobutyricum* (Zhang *et al.*, 2009). Στον Πίνακα 4.6. παρουσιάζονται τα κυριότερα βακτηριακά στελέχη που έχουν μελετηθεί για παραγωγή βουτυρικού οξέος.

Μικροοργανισμός	Πηγή άνθρακα	But (g/L)	Είδος καλλιέργειας	Αναφορά
<i>C. tyrobutyricum</i> CIP 1-776	Γλυκόζη	62.8	Ημι-συνεχής	Zhang <i>et al.</i> (2009)
<i>C. tyrobutyricum</i> ATCC 25755	Γλυκόζη	50.11	Συνεχής	Zhang <i>et al.</i> (2009)
<i>C. tyrobutyricum</i> CIP 1-776	Γλυκόζη	45	Ασυνεχής	Zhang <i>et al.</i> (2009)
<i>C. butyricum</i> S21	Σουκρόζη	20	Ημι-συνεχής	Zhang <i>et al.</i> (2009)
<i>C. thermobutyricum</i> JW 171K	Γλυκόζη	19.38	Συνεχής	Zhang <i>et al.</i> (2009)
<i>C. butyricum</i> ZJUCB	Γλυκόζη	16.74	Ημι-συνεχής	Zhang <i>et al.</i> (2009)
<i>C. butyricum</i> E5	Γλυκερόλη	15.9	Ημι-συνεχής	Petitdemange <i>et al.</i> (1995)
<i>C. butyricum</i> E4	Γλυκερόλη	14	Ημι-συνεχής	Petitdemange <i>et al.</i> (1995)
<i>C. butyricum</i> JM1	Γλυκόζη	13.76	Ασυνεχής	Zhang <i>et al.</i> (2009)
<i>C. butyricum</i> C11	Γλυκερόλη	7.2	Ασυνεχής	Petitdemange <i>et al.</i> (1995)
<i>C. butyricum</i> F7	Γλυκερόλη	5.8	Ασυνεχής	Petitdemange <i>et al.</i> (1995)
<i>C. butyricum</i> E5	Γλυκερόλη	5.5	Ασυνεχής	Petitdemange <i>et al.</i> (1995)

Πίνακας 4. 6. Παραγωγή βουτυρικού οξέος από βακτηριακά στελέχη σε ποικίλες συνθήκες αύξησης με διαφορετικές πηγές άνθρακα

**But:** η συγκέντρωση του βουτυρικού οξέος (g/L)

Με βάση τα στοιχεία των Πινάκων 4.4. και 4.5., που πηγάζουν από τη διεθνή βιβλιογραφία, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις ακετοΐνης κυμαίνονται από 60-75 g/L με πηγή άνθρακα τη σουκρόζη. Επίσης αρκετά υψηλή είναι η παραγωγή της σε υπόστρωμα γλυκόζης από το στέλεχος *B. pumilus* XH195. Χαμηλότερες συγκεντρώσεις παρατηρήθηκαν σε υπόστρωμα μελάσας.

Αντίστοιχα οι υψηλότερες συγκεντρώσεις 2,3-βουτανοδιόλης κυμαίνονται από 90-150 g/L με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη. Αρκετά υψηλή είναι όμως και η παραγωγή της σε υπόστρωμα σουκρόζης από το στέλεχος *S. marcescens* H30, καθώς επίσης και σε υπόστρωμα μελάσας από το στέλεχος *E. aerogenes* DSM 30053.

Όλα τα στελέχη που αναφέρθηκαν προηγουμένως είναι είτε παθογόνα (όπως στελέχη του είδους *Klebsiella pneumoniae*) είτε γενετικώς τροποποιημένα (όπως τα στελέχη *Serratia marcescens* H30, *Bacillus pumilus* XH195, *Serratia marcescens* H32, *Bacillus subtilis* TH-49, *Paenibacillus polymyxa* CS107, *Klebsiella oxytoca* ME-XJ-8 και ME-UD-3, *Klebsiella pneumoniae* SDM, *Klebsiella oxytoca* ME-303, *E. aerogenes* DSM 30053), ειδικά προσαρμοσμένα στις διαδικασίες της ζύμωσης. Σε βιομηχανική κλίμακα, το κίνητρο για τη βελτίωση των στελεχών είναι κυρίως οικονομικό, μιας και τα στελέχη αγρίου τύπου έχουν συνήθως χαμηλότερους ρυθμούς παραγωγής του ζητούμενου μεταβολικού προϊόντος, με αποτέλεσμα να είναι ασύμφορα οικονομικά. Τα παθογόνα στελέχη δεν είναι επιθυμητά από τις βιομηχανίες και όταν χρησιμοποιούνται πρέπει να λαμβάνονται τα κατάλληλα μέτρα προστασίας των εργαζομένων. Για το λόγο αυτό, είναι απαραίτητη η διερεύνηση μη παθογόνων μικροοργανισμών, οι οποίοι θα μπορούν να παράγουν στις μέγιστες δυνατές ποσότητες τα επιθυμητά μεταβολικά προϊόντα.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν προσφάτως απομονωμένα, αγρίου τύπου στελέχη και δυνητικά παθογόνα. Έτσι οι συγκεντρώσεις και αντίστοιχα οι συντελεστές απόδοσης για την ακετοΐνη και την 2,3-βουτανοδιόλη είναι χαμηλότεροι συγκριτικά με στελέχη που αναφέρονται στη βιβλιογραφία. Ωστόσο, η σχετικά καλή απόδοση που έδωσε η ημι-συνεχής καλλιέργεια υπό χαμηλό αερισμό, 0.22 g/g, δείχνει ότι περαιτέρω μελέτη για βελτιστοποίηση της διαδικασίας μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή υψηλότερης συγκέντρωσης τελικών προϊόντων.

Όσον αφορά την παραγωγή βουτυρικού οξέος, παρατηρώντας τα στοιχεία του Πίνακα 4.6., που προέρχονται από τη διεθνή βιβλιογραφία, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις βουτυρικού οξέος κυμαίνονται από 41-62 g/L, με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη.

Παρατηρώντας τον Πίνακα 4.6., φαίνεται πως τα στελέχη που έδωσαν τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις βουτυρικού οξέος, χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα γλυκόζη, είναι το αγρίου τύπου *C. tyrobutyricum* CIP 1-776, κατά την μελέτη σε ημι-συνεχή και ασυνεχή καλλιέργεια, αλλά και ένα γενετικά τροποποιημένο στέλεχος του είδους *C. tyrobutyricum* ATCC 25755 κατά τη μελέτη σε συνεχή καλλιέργεια.

Πέραν όμως των παραπάνω δύο αναφορών που παρουσιάζουν τις έως τώρα πιο αξιοσημείωτες παραχθείσες συγκεντρώσεις βουτυρικού οξέος, η χρήση άλλων στελεχών *Clostridium* σε υπόστρωμα με γλυκόζη, έχει επίσης οδηγήσει στην παραγωγή υψηλών συγκεντρώσεων τελικού προϊόντος. Πιο συγκεκριμένα, το στέλεχος *C. thermobutyricum* JW 171K κατά τη συνεχή καλλιέργειά του σε βιοαντιδραστήρα παράγαγε σχεδόν 20 g/L βουτυρικού οξέος, ενώ το στέλεχος *C. butyricum* ZJUCB παράγαγε 17 g/L κατά τη διάρκεια ημι-συνεχούς καλλιέργειας.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το προσφάτως απομονωμένο, δυνητικά παθογόνο και αγρίου τύπου στέλεχος *C. butyricum* E5. Η ζύμωσή του έγινε σε υπόστρωμα γλυκόζης, σε ημι-συνεχή καλλιέργεια στο βιοαντιδραστήρα. Έτσι, η συγκέντρωση και ο συντελεστής απόδοσης του βουτυρικού οξέος αντίστοιχα, είναι περίπου 9 g/L και 0.19 g/g. Τα αποτελέσματα αυτά μπορούν να συγκριθούν με εκείνα που έδωσαν καλλιέργειες στελεχών *C. butyricum* χρησιμοποιώντας όμως ως πηγή άνθρακα γλυκερόλη για την παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης. Σε αυτές τις ζυμώσεις το βουτυρικό οξύ αποτελεί παραπροϊόν της διεργασίας αν και παράγεται σε ικανοποιητικές ποσότητες. Στην παρούσα μελέτη, η ημι-συνεχής καλλιέργεια έδωσε σχετικά καλή απόδοση, 0.19 g/g, δείχνοντας ότι υπάρχουν δυνατότητες για βελτιστοποίηση της διαδικασίας με περαιτέρω μελέτη, έτσι ώστε να οδηγήσει σε παραγωγή μεγαλύτερης συγκέντρωσης τελικού προϊόντος.

Συμπερασματικά λοιπόν, πρέπει να σημειωθεί ότι στην παρούσα μελέτη επιτεύχθηκε η παραγωγή ακετοΐνης, 2,3-βουτανοδιόλης και βουτυρικού οξέος, αξιοποιώντας χαμηλού κόστους υποστρώματα (εμπορική σουκρόζη και εμπορική γλυκόζη). Οι συγκεντρώσεις που παράχθηκαν μπορούν να θεωρηθούν ικανοποιητικές με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία,

δεδομένου ότι πρόκειται για δυνητικά παθογόνα, προσφάτως απομονωμένα και άγριου τύπου στελέχη, τα οποία μελετήθηκαν σε ασυνεχείς και ημι-συνεχείς καλλιέργειες. Οι έρευνες για την παραγωγή ακετοΐνης, 2,3-βουτανοδιόλης και βουτυρικού οξέος επικεντρώνονται στην εξέταση και βελτιστοποίηση των διαφόρων παραμέτρων όπως είναι ο αερισμός, και η επίδραση του pH, με στόχο την αύξηση της παραγωγή τους και τη βελτίωση της απόδοσης και της παραγωγικότητας των βιοδιεργασιών.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Αγγελής Γ (2007) Μικροβιολογία και Μικροβιακή Τεχνολογία, 1<sup>η</sup> Έκδοση, Εκδόσεις Σταμούλης ΑΕ, Αθήνα.
2. Acumedia (2010) Brain-Heart Infusion Broth (7116). Rev 03.
3. Acumedia (2010) Lactobacilli MRS Broth (7406). Rev 05.
4. Acumedia (2010) Reinforced Clostridial Medium (7714). Rev 02.
5. Afschar AS, Vaz Rosell CE, Jonas R, Quesada Chanto A, Schaller K (1993) Microbial production and downstream processing of 2,3-butanediol. *Journal of Biotechnology*, 27:317-329.
6. Alam S, Capit F, Weigand WA, Hong J (1990) Kinetics of 2,3-butanediol fermentation by *Bacillus amyloliquefaciens*: effect of initial substrate concentration and aeration, *J Chem Technol Biotechnol*, 47:71-84.
7. Andreesen JR, Bahl H, Gottshark G (1989) Introduction to the physiology and biochemistry of the genus *Clostridium*. In: Minton NP, Clarke DJ (Eds.), *Clostridia*, Plenum Press, New York, pp. 27-62.
8. Arvanitoyannis IS, Kassaveti A, Ladas D (2008) Food Waste Treatment Methodologies. In: *Waste Management for the Food Industries*, Elsevier Academic Press, University of Thessaly, Greece, pp. 345-410.
9. Bampidis VA, Robinson PH (2006) Citrus by-products as ruminant feeds: A review. *Animal Fed Science and Technology*, 128: 175-217.
10. Baruah AK, Sharma RN, Borah GC (1993) Impact of sugar mill and distillery effluents on water quality of river Gelabil, Assam, *Indian Journal of Environmental Health*, 35: 288-293.
11. Belitz HD, Grosch W, Schieberle P (2004) *Food Chemistry*, Copyright Springer Verlag Berlin Heidelberg.
12. Benoit TG, Wilson GR, Baugh CL (1990) Fermentation during growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* HD-1. *Lett Appl Microbiol*, 10(1):15-18.
13. Biebl H, Zeng AP, Menzel K, Deckwer WD (1998) Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol and 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 50: 24-29.

14. Blomqvist K, Nikkola M, Lehtovaara P, Suihko ML, Airaksinen U, Straby KB (1993) Characterization of the genes of the 2,3-butanediol operons from *Klebsiella terrigena* and *Enterobacter aerogenes*. J Bacteriol, 175: 1392-1404.
15. Celinska E, Grajek W (2009) Biotechnological production of 2,3-butanediol – Current state and prospects. Biotechnology Advances, 27:715-725.
16. Chandra Ram, Bharagava Ram Naresh, Rai Vibhuti (2008) Melanoidins as major colourant in sugarcane molasses based distillery effluent and its degradation. Bioresource Technology, 99: 4648-4660.
17. Chatzifragkou A, Aggelis G, Komaitis M, Zeng AP, Papanikolaou S (2011) Impact of anaerobiosis strategy and bioreactor geometry on the biochemical response of *Clostridium butyricum* VPI 1718 during 1,3-propanediol fermentation. Bioresource Technology 102:10625-10632.
18. Chatzifragkou A, Papanikolaou S, Dietz D, Doulgeraki AI, Nychas GJE, Zeng AP (2011) Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* growing on biodiesel-derived crude glycerol through a non-sterilized fermentation process. Appl Microbiol Biotechnol, 91:101-112.
19. Chatzifragkou A and Papanikolaou S (2012) Effect of impurities in biodiesel-derived waste glycerol on the performance and feasibility of biotechnological processes. Applied Microbiology and Biotechnology, 95:13-27.
20. Chen CL, Qi W, Wang JY (2013) Microbial cocktail for bioconversion of green waste to reducing sugars. Journal of Bioscience and Bioengineering, Volume 115, Issue 1, pp. 82-85.
21. Cheng KK, Liu Q, Zhang JA, Li JP, Xu JM, Wang GH (2010) Improved 2,3-butanediol production from corncob acid hydrolysate by fed-batch fermentation using *Klebsiella oxytoca*. Process Biochemistry, 45: 613-616.
22. Combes D, Monsan P (1983) Sucrose Hydrolysis by invertase. Characterization of products and substrate inhibition. Elsevier Science Publishers B.V., 117:215-225.
23. Converti A, Perego P, Del Borghi M (2003) Effect of specific oxygen uptake rate on *Enterobacter aerogenes* energetics: carbon and reduction degree balances in batch cultivations. Biotechnol Bioen, 82: 370-377.
24. de Mas CD, Jansen NB, Tsao GT (1988) Production of optically active 2,3-butanediol by *Bacillus polymyxa*. Biotechnol Bioeng, 31:366-377.

25. Djilas S, Canadanovic-Brunet J, Cetkovic G (2009) By-products of fruits processing as a source of phytochemicals. *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly*, 15(4):191-202.
26. Frazer FR, McCaskey TA (1991) Effect of components of acid-hydrolysed hardwood on conversion of D-xylose to 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. *Enzyme Microb Technol*, 13:110-115.
27. Galanakis CM (2012) Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends in Food Science & Technology*, 26:68-87.
28. Garg SK, Jain A (1995) Fermentative production of 2,3-butanediol: a review. *Bioresource Technology*, 5:3-109.
29. Godbole J (2002) Ethanol from cane molasses, Fuel Ethanol Workshop, Honolulu, Hawaii.
30. Gottshalk G (1986) Bacterial metabolism, NewYork: Springer-Verlag.
31. Hespell RB (1996) Fermentation of xylan, corn fiber, or sugars to acetoin and butanediol by *Bacillus polymyxa* strains. *Curr Microbiol*, 32:291-296.
32. Jacobus PH, van Wyk (2001) Biotechnology and the utilization of biowaste as a resource for bioproduct development. *Trends in biotechnology*, Vol 19, No 5.
33. 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*. *Biotechnol Lett*, 30:731-4.
34. Ji XJ, Huang H, Du J, Zhu JG, Ren LJ, Hu N (2009a) Enhanced 2,3-butanediol production by *Klebsiella oxytoca* using a two-stage agitation speed control strategy. *Bioresour Technol*, 100:3410-4.
35. Ji XJ, Huang H, Du J, Zhu JG, Ren LJ, Li S (2009b) Development of an industrial medium for economical 2,3-butanediol production through co-fermentation of glucose and xylose by *Klebsiella oxytoca*. *Bioresour Technol*, 100:5214-5218.
36. 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. *Appl Biochem Biotechnol*, 159:605-13.
37. Ji XJ, Huang H, Zhu JG, Ren LJ, Nie ZK, Du J (2010) Engineering *Klebsiella oxytoca* for efficient 2,3-butanediol production through insertional inactivation of acetaldehyde dehydrogenase gene. *Appl Microbiol Biotechnol*, 85:1751-8.



38. Ji XJ, Nie ZK, Huang H, Ren LJ, Peng C, Ouyang PK (2011) Elimination of carbon catabolite repression in *Klebsiella oxytoca* for efficient 2,3-butanediol production from glucose-xylose mixtures. *Appl Microbiol Biotechnol*, 89:1119–25.
39. Ji XJ, Huang H, Ouyang PK (2011) Microbial 2,3-butanediol production: A state-of-the-art review. *Biotechnology Advances*, 29:351-364.
40. Johansen L, Larsen SH, Stormer FC (1973) Diacetyl (Acetoin) Reductase from *Aerobacter aerogenes* - Kinetic Studies of the Reduction of Diacetyl to Acetoin. *Eur J Biochem*, 34:97-99.
41. Johnson EA (2009) Clostridia. In: Schaechter M (Ed.) *Encyclopedia of Microbiology*, 3<sup>rd</sup> Edition, Academic Press, CA, USA, pp. 87-93.
42. Jones DT (2001) Applied acetone-butanol fermentation. In: Bahl H, Durre P (Eds.) *Clostridia: Biotechnology and Medical Applications*, Willey-VCH Verlag GmbH, pp. 125-168.
43. Jones DT, Woods DR (1986) Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiol Rev*, 50(4):484-524.
44. Jung MY, Park BS, Lee J, Oh MK (2013) Engineered *Enterobacter aerogenes* for efficient utilization of sugarcane molasses in 2,3-butadienol production. *Bioresource Technology*, 139:21-27.
45. Juni E, Heym GA (1955) A cyclic pathway for the bacterial dissimilation of 2,3-butanediol, acetylmethylcarbinol, and diacetyl cycle. I. General aspects of the 2,3-butanediol, 71:425-432.
46. Karadag D, Puhakka Jaakko A (2010) Direction of glucose fermentation towards hydrogen or ethanol production through on-line pH control. *International journal of hydrogen energy*, 35:10245-10251.
47. Kong Q, He CQ, Chen F, Ruan H (2006) Studies on a kinetic model for butyric acid bioproduction by *Clostridium butyricum*. *Lett Appl Microbiol*, 43(1):71-77.
48. Kovanda J, Weinzettel J (2013) The importance of raw material equivalents in economy-wide material flow accounting and its policy dimension. *Environmental science & policy* 29:71-80.
49. Ledenbach LH, Marshall RT (2009) Microbiological spoilage of dairy products. In: Sperber WH, Doyle MP (Eds.) *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and*

- Beverages, Food Microbiology and Food Safety, Springer Science+Business Media, New York, NY, pp. 41-67.
50. Lenz TG, Morerla AR (1980) Economic evaluation of the acetone-butanol fermentation. *Ind Eng Chem Prod Res Dev*, 19(4):478-483.
  51. Li XJ, Huang H, Ouyang PK (2011) Microbial 2,3-butanediol production: A state-of-the-art review. *Biotechnology Advances*, 29:351-364.
  52. Liu YF, Zhang SL, Yong YC, Ji ZX, Ma X, Xu ZH (2011a) Efficient production of acetoin by the newly isolated *Bacillus licheniformis* strain MEL09. *Process Biochem*, 46:390–394.
  53. Liu Z, Qin J, Gao C, Hua D, Maa C, Li L, Wanga Y, Xu P (2011) Production of (2S,3S)-2,3-butanediol and (3S)-acetoin from glucose using resting cells of *Klebsiella pneumonia* and *Bacillus subtilis*. *Bioresource Technology*, 102:10741–1107.
  54. Ma CQ, Wang AL, Qin JY, Li LX, Ai XL, Jiang TY (2009) Enhanced 2,3-butanediol production by *Klebsiella pneumoniae* SDM. *Appl Microbiol Biotechnol*, 82:49–57.
  55. Maddox IS (1996) Microbial production of 2,3-butanediol. In: Rehm HJ, Reed G, editors. *Biotechnology*, Vol 6. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH, pp. 269-291.
  56. Malaoui H, Marczak R (2001) Influence of glucose on glycerol metabolism by wild-type and mutant strains of *Clostridium butyricum* E5 grown in chemostat culture. *Appl Microbiol Biotechnol*, 55:226-233.
  57. 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.
  58. Malaoui H, Marczak R (2001) Separation and characterization of the 1,3-propanediol and glycerol dehydrogenase activities from *Clostridium butyricum* E5 wild-type and mutant D. *Journal of Applied Microbiology*, 90:1006-1014.
  59. Marlatt JA, Datta R (2008) Acetone-butanol fermentation process development and economic evaluation. *Biotechnol Progr*, 2(1):23-28.
  60. Matthews G (2008) Fermentation equipment selection: Laboratory scale bioreactor design considerations. In: McNeil B, Harvey ML (Eds.) *Practical Fermentation Technology*, Wiley and Sons, Ltd, West Sussex PO19 8SQ, England, pp. 3-36.
  61. Metsoviti M, Paramithiotis S, Drosinos EH, Galiotou-Panayotou M, Nychas GJE, Zeng AP, Papanikolaou S (2012) Screening of bacterial strains capable of converting biodiesel-

- derived raw glycerol into 1,3-propanediol, 2,3-butanediol and ethanol. *Eng Life Sci*, 12(1):57-68.
62. Midura TF, Arnon SS (1976) Infant botulism – Identification of *Clostridium botulinum* and its toxins in faeces. 308(7992):934-936.
  63. Miller GT, Spoolman SE (2007) *Living in the environment: Concepts, Connections, and Solutions*, 16<sup>th</sup> Edition, Brooks/Cole, USA, pp. 5-28, 100-122, 438-468.
  64. Mitchell WJ (2001) *General biology and physiology*. In: Bahl H, Durre P (Eds.) *Clostridia*, Willey-VCH Verlag GmbH, pp. 49-104.
  65. Nakashimada Y, Marwoto B, Kashiwamura T, Kakizono T, Nishio N (2000) Enhanced 2,3-butanediol production by addition of acetic acid in *Paenibacillus polymyxa*. *J Biosci Bioen*, 90:661-664.
  66. Nilegaonkar SS, Bhosale SB, Kshirsagar DC, Kapadi A (1992) Production of 2,3-butanediol from glucose by *Bacillus licheniformis*. *World J Microbiol Biotechnol*, 8:378-381.
  67. Papanikolaou S (2009) Microbial conversion of glycerol into 1,3-propanediol: Glycerol assimilation, biochemical events related with 1,3-propanediol biosynthesis and biochemical engineering of the process. In: Aggelis G (ED) *Microbial conversions of raw glycerol*, Nova Science Publishers Inc, New York, pp 137-168.
  68. 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*. *J Chem Technol Biotechnol*, 78:542-547.
  69. Papanikolaou S, Fick M, Aggelis G (2004) The effect of raw glycerol concentration on the production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. *J Chem Technol Biotechnol*, 79:1189-1196.
  70. Parfitt J, Barthel M, Macnaughton S (2010) Food waste within food supply chains: quantification and potential for change to 2050. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 465:3065-3081.
  71. Perego P, Converti A, Del Borghi A, Canepa P (2000) 2,3-Butanediol production by *Enterobacter aerogenes*: selection of the optimal conditions and application to food industries residues. *Bioprocess Engineering*, 23:613-620.
  72. Peters D (2007) *Raw Materials*. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, 105:1-30.

73. Petitdemange E, Durr 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*, 15:498-502.
74. Petrov K, Petrova P (2009) High production of 2,3-butanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* G31. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84: 659-665.
75. Petrov K, Petrova P (2010) Enhanced production of 2,3-butanediol from glycerol by forced pH fluctuations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87: 943-949.
76. Prasad KN (1980) Butyric acid: a small fatty acid with diverse biological functions. In: *Butyric acid in Mammalian Cells*, Pergamon Press, 27(15):1351-1358.
77. Qi G, Kang Y, Li L, Xiao A, Zhang S, Wen Z, Xu D, Chen S (2014) Deletion of meso-2,3-butanediol dehydrogenase gene budC for enhanced D-2,3-butanediol production in *Bacillus licheniformis*. *Biotechnology for biofuels*, 7(16):1-12.
78. 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. *Chin J Chem Eng*, 14:132-6.
79. Ragauskas AJ, Williams CK, Davison BH, Britovsek G, Cairney J, Eckert CA (2006) The path forward for biofuels and biomaterials. *Science*, 311:484-498.
80. Rowe GE (1990) Central metabolism of *Bacillus thuringiensis* during growth and sporulation. *Digitized Theses, Western University*, pp. 12-200.
81. Saha BC (2003) Hemicellulose bioconversion. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 30:279-291.
82. Saha BC, Bothast RJ (1999) Production of 2,3-butanediol by newly isolated *Enterobacter cloacae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 52: 321-326.
83. Saksinchai S, Suphantharika M, Verduyn C (2001) Application of a simple yeast extract from spent brewer's yeast for growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*: a physiological study. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17:307-316.
84. Schieber A, Stintzing FC, Carle R (2001) By-products of plant food processing as a source of functional compounds recent developments. *Trends in Food Science & Technology*, 12:401-413.
85. Sun J, Rao B, Zhang L, Shen Y, Wei D (2012a) Extraction of acetoin from fermentation broth using an acetone/phosphate aqueous two-phase system. *Chem Eng Commun*, 199:1492-503.

86. Sun J, Zhang L, Rao B, Han Y, Chu J, Zhu J (2012b) Enhanced acetoin production by *Serratia marcescens* H32 using statistical optimization and a two-stage agitation speed control strategy. *Biotechnol Bioprocess Eng*, 17:598–605.
87. Sun JA, Zhang LY, Rao B, Shen YL, Wei DZ (2012c) Enhanced acetoin production by *Serratia marcescens* H32 with expression of a water-forming NADH oxidase. *Bioresour Technol*, 119:94–98.
88. Syu MJ (2001) Biological production of 2,3-butanediol. *Appl Microbiol Biotechnol*, 55:10-18.
89. van Andel JG, Zoutberg GR, Crabbendam PM, Breure AM (1985) Glucose fermentation by *Clostridium butyricum* grown under a self-generated gas atmosphere in chemostat culture. *Appl Microbiol Biotechnol* 23:21-26.
90. Voloch M, Jansen NB, Ladisch MR, Tsao GT, Narayan R, Rodwell VW (1985) 2,3-butanediol. In: Moo-Young M, Cooney CL, Humphrey AE, editors. *Comprehensive biotechnology*, Oxford: Pergamon/Elsevier, pp. 933-947.
91. Wang AL, Wang Y, Jiang TY, Li LX, Ma CQ, Xu P (2010) Production of 2,3-butanediol from corncob molasses, a waste by-product in xylitol production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 87:965-970.
92. Wang X, Lv M, Zhang L, Li K, Gao C, Ma C and Xu P (2013) Efficient bioconversion of 2,3-butanediol into acetoin using *Gluconobacter oxydans* DSM 2003. *Biotechnology for Biofuels*, 6(155):1-9.
93. Willke TH, Vorlop KD (2004) Industrial bioconversion of renewable resources as an alternative to conventional chemistry. *Appl Microbiol Biotechnol*, 66:131-142.
94. Xiao Z, Lu JR (2014) Strategies for enhancing fermentative production of acetoin: A review. *Biotechnology Advances*, 32:492-503.
95. Xiao Z, Ma C, Xu P, Lu JR (2009) Acetoin catabolism and acetylbutanediol formation by *Bacillus pumilus* in a chemically defined medium. *PLoS One*, 4:e5627.
96. Xiao Z, Qiao S, Ma C, Xu P (2010b) Acetoin production associated with the increase of cell biomass in *Bacillus pumilus* ATCC 14884. *Afr J Microbiol Res*, 4:1997–2003.
97. Xiao Z, Wang X, Huang Y, Huo F, Zhu X, Xi L (2012) Thermophilic fermentation of acetoin and 2,3-butanediol by a novel *Geobacillus* strain. *Biotechnol Biofuels*, 5:88.
98. Xiao Z, Xu P (2007) Acetoin metabolism in bacteria. *Crit Rev Microbiol*, 33:127–140.

99. Xiao ZJ, Liu PH, Qin JY, Xu P (2007) Statistical optimization of medium components for enhanced acetoin production from molasses and soybean meal hydrolysate. *Appl Microbiol Biotechnol*, 74:61–68.
100. Xiu ZL, Zeng AP (2008) Present state and perspective of downstream processing of biologically produced 1,3-propanediol and 2,3-butanediol. *Appl Microbiol Biotechnol*, 78:917-926.
101. Xu H, Jia S, Liu J (2011b) Production of acetoin by *Bacillus subtilis* TH-49. *International Conference on Consumer Electronics, Commun, Networks*, pp. 1524–1527.
102. Xu P, Xiao Z, Du Y, Wei Z (2012) Acetoin high-yield *Bacillus pumilus* strain. United States patent US 08158402.
103. Yousten AA, Rogoff MH (1969) Metabolism of *Bacillus thuringiensis* in relation to spore and crystal formation. *Journal of Bacteriology*, 100(3):1229-1236.
104. Zahari Mior Ahmad Khushairi Mohd, Zakaria Mohd Rafein, Ariffin Hidayah, mokhtar Mohd Noriznan, Salihon Jailani, Shirai Yoshihito, Hassan Mohd Ali (2012) Renewable sugars from oil palm frond juice as an alternative novel fermentation feedstock for value-added products, *Bioresource Technology*, 110:566-571.
105. Zeng AP, Biebl H, Deckwer WD (1990b) 2,3-Butanediol production by *Enterobacter aerogenes* in continuous culture: role of oxygen supply. *Appl Microbiol Biotechnol*, 33:264-268.
106. Zeng AP, Biebl H, Deckwer WD (1991) Production of 2,3-butanediol in a membrane bioreactor with cell recycle. *Appl Microbiol Biotechnol*, 34:463–468.
107. Zhang C, Yang H, Yang F, Ma Y (2009) Current progress on butyric acid production by fermentation. *Curr Microbiol*, 59:656-663.
108. Zhang LY, Chen S, Xie HB, Tian YT, Hu KH (2012) Efficient acetoin production by optimization of medium components and oxygen supply control using a newly isolated *Paenibacillus polymyxa* CS107. *J Chem Technol Biotechnol*, 87:1551–1557.
109. Zhang X, Yang T, Lin Q, Xu M, Xia H, Xu Z (2011) Isolation and identification of an acetoin high production bacterium that can reverse transform 2,3-butanediol to acetoin at the decline phase of fermentation. *World J Microbiol Biotechnol*, 27:2785–2790.
110. Zhang X, Zhang R, Yang T, Zhang J, Xu M, Li H (2013b) Mutation breeding of acetoin high producing *Bacillus subtilis* blocked in 2,3-butanediol dehydrogenase. *World J Microbiol Biotechnol*, Volume 29, Issue 10, pp 1783-1789.

111. Zhang Y, Li S, Liu L, Wu J (2013) Acetoin production enhanced by manipulating carbon flux in a newly isolated *Bacillus amyloliquefaciens*. *Bioresour Technol*, 130:256–260.
112. Zhang LY, Sun JA, Hao YL, Zhu JW, Chu J, Wei DZ (2010a) Microbial production of 2,3-butanediol by a surfactant (serrawettin)-deficient mutant of *Serratia marcescens* H30. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 37:857–862.
113. Zhang LY, Yang YL, Sun JA, Shen YL, Wei DZ, Zhu JW (2010b) Microbial production of 2,3-butanediol by a mutagenized strain of *Serratia marcescens* H30. *Bioresour Technol*, 101:1961–1967.
114. Zigova J, Sturdik E (2000) Review: Advances in biotechnological production of butyric acid. *Journal of industrial Microbiology and Biotechnology*, 24:153-160.
115. Zigova J, Sturdik E, Vandak, Schlosser S (1999) Butyric acid production by *Clostridium butyricum* with intergrated extraction and pertraction. *Process Biochem* 34(8):835-843.