



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ &
ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ**

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

«Επιστήμη & Τεχνολογία Τροφίμων & Διατροφή του Ανθρώπου»

Κατεύθυνση: «Βιοδιεργασίες Τροφίμων & Βιοδιυλιστήρια»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Αξιοποίηση αποβλήτων φρούτων και λαχανικών προς
βιοτεχνολογική παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης**

ΛΙΑΚΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ ΚΟΥΤΙΝΑΣ

ΑΘΗΝΑ 2016

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Αξιοποίηση αποβλήτων φρούτων και λαχανικών προς
βιοτεχνολογική παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης**

ΛΙΑΚΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ ΚΟΥΤΙΝΑΣ

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή: Απόστολος Κουτίνας

Σεραφείμ Παπανικολάου

Ιωάννης Κούκος

ΑΘΗΝΑ 2016

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφή του Ανθρώπου με κατεύθυνση «Βιοδιεργασίες Τροφίμων και Βιοδιυλιστήρια» στο Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφή του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών κατά το ακαδημαϊκό έτος 2014-2015.

Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντά μου, Επίκουρο Καθηγητή Κουτίνα Απόστολο για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου και για την συνεχή υποστήριξη του στις προσπάθειές μου. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή καθηγητή Παπανικολάου Σεραφείμ και τον Αναπληρωτή καθηγητή Κούκο Ιωάννη για την ανάθεση της παρούσας εργασίας καθώς και για τις εξαιρετικές συμβουλές τους που εξέλαβα στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος. Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους διδάκτορες, υποψήφιους διδάκτορες και μεταπτυχιακούς φοιτητές του εργαστηρίου «Μηχανικής Τροφίμων» του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών για το εξαιρετικό εργασιακό περιβάλλον. Ιδιαίτερα ευχαριστώ θερμά τις υποψήφιες διδάκτορες, Παλαιογεώργου Αναστασία και Πατεράκη Χρυσάνθη για την άψογη συνεργασία μας και την συνεχή μετάδοση γνώσεων Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου και την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένειά μου για την ανιδιοτελή υποστήριξή τους με τον δικό τους μοναδικό τρόπο και για την ενθάρρυνσή τους όλο αυτό το διάστημα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στις μέρες μας η ζήτηση για εναλλακτικές πηγές για την παραγωγή ενέργειας και πρώτων υλών έχει αυξηθεί. Καύσιμα πετρελαίου, χημικά προϊόντα και πολυμερή μπορούν επίσης να παραχθούν μέσω μικροβιακών ζυμώσεων. Απόβλητα τροφίμων παράγονται κάθε χρόνο σε τεράστιες ποσότητες, ενώ η αξιοποίηση αποβλήτων δεν έχει ευρέως διερευνηθεί μέχρι τώρα. Το έτος 2013 παρήχθησαν 279.740.040 τόνοι λαχανικών και 32.994.326 τόνοι φρούτων παγκοσμίως. Το 25,8% του συνολικού βάρους των αποβλήτων τροφίμων αποτελείται από λαχανικά ενώ το 15,8% αντίστοιχα αποτελείται από φρούτα. Το κύριο μέρος των φρούτων αποτελείται από υδατάνθρακες (σακχαρόζη, φρουκτόζη και γλυκόζη), ενώ τα λαχανικά περιέχουν δομικές μονάδες όπως η λιγνίνη, η κυτταρίνη και η ημικυτταρίνη με τη γλυκόζη, ξυλόζη, γαλακτόζη, μαννόζη και αραβινόζη να αποτελούν τις θεμελιώδεις μονάδες τους. Εκχύλιση προϊόντων προστιθέμενης αξίας, όπως οι φαινολικές ενώσεις από τα λαχανικά και οι πηκτίνες από τα φρούτα θα μπορούσε να ενισχύσει το κέρδος της επεξεργασίας. Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης από πέντε στελέχη της οικογένειας *Enterobacteriaceae* με πηγές άνθρακα εμπορικά σάκχαρα, ενώ το καλύτερο από τα πέντε στελέχη επιλέχθηκε για παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης από το εκχύλισμα φρούτων και το υδρόλυμα λαχανικών.

ABSTRACT

Nowadays, demand for alternative resources for the production of energy and commodities, has increased. Petroleum based fuels, commodity chemicals and polymers can also be produced via microbial fermentation. Food waste is produced every year at huge quantities while waste management has not been widely explored so far. In 2013 279,740,040 tones of vegetables and 39,994,326 tones of fruit and were produced worldwide. Of all food waste arising, more than 25.8% per weight includes vegetables and 16.4% includes fruit. Fruit main fraction consists of carbohydrates (sucrose, fructose and glucose) while vegetables are rich in structural domains like lignin, cellulose and hemicelluloses with monosaccharides (glucose, xylose, galactose, mannose, arabinose) being their fundamental units. Extraction of value added products, such as phenolic compounds from vegetables and pectins from fruit, could enhance the profit of the process. In this study, bacterial BDO production by five microorganisms was examined utilizing the main monosaccharides of fruit and vegetable waste. The most promising microorganism was selected for the production of BDO from fruit extract and vegetable hydrolysate.

Περιεχόμενα

1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1	2,3-Βουτανοδιόλη	9
1.2	Εφαρμογές	10
1.3	Μικροοργανισμοί	10
1.4	Μεταβολικό μονοπάτι	12
1.5	Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης.	14
1.6	Φρούτα- Λαχανικά.	20
2.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	29
2.1	Βιολογικό υλικό	29
2.2	Θρεπτικά υποστρώματα	29
2.3	Ζυμώσεις	30
2.3.1	Ζυμώσεις κλειστής καλλιέργειας σε κωνικές φιάλες.	30
2.3.2	Ζυμώσεις ημισυνεχούς καλλιέργειας σε βιοαντιδραστήρα	31
2.4	Συλλογή φρούτων και λαχανικών.	31
2.5	Αναλύσεις	32
2.5.1	Προσδιορισμός υγρασίας	32
2.5.2	Προσδιορισμός περιεκτικότητας λιγνοκυτταρινούχων στα απόβλητα λαχανικών.	32
2.5.3	Ποσοτικός προσδιορισμός λιγνίνης και μονοσακχαριτών προερχόμενων από υδρόλυση κυτταρίνης και ημικυτταρίνης, σε στερεά δείγματα βιομάζας (NREL).	36
2.5.4	Προσδιορισμός και μέτρηση του pH	41
2.5.5	Προσδιορισμός κυτταρικής βιομάζας	41
2.5.6	Μέθοδος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)	42
2.6	Υδρολύσεις πολτού μίγματος λαχανικών	43
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	46
3.1	Προσδιορισμός περιεκτικότητας λιγνοκυτταρινούχων στα απόβλητα λαχανικών.	46
3.2	Επιλογή συνθηκών υδρόλυσης του πολτού λαχανικών.	47
3.3	Παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης από συνθετικά υποστρώματα εμπορικών σακχάρων.	49
3.3.1	Παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης με χρήση του στελέχους <i>Enterobacter</i> sp.	49
3.3.2	Παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης με χρήση του στελέχους <i>Enterobacter aerogenes</i> 9.	55

3.3.3	Παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης με χρήση του στελέχους <i>Enterobacter aerogenes</i> 10. -----	62
3.3.4	Παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης με χρήση του στελέχους <i>Citrobacter freundii</i> 207. -----	68
3.3.5	Παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης με χρήση του στελέχους <i>Enterobacter</i> sp. 208. -----	74
3.3.6	Συνοπτική παρουσίαση αποτελεσμάτων ζυμώσεων μονοσακχαριτών.-----	80
3.4	Παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης με χρήση του στελέχους <i>Enterobacter</i> sp. σε υπόστρωμα εκχυλίσματος φρούτων 20g/L -----	84
3.5	Παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης με χρήση του στελέχους <i>Enterobacter</i> sp. σε υπόστρωμα εκχυλίσματος φρούτων 40g/L. -----	86
3.6	Παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης με χρήση του στελέχους <i>Enterobacter</i> sp. σε υπόστρωμα υδρολύματος λαχανικών 10g/L.-----	87
3.7	Ζυμώσεις ημισυνεχούς καλλιέργειας σε βιοαντιδραστήρα με χρήση του στελέχους <i>Enterobacter</i> sp. σε υπόστρωμα εκχυλίσματος φρούτων. -----	88
4.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ -----	94
5.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ-----	95

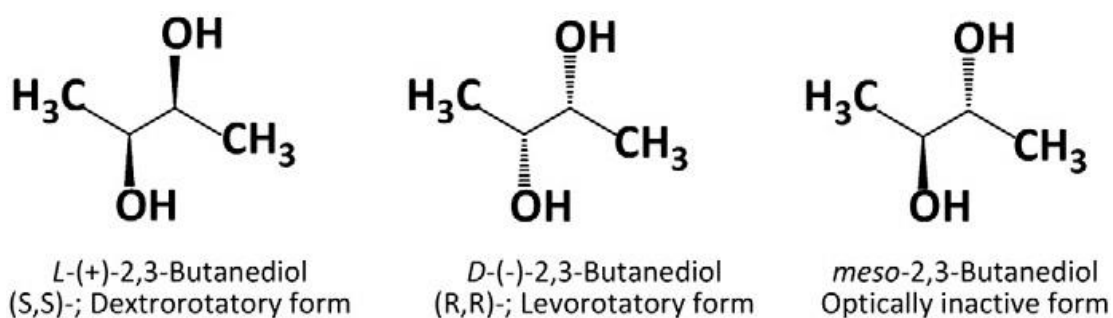
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η επικείμενη εξάντληση των αποθεμάτων αργού πετρελαίου έχει στρέψει το παγκόσμιο ενδιαφέρον στην εκμετάλλευση βιομηχανικών παραπροϊόντων για την παραγωγή καυσίμων, χημικών και πολυμερών μέσω μικροβιακών ζυμώσεων καθώς και στην ανάπτυξη βιοδιωλιστηρίων προς παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας. Η βιοτεχνολογική παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης, μέσω μικροβιακών ζυμώσεων με χρήση αποβλήτων ως πηγή άνθρακα, αποτελεί ένα αντιπροσωπευτικό παράδειγμα μιας τέτοιας βιομετατροπής, η οποία μπορεί να αντικαταστήσει τη μέχρι σήμερα πετροχημική παραγωγή της. Πρώιμα αποτελέσματα του κύκλου ζωής υποδεικνύουν ότι η 2,3-βουτανοδιόλη μπορεί να χρησιμοποιεί 60-87% λιγότερη ενέργεια ορυκτών καυσίμων μειώνοντας τις εκλύσεις του διοξειδίου του άνθρακα στο 70-117% συγκριτικά με την πετροχημική παραγωγή της μέσω διαφόρων διεργασιών και πρώτων υλών

Επιπλέον, η διαδικασία της ζύμωσης δεν απαιτεί οργανικό διαλύτη και μπορεί να χρησιμοποιεί ανακυκλούμενο νερό, βελτιώνοντας περαιτέρω τα περιβαλλοντικά της διαπιστευτήρια (Taylor R. et al., 2015). Τα ανωτέρω συνεπάγονται βελτίωση της ποιότητας του αέρα και μείωση των επιπτώσεων της υπερθέρμανσης του πλανήτη. Επιπλέον η μετατροπή της βιομάζας σε υγρά καύσιμα και χημικά απαιτεί χημική επεξεργασία με υλικά μικρότερης τοξικότητας σε σχέση τα προϊόντα που παράγονται κατά την πετροχημική επεξεργασία. Ωστόσο τροχοπέδη για τη λειτουργία τέτοιου βιοδιωλιστηρίου αποτελεί το κόστος λειτουργίας. Οι πρώτες αναφορές στην 2,3-βουτανοδιόλη ξεκινούν από το 1906 με τους Harden και Walpole και 1913 με τους Harden και Norris, που χρησιμοποίησαν τον μικροοργανισμό *Klebsiella pneumoniae* για να μελετήσουν την παραγωγή της. Ακολούθησαν ο Donker το 1926, με συσσώρευση 2,3-βουτανοδιόλης με τον μικροοργανισμό *Paenibacillus polymyxa* και ο Fulmer το 1933 που πρότεινε την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης σε βιομηχανική κλίμακα. Την περίοδο του 2^{ου} παγκοσμίου πολέμου το ενδιαφέρον για παραγωγή 2,3 βουτανοδιόλης και μετατροπή της σε 1,3 βουταδιένιο επανέρχεται, ωστόσο τροχοπέδη αποτέλεσε η διαθεσιμότητα οικονομικότερων μεθόδων πετροχημικής παραγωγής 1,3-βουταδιενίου. Το 1970 η αυξανόμενη τιμή του πετρελαίου έστρεψε το ενδιαφέρον προς παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης με χρήση της βιομάζας, προσπάθεια που συνεχίζεται μέχρι και σήμερα.

1.1 2,3-Βουτανοδιόλη

Η 2,3-βουτανοδιόλη, γνωστή και ως 2,3-βουτυλεν-γλυκόλη, διμεθυλεν-γλυκόλη, διμεθυλεθυλεν-γλυκόλη και κατά IUPAC βουτανο-2,3-διόλη, είναι ένα άχρωμο, άοσμο υγρό, το οποίο όμως δύναται να υπάρχει και σε κρυσταλλική μορφή. Έχει μοριακό βάρος 90.121 (g/mol), μοριακό τύπο $C_4H_{10}O_2$, σημείο βρασμού που κυμαίνεται από 177 έως 182°C, σημείο πήξης -60°C (Syu, 2001) και απαντάται στη φύση σε τρία ισομερή, τις οπτικά ενεργές μορφές dextro [D-(-)-], levo [L-(+)-] και την οπτικά ανενεργή μορφή meso.



Σχήμα 1.1.1: Τα τρία στερεοϊσομερή της 2,3-βουτανοδιόλης (Xiao-Jun Ji et al. 2011).

1.2 Εφαρμογές

Η 2,3-βουτανοδιόλη δύναται να χρησιμοποιηθεί είτε αυτούσια είτε μέσω των παραγώγων της από τις βιομηχανίες καυσίμων, πλαστικών και τροφίμων. Μία από τις κυριότερες εφαρμογές της είναι η μετατροπή της σε μεθυλ-αιθυλ-κετόνη (MEK), η οποία χρησιμοποιείται ως υγρό πρόσθετο στα καύσιμα, αλλά και ως διαλύτης στην σύνθεση ρητινών. Επιπλέον το παράγωγο 1,3-βουταδιένη παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την βιομηχανία, εφόσον μπορεί περαιτέρω να χρησιμοποιηθεί στην σύνθεση πολυμερών, πλαστικών και ελαστικών (Celińska and Grajek, 2009). Η αφυδρογόνωση της 2,3-βουτανοδιόλης οδηγεί στην παραγωγή διακετυλίου, το οποίο χρησιμοποιείται από την βιομηχανία τροφίμων είτε ως αρωματικό πρόσθετο, προσδίδοντας χαρακτηριστική βουτυρώδη οσμή, είτε ως συντηρητικό, καθώς σύμφωνα με έρευνες παρουσιάζει βακτηριοστατική δράση. Ακόμη τα προϊόντα εστεροποίησης χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο από την βιομηχανία φαρμάκων και καλλυντικών (Garg and Jain, 1995). Λόγω του υψηλού αριθμού οκτανίων εφαρμόζεται ως ενισχυτής οκτανίων στην βενζίνη, ενώ χάρη του χαμηλού σημείου πήξεως (-60°C), μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αντιψυκτικό. Εξαιρετικά σημαντική είναι και η θερμαντική αξία της (27198J/g) σε σύγκριση με άλλα υγρά καύσιμα όπως η μεθανόλη (22081J/g) και η αιθανόλη (29055J/g) (Flickinger, 1980). Ενδεχόμενες εφαρμογές είναι η παραγωγή εκτυπωτικών μελανιών και καπνογόνων (Garg and Jain, 1995).

1.3 Μικροοργανισμοί

Πολλά είδη βακτηρίων δύνανται να παράγουν 2,3-βουτανοδιόλη, ωστόσο αυτά που το κάνουν σε ικανοποιητική ποσότητα ανήκουν στα γένη *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Bacillus* and *Serratia*. Από τη βιβλιογραφία συγκεκριμένα στελέχη των παραπάνω γενών με την ικανότητα παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης είναι: *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus subtilis*, *Brevibacillus brevis* S1, *Corynebacterium glutamicum*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* (γνωστό και ως *Aerobacter aerogenes*), *Klebsiella oxytoca*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis sub sp. Lactis bv. diacetylactis*, *Leuconostoc lactis*, *Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris*, *Oenococcus oeni*, *Pediococcus pentosaceus*, *Raoultella terrigena*, *Serratia marcescens* (Caspi, 2008), *Bacillus polymyxa* (Hespell, 1996; Mallonee and Speckman, 1988; Nakashimada et al., 2000), *Klebsiella terrigena* (Blomqvist et al.,

1993; Mayer et al., 1995), *Streptococcus faecalis* (Speckman and Collins, 1982), *Enterobacter cloacae* (Saha and Bothast., 1999), *Bacillus licheniformis* (Perego et al., 2000), *Bacillus amyloliquefaciens* (Alametal., 1990), *Aerobacter indologenes* (Mickelson and Werkman, 1938), *Rhizobacterium*, *Pseudomonas chlororaphis* O6 (Cho et al., 2008), *Chlamydomonas perigranulata* (Hon-Nami, 2006).

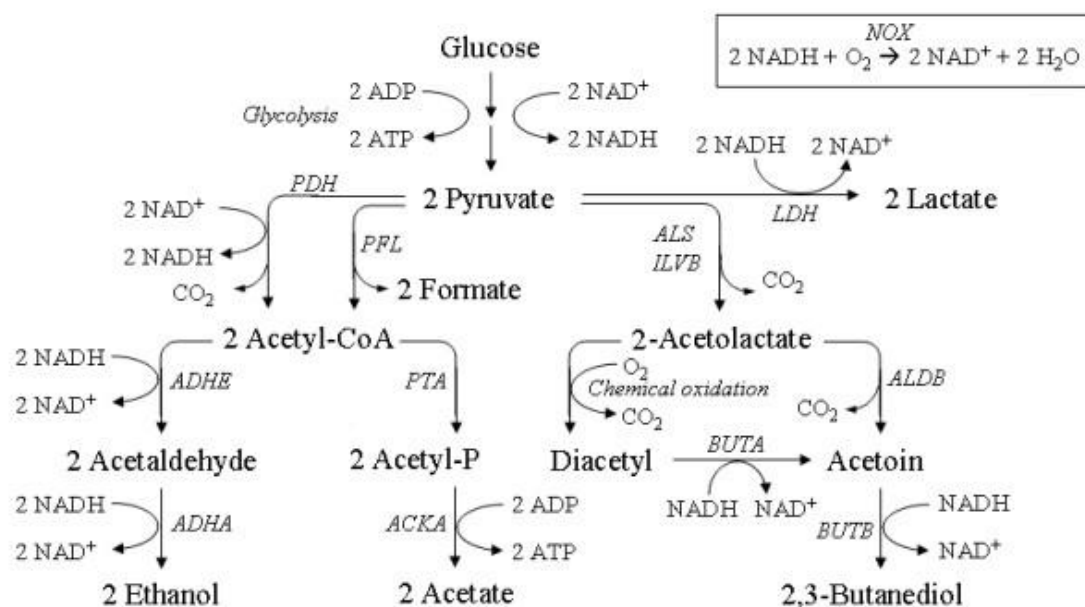
Τα στελέχη *Enterobacter aerogenes* και *Serratia marcescens* θεωρούνται ως οι πολλά υποσχόμενοι μικροοργανισμοί για την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης. Συγκεκριμένα ο *Enterobacter aerogenes* παράγει υδρογόνο κάτω από αυστηρά αναερόβιες συνθήκες, όμως υπό μικροαερόβιες συνθήκες παράγει 2,3-βουτανοδιόλη.

Μέχρι τώρα τα στελέχη *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, και *Paenibacillus polymyxa* έχουν μελετηθεί και παρουσίασαν τη μεγαλύτερη παραγωγικότητα 2,3-βουτανοδιόλης ανάμεσα στα προαναφερθέντα στελέχη. Οι μικροοργανισμοί αυτοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πιθανή παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης σε βιομηχανική κλίμακα (Xiao-Jun Ji et al., 2011). Το γένος *Klebsiella* έχει απομονωθεί από τη φύση και μπορεί να καταναλώσει μεγάλο φάσμα πηγών άνθρακα όπως η γλυκόζη, η μαννόζη, η αραβινόζη, η γαλακτόζη, η ξυλόζη, η λακτόζη και η κυτταρίνη. Μαζί με το είδος *Enterobacter* ανήκουν στην οικογένεια Enterobacteriaceae. Μπορούν να παράγουν τα levo- (+) (-L-) και meso- ισομερή της 2,3-βουτανοδιόλης. Επίσης λόγω της ικανότητάς του να παράγει μεγάλη ποσότητα 2,3-βουτανοδιόλης, τουλάχιστον διπλάσια σε σχέση με τον *Paenibacillus polymyxa* (Xiao-Jun Ji et al., 2011). Ωστόσο όμως λόγω της παθογένειας (Biosafety level 2) αυτού του είδους μικροοργανισμών πρέπει να λαμβάνονται τα κατάλληλα μέτρα ασφαλείας.

Ο *Paenibacillus polymyxa* είναι ένα από τα λίγα είδη *Bacillus*, που μπορεί να αναπτυχθεί υπό αναερόβιες συνθήκες και εκτός των μονοσακχαριτών μπορεί να χρησιμοποιήσει ως υπόστρωμα για ζύμωση και πολυμερή όπως η ξυλάνη, η ινουλίνη και το άμυλο, καθώς έχει την ικανότητα να εκκρίνει τα ένζυμα ξυλανάση (E.C 3.2.1.8), ινουλάση (E.C. 3.2.1.7) και α-αμυλάση (E.C. 3.2.2.1) που αποικοδομούν αυτά τα πολυμερή στους μονοσακχαρίτες τους (Gao et al., 2010; Hespell 1996; Kawazu et al., 1987). Επίσης λόγω της ικανότητάς του να παράγει αποκλειστικά το dextro- (D-) ισομερές της 2,3-βουτανοδιόλης (Hespell, 1996), που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αντιψυκτικό, είχε κεντρίσει το ενδιαφέρον.

1.4 Μεταβολικό μονοπάτι

Το μεταβολικό μονοπάτι παραγωγής της 2,3-βουτανодиόλης με υπόστρωμα τη γλυκόζη παρουσιάζεται στο ακόλουθο σχήμα:



Σχήμα 1.4.1: Μεταβολικό μονοπάτι παραγωγής 2,3 βουτανодиόλης και παραπροϊόντων 2,3-βουτανодиόλης, οξικού, γαλακτικού και μυρμηκικού οξέος (Celińska and Grajek, 2009).

Πολλοί μονοσακχαρίτες (εξόζες ή πεντόζες) (Syu, 2001) καθώς και γλυκερόλη έχουν χρησιμοποιηθεί ως υποστρώματα για ζυμώσεις προς παραγωγή 2,3-βουτανодиόλης (Metsoviti et. al 2012, Metsoviti et al 2013). Κατά το βακτηριακό μεταβολισμό, οι μονοσακχαρίτες πρέπει αρχικά να μετατραπούν σε πυροσταφυλικό οξύ μέσω της γλυκολυτικής οδού Embden-Meyerhof-Parnas κατά τον καταβολισμό της γλυκόζης, ενώ από πεντόζες απαιτείται συνδυασμός του κύκλου των φωσφορικών πεντοζών και της γλυκολυτικής οδού (Jansen and Tsao, 1983). Μαζί με τη 2,3-βουτανодиόλη δύνανται να παραχθούν επίσης και άλλα μεταβολικά προϊόντα όπως το οξικό οξύ, το γαλακτικό οξύ, το μυρμηκικό οξύ, το ηλεκτρικό οξύ, η ακετοΐνη και η αιθανόλη, όπως παρουσιάζονται στο Σχήμα 1.4.1 (Maddox, 1996; Magee and Kosaric, 1987) και η συγκέντρωση των οποίων εξαρτάται από τον εκάστοτε μικροοργανισμό και τις συνθήκες της καλλιέργειας (Celińska and Grajek, 2009).

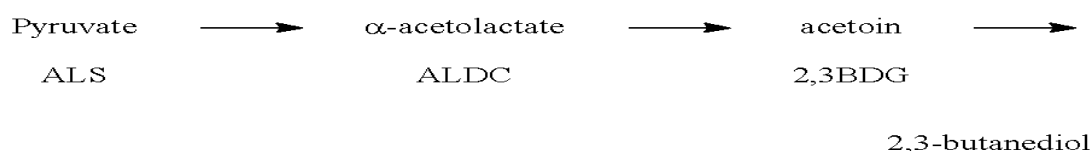
Για τη βιοσύνθεση της 2,3-βουτανοδιόλης από το πυροσταφυλικό οξύ εμπλέκονται τρία βασικά ένζυμα, η συνθάση του α-ακετογαλακτικού (α-ALS, EC4.1.3.18), η αποκαρβοξυλάση του α-ακετογαλακτικού (α-ALDC, EC.4.1.1.5) και η αφυδρογονάση της 2,3-βουτανοδιόλης (BDH, EC 1.1.1.76) ή αλλιώς αναγωγή ακετοΐνης (EC 1.1.1.4). Το ένζυμο α-ALS δρα καλύτερα σε ελαφρώς όξινες συνθήκες (αναφέρεται και ως pH 6 ένζυμο) και έτσι διαφέρει από το αναβολικό α-ALS, ή «pH 8 ένζυμο» (Gottshalk, 1986). Το pH 6 ένζυμο διεξάγει μια αντίδραση δύο σταδίων: στο πρώτο στάδιο, το πυροσταφυλικό συμπλέκεται με τη πυροφωσφορική θειαμίνη (TPP) για το σχηματισμό του ακέτυλο-TPP, το οποίο σε δεύτερο στάδιο συμπυκνώνεται με ένα δεύτερο μόριο του πυροσταφυλικού οξέος για το σχηματισμό του α-ακετογαλακτικού οξέος (Magee and Kosaric, 1987).

Υπό αερόβιες συνθήκες, το α-ALS αδρανοποιείται και συνεπώς δεν παράγεται 2,3-βουτανοδιόλη. Σ' αυτή την περίπτωση το πυροσταφυλικό οδηγείται προς παραγωγή του ακέτυλο-CoA, μέσω της δράσης συμπλέγματος ενζύμων πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης, τα οποία δε συντίθενται σε αναερόβιες συνθήκες και γενικώς αναστέλλονται από την παρουσία του NADH (Gottshalk, 1986). Το ακέτυλο-CoA που σχηματίζεται ακολουθεί κυρίως πορεία για τον κύκλο τρικαρβοξυλικών οξέων (TCA).

Όταν οι συνθήκες της καλλιέργειας είναι μικροαερόφιλες τα ένζυμα γαλακτική αφυδρογονάση (EC 1.1.1.27), λύση πυροσταφυλικού-μυρμηκικού οξέος (EC 2.3.1.54) και αφυδρογονάση α-ακετογαλακτικού (ALS), δρουν στο πυροσταφυλικό οξύ προς το σχηματισμό γαλακτικού οξέος, μυρμηκικού οξέος και 2,3-βουτανοδιόλης αντίστοιχα. Το μυρμηκικό οξύ που σχηματίζεται, μεταβολίζεται στη συνέχεια προς διοξείδιο του άνθρακα και υδρογόνο μέσω του συμπλόκου λύσης μυρμηκικού-υδρογόνου, το οποίο αναστέλλεται υπό αερόβιες συνθήκες και παρουσία αζώτου υπό αναερόβιες συνθήκες (Magee and Kosaric, 1987). Το ηλεκτρικό οξύ προέρχεται από το φωσφοενολοπυροσταφυλικό (PEP), το οποίο αρχικά καρβοξυλιώνεται προς οξαλοξικό, μέσω της καρβοξυλάσης του φωσφοενολοπυροσταφυλικού και στη συνέχεια σε ηλεκτρικό οξύ υπό αυστηρά αναερόβιες συνθήκες (Gottshalk, 1986).

Αρχικά, το πυροσταφυλικό οξύ από τη γλυκόλυση μπορεί να μετατραπεί είτε σε γαλακτικό οξύ, που απαιτεί NADH ή σε α-ακετογαλακτικό (α-acetolactate) από την

α -ALS, η οποία παράγεται κάτω από χαμηλή διαθεσιμότητα NADH. Στη συνέχεια, το α -ακετογαλακτικό κάτω από αναερόβιες συνθήκες μπορεί να μετατραπεί σε ακετοΐνη ενώ υπό την παρουσία οξυγόνου, υφίσταται αποκαρβοξυλίωση και παράγεται 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 (Celińska and Grajek, 2009). Πιο κατανοητά, η βιοσύνθεση της 2,3-βουτανοδιόλης έχει ως εξής:



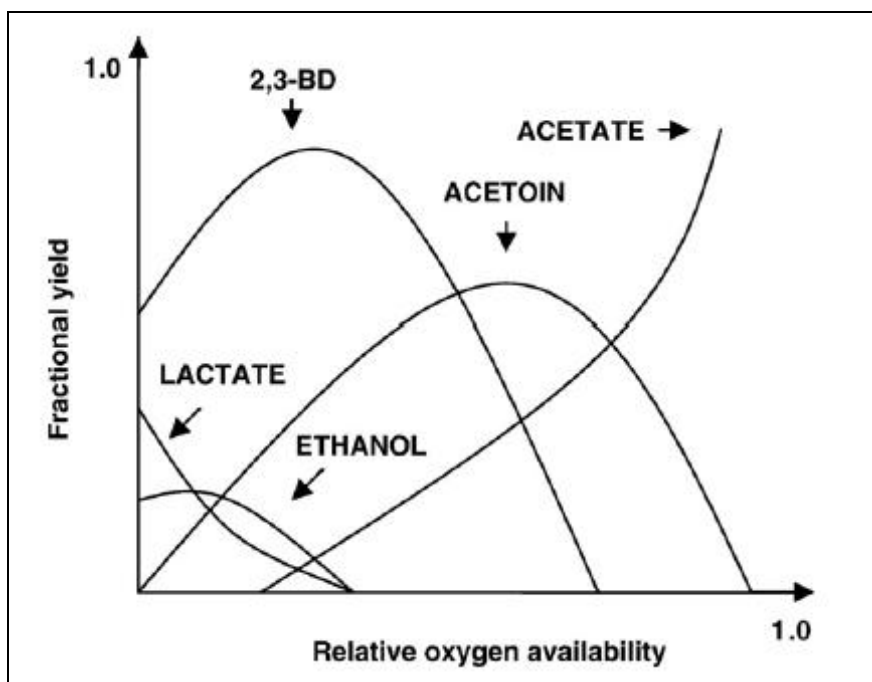
Ο μέγιστος θεωρητικός συντελεστής αποδόσεως (maximum theoretical yield) παραχθείσας 2,3-βουτανοδιόλης ανά καταναλωθείσα γλυκόζη είναι $Y_{\text{BDO/Glu}} = 0,5\text{g/g}$ (Nilegaonkar et al., 1992).

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

Οι κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης είναι η διαθεσιμότητα του οξυγόνου, το pH, η θερμοκρασία και η συγκέντρωση του υποστρώματος. Η 2,3-βουτανοδιόλη παράγεται γενικά σε χαμηλή διαθεσιμότητα οξυγόνου (O_2) και αποτελεί ένα κλασικό παράδειγμα αναερόβιας ζύμωσης, καθώς διατηρείται η οξειδοαναγωγική ισορροπία κατά την διάρκεια της γλυκόλυσης και της βιοσύνθεσης (Converti et al., 2003). Πρέπει να σημειωθεί, ότι οι περισσότερες μελέτες για την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης αφορούν προαιρετικά αναερόβιους μικροοργανισμούς, όπως *Klebsiella* sp. ή *Bacillus polymyxa*. Ο συντελεστής αποδόσεως της 2,3-βουτανοδιόλης δύναται να μεγιστοποιηθεί ελαττώνοντας την παροχή οξυγόνου στη ζύμωση καθώς έτσι περιορίζεται η διαδικασία της αναπνοής. Ωστόσο, με τη μείωση της διαθεσιμότητας του οξυγόνου η παραχθείσα βιομάζα δεν μπορεί να φτάσει στα μέγιστα επίπεδα. Η 2,3-βουτανοδιόλη εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την παραγόμενη βιομάζα. Ως εκ τούτου η απόδοση σε 2,3-βουτανοδιόλη δε θα φτάσει στα μέγιστα δυνατά επίπεδα όταν η βιομάζα είναι επίσης μειωμένη. Σε γενικές γραμμές, η υψηλή συγκέντρωση O_2 ευνοεί την κυτταρική ανάπτυξη, δηλαδή την αύξηση της βιομάζας και των εκπομπών CO_2 , σε βάρος της παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης. Επομένως, η αύξηση της συγκέντρωσης του οξυγόνου οδηγεί σε

υψηλότερη πυκνότητα κυττάρων και σε υψηλότερη παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης σε σχέση με την πλήρη απουσία οξυγόνου.

Από την άλλη μεριά αν η συγκέντρωση του οξυγόνου στο μέσο της ζύμωσης είναι πολύ υψηλή, ο μεταβολισμός μπορεί να στραφεί στην παραγωγή βιομάζας μειώνοντας την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης. Εν κατακλείδι, για να επιτευχθεί η μέγιστη δυνατή απόδοση σε 2,3-βουτανοδιόλη τα επίπεδα διαθέσιμου οξυγόνου για κάθε μικροοργανισμό πρέπει να είναι τέτοια ώστε να επιτευχθεί μία ισορροπία στην παραγωγή βιομάζας και 2,3-βουτανοδιόλης καθώς και να αποφευχθεί η παραγωγή οργανικών οξέων (Celińska and Grajek, 2009) αναλόγως των απαιτήσεων του μικροοργανισμού σε οξυγόνο επηρεάζονται οι αναλογίες των μεταβολικών προϊόντων, όπως φαίνεται στο Σχήμα 1.3.2 (Demas et al., 1988). Η διαθεσιμότητα σε οξυγόνο είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τη ταχύτητα ανάδευσης. Έχει παρατηρηθεί ότι η ανάδευση αυξάνει σημαντικά την απόδοση σε 2,3-βουτανοδιόλη. Σε καλλιέργειες με τους μικροοργανισμούς *Enterobacter aerogenes* και *Klebsiella pneumoniae*, με γλυκόζη ή λακτόζη ως υπόστρωμα σε ανάδευση 220rpm, η παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλη αυξήθηκε έως και 5 φορές στη ζύμωση γλυκόζης και μέχρι 15 φορές στη ζύμωση λακτόζης (Barret et al., 1983) σε σύγκριση με καλλιέργειες με μηδενική ανάδευση.



Σχήμα 1.3.2: Η επιρροή της διαθεσιμότητας του οξυγόνου στην παραγωγή των μεταβολικών προϊόντων (Demas et al., 1988).

Μεγάλη σημασία για την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης έχει και το pH. Γενικά θα μπορούσαμε να ισχυριστούμε ότι οι αλκαλικές συνθήκες ευνοούν το σχηματισμό οργανικών οξέων με ταυτόχρονη μείωση της απόδοσης σε 2,3-βουτανοδιόλη (Garg and Jain, 1995). Αντιθέτως, υπό όξινες συνθήκες, η σύνθεση οργανικών οξέων είναι μειωμένη (πάνω από 10 φορές) και η σύνθεση διόλης είναι αυξημένη (3 με 7 φορές). Ωστόσο, το βέλτιστο pH για παραγωγή διόλης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το μικροοργανισμό και το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται. Στις περισσότερες αναερόβιες ζυμώσεις η ανάπτυξη του μικροοργανισμού γίνεται σε συνδυασμό με το σχηματισμό οργανικών οξέων. Έτσι, κατά τη διάρκεια της ζύμωσης το υπόστρωμα σταδιακά καταναλώνεται και η τάση που τελικά διαμορφώνεται είναι η αδρανοποίηση του μικροοργανισμού από τα δικά του τοξικά προϊόντα (Biebl et al., 1998). Ορισμένοι μικροοργανισμοί έχουν εξελίξει αμυντικές στρατηγικές, όπως η αλλαγή του μεταβολισμού τους ώστε να παράγουν λιγότερο τοξικές ενώσεις, όπως αλκοόλες ή γλυκόλες (Van Houdt et al., 2007). Σε μια μελέτη (Maddox et al., 1996) για την εξήγηση του παραπάνω φαινομένου, θεωρήθηκε ότι η πιθανολογούμενη αιτία επαγωγής της 2,3-βουτανοδιόλης είναι η συσσώρευση των όξινων προϊόντων στο μέσο και όχι η τροποποίηση του pH. Κατά τη διάρκεια της εκθετικής ανάπτυξης του είδους *Clostridium acetobutylicum* παράγεται οξικό και βουτυρικό οξύ. Κατόπιν κατά τη διάρκεια της στατικής φάσης ανάπτυξης (μετά από την ισχυρή αύξηση της οξύτητας), παράγονται προϊόντα όπως η ακετόνη, η βουτανόλη και η αιθανόλη (Lopez-Contreras et al., 2000).

Ένα παρόμοιο φαινόμενο παρατηρήθηκε σε ζύμωση με είδη του γένους *Klebsiella*, όπου σε ουδέτερο pH παρατηρήθηκε σύνθεση οξικού οξέως και αιθανόλης και σε pH μικρότερο του 6 σύνθεση 2,3-βουτανοδιόλης και αιθανόλης (Biebl et al., 1998). Σε ζύμωση γλυκερόλης με το είδος *Klebsiella pneumoniae* σε χαμηλό pH (περίπου 5,5) σχεδόν το 10% (25,3/221,8) του υποστρώματος κατευθύνθηκε προς τη σύνθεση της 2,3-βουτανοδιόλης και το 44% (98,5/221,8) για τη σύνθεση της 1,3-προπανοδιόλης. Αυτό είναι κατανοητό, καθώς η 1,3-προπανοδιόλη είναι το χαρακτηριστικό προϊόν της ζύμωσης της γλυκερόλης (Menzeletal et al., 1997; Biebl et al., 1998). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μελέτης των Biebl et al., 1998 εάν το pH του μέσου είναι σταθερό (συγκεκριμένα στην τιμή 5 ή 7) τότε στο χαμηλότερο pH η τελική συγκέντρωση της 2,3-βουτανοδιόλης είναι υψηλότερη. Ωστόσο, το ανώτατο ποσό της 2,3-βουτανοδιόλης επιτεύχθηκε όταν το

pH δεν ελέγχονταν καθόλου (μειωνόταν συνεχώς με την αρχική τιμή του pH στο 7 και με την τελική τιμή του pH στο 5,5). Αυτό που είναι εξαιρετικά σημαντικό σύμφωνα με τους συγγραφείς της μελέτης είναι ότι η σύνθεση της 2,3-βουτανοδιόλης δεν οφείλεται τόσο στην τιμή του pH, όσο στη παρουσία του οξικού οξέος. Ωστόσο, υποστηρίζουν πως η συσσώρευση οξέος δεν είναι ο μοναδικός παράγοντας που καθορίζει το σχηματισμό 2,3-βουτανοδιόλης, καθώς η βουτανοδιόλη παράγεται, επίσης, σε ουδέτερο pH με τη γλυκερόλη ως πηγή άνθρακα (Biebl et al., 1998) και σε συνεχή ζύμωση με τη γλυκόζη ως πηγή άνθρακα (Zeng et al., 1990). Σύμφωνα με άλλη μελέτη (Voloch et al., 1985) η βέλτιστη τιμή του pH για παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης από το μικροοργανισμό *Klebsiella oxytoca* κυμαίνεται από 5 έως 6. Για τον μικροοργανισμό *Enterobacter aerogenes* θεωρήθηκε ως βέλτιστη τιμή pH για την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης το pH 6 (Converti et al., 2003) καθώς σε pH άνω του 6 διαπιστώθηκε ότι προκαλείται έντονη μείωση της δραστηριότητας των βασικών ενζύμων που συμμετέχουν στην παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης (Stormer, 1968).

Ομοίως σε άλλη μελέτη (Perego et al., 2000) καθορίστηκε η τιμή του pH 6 ως βέλτιστη για την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης σε ζύμωση με τον ίδιο μικροοργανισμό. Η απόδοση σε 2,3-βουτανοδιόλη δύναται να θεωρηθεί σχεδόν σταθερή μέσα σε ένα στενό εύρος pH (από 5 έως 6,5), ενώ σε χαμηλότερες ή υψηλότερες τιμές pH μειώνεται απότομα. Η ισχυρότερη επίδραση του pH παρατηρήθηκε σε όξινες συνθήκες, διότι η χαμηλότερη τιμή pH εμποδίζει, συνήθως, την αύξηση της βιομάζας, καθώς και τις βιολογικές διεργασίες (Perego et al., 2000). Μια ελαφρώς διαφορετική τιμή pH επελέγη για την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης από *Bacillus polymyxa* (pH 6,3-6,8) (Nakashimada et al., 2000). Σε αντίθεση με όσα αναφέρθηκαν προηγουμένως, η παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης ήταν ελαφρώς υψηλότερη σε υψηλότερα pH, ενώ η απόδοση ήταν υψηλότερη σε χαμηλότερο pH. Τέλος, σε άλλη μελέτη σχετικά με την επίδραση του pH στην παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης εξήχθησαν ενδιαφέροντα αποτελέσματα όταν χρησιμοποιήθηκε φωσφορικό ως ρυθμιστικό διάλυμα (Barret et al., 1983). Σε τρεις παραλλαγές τις τιμής του pH, 6, 6,5, και 7, σε καλλιέργειες με *Klebsiella pneumoniae* η παραγωγικότητα σε 2,3-βουτανοδιόλη αυξανόταν σταδιακά από το μικρότερο στο μεγαλύτερο pH. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με τις προαναφερθείσες μελέτες όπου το ελαφρώς όξινο περιβάλλον βελτίωνε την απόδοση

σε 2,3-βουτανοδιόλη και, επομένως, είναι απόρροια της αυξημένης ρυθμιστικής ικανότητας του ρυθμιστικού διαλύματος σε υψηλότερο pH.

Η αποτελεσματικότητα των βιοδιεργασιών είναι αυστηρά εξαρτημένη, εκτός από το pH, και από τη θερμοκρασία, καθώς η τελευταία επηρεάζει την ενζυματική δραστηριότητα και γενικότερα το μεταβολισμό των μικροοργανισμών (Garg and Jain, 1995). Ένα εύρος θερμοκρασιών από 30 έως 37°C θεωρείται το βέλτιστο για βακτηριακή ζύμωση, δεδομένου ότι οι τιμές αυτές ευνοούν την μέγιστη παραγωγή βιομάζας. Εκατέρωθεν των τιμών αυτών η κυτταρική ανάπτυξη μειώνεται αισθητά. Σε θερμοκρασίες εντός του παραπάνω εύρους παρατηρείται αλλαγή του μεταβολισμού των βακτηρίων που έχει ως συνέπεια την επαγωγή διαφορετικών μεταβολικών προϊόντων ή την επαγωγή των ίδιων προϊόντων αλλά σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Η τιμή της βέλτιστης θερμοκρασίας για την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης εξαρτάται άμεσα από το στέλεχος. Σύμφωνα με μελέτη (Biebl et al., 1998) σε καλλιέργειες με το είδος *Klebsiella pneumoniae* η μείωση της θερμοκρασίας από 35°C στους 30°C είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της σύνθεσης αιθανόλης και την αύξηση της σύνθεσης της 2,3-βουτανοδιόλης. Ως εκ τούτου, οι καλύτερες συνθήκες για τη μέγιστη παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης από καλλιέργειες με το είδος *Klebsiella pneumoniae* θεωρούνται: α) μη ελεγχόμενη αύξηση της οξύτητας με αρχικό pH όχι μικρότερο της τιμής 7 και β) θερμοκρασία που δεν υπερβαίνει τους 30°C. Σε καλλιέργεια με το είδος *Klebsiella pneumoniae* θεωρήθηκε ως βέλτιστη θερμοκρασία ζύμωσης η τιμή των 30°C (Yu and Saddler, 1982; Yu et al. 1985), σε ημισυνεχή καλλιέργεια με το είδος *Enterobacter aerogenes* η θερμοκρασία 39°C (Converti et al., 2003) και σε ημισυνεχή ή ασυνεχή καλλιέργεια με το είδος *Bacillus polymyxa* η θερμοκρασία 30°C (Hespell, 1996; Nakashimada et al., 2000).

Σε καλλιέργειες με τα είδη *Klebsiella pneumoniae* και *Enterobacter aerogenes* σε θερμοκρασίες από 30 έως 37°C παρατηρήθηκε ότι σε θερμοκρασία 33°C η παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης ήταν μέγιστη για το είδος *Klebsiella pneumoniae*, ενώ οι αλλαγές στη θερμοκρασία είχαν μικρή επίδραση στην παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης από το είδος *Enterobacter aerogenes* (αν και στους 37°C η 2,3-βουτανοδιόλη παρήχθη πιο γρήγορα) (Barret et al., 1983). Τέλος, σε άλλη μελέτη σε καλλιέργεια με το είδος *Enterobacter aerogenes*, η παραγωγικότητα της 2,3-βουτανοδιόλης αυξήθηκε σταδιακά όσο η θερμοκρασία αυξανόταν έως ενός ορίου (Perego et al., 2000). Οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι σε θερμοκρασία

39°C παρατηρείται η μέγιστη παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης. Δεδομένου, λοιπόν, ότι τα διάφορα στελέχη μπορούν να έχουν διαφορετικές βέλτιστες θερμοκρασίες για την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης, η βέλτιστη τιμή θα πρέπει να καθορίζεται ξεχωριστά για το κάθε στέλεχος σε συνδυασμό με το χρησιμοποιούμενο υπόστρωμα.

Όσον αφορά την επίδραση του υποστρώματος στην παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης θα μπορούσαμε, γενικά, να ισχυριστούμε πως εξαρτάται από την καθαρότητα της πηγής άνθρακα. Έτσι όταν το μέσο της καλλιέργειας είναι απόβλητα γεωργο-βιομηχανιών τότε η αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα είναι της τάξεως του 5-10% (Garg and Jain, 1995). Οι συγκεντρώσεις αυτές είναι σχετικά χαμηλές κυρίως λόγω των τοξικών ουσιών που υπάρχουν στα ακατέργαστα προς ζύμωση υλικά. Η συγκέντρωση, μάλιστα, των τοξικών ουσιών αυξάνει παράλληλα με την αύξηση της συγκέντρωσης της πηγής άνθρακα. Ωστόσο, παρατηρήθηκε ότι σε συγκεντρώσεις σακχάρων άνω των 20g/L, ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης μειωνόταν εξαιτίας της μειωμένης ενεργότητας νερού (a_w). Πρέπει, βέβαια, να σημειωθεί ότι η μείωση της ενεργότητας του νερού είναι συνάρτηση της μοριακότητας του υποστρώματος. Επομένως, στη λακτόζη (δισακχαρίτης) η μείωση είναι μικρότερη από ότι στη γλυκόζη (μονοσακχαρίτης). Η παραγωγικότητα της 2,3-βουτανοδιόλης, όμως, ελάχιστα επηρεάζεται από την αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης του άνθρακα. Σε καλλιέργειες με το είδος *Enterobacter aerogenes* η αρχική συγκέντρωση γλυκόζης από 9 έως 72g/L αποδείχτηκε ότι δεν επηρέαζε την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης (Converti and Perego, 2002). Μέγιστες τιμές παραγωγικότητας εμφανίζονται σε αρχική συγκέντρωση περίπου 100g/L (Celińska and Grajek, 2009), ενώ σε καλλιέργειες με το είδος *Bacillus polymyxa* παρατηρήθηκε αναστολή της αύξησης σε συγκεντρώσεις πηγής άνθρακα άνω των 150g/L (Demas et al., 1988). Επίσης, σε συνεχείς καλλιέργειες το στέλεχος *Klebsiella pneumoniae* DSM 2026 σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 60g/L ήταν σε θέση να καταναλώσει 9,2g/L γλυκερόλη σε χρονικό διάστημα 12 ωρών. Μετά την πάροδο των 12 ωρών η ανάπτυξη του μικροοργανισμού σταματούσε (Biebl et al., 1998). Σε γενικές γραμμές, λοιπόν, διαπιστώνεται ότι το είδος και η συγκέντρωση του υποστρώματος επηρεάζουν την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης, ανάλογα με το είδος του μικροοργανισμού. Τέλος, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η προσθήκη οξικού οξέος σε συγκεντρώσεις έως 200mM στο θρεπτικό μέσο βελτιώνουν την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης (Nakashimada et al., 2000).

1.6 Φρούτα- Λαχανικά.

Τα φρούτα και τα λαχανικά αποτελούν βασικά συστατικά της υγιεινής διατροφής και εμφανίζουν πολλές ομοιότητες όσον αφορά τη σύστασή τους, τις μεθόδους καλλιέργειας, συγκομιδής, αποθήκευσης και επεξεργασίας. Τα λαχανικά μπορούν να ταξινομηθούν σε πέντε κατηγορίες ανάλογα με το εδώδιμο τμήμα του φυτού. Έτσι προκύπτουν τα φυλλώδη λαχανικά (leaf vegetables), τα λαχανικά βλαστού (stem vegetables), τα λαχανικά ρίζας (root vegetables), τα λαχανικά ανθέων (flowering vegetables) και τα ψυχανθή λαχανικά (legumes).

Πίνακας 1.6.1: Ταξινόμηση λαχανικών (Lintas C., 1992).

Κατηγορία	Λαχανικά
Φυλλώδη	Μαρούλι, Λάχανο, Σπανάκι.
Βλαστού	Σέλερι, Σπαράγγια.
Ανθέων	Μπρόκολο, Κουνουπίδι, Μελιτζάνα, Πιπεριά, Αγκινάρα Ντομάτα, Αγγούρι, Κολοκύθι
Ρίζας	Καρότο, Παντζάρι, Πατάτα, Κρεμμύδι, Ραπανάκι
Ψυχανθή	Φασολάκια, Αρακάς.

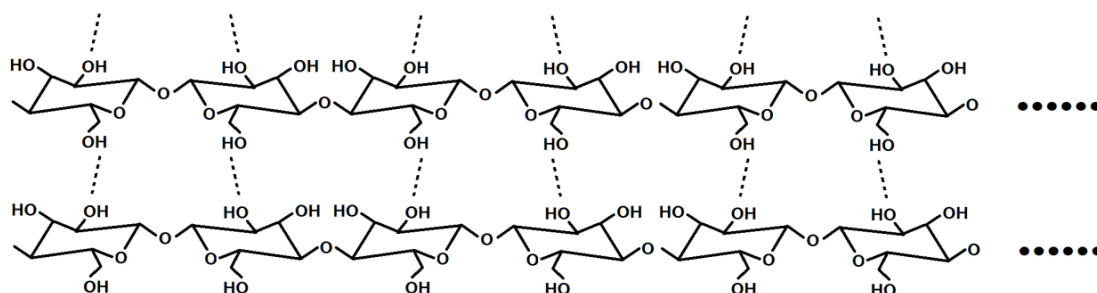
Τα φρούτα αποτελούνται κυρίως από το περικάρπιο, που αποτελεί και το εδώδιμο μέρος και τα κουκούτσια τα οποία και περιβάλλει. Τα περισσότερα φρούτα και λαχανικά είναι διαθέσιμα όλο το χρόνο σε μεγάλη ποικιλία και εκτός από φρέσκα μπορεί να βρεθούν και μαγειρεμένα, ζεστά ή κρύα, κονσερβοποιημένα, τουρσί, κατεψυγμένα ή αποξηραμένα. Περιέχουν βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ), καροτένιο και μερικά αποτελούν καλή πηγή βιταμίνης B6. Παρέχουν υψηλές συγκεντρώσεις ιχνοστοιχείων με παράλληλη χαμηλή συγκέντρωση λίπους. Όλα τα φρούτα και λαχανικά έχουν ιδιαίτερα υψηλή περιεκτικότητα σε νερό η οποία είναι γενικά μεγαλύτερη του 70% του συνολικού τους βάρους και μπορεί να ξεπεράσει το ενενήντα τις εκατό όπως στην περίπτωση του αγγουριού όπου έχει περιεκτικότητα σε νερό ενενήντα έξι τις εκατό (Lintas C., 1992). Τα λαχανικά έχουν γενικά μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε νερό, εύρους ενενήντα έως ενενήντα έξι τις εκατό, σε σχέση με τα φρούτα, που έχουν λίγο μικρότερη περιεκτικότητα μεταξύ ογδόντα και ενενήντα τις εκατό (Dauthy M.E., 1995). Η μέγιστη περιεκτικότητα σε νερό ποικίλει από είδος σε είδος λόγω δομικών διαφορών.

Οι υδατάνθρακες αποτελούν το κύριο συστατικό των φρούτων και λαχανικών, καθώς αντιπροσωπεύουν πενήντα έως ογδόντα τις εκατό του ξηρού τους βάρους (Vicente Ariel R. et al., 2009). Η περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες φέρει μεγάλη διαφορά, ανάλογα με την κατηγορία του λαχανικού, με τα λαχανικά ριζών (root vegetables) να παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες. Στα φρούτα τα κύρια σάκχαρα είναι κυρίως η φρουκτόζη και η γλυκόζη, σε ίσες ποσότητες συνήθως καθώς επίσης και σακχαρόζη. Σε πολλά φρούτα (μήλα, αχλάδια, φράουλες, σταφύλια) η γλυκόζη και η φρουκτόζη απαντώνται σε μεγαλύτερες ποσότητες από τη σακχαρόζη, ωστόσο σε ορισμένα λαχανικά (παντζάρι, καρότο, κρεμμύδι, αρακά, γλυκοπατάτα) και ώριμα φρούτα η περιεκτικότητα σε σακχαρόζη είναι μεγαλύτερη (Vicente Ariel R. et al., 2009). Επίσης τα φρούτα και λαχανικά θεωρούνται καλές πηγές μεταλλικών στοιχείων και βιταμινών, κυρίως βιταμίνης C και καροτενίου, το οποίο συνεισφέρει στο χρώμα του καρπού. Αντίθετα η περιεκτικότητα σε λίπος και πρωτεΐνες είναι αρκετά χαμηλή. Επιπλέον τόσο τα φρούτα όσο και τα λαχανικά περιέχουν φυτικές ίνες, που δεν είναι άλλο από κυτταρίνη, ημικυτταρίνη λιγνίνη, ανθεκτικό άμυλο, πηκτίνες και μη χωνεύσιμους ολιγοσακχαρίτες. Στην περίπτωση των φρούτων και λαχανικών η περιεκτικότητα λιγνίνης είναι σχετικά χαμηλή.

Πίνακας 1.6.2: Γενική σύσταση φρούτων και λαχανικών ανά εκατό γραμμάρια καρπού (Lintas C., 1992).

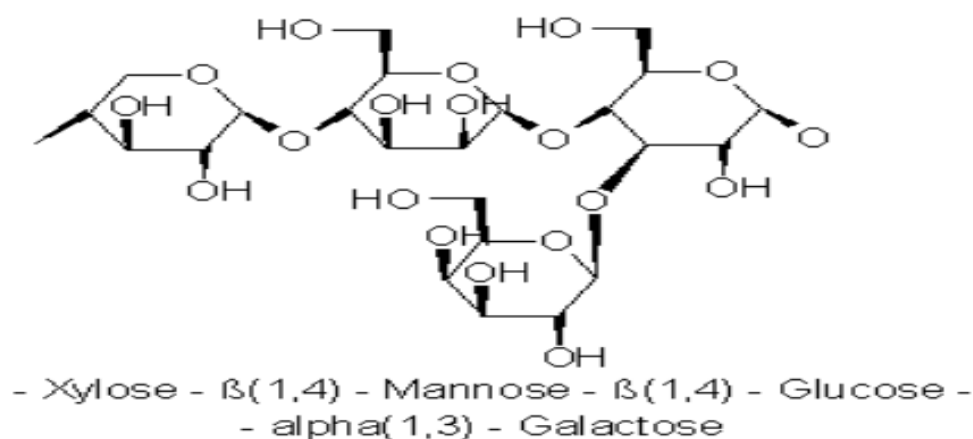
	Νερό (g/100g)	Υδατάνθρακες (g/100g)	Πρωτεΐνες (g/100g)	Λίπος (g/100g)	Φυτικές Ίνες (g/100g)	Μεταλλικά στοιχεία (mg/100g)	Βιταμίνες (mg/100g)
Φρούτα	80-95	1.5-26	0.5-15	0.1-1	0.2-6.4	Ca Fe K	6-50 0.3-1 110-450 β-καροτένιο 0.2-2 C 10-90 B6 0.03-0.35
Λαχανικά	79-96	0.5-18	0.5-5	0.1-1	0.8-8	Ca P Fe Na K	10-170 12-125 0.2-8 2-150 200-600 β-καροτένιο 0.1-5 C 3-230 B6 0.1-0.2

Η λιγνίνη, η κυτταρίνη και η ημικυτταρίνη αποτελούν τα λιγνοκυτταρινούχα συστατικά, τα οποία δομούν το κυτταρικό τοίχωμα των φυτών. Η κυτταρίνη είναι ένας ομο-πολυσακχαρίτης γλυκόζης στον οποίο τα μόρια γλυκόζης συνδέονται μεταξύ τους με β -1,4 γλυκοσιδικό δεσμό σε γραμμική αλυσίδα.



Σχήμα 1.6.1: Απεικόνιση κυτταρίνης (Li Yan, 2014)

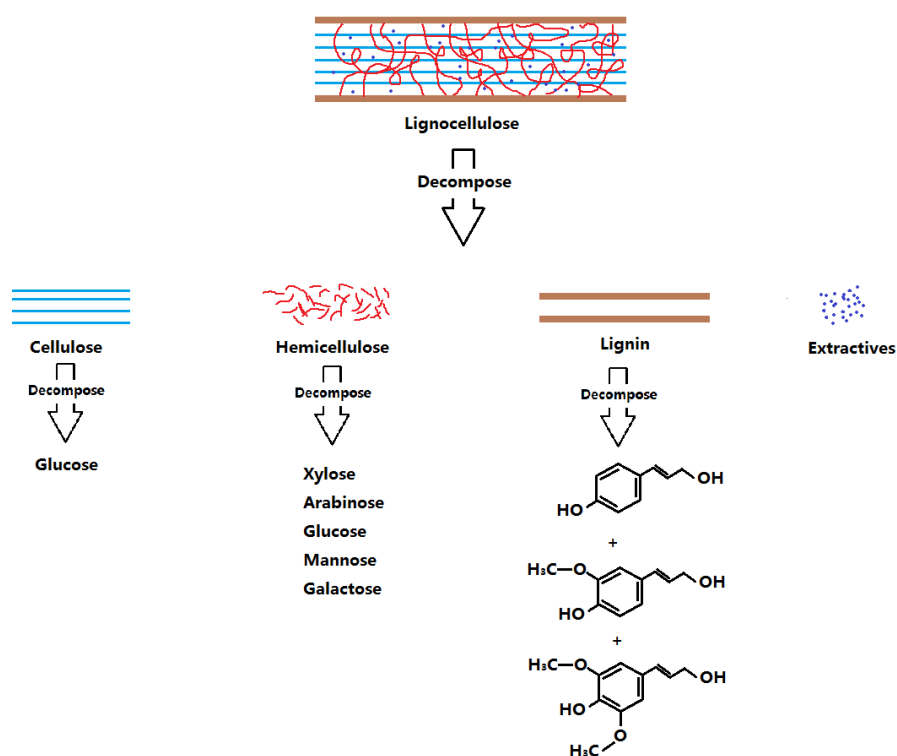
Η ημικυτταρίνη είναι έτερο-πολυσακχαρίτης μορίων κυρίως ξυλόζης αλλά και μαννόζης, γαλακτόζης, ραμνόζης και αραβινόζης που συνδέονται μεταξύ τους δημιουργώντας μικρού μήκους αλυσίδες με πολλές διακλαδισμένες μονάδες σακχάρων.



Σχήμα 1.6.2: Απεικόνιση ημικυτταρίνης (Li Yan, 2014)

Η κυτταρίνη και η ημικυτταρίνη περιβάλλονται από τη λιγνίνη, η οποία είναι σύμπλεγμα φαινολικών ομάδων και όλα είναι πολύ ισχυρά συνδεδεμένα μεταξύ τους. Τα σάκχαρα διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη βιομηχανία βιοδιυλιστηρίων καθώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως κύρια πηγή άνθρακα για παραγωγή χρήσιμων χημικών μέσω ζυμώσεων με βακτήρια. Τα κυτταρινούχα συστατικά

(κυτταρίνη, ημικυτταρίνη) μπορούν να μετατραπούν στους μονοσακχαρίτες τους με όξινη, αλκαλική ή ενζυμική υδρόλυση. Η κυτταρίνη είναι αδιάλυτη στο νερό και τους οργανικούς διαλύτες, ωστόσο υπό συγκεκριμένες συνθήκες μπορεί να αντιδράσει με το νερό, οπότε διασπώνται οι δεσμοί οξυγόνου και από τη μακρά αλυσίδα κυτταρίνης λαμβάνονται τελικά τα μόρια γλυκόζης. Όσο για την ημικυτταρίνη, αυτή διασπάται πιο εύκολα είτε μέσω όξινης, βασικής ή ενζυμικής υδρόλυσης με χρήση ημικυτταρινασών, ενώ τέλος το μεγαλύτερο μέρος της λιγνίνης λαμβάνεται ως αδιάλυτο υπόλειμμα.

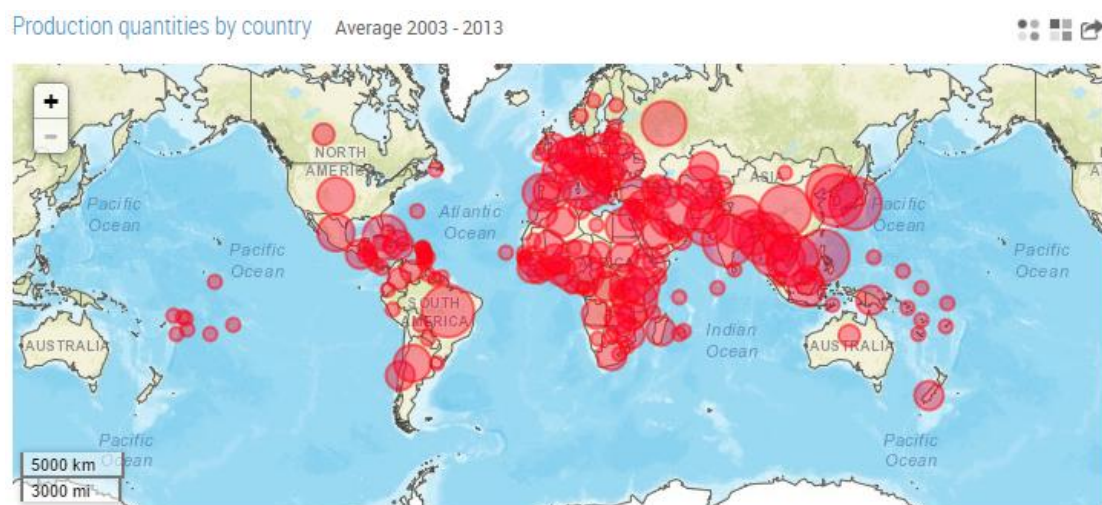


Σχήμα 1.6.3: Συστατικά λιγνοκυτταρινούχου περιεχομένου (Li Yan, 2014).

Για όξινη υδρόλυση μπορούν να χρησιμοποιηθούν οξέα όπως το υδροχλωρικό, το θειικό, το νιτρικό και το υδροφθορικό (Li Yan, 2014). Ιδιαίτερη σημασία έχει η θερμοκρασία που επιλέγεται για την υδρόλυση με ένα εύρος από 140-260°C. Σε υψηλότερες θερμοκρασίες πραγματοποιείται ταχεία μετατροπή της κυτταρίνης σε υδροξυ-μέθυλ-φουρφυράλη (HMF) και της ημικυτταρίνης σε φουρφυράλη. Η συγκέντρωση του οξέος έχει ιδιαίτερη σημασία σε χαμηλότερες κυρίως θερμοκρασίες

εύρους 100-120°C. Οι ενώσεις αυτές που δημιουργούνται κατά την όξινη υδρόλυση των λιγνοκυτταρινούχων υποστρωμάτων έχουν παρεμποδιστική δράση στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών ακόμη και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Γι' αυτό το λόγο πριν τη ζύμωση, για την παραγωγή κάποιου προϊόντος, συνήθως απαιτείται μία προεπεξεργασία του υποστρώματος με σκοπό να αφαιρεθεί η μεγαλύτερη ποσότητα των παρεμποδιστών (Palmqvist E., Hahn-Hagerdal B., 2000a; Palmqvist E., Hahn-Hagerdal B., 2000b).

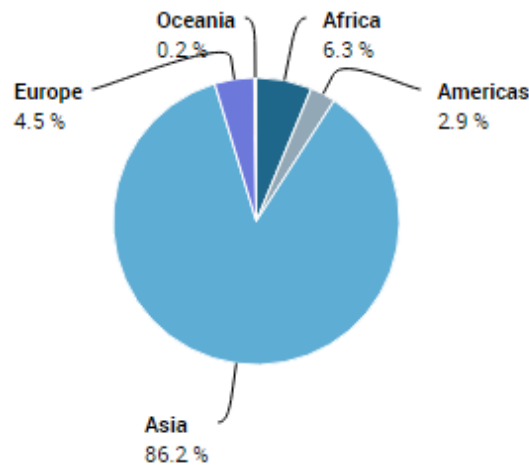
Η ετήσια παραγωγή λαχανικών για το έτος 2013 παγκοσμίως έφτασε τους 279.740.040 τόνους, στην Ευρωπαϊκή Ένωση έφτασε τους 7.578.716 τόνους και τέλος στη Ελλάδα έφτασε τους 78.000 τόνους. Αντίστοιχα η ετήσια παραγωγή φρούτων για το έτος 2013 παγκοσμίως έφτασε τους 32.994.326 τόνους, στην Ευρωπαϊκή Ένωση έφτασε τους 487.101 τόνους και τέλος στην Ελλάδα η παραγωγή έφτασε τους 14.000 τόνους. Όλα τα ανωτέρω στοιχεία ελήφθησαν από το FAO Statistical Yearbook 2016.



The designations employed and the presentation of material in the maps do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of FAO concerning the legal or constitutional status of any country, territory or sea area, or concerning the delimitation of frontiers. South Sudan declared its independence on July 9, 2011. Due to data availability, the assessment presented in the map for Sudan and South Sudan reflects the situation up to 2011 for the former Sudan.

Σχήμα 1.6.4: Σχηματική αναπαράσταση μέσου όρου παραγωγής φρέσκων λαχανικών ανά χώρα κατά το διάστημα των τελευταίων 10 ετών (2003-2013).

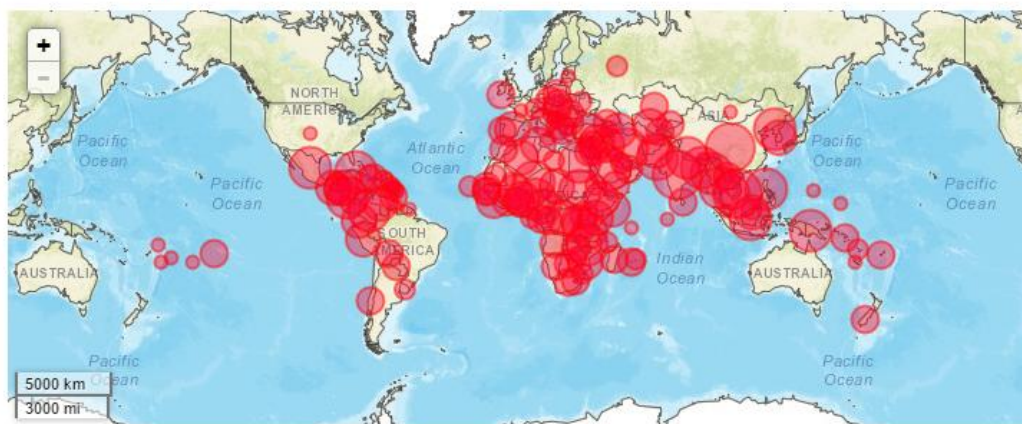
Production share by region Average 2003 - 2013



Σχήμα 1.6.5: Ποσοστό μέσου όρου παραγωγής φρέσκων λαχανικών ανά ήπειρο

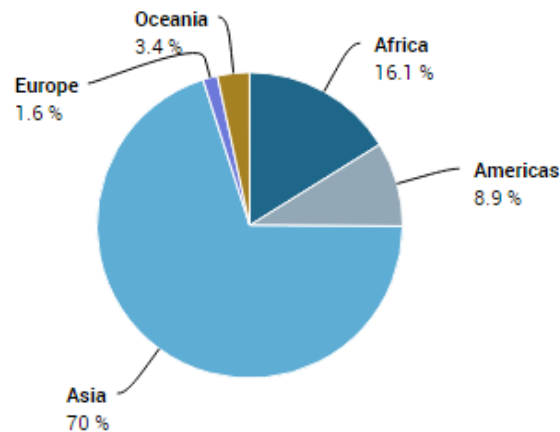
Από την Σχήμα 1.6.5 παρατηρούμε ότι η περισσότερη ποσότητα λαχανικών παράγεται στην Ασία σε ποσοστό 86,2% και ακολουθεί η Αφρική με ποσοστό παραγωγής 6,3%. Όσο για την Ευρώπη η παραγωγή λαχανικών φτάνει σε ποσοστό 4,5%, ακολουθούμενη από την Αμερική σε ποσοστό 2,9% και τέλος η Ωκεανία με μόλις 0,2% παραγωγή.

Production quantities by country Average 2003 - 2013



The designations employed and the presentation of material in the maps do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of FAO concerning the legal or constitutional status of any country, territory or sea area, or concerning the delimitation of frontiers. South Sudan declared its independence on July 9, 2011. Due to data availability, the assessment presented in the map for Sudan and South Sudan reflects the situation up to 2011 for the former Sudan.

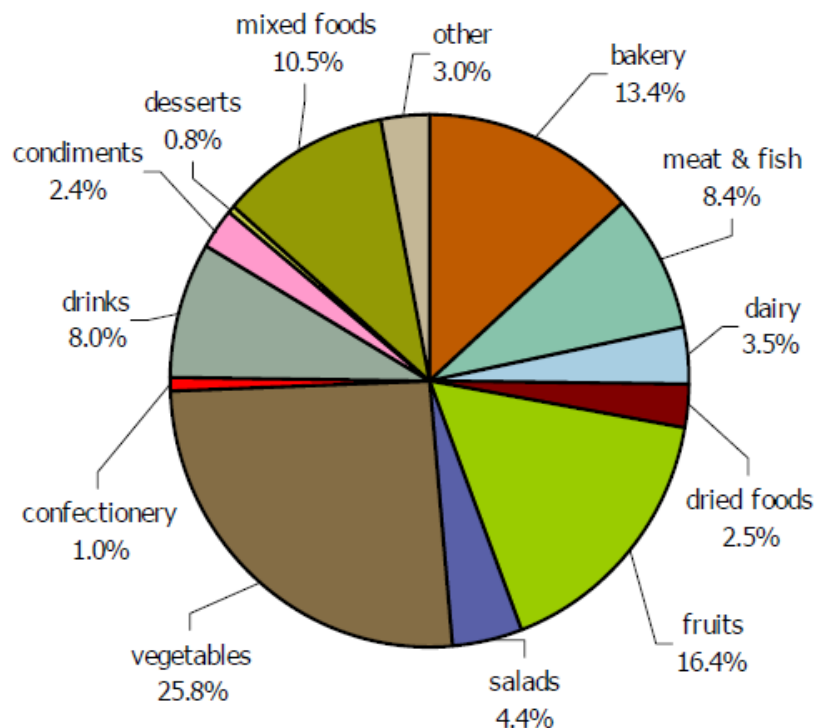
Σχήμα 1.6.6: Σχηματική αναπαράσταση μέσου όρου παραγωγής φρέσκων φρούτων ανά χώρα κατά το διάστημα των τελευταίων 10 ετών (2003-2013).



Σχήμα 1.6.7: Ποσοστό μέσου όρου παραγωγής φρέσκων φρούτων ανά ήπειρο

Από το Σχήμα 1.6.7 παρατηρούμε ότι η περισσότερη ποσότητα φρούτων παράγεται στην Ασία σε ποσοστό 70%. Ακολουθεί η Αφρική με ποσοστό παραγωγής 16,1%. Τρίτη σε σειρά έρχεται η Αμερική με ποσοστό 8,9%, ακολουθούμενη από την Ωκεανία με ποσοστό 3,4% ενώ τελευταία είναι η Ευρώπη με ποσοστό μόλις 1,6%.

Χονδρικά το 1/3 του συνόλου των τροφίμων που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση παγκοσμίως απορρίπτεται, ποσοστό που αντιστοιχεί σε 1,3 δισεκατομμύρια τόνους ετησίως (Gustavson J. et al., 2011). Ύστερα από μελέτη που διεξήχθη στο Ηνωμένο Βασίλειο και αφορούσε τα απόβλητα τροφίμων προερχόμενων κυρίως από τα νοικοκυριά, ελήφθησαν στοιχεία που φανερώνουν ότι πάνω από το 1/4 του βάρους του συνόλου των αποβλήτων τροφίμων αποτελούνται από λαχανικά, ποσοστό που αντιστοιχεί στο 25,8%, ενώ λίγο κάτω από το 1/5 του βάρους του συνόλου των αποβλήτων τροφίμων αποτελείται από φρούτα, ποσοστό που αντιστοιχεί στο 15,8% (Lorrayne Ventour, 2007).

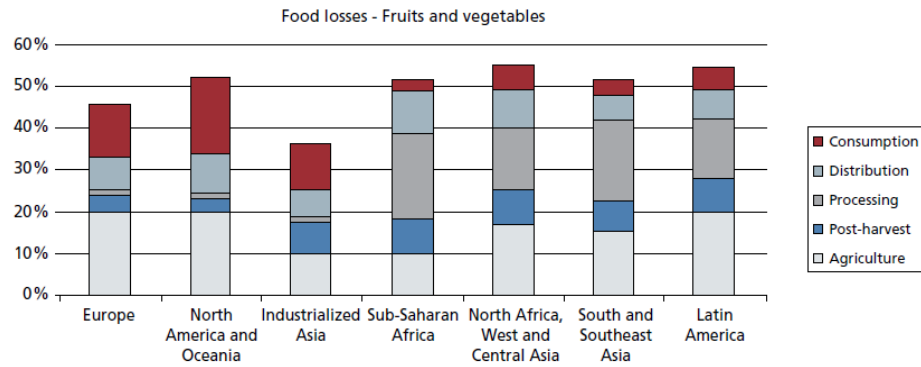


Σχήμα 1.6.8: Σχηματική απεικόνιση του συνόλου των αποβλήτων τροφίμων χωρισμένα σε ομάδες τροφίμων (Lorrayne Ventour, 2007).

Συγκεκριμένα τα απόβλητα φρούτων και λαχανικών μπορούν να ταξινομηθούν σε πέντε κατηγορίες αναλόγως της προέλευσής τους κατά την παραγωγική διαδικασία. Έτσι απόβλητα φρούτων και λαχανικών λαμβάνονται κατά το στάδιο:

- της παραγωγής (agriculture), από απώλειες λόγω μηχανικών βλαβών κατά τη συγκομιδή,
- του χειρισμού τους μετά τη συγκομιδή (post-harvest), λόγω αλλοιώσεων κακής αποθήκευσης και μεταφοράς
- της επεξεργασίας (processing) σε βιομηχανική ή οικιακή κλίμακα για παραγωγή παραδείγματος χάριν, χυμού. Επίσης σ αυτό το στάδιο μπορούν να ληφθούν απόβλητα από καρπούς που δεν επιδέχονται κανενός είδους επεξεργασία όπως το πλύσιμο, το ξεφλούδισμα, το τεμαχισμός ή ο βρασμός.
- της διανομής (distribution), που περιλαμβάνει απόβλητα από τις αγορές,

• της κατανάλωσης (consumption) σε οικιακό επίπεδο (Gustavsson J., et al 2011).



Σχήμα 1.6.9: Γραφική απεικόνιση της ταξινόμησης των αποβλήτων φρούτων και λαχανικών στις κατηγορίες της παραγωγικής διαδικασίας παγκοσμίως (Gustavsson J. et al, 2011).

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Βιολογικό υλικό

Για όλες τις ζυμώσεις χρησιμοποιήθηκαν πέντε στελέχη της οικογένειας Enterobacteriaceae τα οποία είναι : α) *Enterobacter aerogenes* 9, β) *Enterobacter aerogenes* 10, γ) *Enterobacter* sp, δ) *Enterobacter* sp. 208 και ε) *Citrobacter freundii* 207. Όλα τα στελέχη έχουν απομονωθεί από διάφορα είδη τροφίμων και ανήκουν στη συλλογή του εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Φυλάσσονται στους -80°C σε υπόστρωμα Tryptic Soy Broth (TSB) εμπλουτισμένο με 50% (v/v) καθαρής γλυκερόλης (Sigma Chemical, USA). Κατόπιν της ανανέωσής τους επωάζονται σε θερμοστατούμενο κλίβανο στους $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ για 24 ± 1 ώρες σε τρυβλία Petri σε υπόστρωμα αποτελούμενο από 0,5% πεπτόνη, 0,3% εκχύλισμα κρέατος και 1,5% άγαρ και διατηρούνται σε θερμοκρασία $4\pm 1^{\circ}\text{C}$, ενώ προκειμένου να διατηρηθεί η ζωτικότητα τους, πραγματοποιούνται ανανέώσεις κάθε ένα μήνα. Όλοι οι χειρισμοί γινόταν υπό ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής και τα θρεπτικά υποστρώματα, καθώς και οι πρώτες ύλες παρασκευάζονταν την στιγμή που θα χρησιμοποιούνταν και τοποθετούνταν σε αυτόκαυστο όπου και αποστειρώνονταν στους 121°C , 20 λεπτά.

2.2 Θρεπτικά υποστρώματα

Για κάθε μία από όλες τις ζυμώσεις, παρασκευάστηκαν δύο εμβόλια σε κωνικές φιάλες των 500mL. Αρχικά το θρεπτικό υπόστρωμα του κάθε εμβολίου, η σύσταση του οποίου παρουσιάζεται στον πίνακα 2.2.1 και είναι ίδια για όλες τις ζυμώσεις που διεξήχθησαν, αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο στους 121°C για 20 λεπτά. και μετά από παραμονή έως ότου φτάσει σε θερμοκρασία δωματίου, εμβολιάστηκε με μία αποικία του εκάστοτε μικροοργανισμού, που παραλήφθηκε από τρυβλία αποθηκευμένα στους 4°C , σε ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής. Κάθε εμβόλιο τοποθετήθηκε σε αναδευόμενο επωαστικό κλίβανο σε θερμοκρασία 30°C και ταχύτητα ανάδευσης 180rpm για 18 ώρες. Πριν τον εμβολιασμό της κύριας καλλιέργειας πραγματοποιούνταν έλεγχος της καθαρότητας και της ανάπτυξης του εμβολίου μέσω παρατήρησής του σε οπτικό μικροσκόπιο

τύπου Zeiss (Germany). Η πυκνότητα των κυττάρων για κάθε εμβόλιο ήταν σε παρόμοια επίπεδα πριν τον εμβολιασμό και μετριοτάαν σε φωτόμετρο στα 600nm.

Πίνακας 2.2.1 : Σύσταση θρεπτικού υποστρώματος εμβολίου.

Συστατικό	Συγκέντρωση (g/L)
Γλυκόζη	10
Πεπτόνη	5
Εκχύλισμα κρέατος	5
Εκχύλισμα ζύμης	2,5
K ₂ HPO ₄	2
CH ₃ COONa	5
MgSO ₄	0,41

2.3 Ζυμώσεις

2.3.1 Ζυμώσεις κλειστής καλλιέργειας σε κωνικές φιάλες.

Όσον αφορά τις κύριες καλλιέργειες των ζυμώσεων, αυτές είχαν ίδια σύσταση με τα εμβόλια όπως παρουσιάστηκε στον πίνακα 2.2.1. Όπως συνέβη και με τις προκαλλιέργειες μετά την παρασκευή τους ακολούθησε αποστείρωση στο αυτόκαυστο στους 121°C για 20 λεπτά. Ο εμβολιασμός τους έγινε με τη μία εκ των δύο προκαλλιεργειών που παρασκευάστηκαν, σε ασηπτικές εξίσου συνθήκες σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής.

Όλες οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες των 500mL με ενεργό όγκο 100mL εκ των οποίων το 10% v/v αυτού ήταν το εμβόλιο και τιμή pH περίπου στο 7. Κάθε ζύμωση έγινε εις διπλούν για να ελέγχεται η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων.

Στις ζυμώσεις με σκοπό τη μελέτη της ικανότητας των πέντε στελεχών να καταναλώνουν διαφορετικές πηγές άνθρακα, εκτός από γλυκόζη χρησιμοποιήθηκαν συνθετικά υποστρώματα με εμπορικά σάκχαρα, φρουκτόζη, μαννόζη, αραβινόζη, γαλακτόζη, ξυλόζη όλα σε συγκέντρωση 20g/L και τέλος σακχαρόζη σε συγκέντρωση 45g/L. με την υπόλοιπη σύσταση των κύριων καλλιεργειών να παραμένει ίδια.

Στις ζυμώσεις με το υδρόλυμα των λαχανικών και το εκχύλισμα των φρούτων ως πηγές άνθρακα, αυτά αποστειρώθηκαν ξεχωριστά από τα υπόλοιπα πρόσθετα συστατικά του μέσου ζύμωσης, πηγές αζώτου και άλατα και στην συνέχεια αναμίχθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες. Το εκχύλισμα φρούτων ήταν σε συγκεντρώσεις 20g/L και 40g/L. Ο μικροοργανισμός που χρησιμοποιήθηκε επελέγη βάσει των αποτελεσμάτων που πάρθηκαν από τις ζυμώσεις στα συνθετικά σάκχαρα και ήταν ο *Enterobacter* sp. Το υδρόλυμα των λαχανικών ήταν σε συγκέντρωση 15g/L έπειτα από συμπύκνωση μέσω εξάτμισης.

2.3.2 Ζυμώσεις ημισυνεχούς καλλιέργειας σε βιοαντιδραστήρα

Οι ζυμώσεις ημισυνεχούς καλλιέργειας πραγματοποιήθηκαν σε βιοαντιδραστήρα 1L με ενεργό όγκο 600mL, με εκχύλισμα φρούτων ως πηγή άνθρακα και προσθήκη αζώτου και αλάτων, σε συγκεντρώσεις όπως παρατίθενται στον πίνακα 2.2.1. Για τη ζύμωση χρησιμοποιήθηκε συμπυκνωμένο εκχύλισμα φρούτων και 1% εκχύλισμα ζύμης. Το αρχικό pH ρυθμίστηκε στην τιμή 7 και όταν η τιμή αυτή μειώθηκε στο 6,3, λόγω παραγωγής οξέων, ρυθμίστηκε με προσθήκη καυστικού νατρίου 5M. Η παροχή αέρα ρυθμίστηκε στα 0,5 vvm καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης ενώ το διαλυτό οξυγόνο διατηρούνταν στο 0,5% μέσω της ανάδευσης, που κυμαινόταν από 150-250rpm. Το εμβόλιο όγκου 60mL είχε σύσταση όπως παρουσιάστηκε στον πίνακα 2.2.1. Όλα τα θρεπτικά υποστρώματα, προκαλλιέργειες, τροφοδοσία του μικροοργανισμού, καυστικό νάτριο 5M αποστειρώθηκαν στο αυτόκαυστο στους 121°C για 20 λεπτά.

2.4 Συλλογή φρούτων και λαχανικών.

Όλα τα απόβλητα φρούτων και λαχανικών παραλήφθηκαν από την κεντρική λαχαναγορά Ρέντη. Σ' αυτά περιλαμβάνονταν φύλλα μαρουλιού, φύλλα παντζαριού, λάχανο, μπρόκολο, καρότα, μελιτζάνα, πιπεριές κόκκινες και πράσινες, φασολάκια, corn salad, tat soi salad, βανίλιες, μήλα και αχλάδια. Αρχικά όλα τα λαχανικά και φρούτα πολτοποιήθηκαν σε μπλέντερ και αποθηκεύτηκαν το καθένα ξεχωριστά στους -20°C. Αφού πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις σχετικά με την υγρασία τους, την περιεκτικότητα σε λιγνοκυτταρινούχα και δοκιμές υδρόλυσης, ώστε να βρεθεί αυτή που αποφέρει το μεγαλύτερο ποσοστό υδρόλυσης, οι πολτοί των λαχανικών

ομογενοποιήθηκαν σε έναν, ο οποίος υδρολύθηκε, φυγοκεντρήθηκε για την απομάκρυνση των στερεών και το υγρό που λήφθηκε συμπυκνώθηκε δύο φορές ώστε να έχει κατάλληλη συγκέντρωση σακχάρων αφού θα χρησιμοποιούνταν για ζύμωση ως πηγή άνθρακα. Κάθε πολτός φρούτων πολτοποιήθηκε ξεχωριστά και στη συνέχεια αποθηκεύτηκε στο ψυγείο στους 4°C. και τα υπερκείμενα αποτέλεσαν χωρίς καμία άλλη επεξεργασία το υπόστρωμα για τη ζύμωση.

2.5 Αναλύσεις

2.5.1 Προσδιορισμός υγρασίας

Αρχή της μεθόδου: Στηρίζεται στην εύρεση επί τοις % απώλειας του βάρους του δείγματος με την ξήρανσή του βάσει της παραδοχής ότι όλη η απώλεια του βάρους οφείλεται στην απομάκρυνση της υγρασίας του. Τα δείγματα ζυγίστηκαν ξεχωριστά σε αναλυτικό ζυγό (Mettler Toledo), έπειτα ξηράνθηκαν σε φούρνο (Mettmert) σε θερμοκρασία 60°C για 24 ώρες, τοποθετήθηκαν σε ξηραντήρα έτσι ώστε η θερμοκρασία του δείγματος να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου και ζυγίστηκαν σε αναλυτικό ζυγό. Η υγρασία υπολογίζεται από την Εξίσωση 1:

$$\% \text{ Υγρασία} = ((\text{Νωπό δείγμα (g)} - \text{Ξηρό δείγμα (g)})) / (\text{Νωπό δείγμα (g)}) * 100 \text{ (Εξίσωση 1)}$$

2.5.2 Προσδιορισμός περιεκτικότητας λιγνοκυτταρινούχων στα απόβλητα λαχανικών.

Στον ποιοτικό έλεγχο των ζωοτροφών χρησιμοποιούνται οι όροι Acid Detergent Fibre και Neutral Detergent Fibre και αποτελούν δείκτες της πρόσληψης ενέργειας μέσω της διατροφής, ειδικά σε μηρυκαστικά θηλαστικά. Τα συστατικά των φυτικών κυτταρικών τοιχωμάτων μπορούν να διαχωριστούν σε δύο κλάσματα ανάλογα με τη ικανότητα χώνευσης τους με απορρυπαντικά: 1) αυτά που δεν χωνεύονται εύκολα (ημικυτταρίνες, κυτταρίνη, λιγνίνη) και 2) ουσίες που χωνεύονται εύκολα (π.χ. άμυλο και σάκχαρα). Η τιμή της ADF αποτελεί δείκτη των αδιάλυτων συστατικών (κυτταρίνη, λιγνίνη) έπειτα από επεξεργασία με όξινο διάλυμα απορρυπαντικού. Όσο αυξάνει η τιμή της, τόσο δυσκολότερα θα χωνευθεί η ζωοτροφή. Η τιμή NDF αποτελεί το σύνολο των κυτταρικών τοιχωμάτων και συνίσταται από το κλάσμα της ADF και τις ημικυτταρίνες. Όσο αυξάνει η τιμή της, τόσο λιγότερη ζωοτροφή θα

καταναλωθεί από το ζώο. Τέλος η τιμή ADL (Acid Detergent Lignin) αποτελεί δείκτη της λιγνίνης.

Η μέθοδος προτάθηκε αρχικά για ζωοτροφές αλλά εφαρμόζεται και σε τρόφιμα κυρίως ολικής αλέσεως. Η όξινη υδρόλυση με H_2SO_4 παρουσία βρωμιούχου N-δεκαεξυλο-N,N,N-τριμεθυλο-αμμώνιο γίνεται για την καταβύθιση πρωτεϊνών και την απομάκρυνση απλών σακχάρων και αμύλου.



Σχήμα 2.5.2.1: Συσκευή προσδιορισμού κυτταρίνης-λιγνίνης.

Αντιδραστήρια

Διάλυμα όξινου απορρυπαντικού ή διάλυμα ADF: 20g βρωμιούχο N-δεκαεξυλο-N,N,N-τριμεθυλο-αμμώνιο αραιώνονται σε 1L θεικού οξέος C (H_2SO_4)= 0,5mol/L. Το διάλυμα πρέπει να αποθηκεύεται στο σκοτάδι στους 18 με 20°C.

Αντι-αφριστικός παράγοντας : δεκαϋδρόναφθαλίνιο (δεκαλίνη) (Προσοχή! Κατά την αποθήκευση παρουσία οξυγόνου, σχηματίζει εκρηκτικά υπεροξειδία).

Αρχή της μεθόδου NDF: Το μέρος των συστατικών του φυτικού υλικού τα οποία δεν απομακρύνονται (eluted) από ένα ουδέτερο απορρυπαντικό (neutral detergent), όπως περιγράφεται παρακάτω αποτελεί τις ίνες ουδέτερου απορρυπαντικού (NDF). Στις ζωοτροφές φυτικής προέλευσης, το περιεχόμενο της NDF υποδεικνύει το τμήμα της ημικυτταρίνης, κυτταρίνης, λιγνίνης και αζωτούχων ενώσεων λιγνίνης. Μετά την έκπλυση, με τη χρήση ουδέτερου απορρυπαντικού, το αδιάλυτο υπόλειμμα ξηραίνεται, ζυγίζεται, και κατόπιν αποτεφρώνεται. Η διαφορά

μεταξύ της περιεκτικότητας σε τέφρα και του ξηρού διαλυτού υπολείμματος είναι η περιεκτικότητα σε NDF. Η διαδικασία της διάλυσης και της διήθησης απλοποιείται με τη χρήση των Fibre Bags. Το πιο σημαντικό μέρος στην ανάλυση ινών είναι ο χρόνος έκπλυσης και η ακρίβεια της ζύγισης.

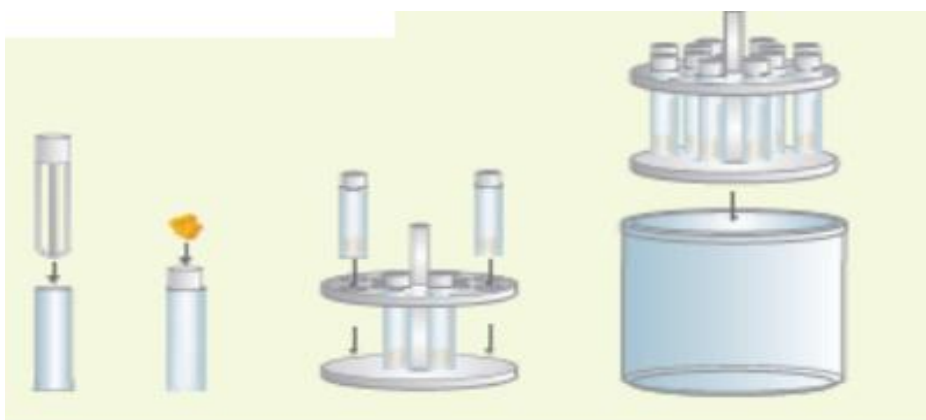
Αρχή της μεθόδου ADF: Το μέρος των συστατικών του φυτικού υλικού τα οποία δεν απομακρύνονται από ένα όξινο απορρυπαντικό (acid detergent), όπως περιγράφεται παρακάτω αποτελεί τις ίνες όξινου απορρυπαντικού (ADF). Στις ζωοτροφές φυτικής προέλευσης, το περιεχόμενο της ADF υποδεικνύει το τμήμα της κυτταρίνης, λιγνίνης και αζωτούχων ενώσεων λιγνίνης. Μετά την έκπλυση, με τη χρήση όξινου απορρυπαντικού, το αδιάλυτο υπόλειμμα ξηραίνεται, ζυγίζεται, και κατόπιν αποτεφρώνεται. Η διαφορά μεταξύ της περιεκτικότητας σε τέφρα και του ξηρού αδιάλυτου υπολείμματος είναι η περιεκτικότητα σε ADF. Η διαδικασία της διάλυσης και της διήθησης απλοποιείται με τη χρήση των Fibre Bags. Το πιο σημαντικό μέρος στην ανάλυση ινών είναι ο χρόνος έκπλυσης και η ακρίβεια της ζύγισης.

Σε φούρνο θερμοκρασίας $105\pm 1^{\circ}\text{C}$ για 1 ώρα ξηραίνεται ο απαραίτητος αριθμός των Fibre Bags. Το βάρος των Fibre Bags είναι η τιμή ml για το πρωτόκολλο ζύγισης. Στη συνέχεια τα Fibre Bags αποθηκεύονται σε ξηραντήρα μέχρι τη χρήση τους.

Το βάρος του δείγματος που πρόκειται να τοποθετηθεί στα Fibre Bags θα πρέπει να είναι 1g (ζύγιση με ακρίβεια 1mg), τιμή ml .

Η τιμή του τυφλού, καθορίζεται παράλληλα με την ανάλυση των δειγμάτων (Fibre Bag χωρίς δείγμα). Θα πρέπει να είναι $<1\text{mg/Fibre Bag}$. Αρκεί να καθοριστεί μία τιμή ανά πακέτο Fibre Bags. Τα γυάλινα διαχωριστικά εισέρχονται στα Fibre Bags και τα δύο μαζί τοποθετούνται στο καρουσέλ (Σχήμα 2.5.2.2). 360mL διαλύματος ADF μεταφέρονται σε ποτήρι ζέσεως. Προστίθενται πέτρες βρασμού και ως αντι-αφριστικός παράγοντας δεκαϋδρόναφθαλένιο. Το εργαλείο χειρισμού συνδέεται στο καρουσέλ και τοποθετείται προσεκτικά στο ποτήρι ζέσεως που περιέχει το διάλυμα ADF. Το καρουσέλ περιστρέφεται για περίπου 1 λεπτό, μέχρις ότου τα Fibre Bags διαβραχούν και γεμίσουν πλήρως με το διάλυμα. Κατόπιν το ποτήρι ζέσεως τοποθετείται στην προθερμασμένη εστία, η οποία αρχικά ρυθμίζεται σε λειτουργία μέγιστης ισχύς (για περίπου 3-5 λεπτά). Μόλις το διάλυμα αρχίσει να βράζει

μειώνεται η ισχύς της θέρμανσης. Το δείγμα αφήνεται σε ομαλό βρασμό για 60 λεπτά, παράλληλα τα δείγματα πρέπει να επιπλέουν ελεύθερα στα Fibre Bags. Αυτό ενισχύεται περιστρέφοντας το καρουσέλ με το εργαλείο χειρισμού ή με μια ελαφρά ανάδευση στο ποτήρι ζέσεως. Ακριβώς 60 λεπτά από την έναρξη του βρασμού απομακρύνεται το ποτήρι ζέσεως από την εστία, σηκώνεται το καρουσέλ έξω από το ποτήρι χρησιμοποιώντας το εργαλείο χειρισμού και με αυτό το τρόπο στραγγίζονται τα Fibre Bags από το διάλυμα. Το περιεχόμενο του ποτηριού ζέσεως απορρίπτεται στα απόβλητα. Τα δείγματα πλένονται 3-5 φορές με ζεστό νερό (περίπου 100mL) μέχρι να απαλλαχθούν από το απορρυπαντικό. Τα Fibre Bags με το υπόλειμμα του δείγματος τοποθετούνται σε προζυγισμένα χωνευτήρια (τιμή m6), τα οποία έχουν προηγούμενα αποτεφρωθεί στους 600°C. Τοποθετούνται σε φούρνο στους 105°C για τουλάχιστον 4 ώρες ή για όλη τη νύχτα και στη συνέχεια σε ξηραντήρα για 30 λεπτά και ζυγίζονται, τιμή m3. Το υπόλειμμα του δείγματος μαζί με το Fibre Bag αποτεφρώνεται στους 600°C για τουλάχιστον 4 ώρες ή μέχρι σταθεροποίησης του βάρους. Οι ατμοί που προκύπτουν δεν είναι επικίνδυνοι. Μετά την αποτέφρωση, το χωνευτήρι αφήνεται να ψυχθεί σε ξηραντήρα για 30 λεπτά και ζυγίζεται, τιμή m4.



Σχήμα 2.5.2.2: Προετοιμασία δείγματος και τοποθέτηση στο καρουσέλ.

Υπολογισμός περιεκτικότητας λιγνίνης, κυτταρίνης και ημικυτταρίνης:

Η περιεκτικότητα σε NDF ή ADF ή ADL είναι το μη διαλυτό μέρος που απομένει μετά το βρασμό στο έκαστο διάλυμα του απορρυπαντικού αφού αφαιρεθεί το περιεχόμενο σε τέφρα. Κατά συνέπεια, υπολογίζεται από τις Εξισώσεις 9, 10.

$$\% = \frac{((m3 - m1) - (m4 - m5)) \times 100}{m2} \quad (\text{Εξίσωση 9}), \text{ και } m5 = m7 - m6 \quad (\text{Εξίσωση 10})$$

Όπου:

m1 = μάζα του Fibre Bag (g)

m2 = μάζα αρχικού ξηρού δείγματος (g)

m3 = μάζα της κάψας με Fibre Bag και υπόλειμμα δείγματος μετά την πέψη (g)

m4 = μάζα κάψας με τέφρα (g)

m5 = μάζα τέφρας κενού Fibre Bag (g)

m6 = μάζα κάψας (g)

m7 = μάζα κάψας με τέφρα κενού Fibre Bag (g)

2.5.3 Ποσοτικός προσδιορισμός λιγνίνης και μονοσακχαριτών προερχόμενων από υδρόλυση κυτταρίνης και ημικυτταρίνης, σε στερεά δείγματα βιομάζας (NREL).

Οι υδατάνθρακες και η λιγνίνη αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος σε δείγματα βιομάζας. Οι υδατάνθρακες διαχωρίζονται στους πολυμερείς υδατάνθρακες α) την κυτταρίνη, β) την ημικυτταρίνη και σ' εκείνα τα συστατικά βιομάζας που δε συνδέονται με χημικούς δεσμούς, απομακρύνονται από τη βιομάζα με εκχυλίσεις ή πλύσεις με νερό και περιλαμβάνουν, τη σακχαρόζη, τα νιτρικά, τις πρωτεΐνες, την τέφρα, τη χλωροφύλλη και τους κηρούς. Όσο για τη λιγνίνη πρόκειται για ένα σύμπλεγμα φαινολικών πολυμερών.

Ακολουθεί μία δύο σταδίων υδρόλυση ώστε η βιομάζα να μετατραπεί σε μορφή που εύκολα μπορεί να ποσοτικοποιηθεί. Η λιγνίνη κλασματούνεται σε διαλυτή και αδιάλυτη λιγνίνη. Στο στερεό που αποτελεί την αδιάλυτη λιγνίνη μπορεί να περιέχονται επίσης τέφρα και πρωτεΐνες, τα οποία μετρώνται μέσω σταθμικής ανάλυσης. Η διαλυτή ωστόσο λιγνίνη μετράται μέσω φασματοφωτομετρίας υπεριώδους-ορατού (UV-Vis). Κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης τα πολυμερή υδατανθράκων μετατρέπονται στα αντίστοιχα μονομερή τους και στη συνέχεια

μετρώνται μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης HPLC. Το οξικό άλας υπολογίζεται εξίσου μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης HPLC. Σε περίπτωση που στη βιομάζα περιέχεται ημικυτταρίνη αποτελούμενη από ξυλάνη, αλλά όχι από μαννάνη, συνιστάται και μέτρηση της ποσότητας ακετυλίου.

Πριν την έναρξη της μεθόδου θα πρέπει να γίνει προετοιμασία των δειγμάτων, σύμφωνα με το εγχειρίδιο LAP “Preparation of Samples for Biomass Compositional Analysis”.

Συγκεκριμένα:

Το εύρος του μεγέθους των σωματιδίων πρέπει να είναι σύμφωνα με το εγχειρίδιο ώστε να μην υπάρχει στατιστικά μεγάλη απόκλιση στη συγκέντρωση των υδατανθράκων.

Δείγματα που περιέχουν εκχυλίσματα είναι ακατάλληλα για τη μέθοδο καθώς αυξάνεται το ποσοστό λιγνίνης

Δείγματα με ποσοστό τέφρας μεγαλύτερο του 10% κατά βάρος είναι ακατάλληλα

Δείγματα με περιεχόμενη υγρασία μεγαλύτερη από 10% κατά βάρος είναι ακατάλληλα γι' αυτό θα πρέπει όλα τα δείγματα να είναι λυοφιλιωμένα.

Δείγματα που περιέχουν πρωτεΐνες αυξάνουν το ποσοστό της αδιάλυτης λιγνίνης εκτός κι αν έχει υπολογιστεί μέσω σταθμικής ανάλυσης από το αδιάλυτο σε οξύ υλικό.

Αντιδραστήρια

Θεικό οξύ 72% w/w

Ανθρακικό ασβέστιο

Απιονισμένο νερό

Υψηλής καθαρότητας πρότυπα διαλύματα: D(+) γλυκόζη, D(+) ξυλόζη, D(+) γαλακτόζη, D(+) μαννόζη και L(+) αραβινόζη.

Πειραματική πορεία.

Ζυγίζονται $300 \pm 10 \text{ mg}$ λυοφιλωμένου δείγματος σε αναλυτικό ζυγό και τοποθετούνται στις φιάλες αναεροβίωσης. Η ανάλυση για κάθε δείγμα γίνεται εις διπλούν. Ο συνιστώμενος αριθμός δειγμάτων για μία ανάλυση είναι τρία έως έξι δείγματα κι όλα εις διπλούν.

Σε κάθε φιάλη αναεροβίωσης προστίθενται $3,00 \pm 0,01 \text{ mL}$ 72% θειικό οξύ. Αφού τα κλείσουμε αναδεύουμε ελαφρά ώστε όλο το δείγμα να βραχεί από το θειικό οξύ.

Τοποθετούμε τις φιάλες αναεροβίωσης σε υδατόλουτρο $30 \pm 3^\circ \text{C}$ και αφήνουμε για 60 ± 5 λεπτά, αναδεύοντας ανά τακτά χρονικά διαστήματα χωρίς όμως να βγάζουμε τα δείγματα από το υδατόλουτρο.

Προσθέτουμε $84,00 \pm 0,04 \text{ mL}$ απεσταγμένο νερό σε κάθε φιάλη αναεροβίωσης με σκοπό την αραίωση του θειικού οξέος στο 4% τελικής συγκέντρωσης και τα σφραγίζουμε.

Τοποθετούμε σε αυτόκαυστο στους 121°C και αφήνουμε για 30 λεπτά.

Παράλληλα ετοιμάζονται πρότυπα διαλύματα που περιέχουν γλυκόζη, ξυλόζη, γαλακτόζη, αραβινόζη και μαννόζη, σε συγκεντρώσεις που παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 2.6.3.1: Συγκεντρώσεις προτύπων διαλυμάτων.

Πρότυπα	Γλυκόζη (mg)	Ξυλόζη (mg)	Γαλακτόζη (mg)	Αραβινόζη (mg)	Μαννόζη (mg)
Ισομοριακό std1	600	600	600	600	600
High	400	1000	200	200	100
Concentration std2					
Medium	200	500	100	100	50
concentration std3					
Low	40	100	20	20	10
concentration std4					

Τα πρότυπα παρασκευάζονται σε τελικό όγκο 100mL και αποθηκεύονται στους -20°C . Για κάθε ανάλυση λαμβάνονται κατόπιν απόψυξης 10mL διαλύματος σε φιάλες αναεροβίωσης και προστίθενται σε κάθε ένα 348μL θεικού οξέος 72%. Έπειτα σφραγίζονται και τοποθετούνται κι αυτά μαζί με τα δείγματα στο αυτόκαυστο στους 121°C για 30 λεπτά. Αφήνουμε τις φιάλες αναεροβίωσης να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια διηθούμε υπό κενό όλα τα υγρά.

Για τον προσδιορισμό της αδιάλυτης λιγνίνης: Τοποθετούμε κάθε προζυγισμένο φίλτρο τύπου Whatman (Glass micro fiber filter 934-AH) με πόρους διαμέτρου 47mm, το οποίο είναι άκαυστο, μετά από κάθε διήθηση σε προζυγισμένη κάψα και στη συνέχεια στο φούρνο στους $105\pm 3^{\circ}\text{C}$ για τουλάχιστον τέσσερις ώρες, μέχρι σταθεροποίησης του βάρους τους. Αφού ζυγίσουμε την κάψα με το φίλτρο και το αδιάλυτο υπόλειμμα τις τοποθετούμε σε φούρνο $575\pm 25^{\circ}\text{C}$ για 4 ώρες. Το υπόλειμμα που θα έχει τελικά παραμείνει πάνω στο φίλτρο αποτελεί την αδιάλυτη λιγνίνη.

Για τον προσδιορισμό της διαλυτής λιγνίνης: Το υπερκείμενο που παραλαμβάνουμε μετά τη διήθηση φωτομετρούμε σε φασματοφωτόμετρο UV-VIS στα 240nm με την επιθυμητή τιμή να βρίσκεται μεταξύ 0,7-1. Εάν χρειαστεί αραιώση χρησιμοποιούμε απιονισμένο νερό που αποτελεί και το τυφλό δείγμα. Ο φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της διαλυτής λιγνίνης πρέπει να ολοκληρωθεί εντός 6 ωρών. Ωστόσο το υπερκείμενο που χρησιμοποιείται στη συνέχεια για τον προσδιορισμό των υδατανθράκων μπορεί να αποθηκευτεί στο ψυγείο για το πολύ δύο εβδομάδες.

Για τον προσδιορισμό των υδατανθράκων: Από το υπερκείμενο μετά τη διήθηση λαμβάνονται 2mL σε πλαστικό φιαλίδιο εις διπλούν, αραιώνονται με 10mM θεικού οξέος, φιλτράρονται με φίλτρο Whatman με πόρους διαμέτρου 0,2μm και ο προσδιορισμός γίνεται στην HPLC με στήλη AminexHPX-87P. Ξεχωριστά λαμβάνονται 20mL από το υπερκείμενο στο οποίο γίνεται διόρθωση pH μεταξύ των τιμών 5-6 με ανθρακικό ασβέστιο. Αφήνουμε σε ηρεμία ώστε να διαχωριστεί το υπερκείμενο από το στερεό ανθρακικό ασβέστιο που έχει προστεθεί και αφού γίνει και πάλι αραιώση με 10mM θεικού οξέος και φιλτράρισμα ακολουθεί ανάλυση στην HPLC με στήλη ShodexSP0810.

Υπολογισμοί:

Υπολογισμός ξηρού βάρους δειγμάτων

ODW= Weight_{air dry sample} *%Total solids/100(εξίσωση 1) όπου

%Total solids= (Weight_{dried sample plus dish}- Weight_{dish})*100/weight_{sample as received}

Υπολογισμός αδιάλυτου υπολείμματος (AIR) και αδιάλυτης λιγνίνης (AIL):

%AIR= (Weight_{crucible plus AIR}-Weight_{crucible})*100/ODW_{sample} (εξίσωση 2)

%AIL= [(Weight_{crucible plus AIR}-Weight_{crucible})-(Weight_{crucible plus ash}-Weight_{crucible})-Weight_{protein}] *100/ ODW_{sample} (εξίσωση 3)

Υπολογισμός διαλυτής λιγνίνης (ASL):

%ASL=UV_{abs} *Volume_{filtrate} *dilution*100/ε*ODW_{sample} *Pathlength (εξίσωση 4) όπου

Volume_{filtrate}= 86,73mL

Dilution= (Volume_{sample} +Volume_{diluting solvent})/ Volume_{sample}

ODW= βάρος ξηρού δείγματος σε mg

Pathlength= μήκος κύματος σε 1cm

ε= 25 (L/g*cm)

Υπολογισμός συνολικής λιγνίνης:

%Lignin= %ASL+%AIL(εξίσωση 5)

Υπολογισμός της εκατοστιαίας ποσότητας σακχάρου κάθε προτύπου που λήφθηκε μετά τη υδρόλυση

% R_{sugar} = C_{sugar by HPLC}(mg/mL)*100/C_{sugar before hydrolysis} (mL/mL) (εξίσωση 6)

Υπολογισμός της συγκέντρωσης του σακχάρου κάθε δείγματος μετά την υδρόλυση σύμφωνα με τις τιμές της HPLC

C_x (mg/mL)= C_{HPLC} (mg/mL)*dilution factor*100/%R_{sugar} (εξίσωση 6) (εξίσωση 7)

Υπολογισμός της συγκέντρωσης πολυσακχαριτών βάσει της συγκέντρωσης των μονοσακχαριτών

$$C_{\text{anhydro}} = C_{\text{corr}} * \text{Anhydro correction (εξίσωση 8) όπου}$$

$$C_{\text{corr}} = C_x \text{ (εξίσωση 7)}$$

Anhydro correction: είναι διορθωτικός συντελεστής που ισούται με 0,89 για τη ξυλόζη, γαλακτόζη και μαννόζη, 0,88 για αραβινόζη και 0,90 για γλυκόζη.

$$C_{\text{anhydro xylan}} = (\text{Xylose}_{\text{corr}} - \text{Xylose}_{\text{AA correction}}) * 132/150 \text{ (εξίσωση 9) όπου}$$

$$\text{Xylose}_{\text{AA correction}} = (C_{\text{acetic acid}}/C_{\text{xylose}}) * 17(\text{OH-MW})/132 \text{ (εξίσωση 10) (xylose MW)}$$

Υπολογισμός εκατοστιαίας τιμής κάθε σακχάρου «on an extractives free basis»

$$\% \text{Sugar}_{\text{ext free}} = C_{\text{anhydro}} * V_{\text{filtrate}} * 100 / \text{ODW}_{\text{sample}} * 1000 \text{ (εξίσωση 11) όπου}$$

$$V_{\text{filtrate}} = 86,73 \text{ mL}$$

Υπολογισμός εκατοστιαίας τιμής οξικού άλατος

$$\% \text{Acetate}_{\text{ext free}} = C_{\text{AA HPLC}} * \text{Volume}_{\text{filtrate}} * \text{conversion factor} * 100 / \text{ODW}_{\text{sample}} \text{ (εξίσωση 12) όπου}$$

$$C_{\text{AA HPLC}} = \text{συγκέντρωση οξικού οξέος όπως πάρθηκε από την HPLC σε mg/mL}$$

$$\text{Volume}_{\text{filtrate}} = 86,73 \text{ mL}$$

Conversion factor = 0,983, συντελεστής μετατροπής από οξικό οξύ σε οξικό άλας στη βιομάζα.

2.5.4 Προσδιορισμός και μέτρηση του pH

Το pH του διαλύματος της καλλιέργειας μετριόταν καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης, σε κάθε σημείο που λαμβανόταν ανά δύο ώρες με πεχάμετρο τύπου Jenway 3020 pH meter τύπου HI 2211 pH/ORP Meter, Hanna Instruments.

2.5.5 Προσδιορισμός κυτταρικής βιομάζας

Ο προσδιορισμός της βιομάζας έγινε με δύο τρόπους: Έμμεσα με τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (Optical Density, O.D.) σε φασματοφωτόμετρο

(Spectrometer, HitachiU-2000). Κατά τη διάρκεια όλων των ζυμώσεων που πραγματοποιήθηκαν, λαμβανόταν δείγμα 3mL από το υγρό της καλλιέργειας. 2mL αυτού μεταφέρονταν σε φιαλίδια τα οποία φυγοκεντρούνταν σε φυγόκεντρο τύπου Heraeus Sepatech Suprafuge 22 (9000rpm, 10min στους 7°C). Στη συνέχεια το ίζημα διαχωριζόταν από το υπερκείμενο στο οποίο πραγματοποιήθηκε λήψη της τιμής της απορρόφησης σε μήκος κύματος 660nm αφού πρώτα μετριοίταν η απορρόφηση σε δείγμα απεσταγμένου νερού που αποτελούσε το τυφλό δείγμα.

Το ίζημα, που αποτελούσε την παραγόμενη βιομάζα, μετά τη φυγοκέντρωση και ύστερα από δύο πλύσεις με απεσταγμένο νερό μεταφερόταν σε προζυγισμένα φιαλίδια και τοποθετούνταν μέχρι σταθεροποίησης του βάρους του, στο φούρνο στους 100°C. Στη συνέχεια παρέμεναν στο ξηραντήρα μέχρι να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου και ζυγίζονταν σε ζυγό ακριβείας τύπου Kern ABJ (4 δεκαδικών ψηφίων). Η διαφορά του άδειου φιαλιδίου από αυτό που έφερε το ξηρό υπόλειμμα ισούταν με την παραγόμενη βιομάζα.

2.5.6 Μέθοδος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των καταναλωθέντων σακχάρων και των παραγόμενων οξέων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC). Όλα τα δείγματα αρχικά φυγοκεντρήθηκαν και το υπερκείμενο υγρό χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των σακχάρων και των παραγόμενων οξέων αφού πρώτα αραιώθηκε με 10mM H₂SO₄ και φιλτραρίστηκε με τη χρήση φίλτρων Whatman που διέθεταν μεμβράνη με πόρους διαμέτρου 0,2μm.

Τα χαρακτηριστικά του υγρού χρωματογράφου που χρησιμοποιήθηκε ήταν:

Στήλη (στατική φάση): Aminex HPX-87H (Bio-rad, Richmond, USA)(300 mm x 7,8mm)

Κινητή φάση: 10mM H₂SO₄ σε απιονισμένο, απεσταγμένο και φιλτραρισμένο νερό.

Ανιχνευτής: RI (Shimadzu)

Αυτόματος δειγματολήπτης

Ροή κινητής φάσης: 0,6mL/min

Όγκος ένεσης: 10μL

2.6 Υδρολύσεις πολτού μίγματος λαχανικών

Γενικά υδρόλυση λιγνοκυτταρινούχου περιεχομένου μπορεί να πραγματοποιηθεί με οξέα, βάσεις και ενζυμικά (Yan Li., 2011). Στην όξινη και βασική υδρόλυση επιλέγονται κατάλληλες συνθήκες, συγκέντρωση οξέων/βάσεων, θερμοκρασίας και χρόνου υδρόλυσης με σκοπό τη λήψη του μεγαλύτερου ποσοστού υδρολύσεως. Στην ενζυμική υδρόλυση τα ένζυμα, ως βιολογικοί καταλύτες, δρουν στο γλυκοσιδικό δεσμό όπου προκύπτουν οι αντίστοιχοι μονοσακχαρίτες. Στην ενζυμική υδρόλυση της κυτταρίνης τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται είναι οι ενδο-γλυκανάσες, οι έξω-γλυκανάσες και οι β-γλυκοσιδάσες (Demers A. et al., 2012). Ωστόσο η όξινη υδρόλυση προτιμάται από την ενζυμική και σε βιομηχανική κλίμακα λόγω του μεγαλύτερου ποσοστού υδρολύσεως που αποφέρει (Silvia Morales-de la Rosa et al). Επίσης μπορεί να ολοκληρωθεί σε λιγότερο χρόνο ενώ δεν απαιτείται προεπεξεργασία του δείγματος, για απομάκρυνση της λιγνίνης, όπως στην ενζυμική υδρόλυση ώστε να έχουν πρόσβαση τα ένζυμα. Η ενζυμική υδρόλυση όμως πραγματοποιείται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (Demers A. et al., 2012) και χωρίς την παραγωγή παραπροϊόντων, που δρουν παρεμποδιστικά, όπως η φουρφουράλη και υδροξυ-μέθυλο φουρφουράλη (Dussán Kelly J. et al, 2014).

Στα λαχανικά πραγματοποιήθηκε χημική υδρόλυση με θειικό οξύ. Αρχικά έγιναν δοκιμές με διαφορετικές συγκεντρώσεις θειικού οξέος (0,5%, 1%, 3% και 7% w/w)σε διαφορετικούς χρόνους αποστείρωσης (15 και 30 λεπτά) ώστε να βρεθούν οι συνθήκες στις οποίες επιτυγχάνεται το μεγαλύτερο ποσοστό υδρολυμένης κυτταρίνης και ημικυτταρίνης . Γι' αυτές χρησιμοποιήθηκε το μπρόκολο σε ποσότητα 50g/L και 100g/L ξηρού βάρους διότι ήταν το λαχανικό στη μεγαλύτερη ποσότητα. Για τις δοκιμές χρησιμοποιήθηκαν φιάλες Duran 100 και 250mL με τελικό όγκο 50 και 100mL αντίστοιχα.

Πίνακας 2.5.1: Δοκιμές υδρόλυσης.

Ποσότητα ξηρού (g/L)	Ξηρό βάρος (g)	Ποσότητα H ₂ SO ₄ (mL)	Τελικός όγκος φιάλης Duran(mL)	Συγκέντρωση H ₂ SO ₄ (%)	Χρόνος αποστείρωσης (min.)
50	4,8	96	100	0,5	15
50	4,76	95	100	0,5	15
50	4,82	96	100	1	15
50	4,76	95	100	1	15
50	4,77	95	100	0,5	30
50	4,77	95	100	0,5	30
50	4,81	96	100	1	30
50	4,77	95	100	1	30
50	2,36	47	50	3	30
50	2,4	48	50	3	30
50	2,38	47	50	7	30
50	2,38	47	50	7	30
100	4,75	47	50	0,5	30
100	4,77	48	50	0,5	30
100	4,79	48	50	1	30
100	4,79	48	50	1	30
100	4,78	48	50	3	30
100	4,79	48	50	3	30
100	4,80	48	50	7	30
100	4,76	48	50	7	30

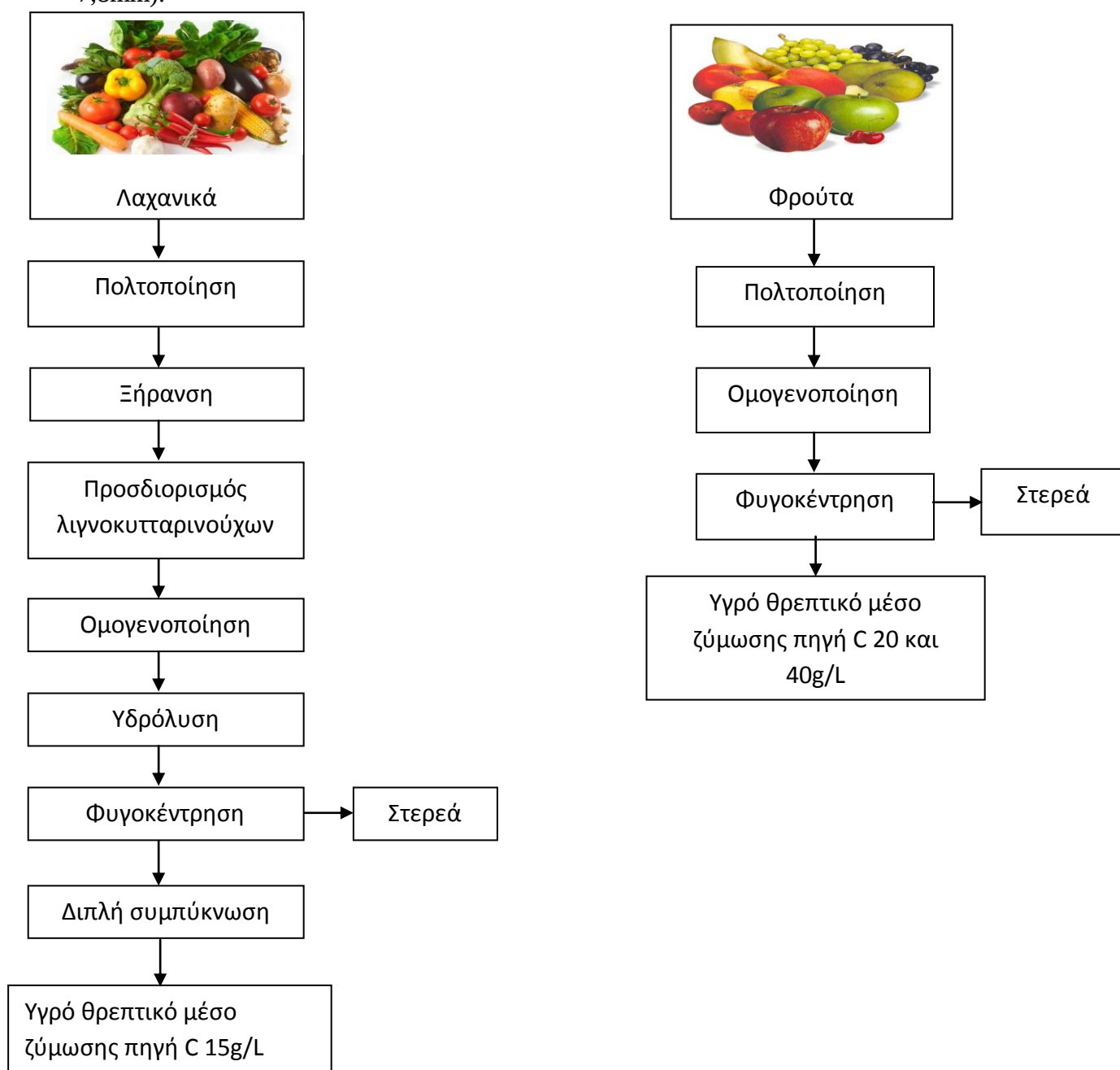
Η υγρασία του μπρόκολου υπολογίστηκε ότι είναι 0,90521. Το ξηρό βάρος, βάσει του οποίου υπολογίστηκε η ποσότητα H₂SO₄ που προστέθηκε σε κάθε δοκιμή, υπολογίστηκε από τον παρακάτω τύπο:

$$\text{ξηρό βάρος} = \text{νωπό δείγμα(g)} - (\text{νωπό δείγμα(g)} * \text{υγρασίαδείγματος})$$

Η ποσότητα θεικού οξέος που προστέθηκε υπολογίστηκε σύμφωνα με την ποσότητα που απαιτείται ώστε η τελική συγκέντρωση του ξηρού μπρόκολου να είναι 50 g/L. Η αρχική συγκέντρωση του θεικού οξέος που χρησιμοποιήθηκε ήταν 40% w/w και σύμφωνα με τον νόμο των αραιώσεων:

$c1 \left(\frac{g}{L} \right) * V1(L) = c2 \left(\frac{g}{L} \right) * V2(L)$ λήφθηκε το αραιωμένο θεικό οξύ για κάθε μία τις δοκιμές. Μετά την υδρόλυση ακολούθησε διήθηση με διηθητικό χαρτί Whatman filter paper 1 με διάμετρο πόρων 25mm και το υπερκείμενο που λήφθηκε μοιράστηκε σε ίσες ποσότητες. Στη μισή ποσότητα έγινε διόρθωση pH, με ανθρακικό ασβέστιο, μεταξύ των τιμών 5-6. Στα δείγματα των 50g/L έγινε αραιώση 1:5 με θεικό οξύ

10mM ενώ σ' αυτά των 100g/L αραιώση 1:20, όλα σε τελικό όγκο 2mL. Ακολούθησε φιλτράρισμα με φίλτρο Whatman που διέθεταν μεμβράνη με πόρους διαμέτρου 0,2μm. και στο τέλος ανάλυση HPLC με στήλη Shodex SP0810. Στην υπόλοιπη μισή ποσότητα τα δείγματα των 50g/L αραιώθηκαν 1:5 με θειικό οξύ 10mM ενώ εκείνα των 100g/L αραιώθηκαν 1:20, όλα σε τελικό όγκο 2mL. Ακολούθησε φιλτράρισμα με φίλτρο Whatman που διέθεταν μεμβράνη με πόρους διαμέτρου 0,2μm. και στο τέλος ανάλυση HPLC με τη στήλη Aminex HPX-87H (Bio-rad, Richmond, USA)(300mm x 7,8mm).



Σχήμα 2.6.1: Διαγράμματα επεξεργασίας λαχανικών-φρούτων

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ–ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Προσδιορισμός περιεκτικότητας λιγνοκυτταρινούχων στα απόβλητα λαχανικών.

Από τον πίνακα 3.1.1 παρατηρούμε ότι η τιμή της κυτταρίνης για τα διάφορα λαχανικά κυμάνθηκε από 6,54, στα καρότα, έως 22,4 στο μαρούλι. Η τιμή της ημικυτταρίνης κυμάνθηκε από 3,19, στο λάχανο, έως 9,85 στα corn salad και tat soi salad. Τέλος η αυξημένη τιμή της λιγνίνης οφείλεται στην προσμέτρηση της μη χωνεύσιμης πρωτεΐνης (crude protein) σ' αυτή και κυμάνθηκε από 7,8, στα φασολάκια, έως 28,47 στη μελιτζάνα. Γενικά όλα τα λαχανικά περιέχουν κυτταρίνη σε μεγαλύτερο ωστόσο ποσοστό παρατηρείται στα φυλλώδη λαχανικά όπως το μαρούλι εξ' ου και το ποσοστό στους πολτούς του μαρουλιού, των πράσινων λαχανικών και των corn salad tat soi salad. Επίσης το ποσοστό κυτταρίνης σε φασολάκια (12,63), σε λάχανο (12,92) και μπρόκολο (14,24) πλησιάζει αρκετά τις τιμές σύμφωνα με τους B. Rani et al. (1994).

Πίνακας 3.1.1: Εκατοστιαία περιεκτικότητα λαχανικών σε λιγνοκυτταρινούχα σύμφωνα με τις μεθόδους ADF, ADL, NDF.

Πολτός λαχανικού	Κυτταρίνη %g/g _{ξηρού βάρους} (ADF-ADL)	Ημικυτταρίνη %g/g _{ξηρού βάρους} (NDF-ADF)	Λιγνίνη%g/g _{ξηρού βάρους} (ADL)
Corn salad tat soi	15,21	9,85	11,65
Μείγμα πράσινων	20,10	4,56	12,90
Πιπεριές	10,18	4,17	11,48
Μελιτζάνα	4,83	9,30	28,47
Μαρούλι	22,40	5,07	9,09
Φασολάκια	12,63	5,67	7,80
καρότα	6,54	7,89	12,47
Λάχανο	12,92	3,19	7,94
Μπρόκολο	14,24	7,70	12,98

Παρόμοια και στη μέθοδο της NREL η περιεκτικότητα των λαχανικών σε κυτταρίνη κυμάνθηκε από 12,04% στο μείγμα πράσινων έως 26,6% στα φασολάκια. Η περιεκτικότητα της ημικυτταρίνης κυμάνθηκε από 3,19 στο λάχανο έως 9,85 στο corn salad tat soi salad. Καθώς πρόκειται για διαφορετικές μεθόδους ως προς την

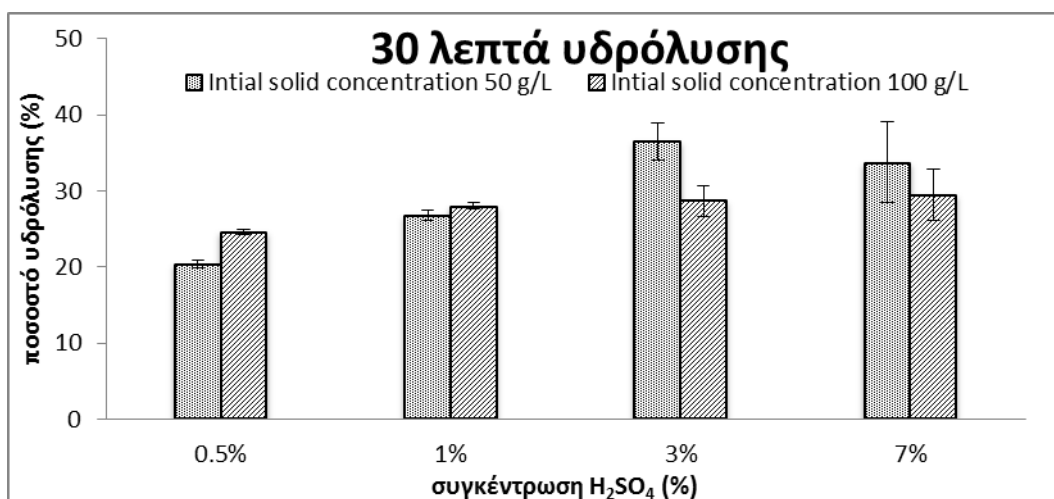
επεξεργασία των δειγμάτων και τα αντιδραστήρια δικαιολογούνται οι μικρές διαφορές στο ποσοστό κυτταρίνης και ημικυτταρίνης

Πίνακας 3.1.2: Εκατοστιαία περιεκτικότητα λαχανικών σε κυτταρινούχα συστατικά σύμφωνα με τη μέθοδο της NREL.

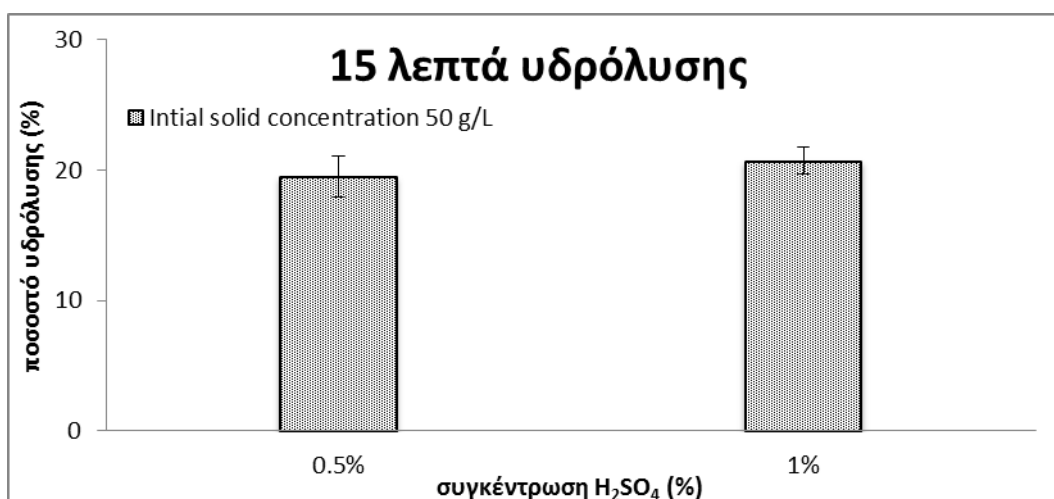
Πολτός λαχανικού	Κυτταρίνη (%g/g _{ξηρού βάρους})	Ημικυτταρίνη (%g/g _{ξηρού βάρους})
Corn salad tat soi salad	21,18	11,88
Μείγμα πράσινων	12,04	4,06
Πιπεριές	16,41	3,27
Μελιτζάνα	17,60	3,93
Μαρούλι	12,97	8,51
Φασολάκια	26,60	6,41
Καρότα	12,04	3,93
Λάχανο	25,94	10,99
Μπρόκολο	17,60	9,29

3.2 Επιλογή συνθηκών υδρόλυσης του πολτού λαχανικών.

Από το σχήμα 3.2.1 παρατηρούμε ότι με τη συγκέντρωση των 50g/L ξηρού μπρόκολου το ποσοστό υδρόλυσης αυξανόταν, παρουσιάζοντας τη μεγαλύτερη τιμή σε συγκέντρωση θεικού οξέος 3% (w/w) περίπου στο 37%. Ωστόσο στη μεγαλύτερη συγκέντρωση του 7% (w/w) το ποσοστό υδρόλυσης μειώθηκε κάτω από 35%. Όσον αφορά στο χρόνο της υδρόλυσης, μετά τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε 50g/L ξηρού μπρόκολου σε 0,5% και 1% (w/w) θεικού οξέος φαίνεται, από τα δύο παραπάνω γραφήματα, ότι το ποσοστό υδρόλυσης ήταν χαμηλότερο σε σχέση με αυτό στα τριάντα λεπτά υπό τις ίδιες υπόλοιπες συνθήκες οπότε και επελέγη τελικά χρόνος υδρόλυσης τα τριάντα λεπτά. Τα ίδια πειράματα στα τριάντα λεπτά υδρόλυσης, με συγκέντρωση θεικού οξέος από 0,5% έως 7% πραγματοποιήθηκαν και σε 100g/L ξηρού μπρόκολου, ωστόσο όπως φαίνεται και από το αντίστοιχο γράφημα, σχήμα 3.2.1, το ποσοστό υδρόλυσης κυμάνθηκε σε παρόμοιες τιμές, από 25% έως 30% και χαμηλότερες από αυτή του 37%, των 50g/L με 3% (w/w) θεικού οξέος.



Σχήμα 3.2.1: Ποσοστά υδρολύσεως του πολτού λαχανικών ανάλογα με τη συγκέντρωση του θεικού οξέος σε χρόνο τριάντα λεπτών στους 121°C.



Σχήμα 3.2.2: Ποσοστά υδρολύσεως του πολτού λαχανικών ανάλογα με τη συγκέντρωση του θεικού οξέος (0,5%, 1%) σε χρόνο δεκαπέντε λεπτών στους 121°C.

Έτσι βάσει των ανωτέρω αποτελεσμάτων οι συνθήκες που απέφεραν το καλύτερο ποσοστό υδρόλυσης κυτταρίνης και ημικυτταρίνης ήταν με 3% (w/w) θεικό οξύ, στους 121°C για 30 λεπτά. Σύμφωνα με τους Ajani A. O. et al. (2011) πρέπει οι συνθήκες υδρόλυσης, ιδιαίτερα η συγκέντρωση του θεικού οξέος, να μην είναι πολύ ισχυρές καθώς έτσι μειώνεται το ποσοστό υδρόλυσης, γιατί μέρος της γλυκόζης που προκύπτει από την υδρόλυση της κυτταρίνης μετατρέπεται σε οργανικά οξέα ή φουρφοουράλη και υδροξυμεθυλφουρφοουράλη μειώνοντας έτσι το ποσοστό υδρόλυσης (hydrolysis yield).

3.3 Παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης από συνθετικά υποστρώματα εμπορικών σακχάρων.

Καθένα από τα πέντε στελέχη της οικογένειας *Enterobacteriaceae* αναπτύχθηκε σε επτά διαφορετικά συνθετικά υποστρώματα εμπορικών σακχάρων, γλυκόζης, φρουκτόζης, μαννόζης, αραβινόζης, γαλακτόζης, ξυλόζης, συγκέντρωσης 20g/L και σακχαρόζης 45g/L, ώστε να εξετασθεί για καθένα στέλεχος η ποσότητα βουτανοδιόλης που μπορεί να παράγει καταναλώνοντας κάθε μία από τις προαναφερθείσες πηγές άνθρακα. Η ανάπτυξή τους πραγματοποιήθηκε σε κωνικές φιάλες των 500mL με ενεργό όγκο 100mL, εκ των οποίων 10% αυτού αποτελούσε το εμβόλιο, υπό ανάδευση 180rpm και θερμοκρασία 30°C.

3.3.1 Παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης με χρήση του στελέχους *Enterobacter* sp.

Η κατανάλωση επτά διαφορετικών σακχάρων καθώς και η παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης και άλλων προϊόντων μελετήθηκαν για το στέλεχος *Enterobacter* sp.

Όπως είναι εμφανές στα σχήματα, όσον αφορά την κατανάλωση της πηγής άνθρακα παρατηρούμε ότι οι τέσσερις από τις έξι πηγές καταναλώνονται μέχρι και τις 12 πρώτες ώρες ζύμωσης. Πιο συγκεκριμένα η γαλακτόζη (Σχήμα 3.3.1.5) και η γλυκόζη (Σχήμα 3.3.1.7) έχουν καταναλωθεί στις οχτώ ώρες ζύμωσης, για την αραβινόζη (Σχήμα 3.3.1.1), τη φρουκτόζη (Σχήμα 3.3.1.3) και τη μαννόζη (Σχήμα 3.3.1.9) απαιτήθηκαν δέκα ώρες μέχρι την ολική κατανάλωση των σακχάρων, ενώ η ξυλόζη (Σχήμα 3.3.1.11) έχει καταναλωθεί στις δώδεκα ώρες. Καθότι η σακχαρόζη (Σχήμα 3.3.1.13) που χρησιμοποιήθηκε ήταν μεγαλύτερης συγκέντρωσης, της τάξεως των 45g/L, είναι λογικό να καταναλωθεί σε μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Έτσι όπως φαίνεται και από το αντίστοιχο γράφημα η σακχαρόζη καταναλώθηκε στις είκοσι ώρες ζύμωσης.

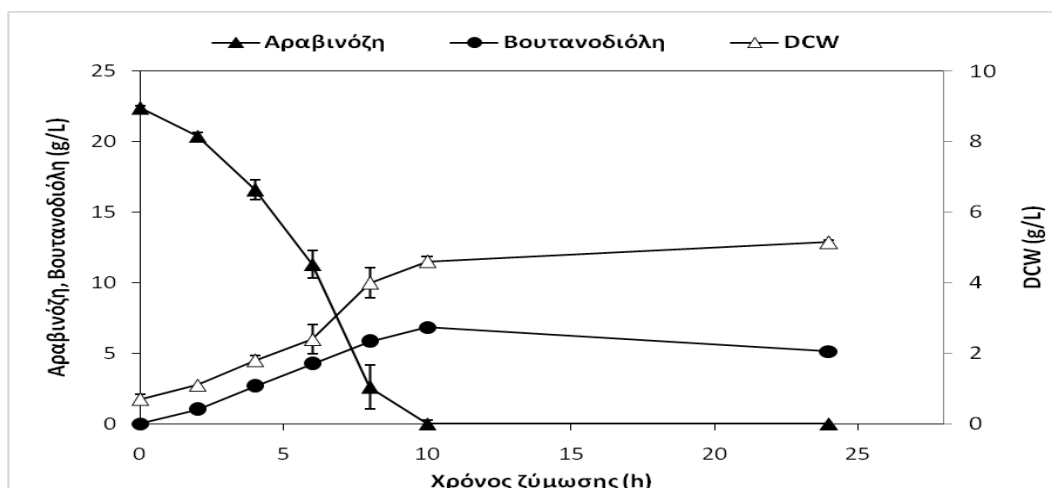
Η παραγωγή 2,3 βουτανοδιόλης, με πηγές άνθρακα αραβινόζη, γλυκόζη και μαννόζη, ξεκινά από τις δύο πρώτες ώρες της ζύμωσης, ενώ με πηγές άνθρακα φρουκτόζη, γαλακτόζη και ξυλόζη ξεκινά στις τέσσερις ώρες ζύμωσης. Η μέγιστη παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη παρατηρείται στις οχτώ ώρες με συγκέντρωση 8,05g/L, συντελεστή αποδόσεως $Y = 0,38\text{g/g}$ και παραγωγικότητα $P = 1,01\text{g/L}\cdot\text{h}$. Για την αραβινόζη, φρουκτόζη, γαλακτόζη και μαννόζη μέγιστη παραγωγή παρατηρείται στις δέκα ώρες. Η μέγιστη συγκέντρωση 2,3-βουτανοδιόλης για την αραβινόζη έφτασε τα 6,855g/L, με συντελεστή αποδόσεως

$Y = 0,31\text{g/g}$ και παραγωγικότητα $P = 0,69\text{ g/L}\cdot\text{h}$, για τη φρουκτόζη, τα $7,675\text{g/L}$, με συντελεστή αποδόσεως $Y = 0,37\text{g/g}$ και παραγωγικότητα $P = 0,73\text{g/L}\cdot\text{h}$, για τη γαλακτόζη τα $7,25\text{g/L}$ με συντελεστή αποδόσεως $Y = 0,37\text{g/g}$ και παραγωγικότητα $P = 0,73\text{g/L}\cdot\text{h}$ και για την αραβινόζη τα $8,6\text{g/L}$ με συντελεστή αποδόσεως $Y = 0,38\text{g/g}$ και παραγωγικότητα $P = 0,86\text{g/L}\cdot\text{h}$. Στην περίπτωση της ξυλόζης μέγιστη παραγωγή παρατηρείται στις δώδεκα ώρες με $8,2\text{g/L}$, συντελεστή αποδόσεως $Y = 0,38\text{g/g}$ και παραγωγικότητα $P = 0,68\text{g/L}\cdot\text{h}$.

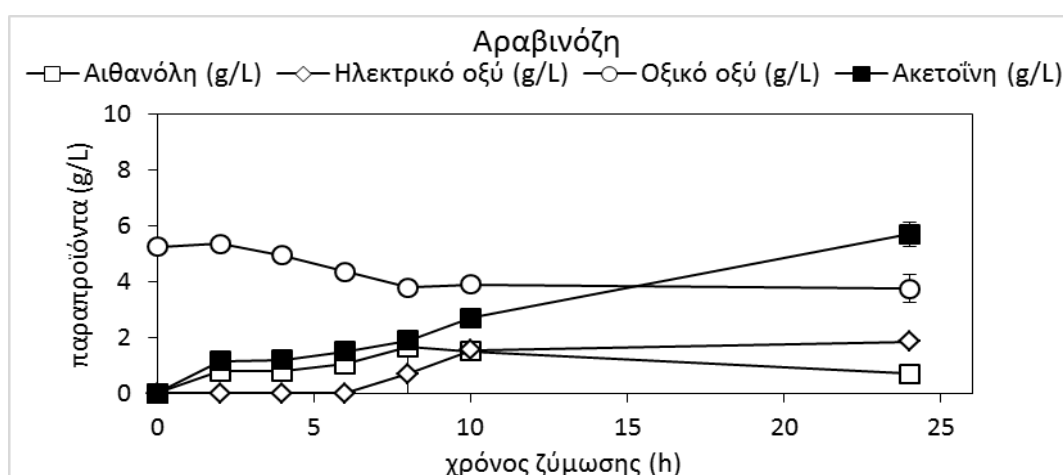
Χρησιμοποιώντας τη σακχαρόζη η παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης ξεκινά μετά τις δύο πρώτες ώρες ζύμωσης και λαμβάνει τη μέγιστη τιμή συγκεντρώσεως στις είκοσι ώρες ζύμωσης όπου και έχει καταναλωθεί όλη η πηγή άνθρακα. Συγκεκριμένα η 2,3-βουτανοδιόλη φτάνει τα $18,25\text{g/L}$ με συντελεστή αποδόσεως $Y = 0,40\text{g/g}$ και παραγωγικότητα $P = 0,91\text{g/L}\cdot\text{h}$.

Όσον αφορά την παραγόμενη βιομάζα, αυτή παρουσίασε παρόμοια συμπεριφορά, ως προς το ρυθμό παραγωγή της και στις έξι πηγές άνθρακα φτάνοντας κατά μέσο όρο τα $5,2\text{g/L}$. Πιο συγκεκριμένα παρατηρήθηκε εκθετικός ρυθμός παραγωγής της κατά τις οχτώ με δέκα ώρες ζύμωσης, ανάλογα με την πηγή άνθρακα, ενώ από το σημείο εκείνο και μετά η βιομάζα αυξανόταν με μικρότερο ρυθμό. Τέλος στην περίπτωση της σακχαρόζης η βιομάζα που παράχθηκε έφτασε τα $5,7\text{g/L}$.

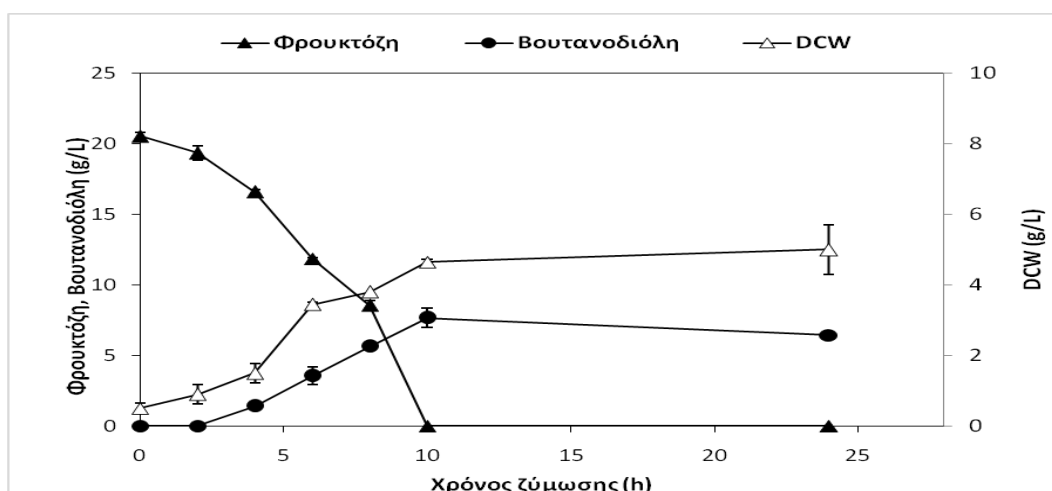
Η παραγωγή των παραπροϊόντων παρουσίασε παρόμοια συμπεριφορά για όλες τις πηγές άνθρακα. Η συγκέντρωση του οξικού οξέος κυμάνθηκε από $4\text{-}5\text{g/L}$, του ηλεκτρικού οξέος από $1\text{-}2\text{g/L}$, της αιθανόλης από $1\text{-}2\text{g/L}$ και της ακετοΐνης από $1,7\text{-}2,7\text{g/L}$. Για τη σακχαρόζη η συγκέντρωση του οξικού οξέος μεταβλήθηκε από $7,65\text{-}1,3\text{g/L}$, του ηλεκτρικού οξέος έφτασε τα 3g/L , και της αιθανόλης τα $3,4\text{g/L}$. Από όλες τις πηγές άνθρακα που μελετήθηκαν ο μικροοργανισμός *Enterobacter* sp. κατανάλωσε πιο αποδοτικά την γλυκόζη καθώς η μέγιστη παραγωγικότητα ήταν $1,01\text{g/L}\cdot\text{h}$.



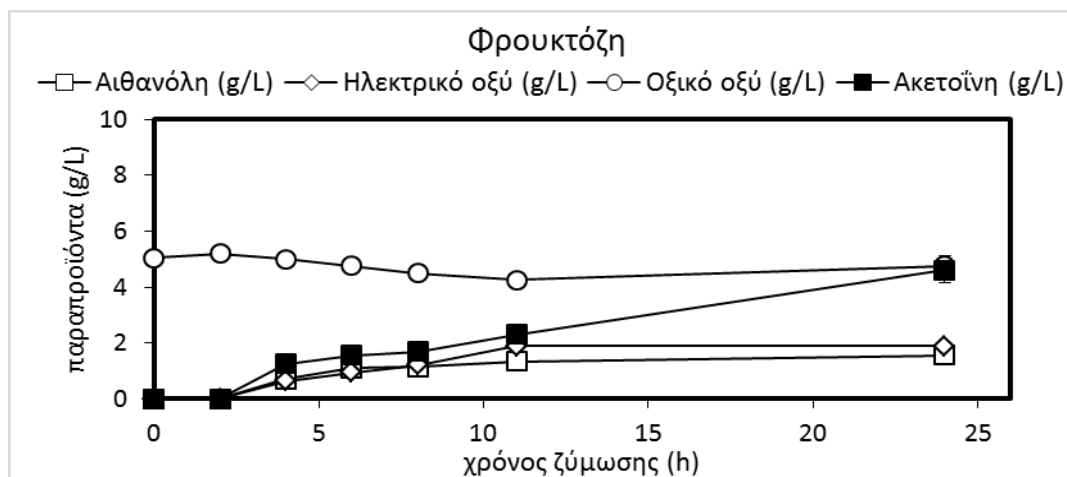
Σχήμα 3.3.1.1: Γράφημα κατανάλωσης αραβινόζης, παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης, παραγωγής βιομάζας με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter* sp.



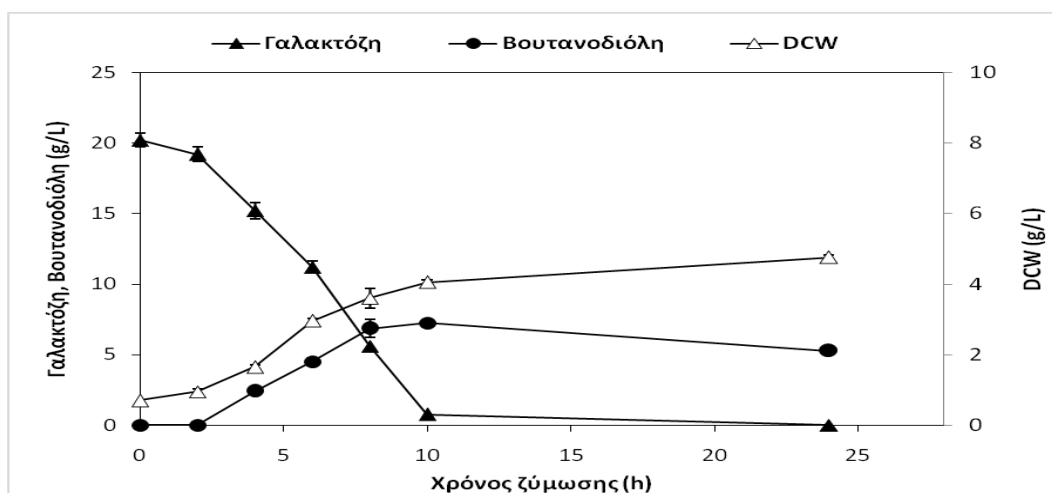
Σχήμα 3.3.1.2: Γράφημα παραγωγής παραπροϊόντων με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter* sp.



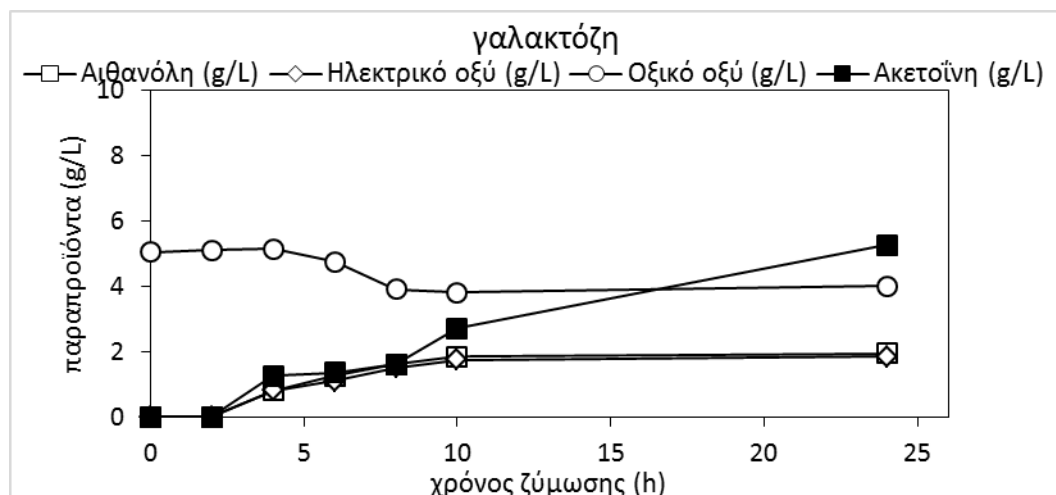
Σχήμα 3.3.1.3: Γράφημα κατανάλωσης φρουκτόζης, παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης, παραγωγής βιομάζας με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter* sp.



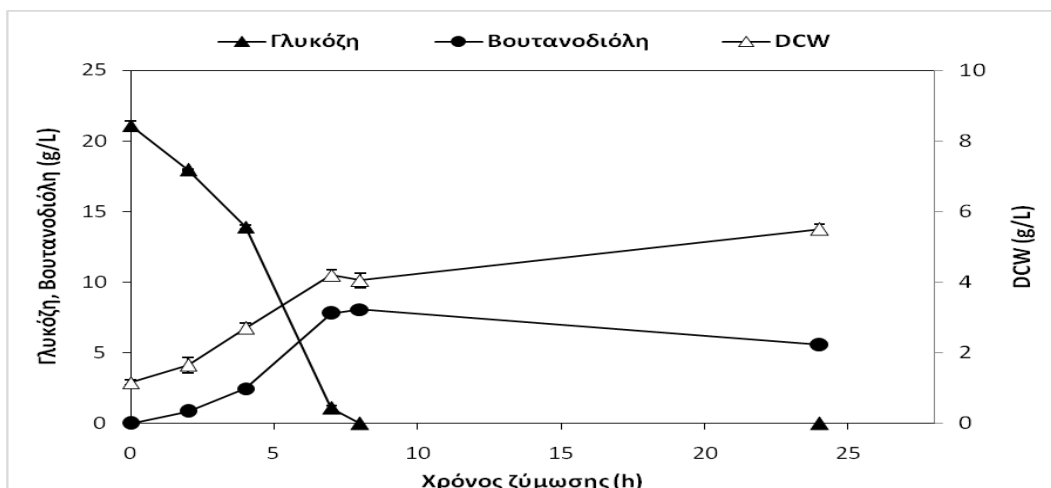
Σχήμα 3.3.1.4: Γράφημα παραγωγής παραιορροΐόντων με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter* sp.



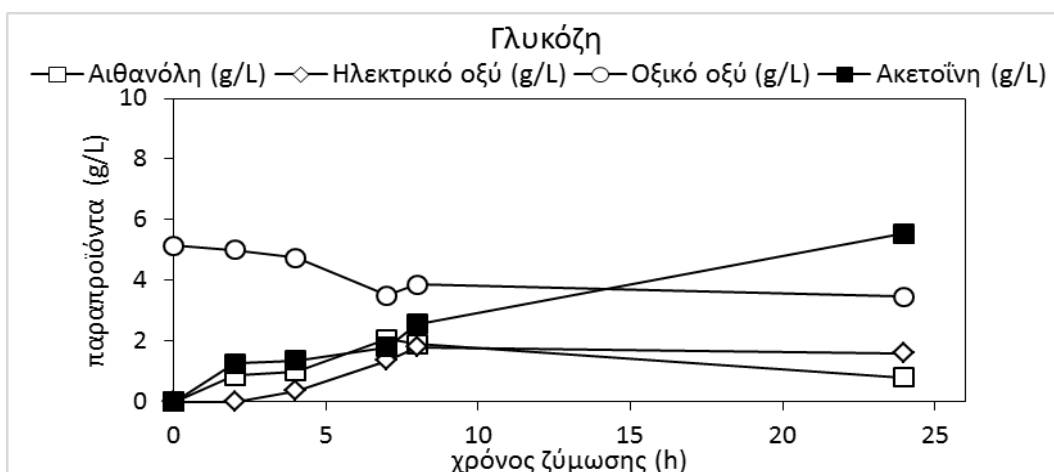
Σχήμα 3.3.1.5: Γράφημα κατανάλωσης γαλακτόζης, παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης, παραγωγής βιομάζας με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter* sp.



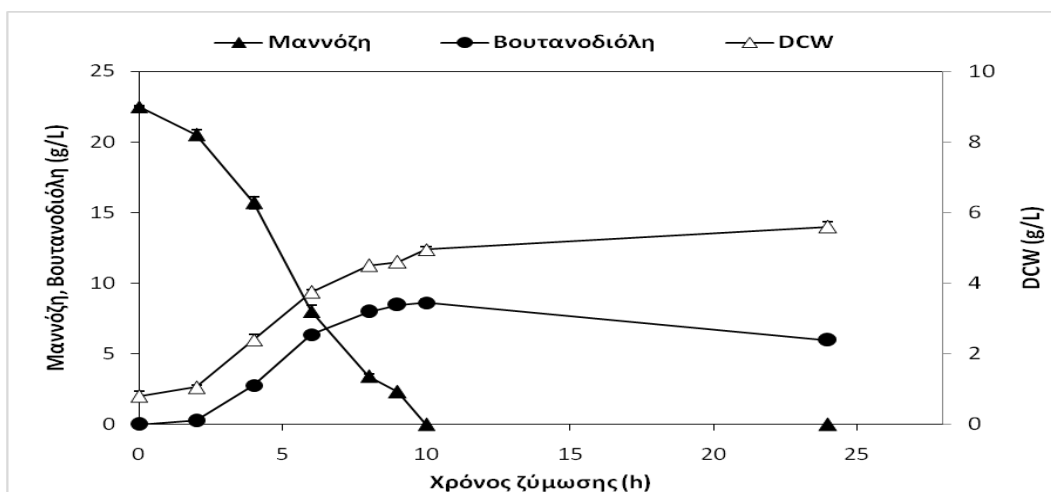
Σχήμα 3.3.1.6: Γράφημα παραγωγής παραιορροΐόντων με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter* sp.



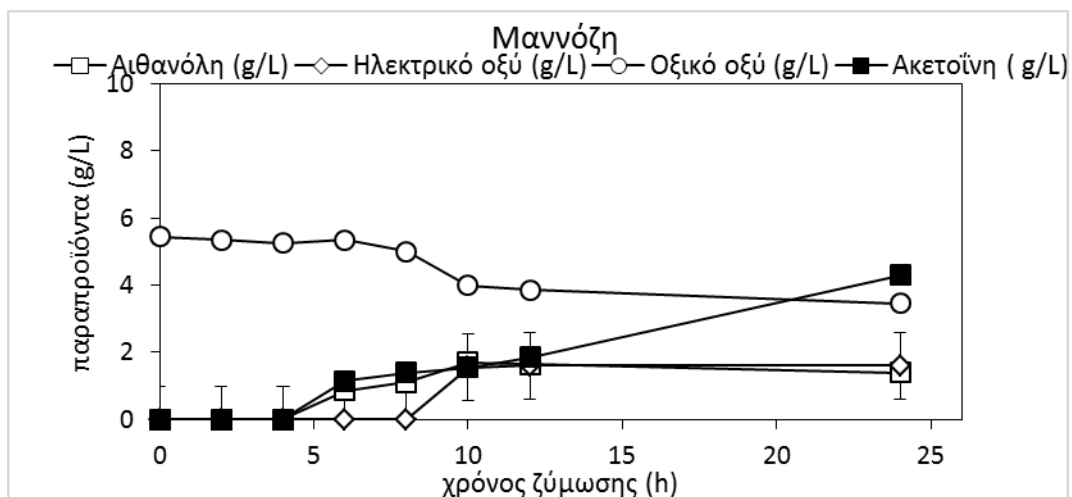
Σχήμα 3.3.1.7: Γράφημα καταναλώσεως γλυκόζης, παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης, παραγωγής βιομάζας με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter* sp.



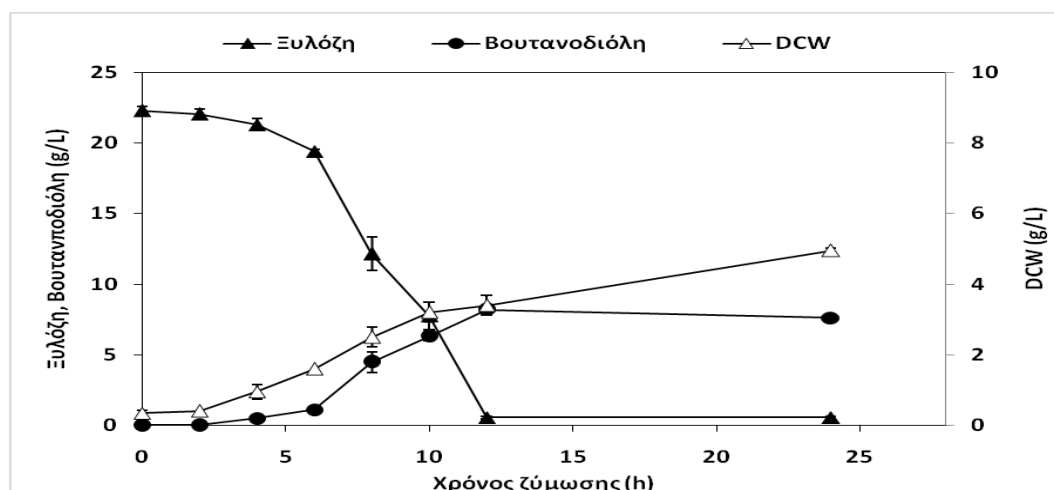
Σχήμα 3.3.1.8: Γράφημα παραγωγής παραπροϊόντων με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter* sp.



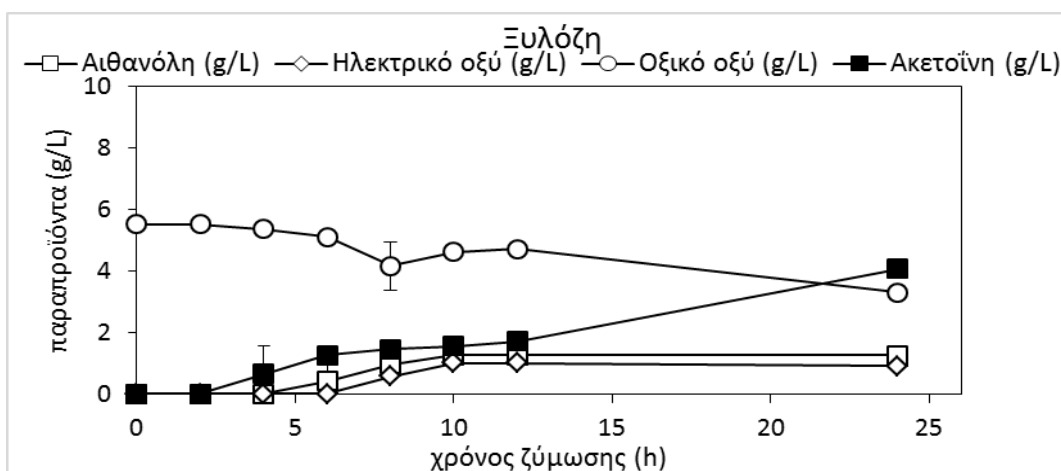
Σχήμα 3.3.1.9: Γράφημα καταναλώσεως μαννόζης, παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης, παραγωγής βιομάζας με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter* sp.



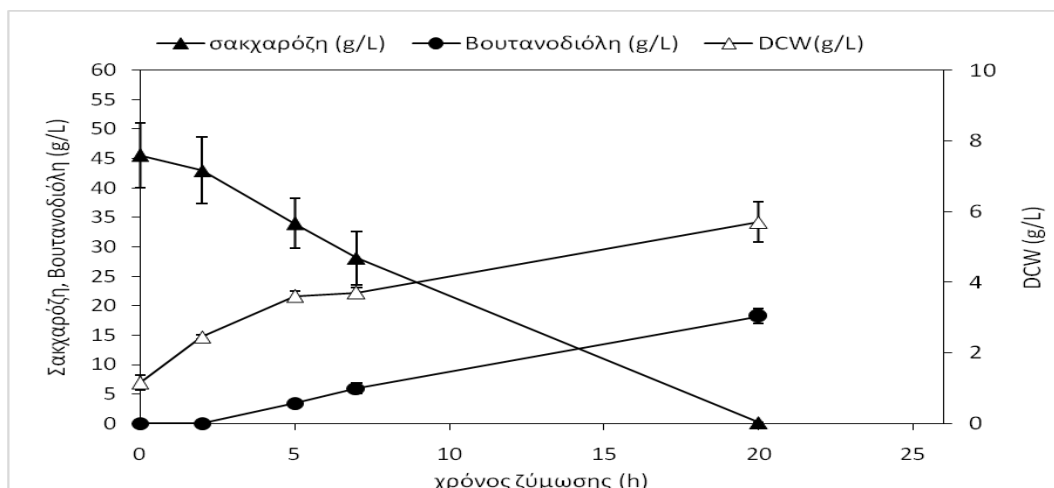
Σχήμα 3.3.1.10: Γράφημα παραγωγής παραπροϊόντων με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter* sp.



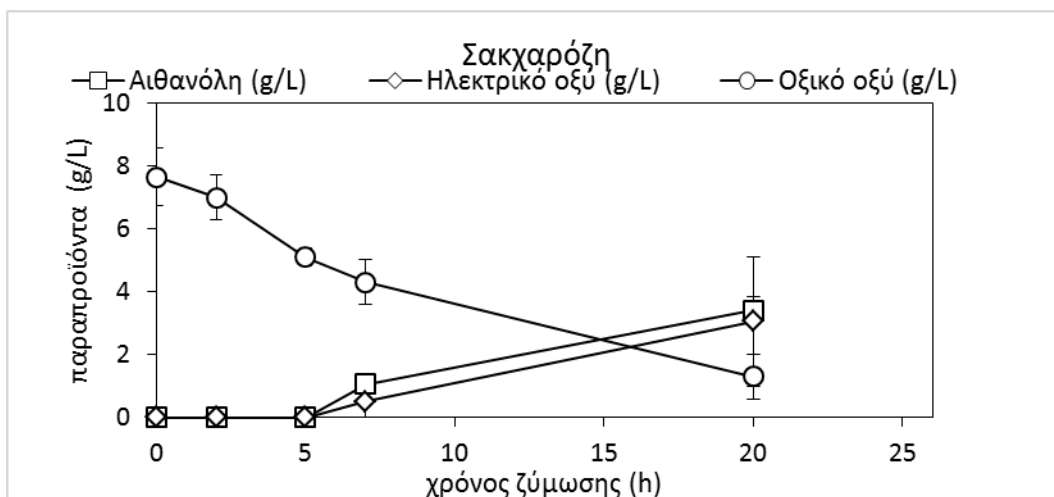
Σχήμα 3.3.1.11: Γράφημα κατανάλωσης ξυλόζης, παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης, παραγωγής βιομάζας με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter* sp.



Σχήμα 3.3.1.12: Γράφημα παραγωγής παραπροϊόντων με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter* sp.



Σχήμα 3.3.1.13: Γράφημα κατανάλωσης σακχαρόζης, παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης, παραγωγής βιομάζας με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter* sp.



Σχήμα 3.3.1.14: Γράφημα παραγωγής παραπροϊόντων με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter* sp.

3.3.2 Παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης με χρήση του στελέχους *Enterobacter aerogenes* 9.

Η κατανάλωση επτά διαφορετικών σακχάρων καθώς και η παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης και άλλων προϊόντων μελετήθηκαν για το στέλεχος *Enterobacter aerogenes* 9.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα παραπάνω γραφήματα παρατηρούμε ότι το στέλεχος *Enterobacter aerogenes* 9 παρουσίασε διαφορετική συμπεριφορά ως προς το ρυθμό κατανάλωσης των σακχάρων. Συγκεκριμένα κατανάλωσε τη γαλακτόζη (Σχήμα 3.3.2.5), την αραβινόζη (Σχήμα 3.3.2.1), και τη γλυκόζη (Σχήμα 3.3.2.7.), κατά τις

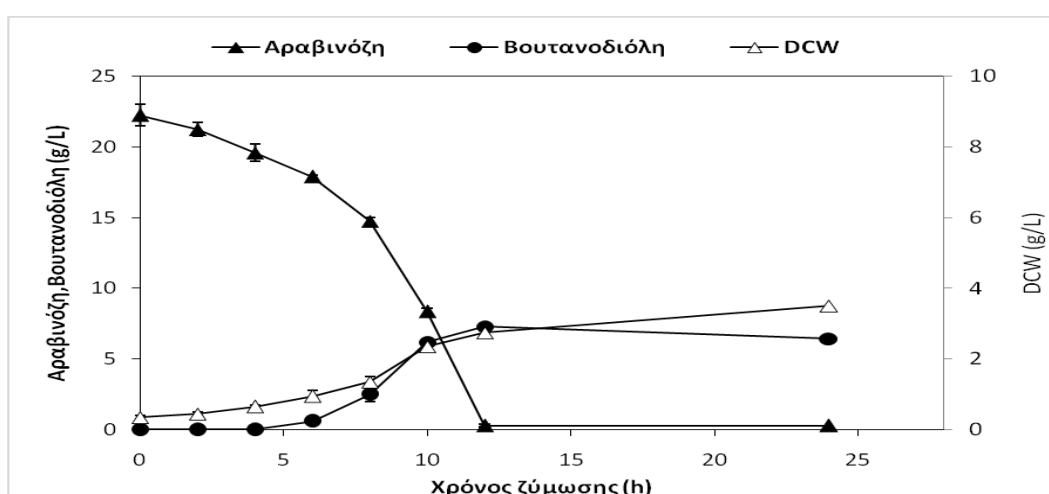
δώδεκα πρώτες ώρες ζύμωσης καθώς και τη μαννόζη (Σχήμα 3.3.2.9), ωστόσο μικρή ποσότητα, συγκεντρώσεως 1g/L, παρέμεινε μέχρι και τις εικοσιτέσσερις ώρες κατά την τελευταία δειγματοληψία. Για τη φρουκτόζη (Σχήμα 3.3.2.3), και τη ξυλόζη (Σχήμα 3.3.2.11), παρατηρήθηκε μία δυσκολία στην κατανάλωσή τους καθώς κατά τις δέκα πρώτες ώρες της ζύμωσης η συγκέντρωση των σακχάρων δε μεταβλήθηκε ιδιαίτερα ενώ από τις δέκα ώρες και μετά η κατανάλωση των σακχάρων ήταν ταχύτατη. Η κατανάλωση της φρουκτόζης ολοκληρώθηκε κατά τις είκοσι ώρες με μία ποσότητα, σακχάρων 1,2g/L να παραμένει μέχρι τις εικοσιτέσσερις ώρες. Η κατανάλωση της ξυλόζης ολοκληρώθηκε στις εικοσιτέσσερις ώρες, με μία μικρή ποσότητα, σακχάρων 2,3g/L να παραμένει μέχρι τις είκοσι έξι ώρες. Όσο για τη σακχαρόζη (Σχήμα 3.3.2.13), αυτή καταναλώθηκε στις είκοσι ώρες ζύμωσης κι όπως φαίνεται κι από το αντίστοιχο γράφημα, η συγκέντρωσή της μειωνόταν συνεχώς καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης. Ο χρόνος που απαιτήθηκε είναι λογικός καθώς ήταν αυξημένη και η συγκέντρωση της σακχαρόζης που χρησιμοποιήθηκε.

Η παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης ξεκινάει μετά τις τέσσερις ώρες ζύμωσης της αραβινόζης, γαλακτόζης, μαννόζης και γλυκόζης με τη μέγιστη παραγωγή να παρατηρείται στις δώδεκα ώρες ζύμωσης με 7,3g/L τελική συγκέντρωση βουτανοδιόλης για την αραβινόζη, συντελεστή αποδόσεως $Y = 0,33\text{g/g}$ και παραγωγικότητα $P = 0,61\text{g/L}\cdot\text{h}$, με 6,45g/L για τη γαλακτόζη, συντελεστή αποδόσεως $Y = 0,34\text{g/g}$ και παραγωγικότητα $P = 0,59\text{g/L}\cdot\text{h}$, με 7,3g/L για τη μαννόζη, συντελεστή αποδόσεως $Y = 0,37\text{g/g}$ και παραγωγικότητα $P = 0,61\text{g/L}\cdot\text{h}$ και με 6,9g/L για τη γλυκόζη, συντελεστή αποδόσεως $Y = 0,37\text{g/L}$ και παραγωγικότητα $P = 0,58\text{g/L}\cdot\text{h}$. Εν συνεχεία 2,3-βουτανοδιόλη ξεκινά να παράγεται με χρήση φρουκτόζης και ξυλόζης ως πηγές άνθρακα μετά τις οχτώ ώρες με τη μέγιστη συγκέντρωση στα 7,65g/L στις είκοσι ώρες για τη φρουκτόζη με συντελεστή αποδόσεως $Y = 0,3\text{g/g}$ και παραγωγικότητα $P = 0,38\text{g/L}\cdot\text{h}$ και στα 7,1g/L στις εικοσιτέσσερις ώρες για τη ξυλόζη με συντελεστή αποδόσεως $Y = 0,36\text{g/g}$ και παραγωγικότητα $P = 0,3\text{g/L}\cdot\text{h}$. Με χρήση της σακχαρόζης ως πηγή άνθρακα η παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης ξεκινά στις τέσσερις ώρες, με μέγιστη παραγωγή, συγκεντρώσεως 18,4g/L, στις είκοσι ώρες συντελεστή αποδόσεως $Y = 0,4\text{g/g}$ και παραγωγικότητα $P = 0,92\text{g/L}\cdot\text{h}$.

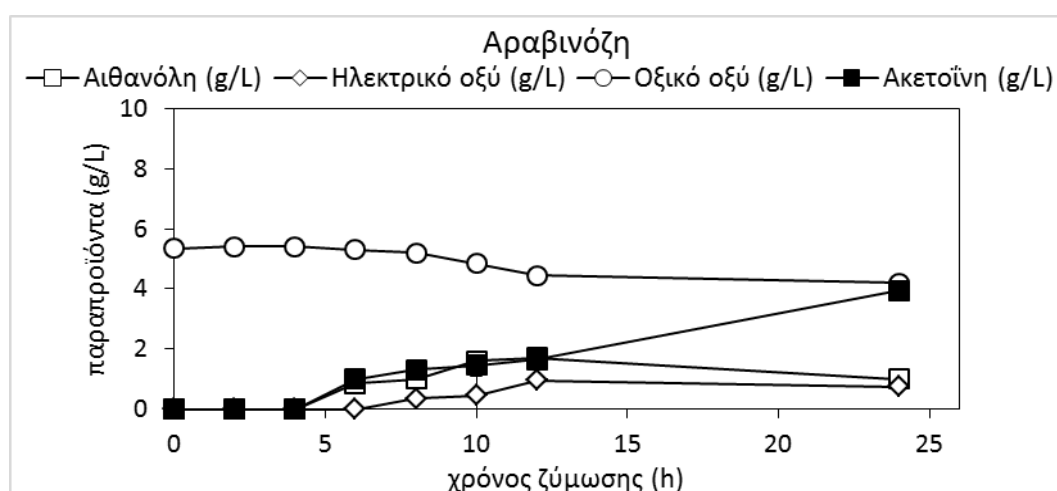
Η βιομάζα παρουσιάζει παρόμοια συμπεριφορά ως προς το ρυθμό παραγωγή της, σε όλες τις πηγές άνθρακα φτάνοντας κατά μέσο όρο τα 3,5g/L. Πιο

συγκεκριμένα παρατηρήθηκε εκθετικός ρυθμός παραγωγής της κατά τις δέκα με δώδεκα ώρες ζύμωσης, ανάλογα με την πηγή άνθρακα, ενώ από το σημείο εκείνο και μετά η βιομάζα αυξανόταν με μικρότερο ρυθμό. Τέλος όσον αφορά στη σακχαρόζη η παραγόμενη βιομάζα έφτασε τα 5,7g/L στο τέλος της ζύμωσης στις είκοσι ώρες.

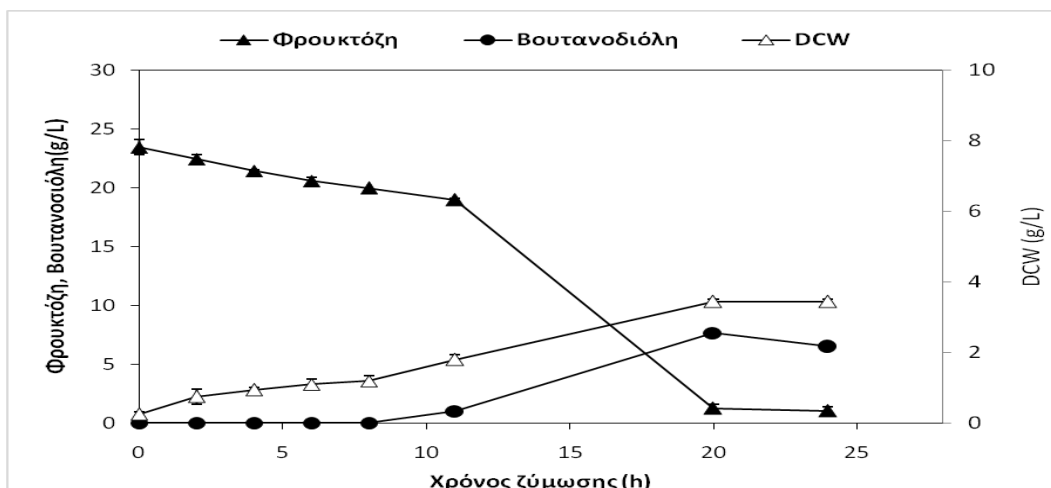
Η παραγωγή των παραπροϊόντων παρουσίασε παρόμοια συμπεριφορά για όλες τις πηγές άνθρακα. Η συγκέντρωση του οξικού οξέος κυμάνθηκε από 3,5-5g/L, του ηλεκτρικού οξέος από 0,75-2,3g/L, της αιθανόλης από 1-1,5g/L και της ακετοΐνης από 2-4,5g/L. Για τη σακχαρόζη η συγκέντρωση του οξικού οξέος μεταβλήθηκε από 7,3-0,3g/L, του ηλεκτρικού οξέος έφτασε τα 6,2g/L, και της αιθανόλης τα 3,4g/L.



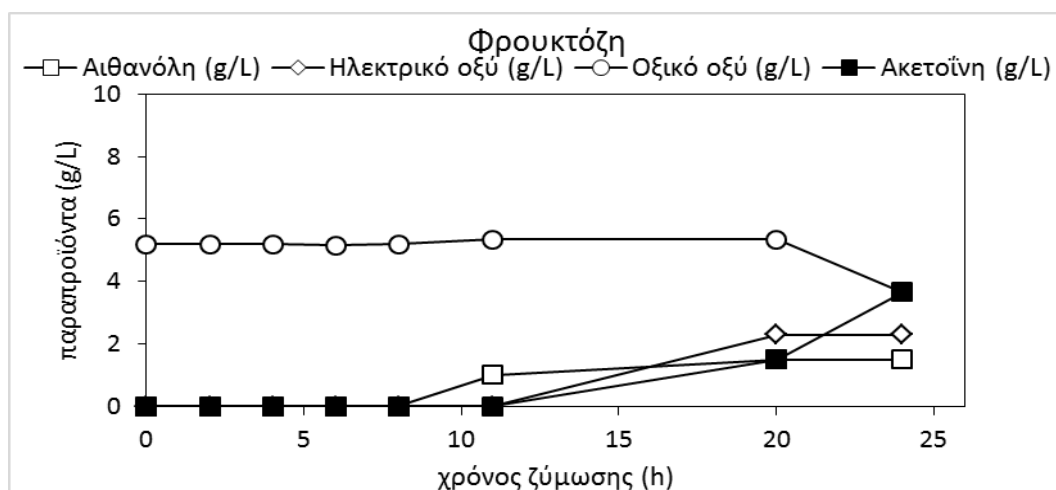
Σχήμα 3.3.2.1: Γράφημα κατανάλωσης αραβινόζης, παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης, παραγωγής βιομάζας με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter aerogenes* 9.



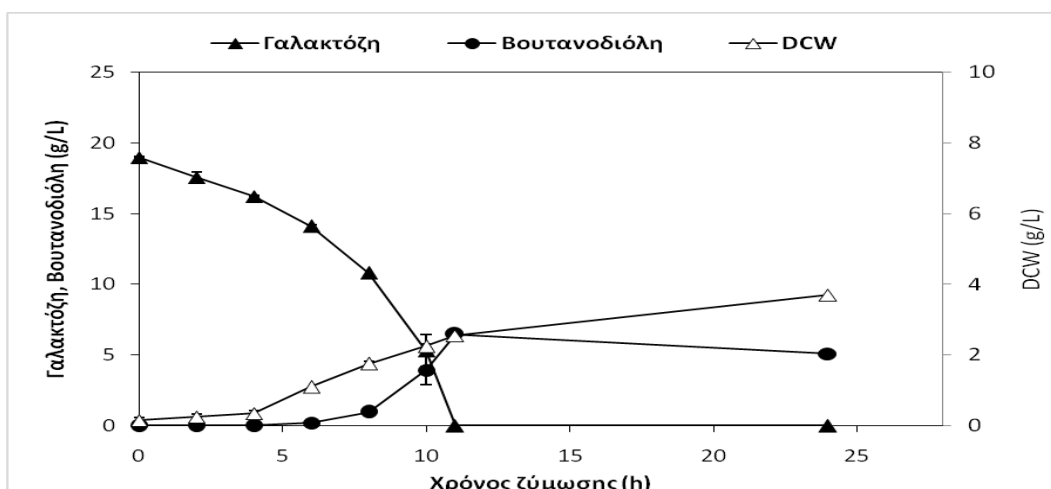
Σχήμα 3.3.2.2: Γράφημα παραγωγής παραπροϊόντων με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter aerogenes* 9.



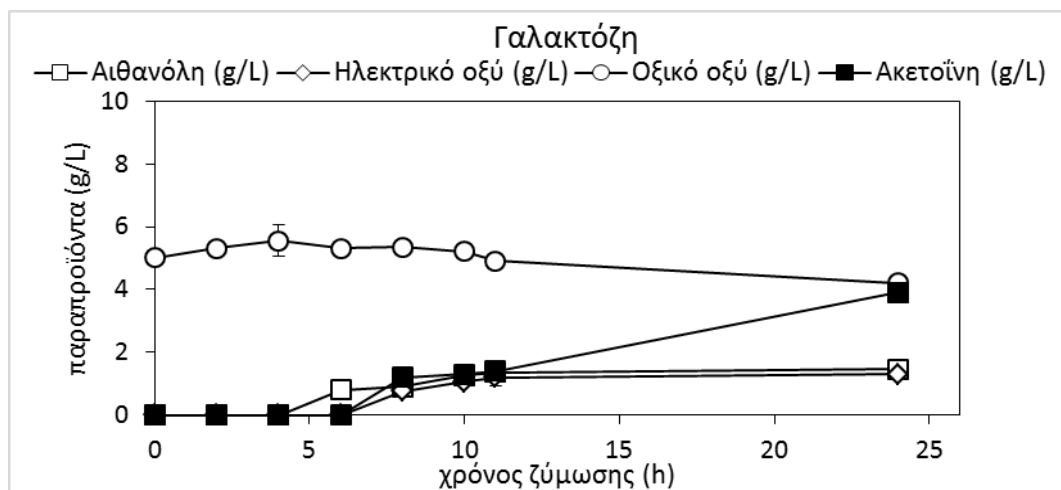
Σχήμα 3.3.2.3: Γράφημα κατανάλωσης φρουκτόζης, παραγωγής 2,3-βουτανολιόλης, παραγωγής βιομάζας με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter aerogenes* 9.



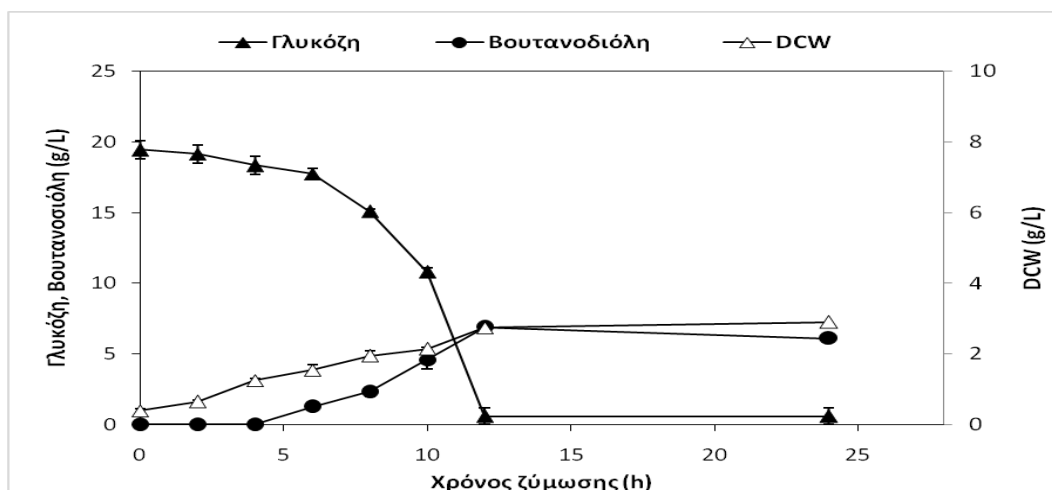
Σχήμα 3.3.2.4: Γράφημα παραγωγής παραπροϊόντων με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter aerogenes* 9.



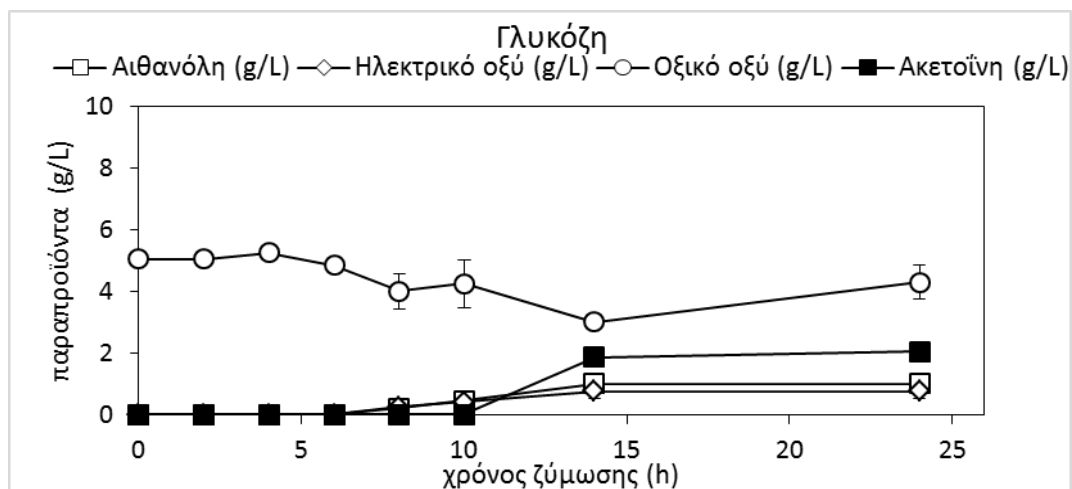
Σχήμα 3.3.2.5: Γράφημα κατανάλωσης γαλακτόζης, παραγωγής 2,3-βουτανολιόλης, παραγωγής βιομάζας με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter aerogenes* 9.



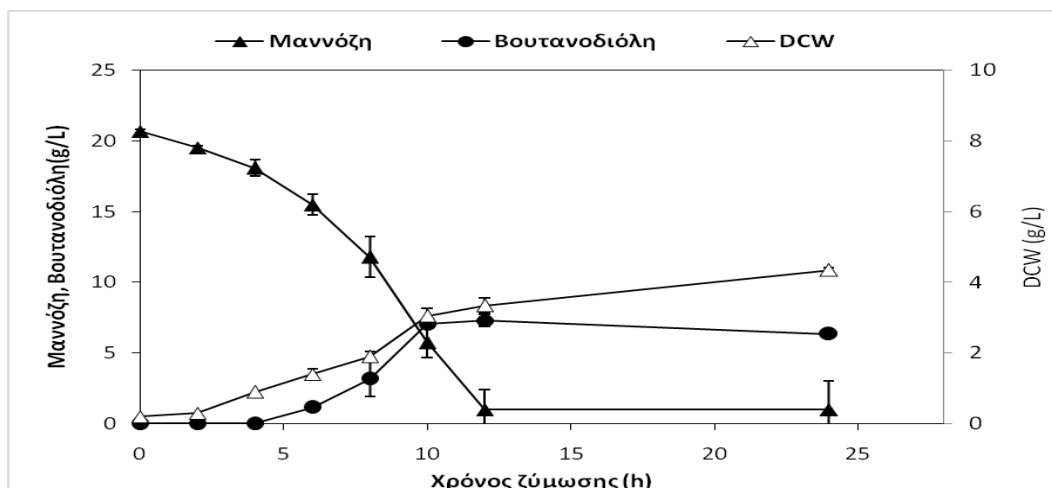
Σχήμα 3.3.2.6: Γράφημα παραγωγής παραπροϊόντων με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter aerogenes* 9.



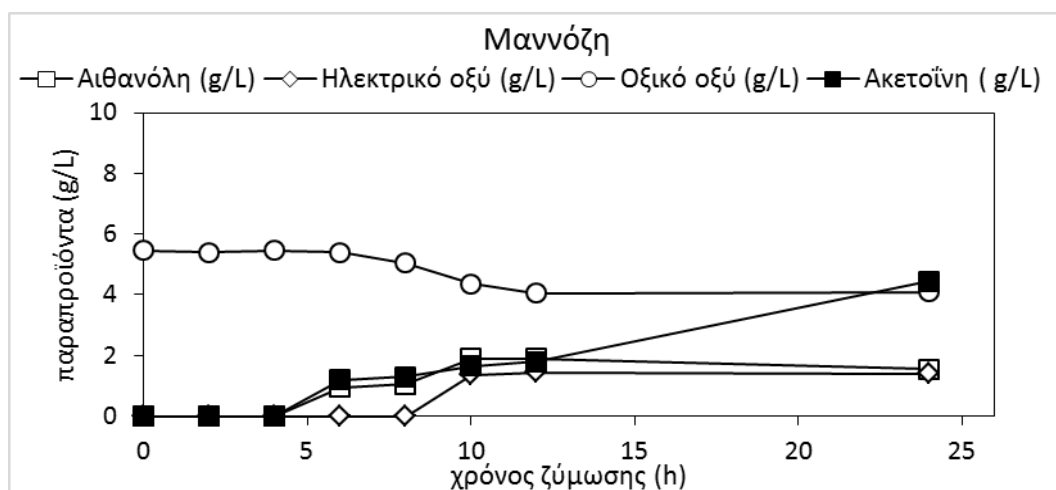
Σχήμα 3.3.2.7: Γράφημα κατανάλωσης γλυκόζης, παραγωγής 2,3-βουτανوديόλης, παραγωγής βιομάζας με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter aerogenes* 9.



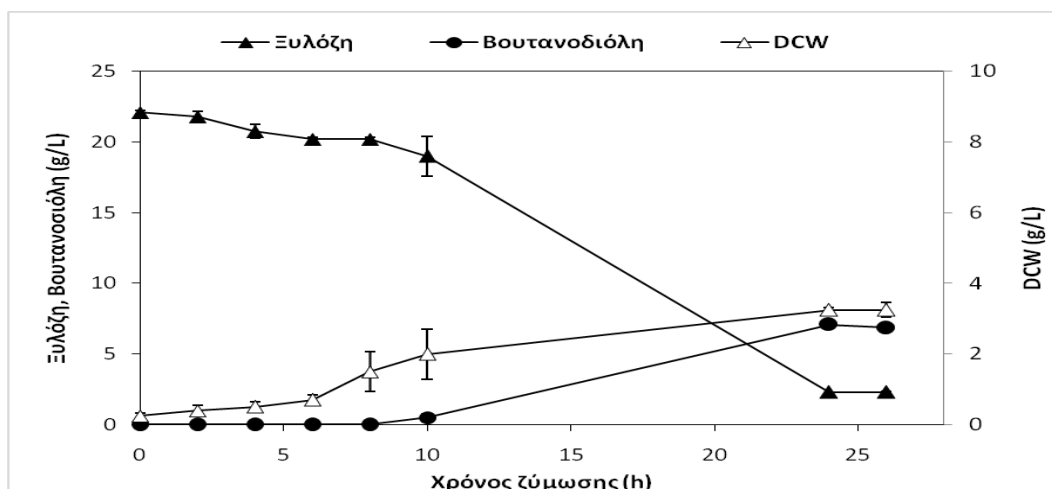
Σχήμα 3.3.2.8: Γράφημα παραγωγής παραπροϊόντων με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter aerogenes* 9.



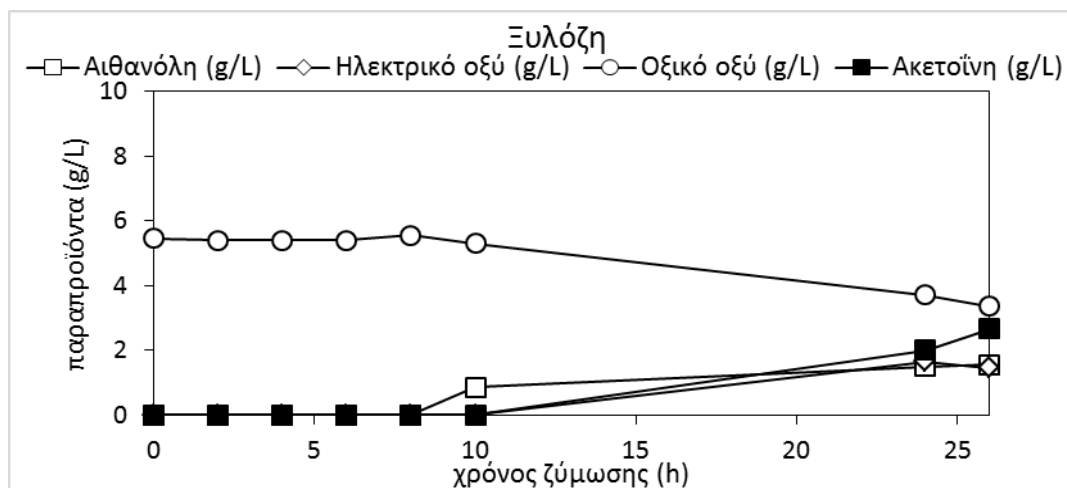
Σχήμα 3.3.2.9: Γράφημα κατανάλωσης μαννόζης, παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης, παραγωγής βιομάζας με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter aerogenes* 9.



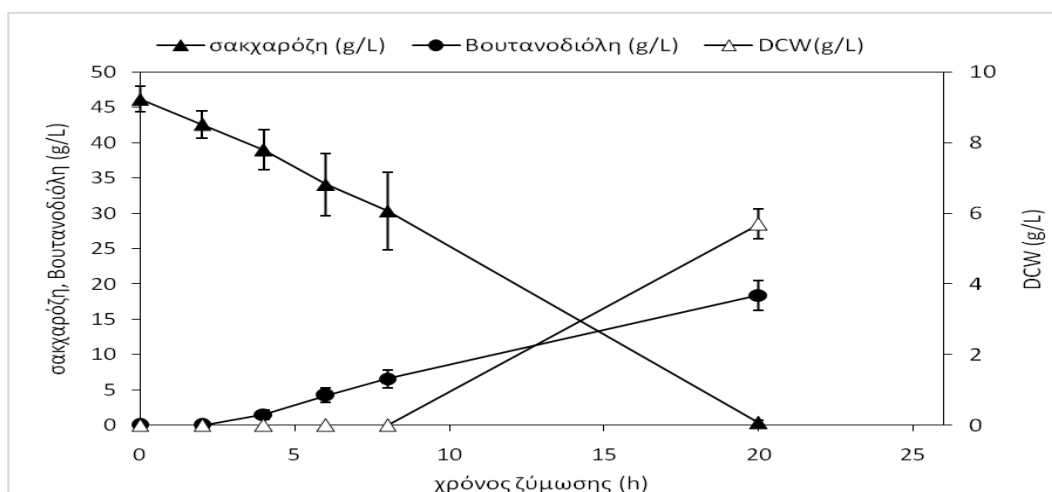
Σχήμα 3.3.2.10: Γράφημα παραγωγής παραπροϊόντων με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter aerogenes* 9.



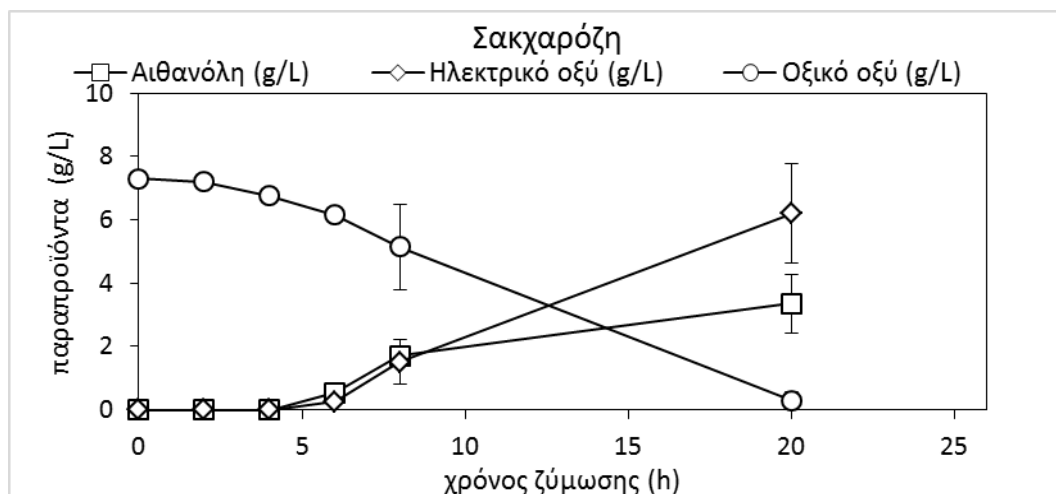
Σχήμα 3.3.2.11: Γράφημα κατανάλωσης ξυλόζης, παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης, παραγωγής βιομάζας με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter aerogenes* 9.



Σχήμα 3.1.2.12: Γράφημα παραγωγής παραπροϊόντων με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter aerogenes* 9.



Σχήμα 3.3.2.13: Γράφημα κατανάλωσης σακχαρόζης, παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης, παραγωγής βιομάζας με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter aerogenes* 9.



Σχήμα 3.3.2.14: Γράφημα παραγωγής παραπροϊόντων με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter aerogenes* 9.

3.3.3 Παραγωγή 2,3-βουτανονοδιόλης με χρήση του στελέχους *Enterobacter aerogenes* 10.

Η κατανάλωση επτά διαφορετικών σακχάρων καθώς και η παραγωγή 2,3-βουτανονοδιόλης και άλλων προϊόντων μελετήθηκαν για το στέλεχος *Enterobacter aerogenes* 10.

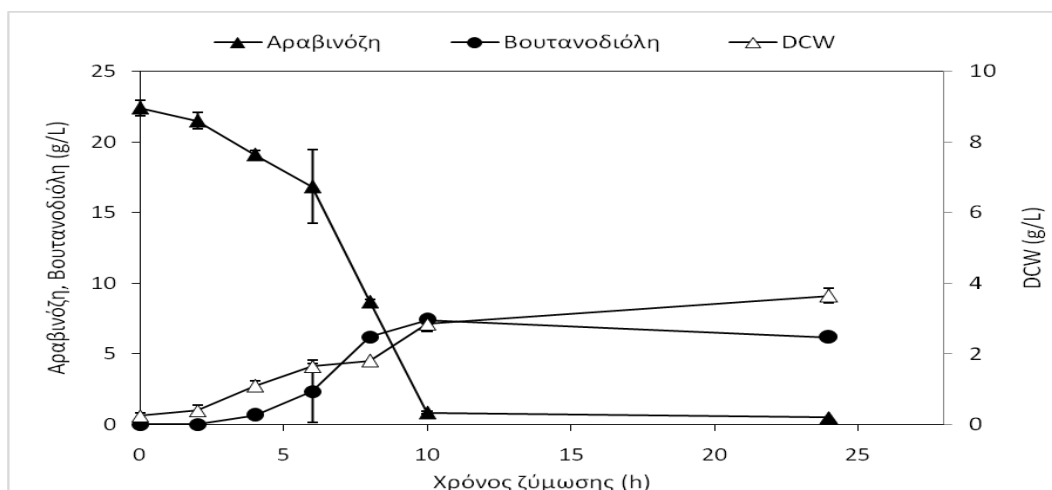
Το στέλεχος *Enterobacter aerogenes* 10 φαίνεται να καταναλώνει στις δέκα ώρες ζύμωσης την αραβινόζη (Σχήμα 3.3.3.1), τη γαλακτόζη (Σχήμα 3.3.3.5), και τη μαννόζη (Σχήμα 3.3.3.9), ενώ τη γλυκόζη (Σχήμα 3.3.3.7) στις δώδεκα ώρες ζύμωσης. Όσο για τη φρουκτόζη (Σχήμα 3.3.3.3) και τη ξυλόζη (Σχήμα 3.3.3.11) παρατηρείται ένας πιο αργός ρυθμός στην κατανάλωσή τους συγκριτικά με τις υπόλοιπες πηγές άνθρακα. Συγκεκριμένα η φρουκτόζη καταναλώνεται στις δεκαοχτώ ώρες ζύμωσης ενώ η ξυλόζη στις είκοσι ώρες με μία μικρή ποσότητα, συγκεντρώσεως 1,8g/L να παραμένει μέχρι και τις είκοσι έξι ώρες. Όσο για τη σακχαρόζη (Σχήμα 3.3.3.13) και με το συγκεκριμένο στέλεχος, αυτή καταναλώνεται εξίσου στις είκοσι ώρες ζύμωσης.

Η παραγωγή 2,3-βουτανονοδιόλης ξεκινάει μετά τις δύο πρώτες ώρες ζύμωσης για την αραβινόζη, τη γλυκόζη, τη μαννόζη και γαλακτόζη με το μέγιστο παραγωγής της να παρατηρείται και με τις τέσσερις πηγές άνθρακα στις δέκα ώρες ζύμωσης με 7,4g/L για την αραβινόζη, συντελεστή αποδόσεως $Y = 0,34\text{g/g}$ και παραγωγικότητα $P = 0,74\text{ g/L}\cdot\text{h}$, με 7,9g/L για τη γλυκόζη, συντελεστή αποδόσεως $Y = 0,37\text{g/g}$ και παραγωγικότητα $P = 0,79\text{g/L}\cdot\text{h}$, με 8g/L για τη μαννόζη, συντελεστή αποδόσεως $Y = 0,36\text{g/g}$ και παραγωγικότητα $P = 0,8\text{g/L}\cdot\text{h}$ και με 6,9g/L για τη γαλακτόζη, συντελεστή αποδόσεως $Y = 0,34\text{g/L}$ και παραγωγικότητα $P = 0,69\text{g/L}\cdot\text{h}$. Μετά τις τέσσερις ώρες ζύμωσης ξεκινά παραγωγή 2,3-βουτανονοδιόλης με πηγές άνθρακα φρουκτόζη και ξυλόζη με τη μέγιστη συγκέντρωση στις δεκαοχτώ ώρες ζύμωσης για τη φρουκτόζη στα 7,65g/L, με συντελεστή αποδόσεως $Y = 0,34\text{g/g}$ και παραγωγικότητα $P = 0,69\text{g/L}\cdot\text{h}$ και με τη μέγιστη συγκέντρωση στις είκοσι ώρες για τη ξυλόζη στα 7,9g/L, με συντελεστή αποδόσεως $Y = 0,36\text{g/g}$ και με παραγωγικότητα $P = 0,4\text{g/L}\cdot\text{h}$. Τέλος με τη σακχαρόζη ως πηγή άνθρακα μέγιστη παραγωγή 2,3-βουτανονοδιόλης παρατηρείται στις είκοσι ώρες με συγκέντρωση 20,15g/L, συντελεστή αποδόσεως $Y = 0,4\text{g/g}$ και παραγωγικότητα $P = 1\text{g/L}\cdot\text{h}$.

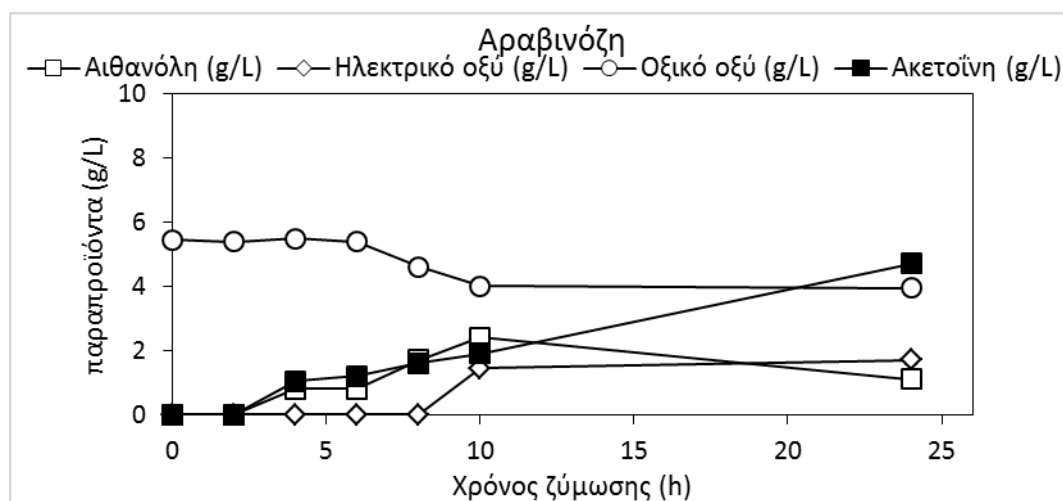
Η βιομάζα φτάνει κατά μέσο όρο τα 3,6g/L με το ρυθμό παραγωγής να παρουσιάζει παρόμοια συμπεριφορά για τις πέντε πηγές άνθρακα, αραβινόζη,

γαλακτόζη, μαννόζη, ξυλόζη και φρουκτόζη ενώ στην γλυκόζη η βιομάζα παράγεται με μικρότερο ρυθμό κι όπως φαίνεται από το γράφημα, στην μικρότερη συγκέντρωση. Με τη σακχαρόζη η παραγόμενη βιομάζα φτάνει σε συγκέντρωση τα 8,85g/L

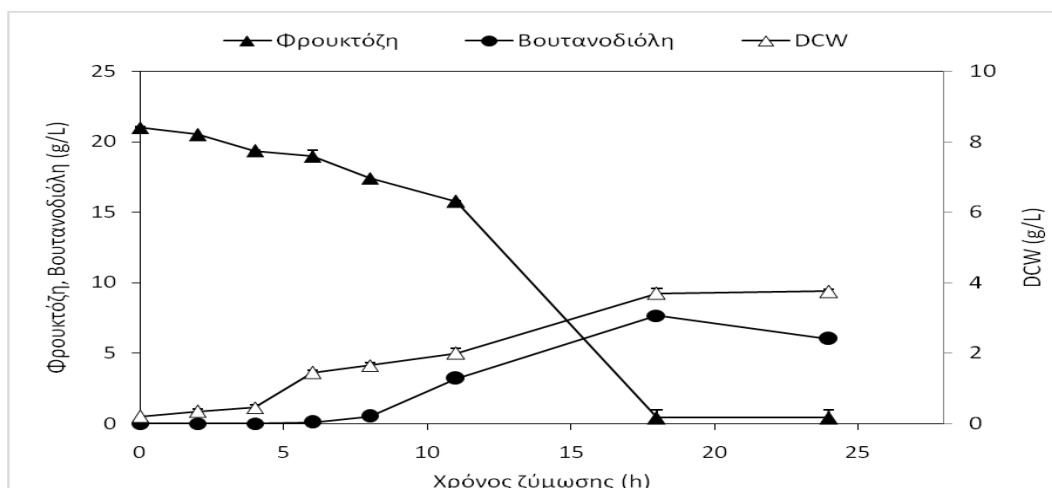
Η παραγωγή των παραπροϊόντων παρουσίασε παρόμοια συμπεριφορά για όλες τις πηγές άνθρακα. Η συγκέντρωση του οξικού οξέος κυμάνθηκε για τις έξι πηγές άνθρακα από 5,5g/L., αρχική συγκέντρωση, έως 2,5g/L, η παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος από 1-2,65g/L, της αιθανόλης από 1,1-1,65g/L και της ακετοΐνης από 3.7-5.9g/L. Για τη σακχαρόζη η συγκέντρωση του οξικού οξέος μειώθηκε από 7,3-0,3 g/L, του ηλεκτρικού οξέος έφτασε τα 4g/L, και της αιθανόλης τα 2,9g/L.



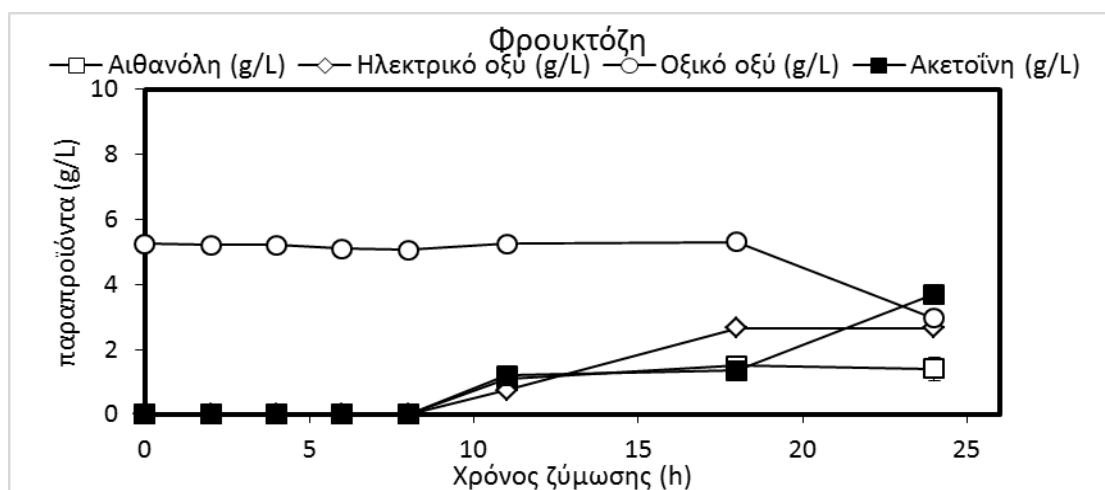
Σχήμα 3.3.3.1: Γράφημα κατανάλωσης αραβινόζης, παραγωγής 2,3-βουτανιοδιόλης, παραγωγής βιομάζας με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter aerogenes* 10.



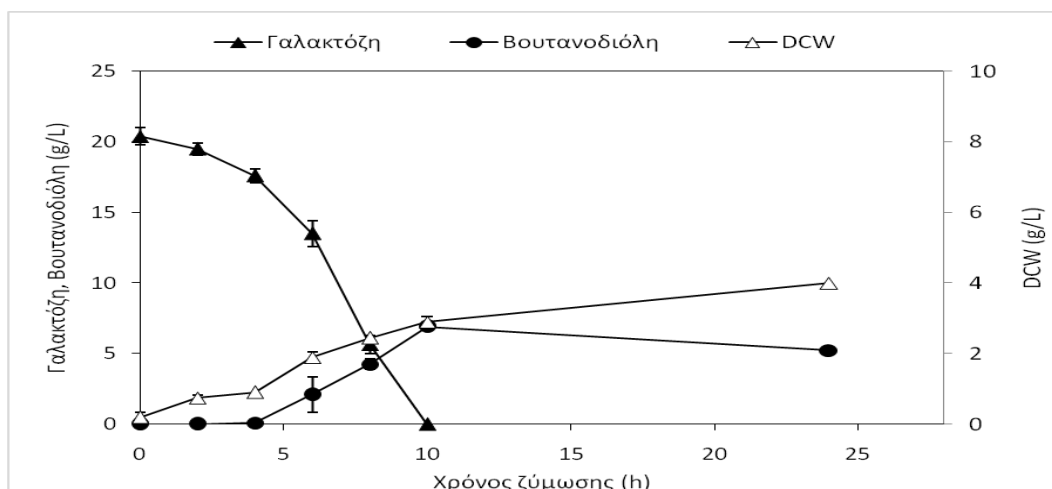
Σχήμα 3.3.3.2: Γράφημα παραγωγής παραπροϊόντων με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter aerogenes* 10.



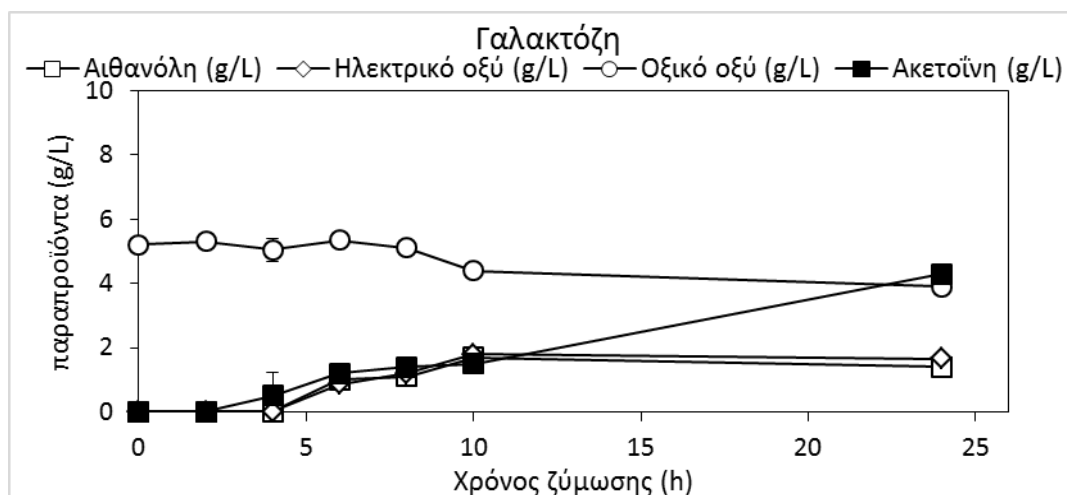
Σχήμα 3.3.3.3: Γράφημα κατανάλωσης φρουκτόζης, παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης, παραγωγής βιομάζας με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter aerogenes* 10.



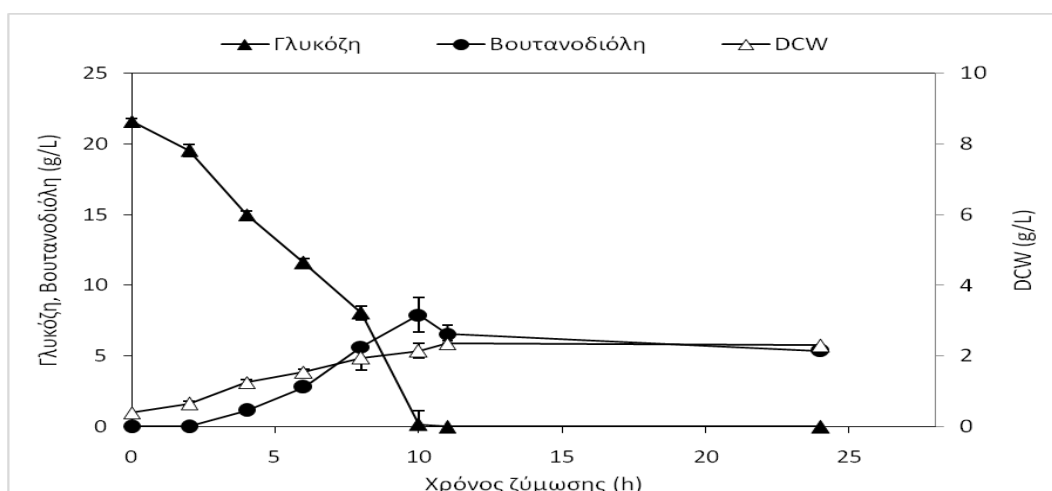
Σχήμα 3.3.3.4: Γράφημα παραγωγής παραπροϊόντων με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter aerogenes* 10.



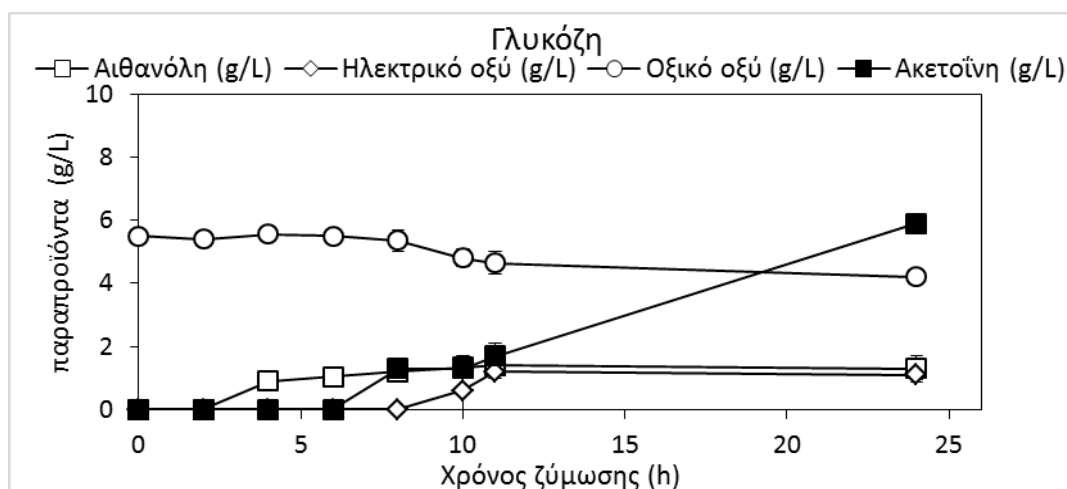
Σχήμα 3.3.3.5: Γράφημα κατανάλωσης γαλακτόζης, παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης, παραγωγής βιομάζας με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter aerogenes* 10.



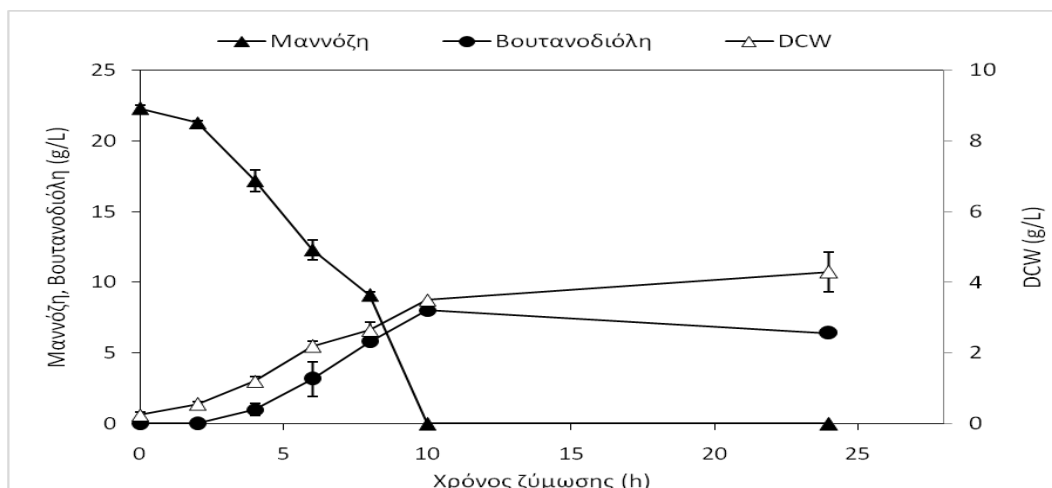
Σχήμα 3.3.3.6: Γράφημα παραγωγής παραπροϊόντων με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter aerogenes* 10.



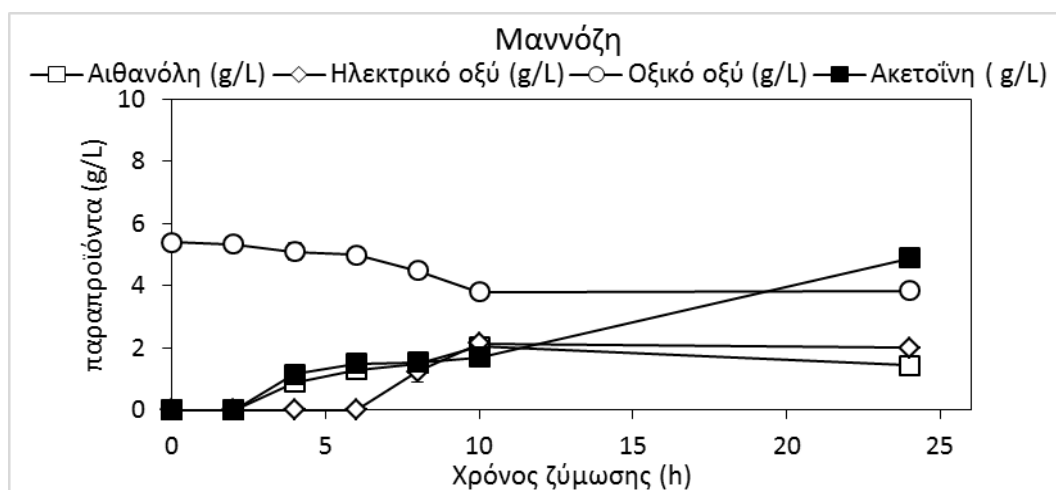
Σχήμα 3.3.3.7: Γράφημα κατανάλωσης γλυκόζης, παραγωγής 2,3-βουτανδιόλης, παραγωγής βιομάζας με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter aerogenes* 10.



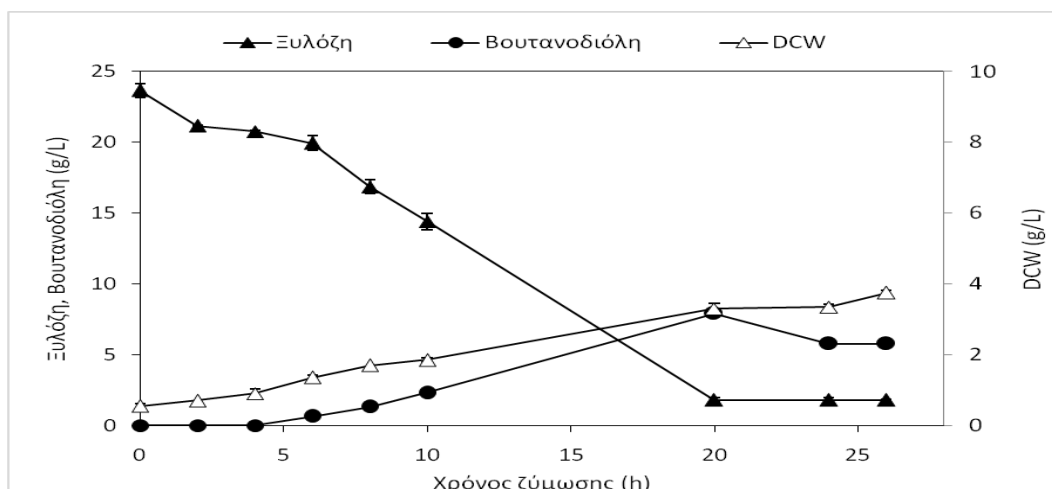
Σχήμα 3.3.3.8: Γράφημα παραγωγής παραπροϊόντων με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter aerogenes* 10.



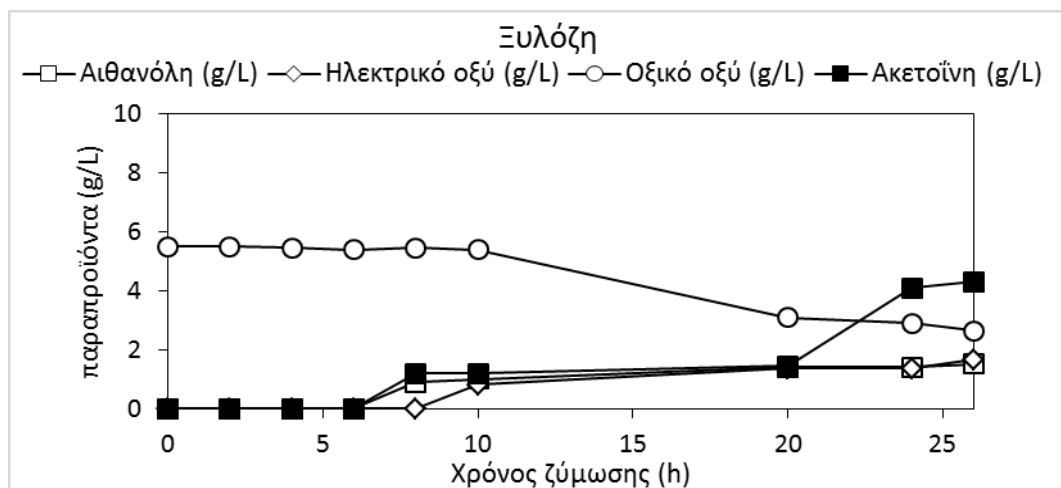
Σχήμα 3.1.3.9: Γράφημα κατανάλωσης μαννόζης, παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης, παραγωγής βιομάζας με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter aerogenes* 10.



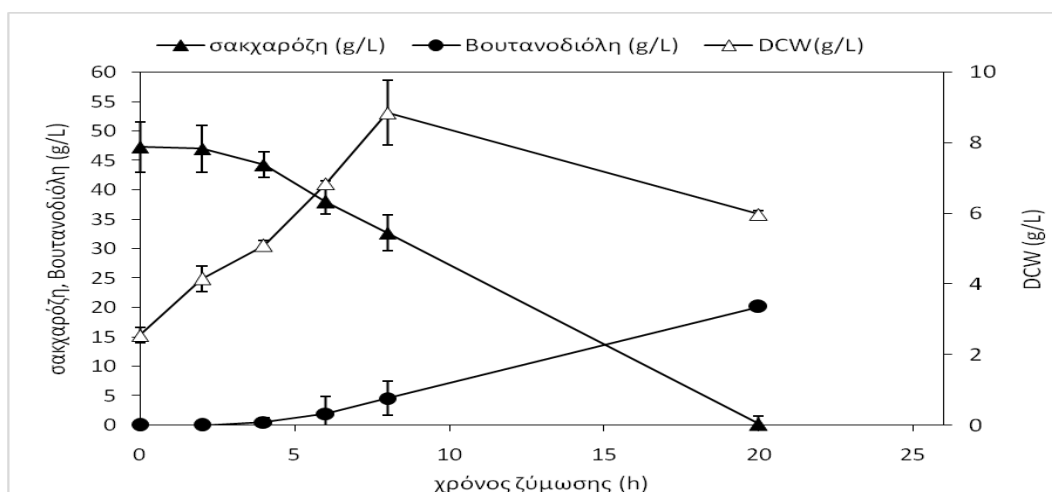
Σχήμα 3.3.3.10: Γράφημα παραγωγής παραπροϊόντων με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter aerogenes* 10.



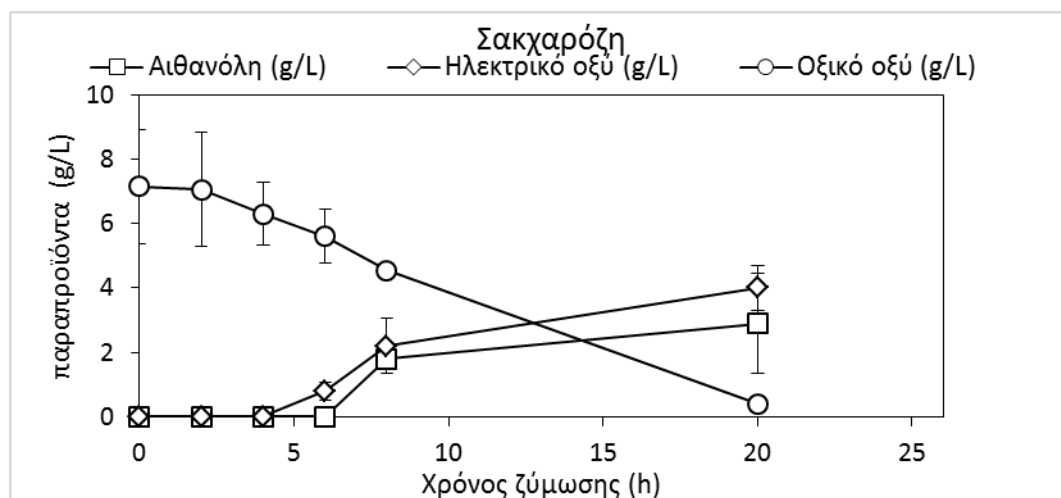
Σχήμα 3.3.3.11: Γράφημα κατανάλωσης ξυλόζης, παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης, παραγωγής βιομάζας με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter aerogenes* 10.



Σχήμα 3.3.3.12: Γράφημα παραγωγής παραπροϊόντων με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter aerogenes* 10.



Σχήμα 3.3.3.13: Γράφημα κατανάλωσης σακχαρόζης, παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης, παραγωγής βιομάζας με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter aerogenes* 10.



Σχήμα 3.3.3.14: Γράφημα παραγωγής παραπροϊόντων με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter aerogenes* 10.

3.3.4 Παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης με χρήση του στελέχους *Citrobacter freundii* 207.

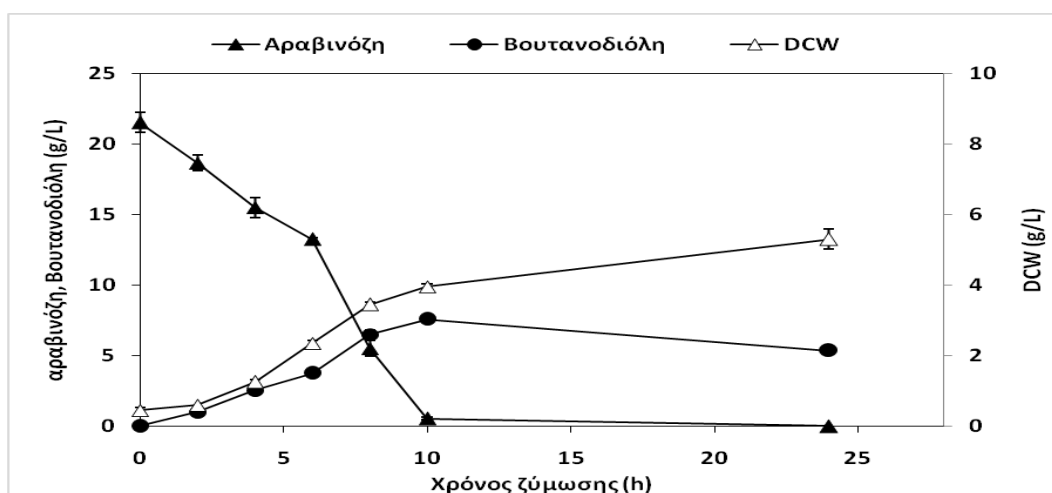
Όπως φαίνεται και από τα γραφήματα το στέλεχος *Citrobacter freundii* 207 έχει καταναλώσει πλήρως εντός των οχτώ πρώτων ωρών τη γλυκόζη (Σχήμα 3.3.4.7), ενώ ακολουθεί η φρουκτόζη (Σχήμα 3.3.4.3), την οποία καταναλώνει πλήρως στις εννέα ώρες ζύμωσης. Η αραβινόζη (Σχήμα 3.3.4.1) και η μαννόζη (Σχήμα 3.3.4.9), καταναλώνονται στις δέκα ώρες. Όσον αφορά τη ξυλόζη (Σχήμα 3.3.4.11) παρατηρείται ένας αργός ρυθμός κατανάλωσης, μέχρι τις έξι πρώτες ώρες ζύμωσης, ο οποίος αυξάνει απότομα μέχρι και τις δεκατέσσερις ώρες όπου και παρατηρείται πλήρης κατανάλωσή της. Σχεδόν όλη η ποσότητα της γαλακτόζης (Σχήμα 3.3.4.5) καταναλώνεται στις δέκα ώρες ζύμωσης ωστόσο μικρή ποσότητα, συγκεντρώσεως 1,3g/L, τελικά καταναλώνεται πλήρως στις εικοσιτέσσερις ώρες. Στη ζύμωση με πηγή άνθρακα τη σακχαρόζη (Σχήμα 3.3.4.13), αυτή καταναλώθηκε στις είκοσι δύο ώρες ζύμωσης.

Από την έναρξη κιόλας της ζύμωσης ξεκινάει η παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης με πηγές άνθρακα αραβινόζη, φρουκτόζη, γαλακτόζη, μαννόζη και γλυκόζη. Στην περίπτωση της γλυκόζης μέγιστη παραγωγή παρατηρείται στις οχτώ ώρες ζύμωσης με συγκέντρωση 6,98g/L, συντελεστή αποδόσεως $Y = 0,36\text{g/g}$ και παραγωγικότητα $P = 0,87\text{g/L}\cdot\text{h}$. Στην περίπτωση της φρουκτόζης μέγιστη παραγωγή παρατηρείται στις εννέα ώρες ζύμωσης με 7,73g/L, συντελεστή αποδόσεως $Y = 0,35\text{g/g}$ και παραγωγικότητα $P = 0,86\text{g/L}\cdot\text{h}$. ενώ στις δέκα ώρες ζύμωσης μέγιστη παραγωγή παρουσιάστηκε στην αραβινόζη με 7,58g/L, συντελεστή αποδόσεως $Y = 0,36\text{g/g}$ και παραγωγικότητα $P = 0,76\text{g/L}\cdot\text{h}$, στη γαλακτόζη με 6,81g/L, συντελεστή αποδόσεως $Y = 0,35\text{g/g}$ και παραγωγικότητα $P = 0,68\text{g/L}\cdot\text{h}$ και στη μαννόζη με 8,3g/L, συντελεστή αποδόσεως $Y = 0,36\text{g/g}$ και παραγωγικότητα $P = 0,83\text{g/L}\cdot\text{h}$. Επίσης η παραγωγή του προϊόντος με πηγή άνθρακα τη ξυλόζη ξεκινά μετά τις τέσσερις ώρες ζύμωσης με τη μέγιστη συγκέντρωση να παρατηρείται στις δεκατέσσερις ώρες στα 8,6g/L με συντελεστή αποδόσεως $Y = 0,36\text{g/g}$ και παραγωγικότητα $P = 0,61\text{g/L}\cdot\text{h}$. Τέλος στη ζύμωση της σακχαρόζης μέγιστη παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης παρατηρείται στις είκοσι δύο ώρες με συγκέντρωση 19,5g/L, συντελεστή αποδόσεως $Y = 0,4\text{g/g}$ και παραγωγικότητα $P = 0,89\text{g/L}\cdot\text{h}$.

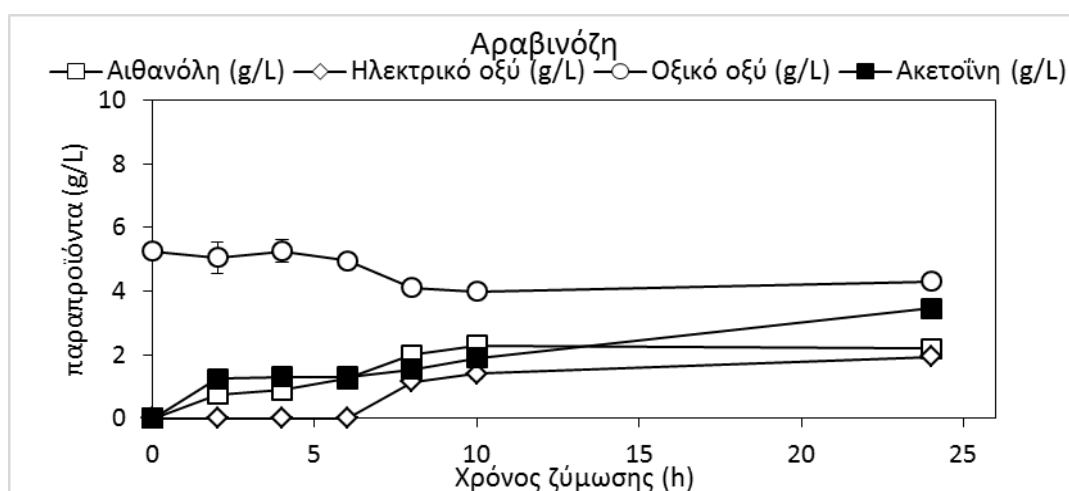
Τέλος η παραγωγή βιομάζας παρουσιάζει παρόμοιο ρυθμό σε όλες τις πηγές άνθρακα εκτός της ξυλόζης, που είναι λίγο μικρότερος και φτάνει σε συγκέντρωση

κατά μέσο όρο τα 5g/L, με τη χαμηλότερη συγκέντρωση βιομάζας να παρατηρείται με υπόστρωμα τη φρουκτόζη στα 4,25g/L. Με τη σακχαρόζη η παραγόμενη βιομάζα έφτασε τα 5,4g/L.

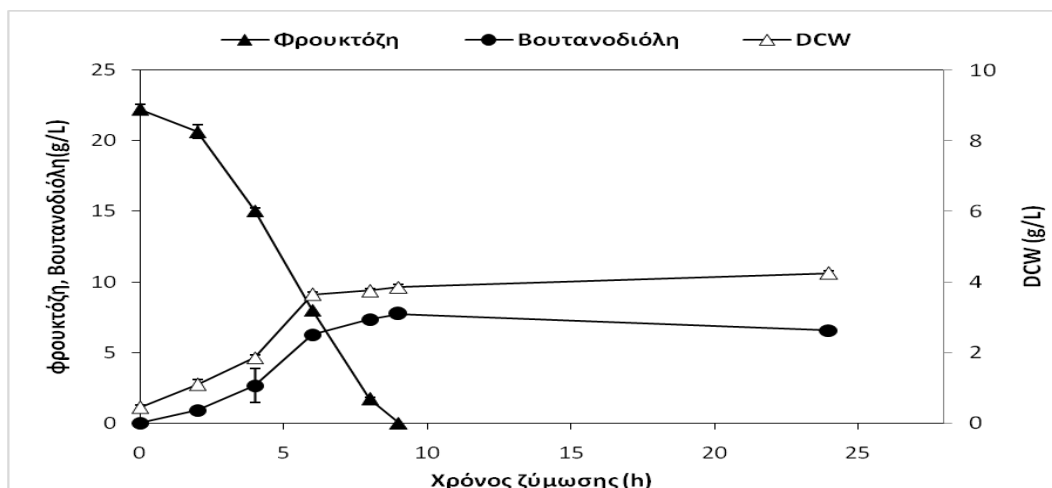
Η παραγωγή των παραπροϊόντων παρουσίασε παρόμοια συμπεριφορά για όλες τις πηγές άνθρακα. Η συγκέντρωση του οξικού οξέος κυμάνθηκε για τις έξι πηγές άνθρακα από 5,2g/L., αρχική συγκέντρωση, έως 3,7g/L, η παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος από 1,5-1,95g/L, της αιθανόλης από 1,6-4,65g/L και της ακετοΐνης από 3,3-4g/L. Για τη σακχαρόζη η συγκέντρωση του οξικού οξέος μειώθηκε από 8.1 στο 1.9g/L., του ηλεκτρικού οξέος έφτασε τα 3,65g/L, και της αιθανόλης τα 4,65g/L.



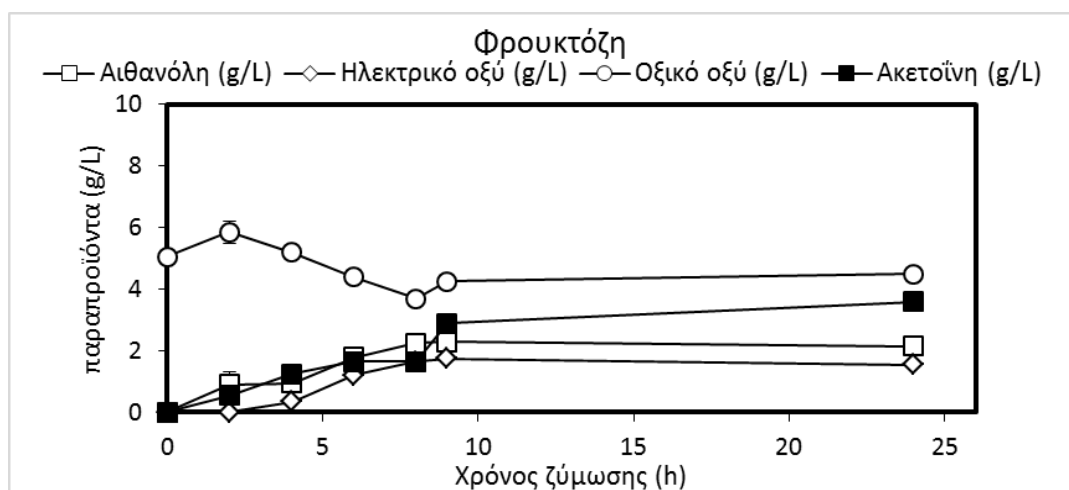
Σχήμα 3.3.4.1: Γράφημα κατανάλωσης αραβινόζης, παραγωγής 2,3-βουτανودیολης, παραγωγής βιομάζας με χρήση του μικροοργανισμού *Citrobacter freundii* 207.



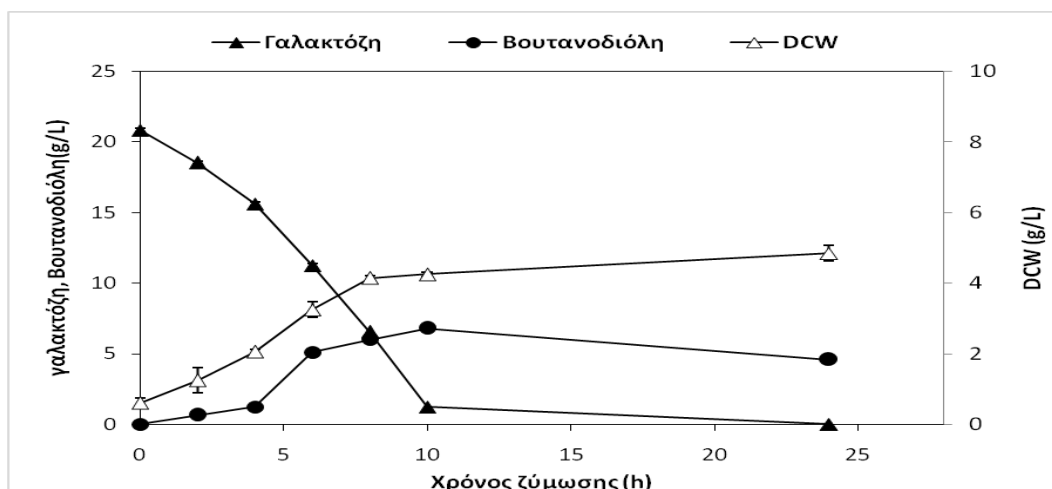
Σχήμα 3.3.4.2: Γράφημα παραγωγής παραπροϊόντων με χρήση του μικροοργανισμού *Citrobacter freundii* 207.



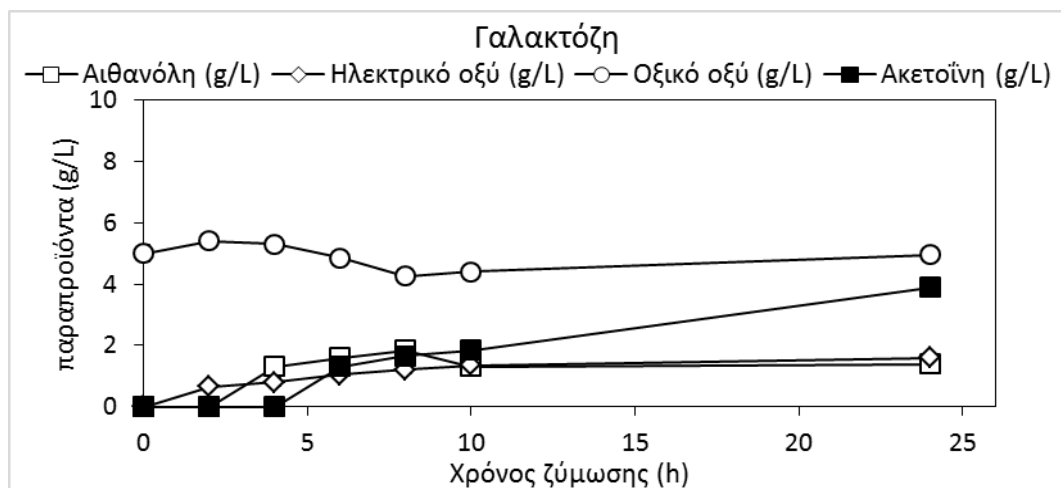
Σχήμα 3.3.4.3: Γράφημα κατανάλωσης φρουκτόζης, παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης, παραγωγής βιομάζας με χρήση του μικροοργανισμού *Citrobacter freundii* 207.



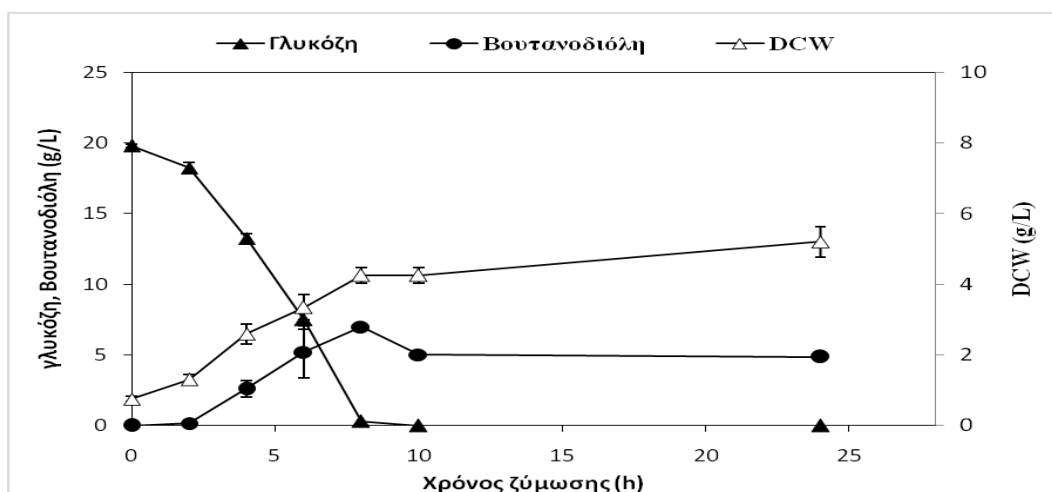
Σχήμα 3.3.4.4: Γράφημα παραγωγής παραπροϊόντων με χρήση του μικροοργανισμού *Citrobacter freundii* 207.



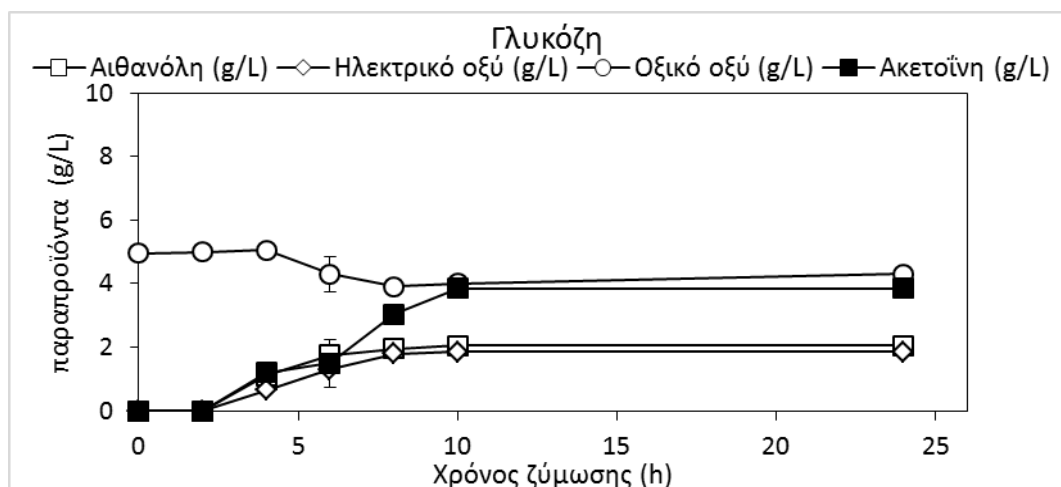
Σχήμα 3.3.4.5: Γράφημα κατανάλωσης γαλακτόζης, παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης, παραγωγής βιομάζας με χρήση του μικροοργανισμού *Citrobacter freundii* 207.



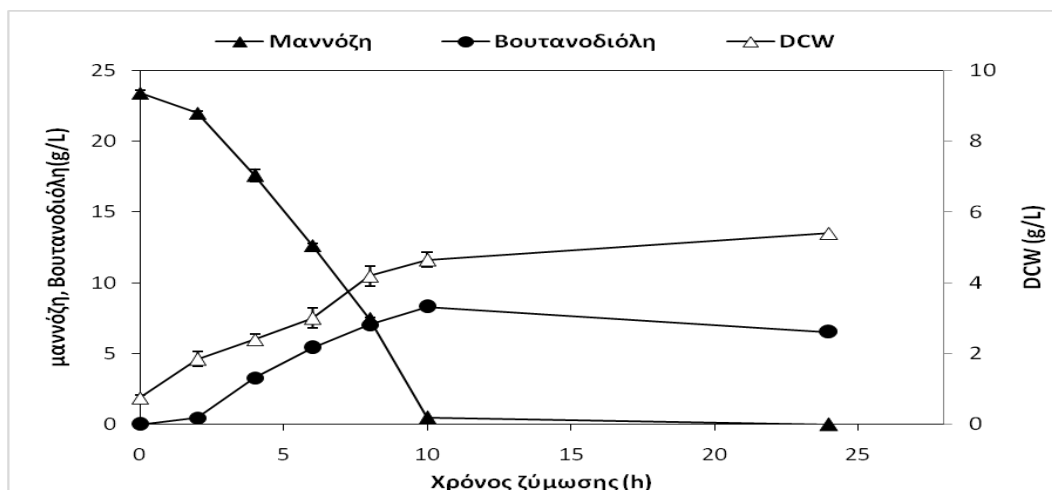
Σχήμα 3.3.4.6: Γράφημα παραγωγής παραπροϊόντων με χρήση του μικροοργανισμού *Citrobacter freundii* 207.



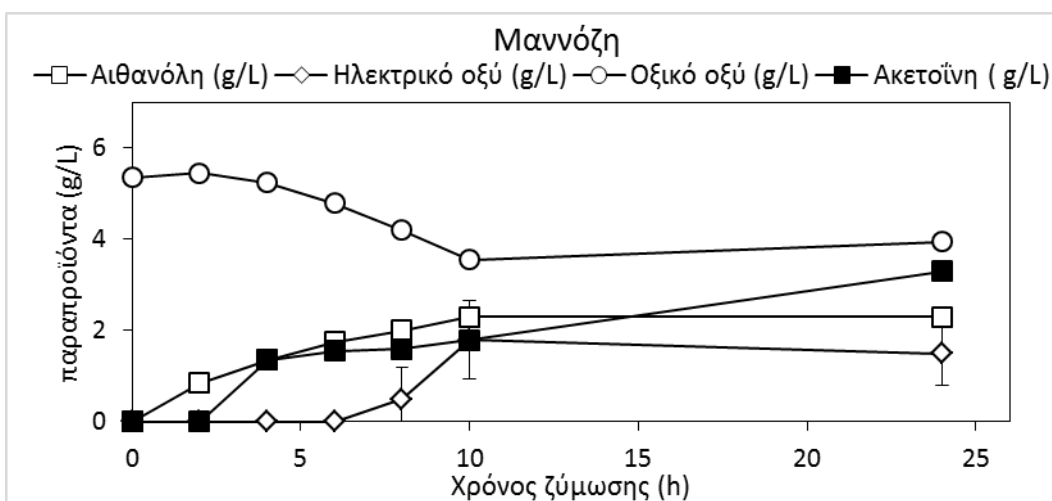
Σχήμα 3.3.4.7: Γράφημα κατανάλωσης γλυκόζης, παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης, παραγωγής βιομάζας με χρήση του μικροοργανισμού *Citrobacter freundii* 207.



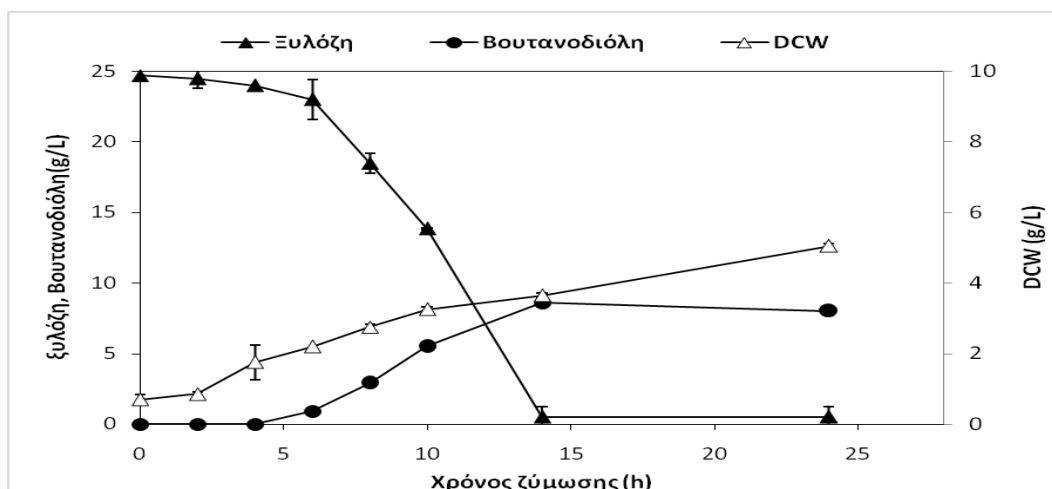
Σχήμα 3.3.4.8: Γράφημα παραγωγής παραπροϊόντων με χρήση του μικροοργανισμού *Citrobacter freundii* 207.



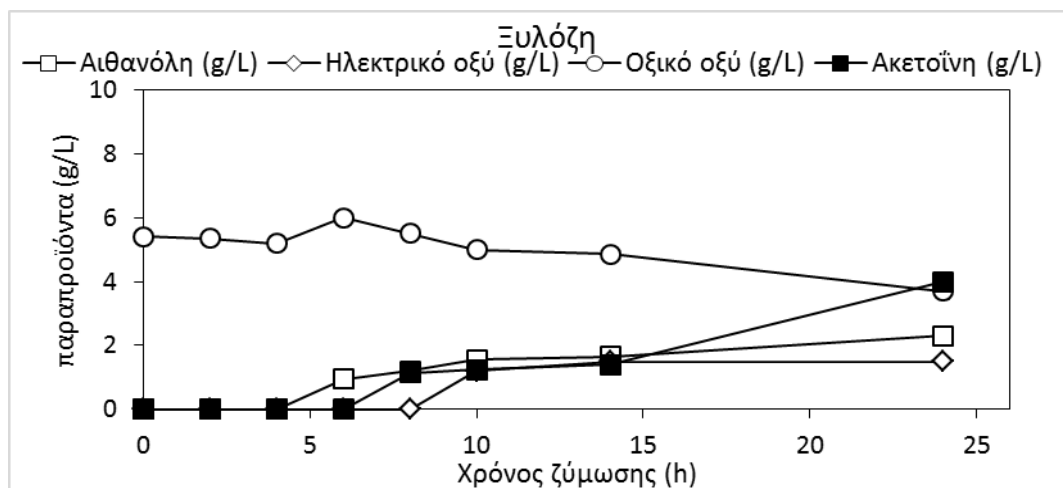
Σχήμα 3.3.4.9: Γράφημα κατανάλωσης μαννόζης, παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης, παραγωγής βιομάζας με χρήση του μικροοργανισμού *Citrobacter freundii* 207.



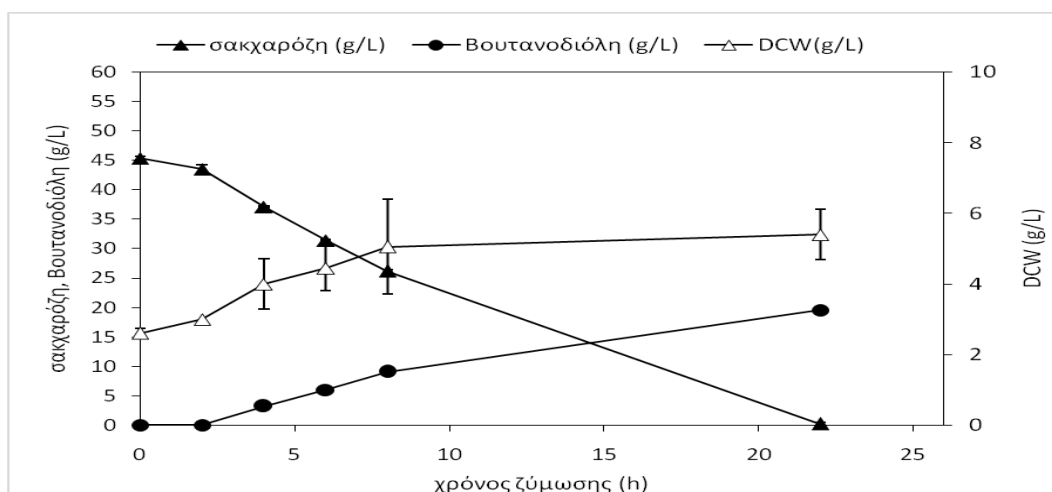
Σχήμα 3.3.4.10: Γράφημα παραγωγής παραπροϊόντων με χρήση του μικροοργανισμού *Citrobacter freundii* 207.



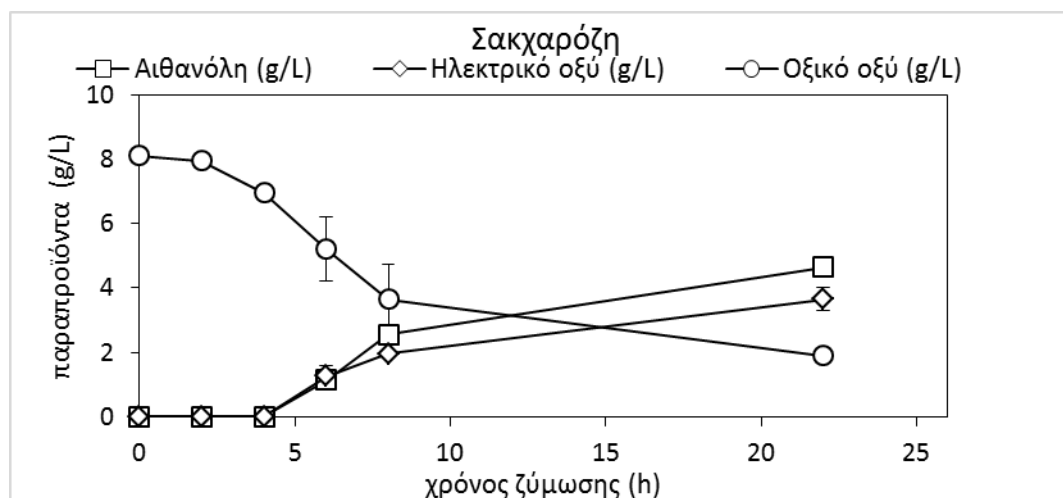
Σχήμα 3.3.4.11: Γράφημα κατανάλωσης ξυλόζης, παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης, παραγωγής βιομάζας με χρήση του μικροοργανισμού *Citrobacter freundii* 207.



Σχήμα 3.3.4.12: Γράφημα παραγωγής παραπροϊόντων με χρήση του μικροοργανισμού *Citrobacter freundii* 207.



Σχήμα 3.3.4.13: Γράφημα κατανάλωσης σακχαρόζης, παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης, παραγωγής βιομάζας με χρήση του μικροοργανισμού *Citrobacter freundii* 207.



Σχήμα 3.3.4.14: Γράφημα παραγωγής παραπροϊόντων με χρήση του μικροοργανισμού *Citrobacter freundii* 207.

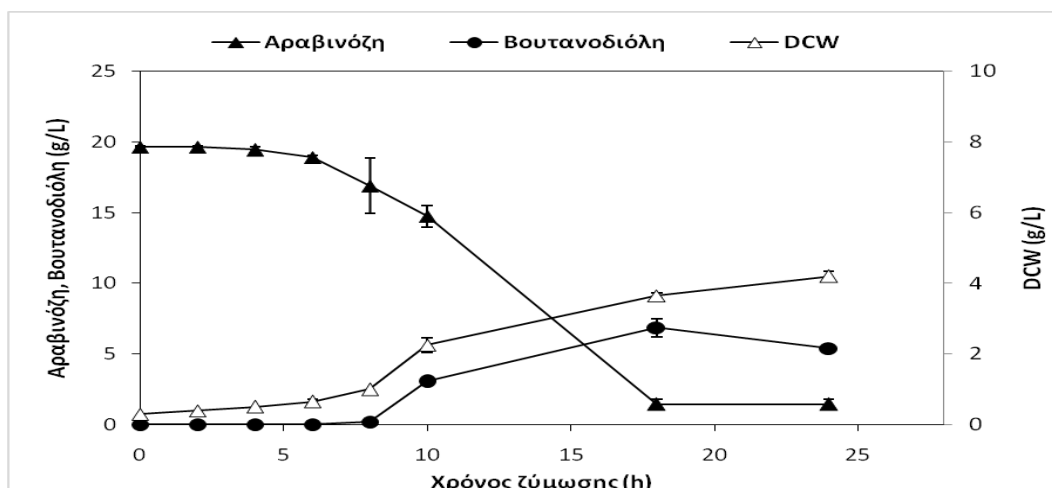
3.3.5 Παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης με χρήση του στελέχους *Enterobacter* sp. 208.

Το στέλεχος *Enterobacter* sp. 208 κατανάλωσε μόνο τη γαλακτόζη (Σχήμα 3.3.5.5) στις δέκα πρώτες ώρες της ζύμωσης, με μία ποσότητα σακχάρων 1g/L να παραμένει μέχρι την τελευταία δειγματοληψία στις εικοσιτέσσερις ώρες, ενώ για τη γλυκόζη (Σχήμα 3.3.5.7) και τη μαννόζη (Σχήμα 3.3.5.9) απαιτήθηκαν δώδεκα ώρες με μία μικρή ωστόσο ποσότητα μαννόζης του 1g/L να παραμένει μέχρι και τις εικοσιτέσσερις ώρες. Για όλες τις υπόλοιπες πηγές άνθρακα που χρησιμοποιήθηκαν, αραβινόζη (Σχήμα 3.3.5.1), φρουκτόζη (Σχήμα 3.3.5.3) και ξυλόζη (Σχήμα 3.3.5.11) απαιτήθηκαν δεκαοχτώ έως είκοσι ώρες για την κατανάλωσή τους και εκτός της φρουκτόζης που καταναλώθηκε, μικρή ποσότητα αραβινόζης και ξυλόζης συγκεντρώσεων 1,45g/L, και 3g/L αντίστοιχα παρέμειναν μέχρι και την τελευταία δειγματοληψία στις εικοσιτέσσερις ώρες. Η σακχαρόζη (Σχήμα 3.3.5.13) καταναλώθηκε πλήρως στις είκοσι ώρες ζύμωσης όπως και με τους προαναφερθέντες μικροοργανισμούς ακολουθώντας γενικά ίδια πορεία προς την κατανάλωσή της.

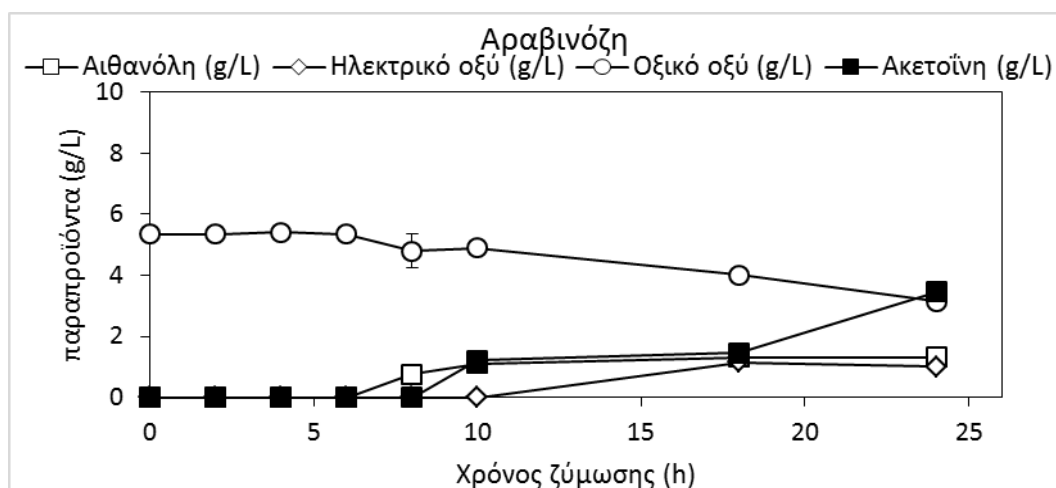
Η παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης ξεκινά μετά τις δύο ώρες για τη μαννόζη, μετά τις τέσσερις ώρες για τη γαλακτόζη και τη γλυκόζη, μετά τις έξι ώρες για την αραβινόζη και τη ξυλόζη, μετά τις οχτώ ώρες για τη φρουκτόζη και για τη σακχαρόζη μετά τις δύο πρώτες ώρες της ζύμωσης. Μέγιστη συγκέντρωση 2,3-βουτανοδιόλης παρατηρείται για τη γαλακτόζη στις δέκα ώρες στα 6,295g/L με συντελεστή αποδόσεως $Y = 0,33\text{g/g}$ και παραγωγικότητα $P = 0,63\text{g/L}\cdot\text{h}$, για τη μαννόζη και τη γλυκόζη στις δώδεκα ώρες με 7,62g/L, συντελεστή αποδόσεως $Y = 0,34\text{g/g}$ και παραγωγικότητα $P = 0,64\text{g/L}\cdot\text{h}$ και με 7,5g/L, συντελεστή αποδόσεως $Y = 0,38\text{g/g}$ και παραγωγικότητα $P = 0,63\text{g/L}\cdot\text{h}$, για την αραβινόζη στις δεκαοχτώ ώρες και 6,85g/L με συντελεστή αποδόσεως $Y = 0,33\text{g/g}$ και παραγωγικότητα $P = 0,33\text{g/L}\cdot\text{h}$ αντίστοιχα, για τη φρουκτόζη και τη ξυλόζη στις είκοσι ώρες στα 7,8g/L με συντελεστή αποδόσεως $Y = 0,38\text{g/g}$ και παραγωγικότητα $P = 0,39\text{g/L}\cdot\text{h}$ και με 7,85g/L, συντελεστή αποδόσεως $Y = 0,37\text{g/g}$ και παραγωγικότητα $P = 0,39\text{g/L}\cdot\text{h}$ αντίστοιχα και τέλος για τη σακχαρόζη στις είκοσι ώρες σε συγκέντρωση 17,6g/L, με συντελεστή αποδόσεως $Y = 0,36\text{g/g}$ και παραγωγικότητα $P = 0,88\text{g/L}\cdot\text{h}$.

Η βιομάζα ακολουθεί παρόμοιο ρυθμό παραγωγής σε όλες τις πηγές άνθρακα και φτάνει κατά μέσο όρο τα 3,6g/L. Στη σακχαρόζη, η οποία χρησιμοποιήθηκε σε μεγαλύτερη συγκέντρωση, η παραγόμενη βιομάζα έφτασε τα 5,8g/L.

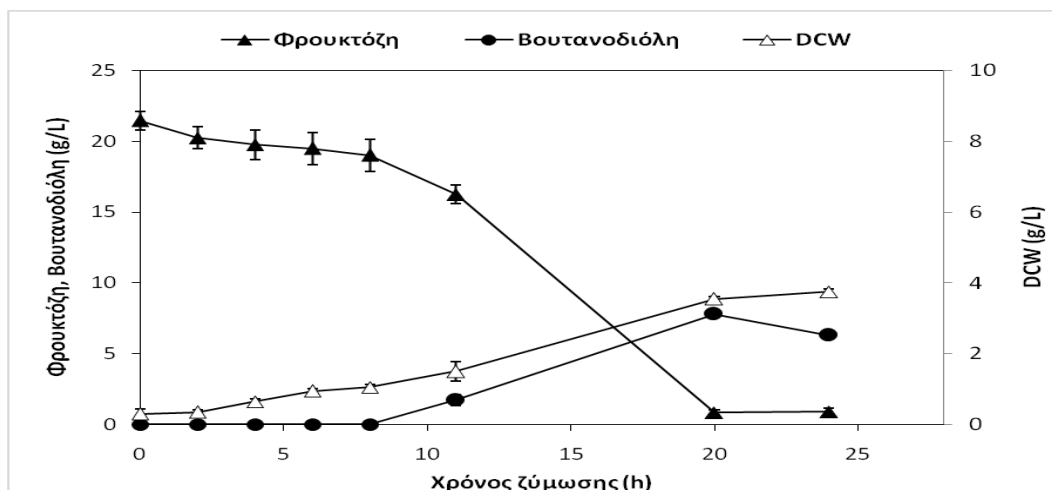
Η παραγωγή των παραπροϊόντων παρουσίασε παρόμοια συμπεριφορά για όλες τις πηγές άνθρακα. Η συγκέντρωση του οξικού οξέος κυμάνθηκε για τις έξι πηγές άνθρακα από 5,45g/L., αρχική συγκέντρωση, έως 2,6g/L, η παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος από 1,25-2,65g/L, της αιθανόλης από 1,3-1.9g/L και της ακετοΐνης από 2,25-4,4g/L. Για τη σακχαρόζη η συγκέντρωση του οξικού οξέος μειώθηκε από 8,1 στο 1,5g/L, του ηλεκτρικού οξέος έφτασε τα 4,25g/L, και της αιθανόλης τα 3,55g/L.



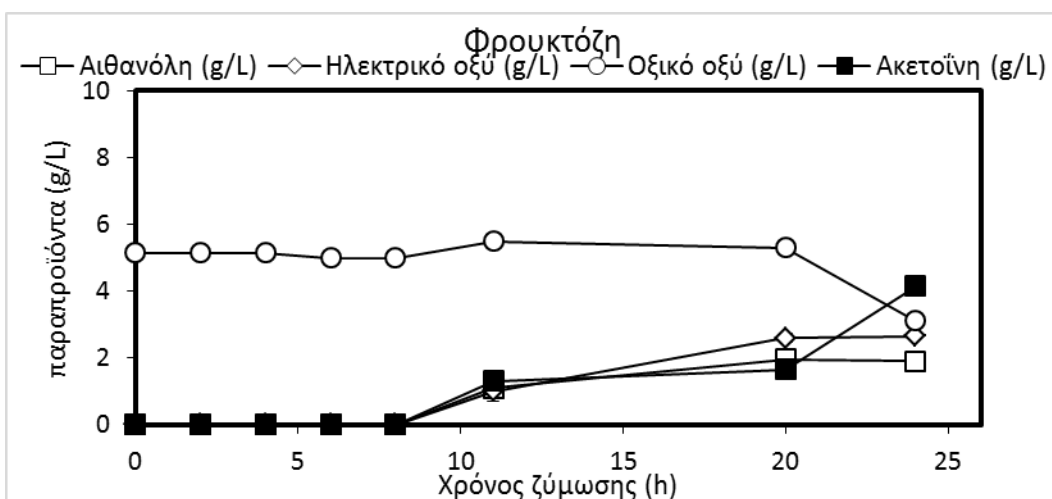
Σχήμα 3.3.5.1: Γράφημα κατανάλωσης αραβινόζης, παραγωγής 2,3-βουτανιοδιόλης, παραγωγής βιομάζας με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter sp.* 208.



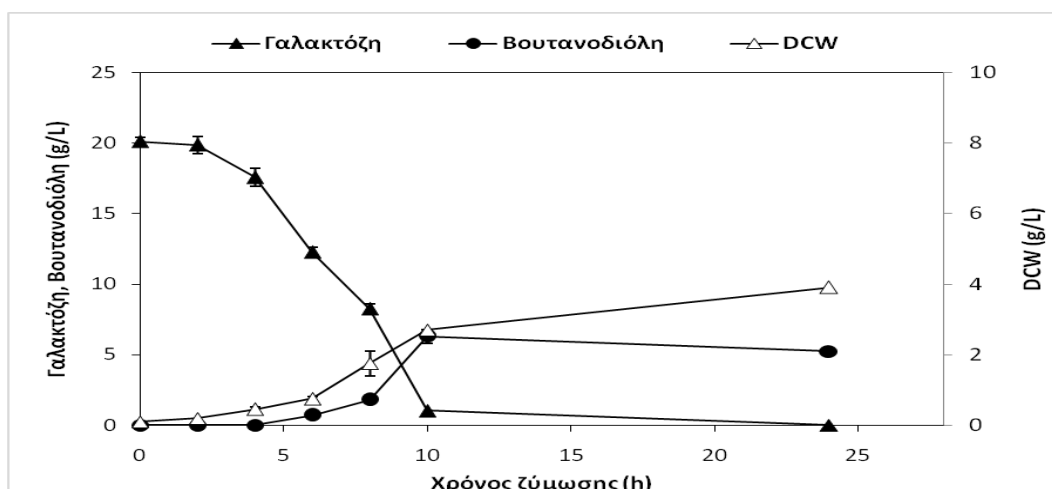
Σχήμα 3.3.5.2: Γράφημα παραγωγής παραπροϊόντων με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter sp.* 208.



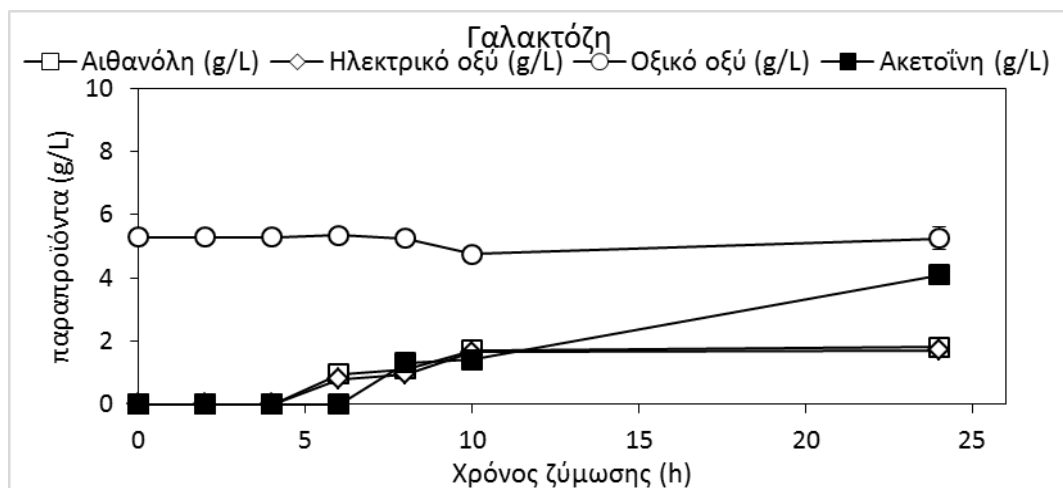
Σχήμα 3.3.5.3: Γράφημα κατανάλωσης φρουκτόζης, παραγωγής 2,3-βουτανολιόλης, παραγωγής βιομάζας με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter* sp. 208.



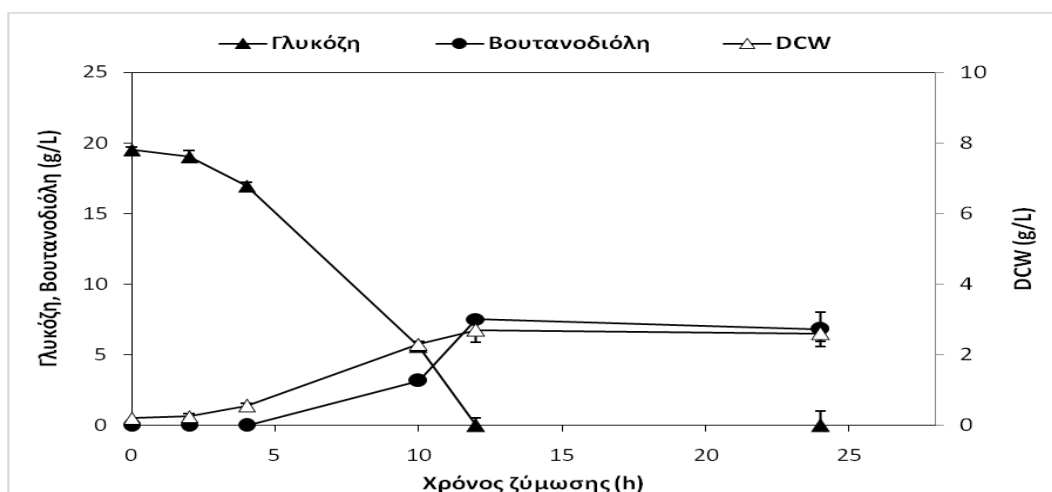
Σχήμα 3.3.5.4: Γράφημα παραγωγής παραπροϊόντων με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter* sp. 208.



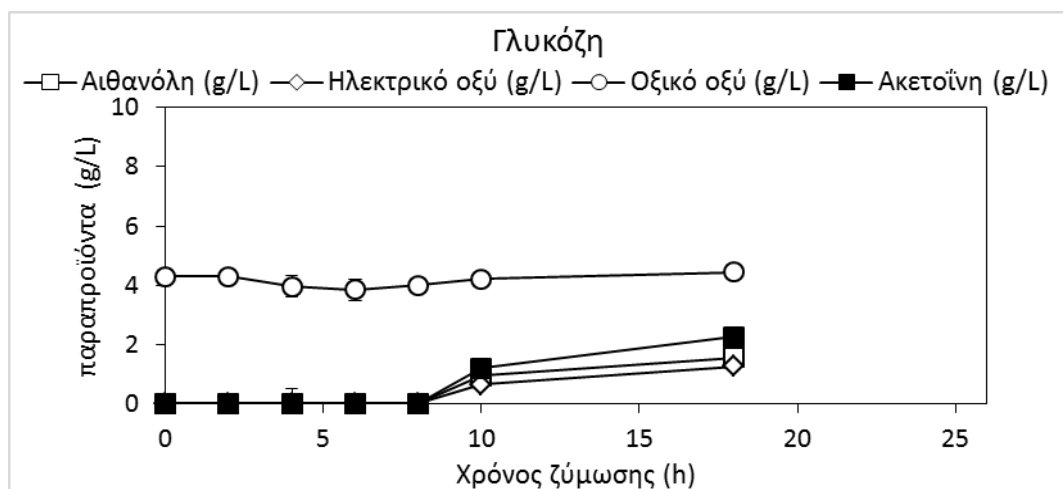
Σχήμα 3.3.5.5: Γράφημα κατανάλωσης γαλακτόζης, παραγωγής 2,3-βουτανολιόλης, παραγωγής βιομάζας με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter* sp. 208.



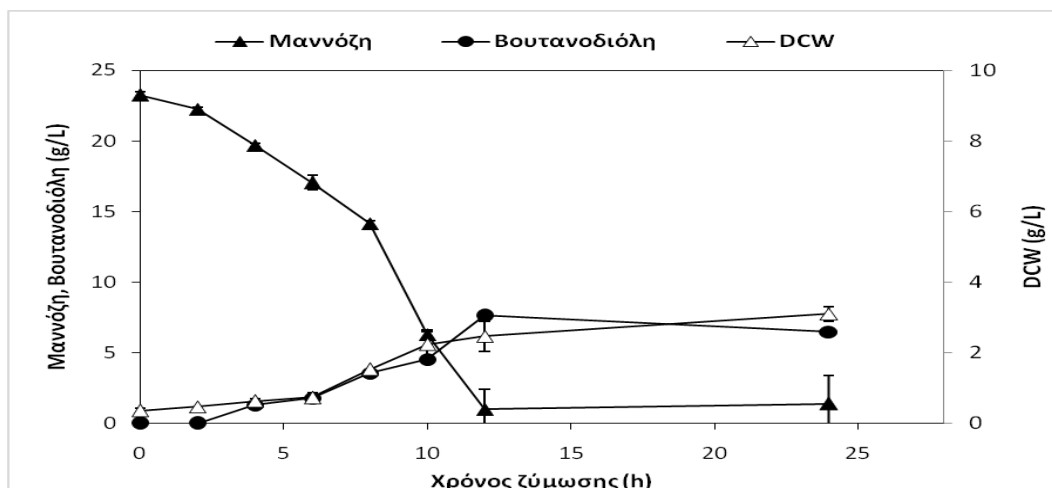
Σχήμα 3.3.5.6: Γράφημα παραγωγής παραπροϊόντων με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter* sp. 208.



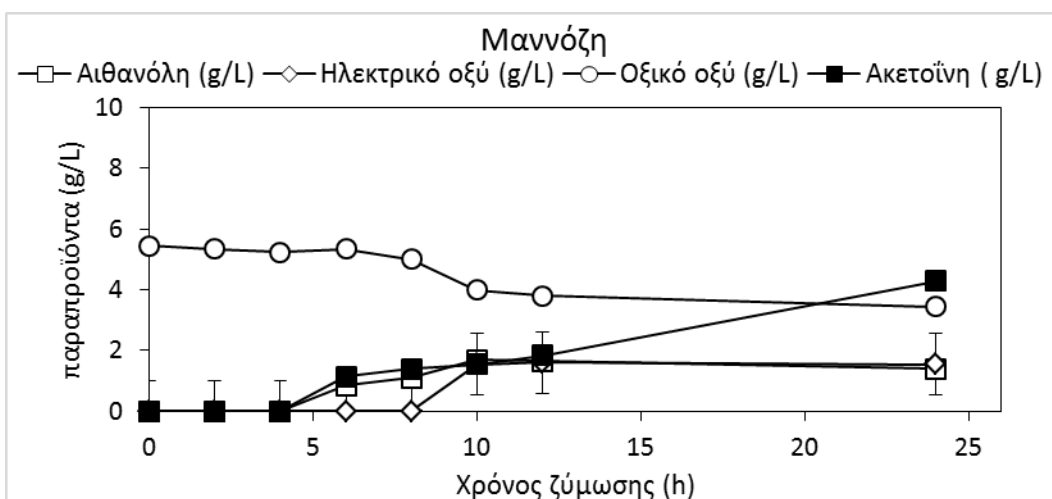
Σχήμα 3.3.5.7: Γράφημα κατανάλωσης γλυκόζης, παραγωγής 2,3-βουτανودیολης, παραγωγής βιομάζας με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter* sp. 208.



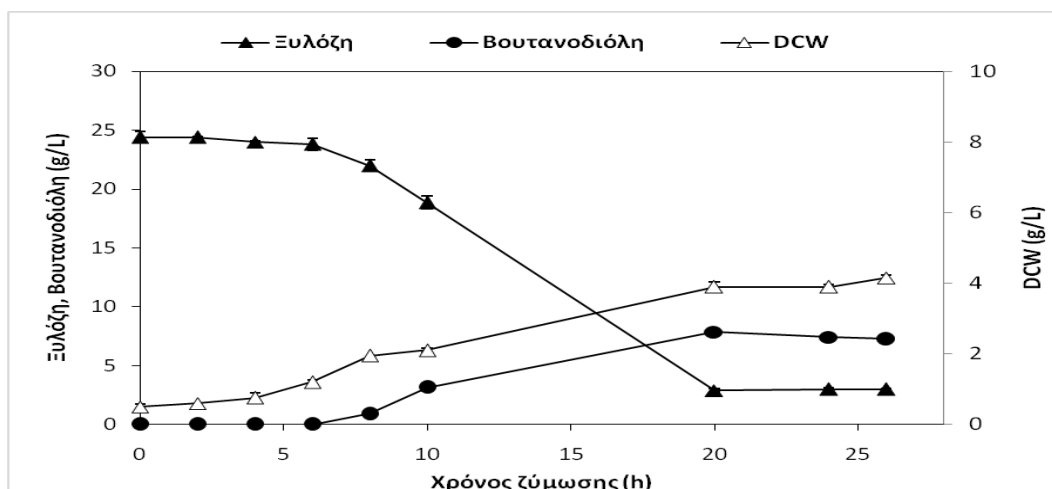
Σχήμα 3.3.5.8: Γράφημα παραγωγής παραπροϊόντων με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter* sp. 208.



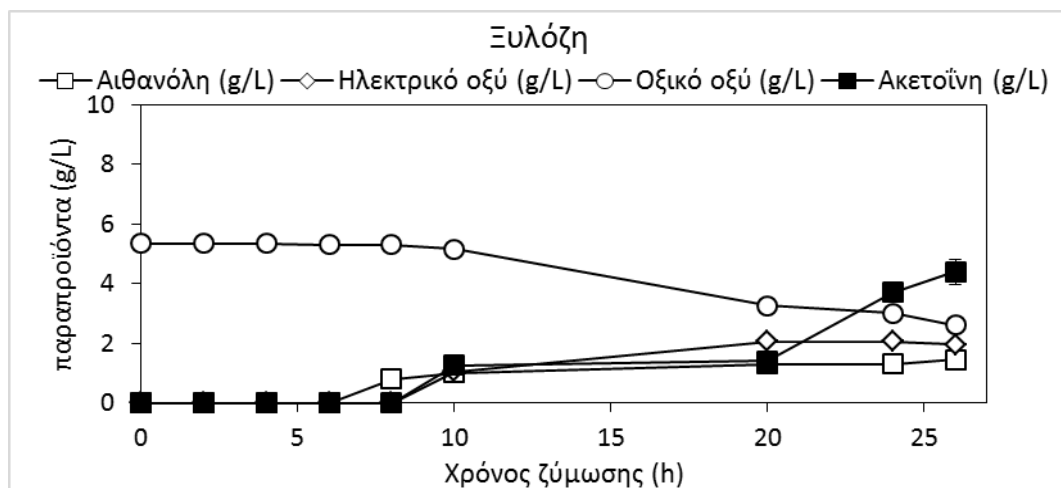
Σχήμα 3.3.5.9: Γράφημα κατανάλωσης μαννόζης, παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης, παραγωγής βιομάζας με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter* sp. 208.



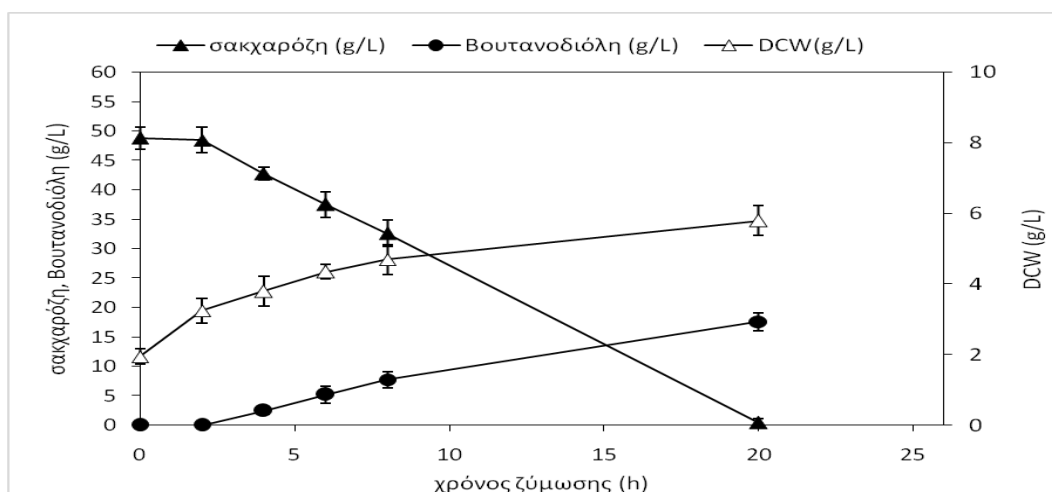
Σχήμα 3.3.5.10: Γράφημα παραγωγής παραπροϊόντων με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter* sp. 208.



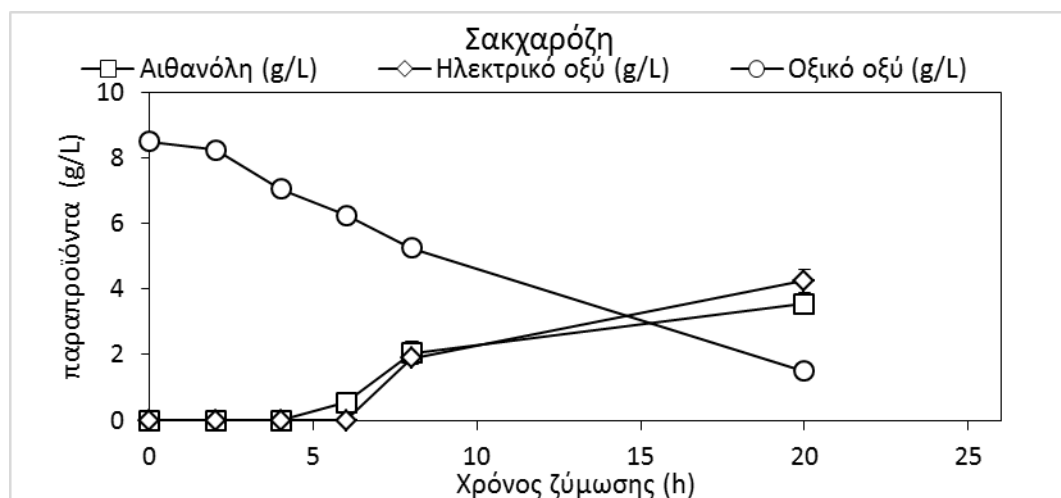
Σχήμα 3.3.5.11: Γράφημα κατανάλωσης ξυλόζης, παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης, παραγωγής βιομάζας με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter* sp. 208.



Σχήμα 3.3.5.12: Γράφημα παραγωγής παραπροϊόντων με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter* sp. 208.



Σχήμα 3.3.5.13: Γράφημα κατανάλωσης σακχαρόζης, παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης, παραγωγής βιομάζας με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter* sp. 208.



Σχήμα 3.3.5.14: Γράφημα παραγωγής παραπροϊόντων με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter* sp. 208

3.3.6 Συνοπτική παρουσίαση αποτελεσμάτων ζυμώσεων μονοσακχαριτών.

Συνοπτικά αποτελέσματα των ζυμώσεων των μονοσακχαριτών με καθένα από τα πέντε στελέχη εντεροβακτηρίων σε κωνικές φιάλες 500mL, με ενεργό όγκο 100mL, στους 30°C, υπό ανάδευση 180rpm σε περιστρεφόμενο επωαστικό κλίβανο. Απ' όλα τα βακτήρια, αυτός που ταχύτερα κατανάλωσε τις πηγές άνθρακα σε σχέση με τα υπόλοιπα βακτήρια ήταν ο *Enterobacter* sp. καθώς επίσης παρήγαγε και τη μεγαλύτερη ποσότητα 2,3-βουτανοδιόλης, συγκεντρώσεως 8,5g/L όταν καλλιεργήθηκε στη μαννόζη. Τη μικρότερη παραγωγικότητα παρουσίασε το στέλεχος *Enterobacter* sp. 208. Βάσει των ανωτέρω αποτελεσμάτων επελέγη τελικά το στέλεχος *Enterobacter* sp., ως αυτό που θα χρησιμοποιούνταν για τις ζυμώσεις, στις κωνικές φιάλες, με το εκχύλισμα φρούτων και το υδρόλυμα των λαχανικών καθώς και αυτό που τελικά χρησιμοποιήθηκε για τη ζύμωση του εκχυλίσματος φρούτων στο βιοαντιδραστήρα ημισυνεχούς καλλιέργειας.

Πίνακας 3.3.6.2: Συνοπτική παρουσίαση στελεχών και συνθετικών υποστρωμάτων ζυμώσεων, παραγόμενης 2,3-βουτανοδιόλης, συντελεστή αποδόσεως και παραγωγικότητας.

Στέλεχος	Υπόστρωμα	Βουτανοδιόλη(g/L)	Συντελεστής αποδόσεως Y(g/g)	Παραγωγικότητα P(g/L*h)
<i>Enterobacter</i> sp.	Γλυκόζη	8,1	0,38	1,01
	Φρουκτόζη	7,7	0,37	0,77
	Μαννόζη	8,5	0,38	0,86
	Αραβινόζη	6,9	0,31	0,69
	Ξυλόζη	6,3	0,38	0,68
	Γαλακτόζη	7,3	0,37	0,73
	Σακχαρόζη	18,3	0,4	0,91
<i>Enterobacter aerogenes</i> 9	Γλυκόζη	6,9	0,37	0,58
	Φρουκτόζη	7,7	0,34	0,38
	Μαννόζη	7,3	0,37	0,61
	Αραβινόζη	7,3	0,33	0,61
	Ξυλόζη	7,1	0,36	0,3
	Γαλακτόζη	6,5	0,34	0,59
	Σακχαρόζη	18,4	0,4	0,92
<i>Enterobacter aerogenes</i> 10	Γλυκόζη	7,9	0,37	0,79
	Φρουκτόζη	7,7	0,37	0,43
	Μαννόζη	8	0,36	0,8
	Αραβινόζη	7,4	0,34	0,74
	Ξυλόζη	7,9	0,36	0,4
	Γαλακτόζη	6,9	0,34	0,69
	Σακχαρόζη	20,2	0,4	1,01
<i>Enterobacter</i> sp.208	Γλυκόζη	7,5	0,38	0,63
	Φρουκτόζη	7,8	0,38	0,39
	Μαννόζη	7,6	0,34	0,64
	Αραβινόζη	6,9	0,38	0,38
	Ξυλόζη	7,9	0,37	0,39
	Γαλακτόζη	6,3	0,33	0,63
	Σακχαρόζη	17,6	0,36	0,88
<i>Citrobacter freundii</i> 207	Γλυκόζη	7	0,36	0,87
	Φρουκτόζη	7,7	0,35	0,88
	Μαννόζη	8,3	0,36	0,83
	Αραβινόζη	7,6	0,36	0,76
	Ξυλόζη	8,6	0,36	0,61
	Γαλακτόζη	6,8	0,35	0,68
	Σακχαρόζη	19,6	0,4	0,89

Όσον αφορά στα παραπροϊόντα, σε όλα τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν με όλους τους ανωτέρου μικροοργανισμούς, η παρουσία τους είναι αναμενόμενη αν λάβουμε υπόψη το μεταβολικό μονοπάτι για την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης. Πιο συγκεκριμένα η παρουσία του οξικού οξέος σε συγκέντρωση περίπου 5g/L οφείλεται στην προσθήκη του άλατος κατά την

παρασκευή της προκαλλιέργειας και της κύριας καλλιέργειας. Στην πορεία της ζύμωσης το οξικό οξύ ανακαταναλώνεται. Επίσης παρατηρείται παραγωγή αιθανόλης και ηλεκτρικού οξέος. Η παραγωγή ακετοΐνης οφείλεται στη μετατροπή της παραγόμενης βουτανοδιόλης, κυρίως του meso- ισομερούς, σε αυτή. Πρόκειται για μία αντίδραση κατά την οποία βουτανοδιόλη μετατρέπεται σε ακετοΐνη και παράγεται έτσι κι ένα μόριο NADH, το οποίο χρησιμοποιεί ο μικροοργανισμός ως ενέργεια.

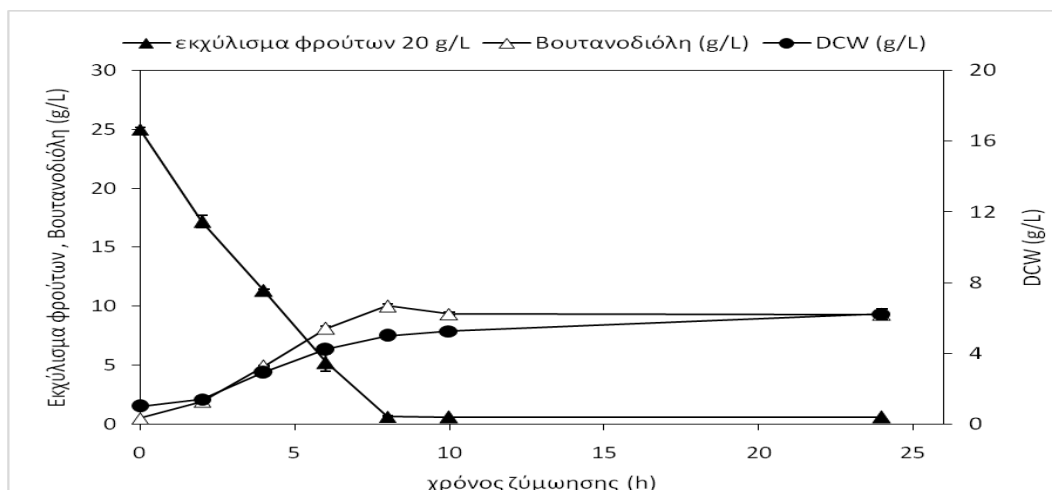
Πίνακας 3.3.6.3: Συνοπτική παρουσίαση στελεχών και υποστρωμάτων ζυμώσεων, παραγόμενης 2,3-βουτανودیολης, συντελεστή αποδόσεως και παραγωγικότητας από βιβλιογραφία.

Στέλεχος	Υπόστρωμα (g/L)	Βουτανودیολη (g/L)	Συντελεστής αποδόσεως Y(g/g)	Παραγωγικότητα P(g/L*h)	Βιβλιογραφική πηγή.
<i>K. pneumoniae</i>	Γλυκόζη	20,93	0,38		Song et al. 2012
<i>E. cloacae</i> NRRLB 23289	Γλυκόζη	18,6	0,37	0,006	Saha et al 1999
	Ξυλόζη	18,9	0,38	0,006	
	Αραβινόζη	21,7	0,43	0,01	
	Μαννόζη	18,6	0,37	0,005	
	Γαλακτόζη	18,9	0,38	0,006	
	Φρουκτόζη	21,7	0,43	0,01	
	Σακχαρόζη	17,7	0,35	0,007	
	Μείγμα (Γλυκόζη-Αραβινόζη-Γαλακτόζη) 1:1:1	19,6	0,39	0,008	
	Μείγμα (Γλυκόζη-Αραβινόζη-Γαλακτόζη) 1:2:1	19,5	0,39	0,008	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Γλυκόζη	19,66	0,38	0,76	Huang et al. 2013
	Ξυλόζη	14,67	0,39	0,82	
	Αραβινόζη	15,45	0,37	0,87	
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Γλυκόζη	20,15	0,41	0,78	
	Ξυλόζη	14,81	0,37	0,52	
	Αραβινόζη	15,88	0,38	0,73	
<i>Serratia marcescens</i>	Γλυκόζη	19,61	0,41	0,75	
	Αραβινόζη	9	0,35	0,46	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Γλυκόζη	11,5	0,23	0,23	Grover et al 1990
<i>Klebsiella Pneumoniae</i>	Γλυκόζη	52,4	0,38	1-1,5	Qin et al 2006
<i>Citrobacter freundii</i>	Γλυκερόλη	4,3	0,24	0,005	Metsoviti et al 2012
<i>Enterobacter aerogenes</i> 9	Γλυκερόλη	1,5	0,12	0,005	
<i>Enterobacter aerogenes</i> 10	Γλυκερόλη	2	0,14	0,005	
<i>Enterobacter</i> sp. 208	Γλυκερόλη	3	0,18	0,0038	

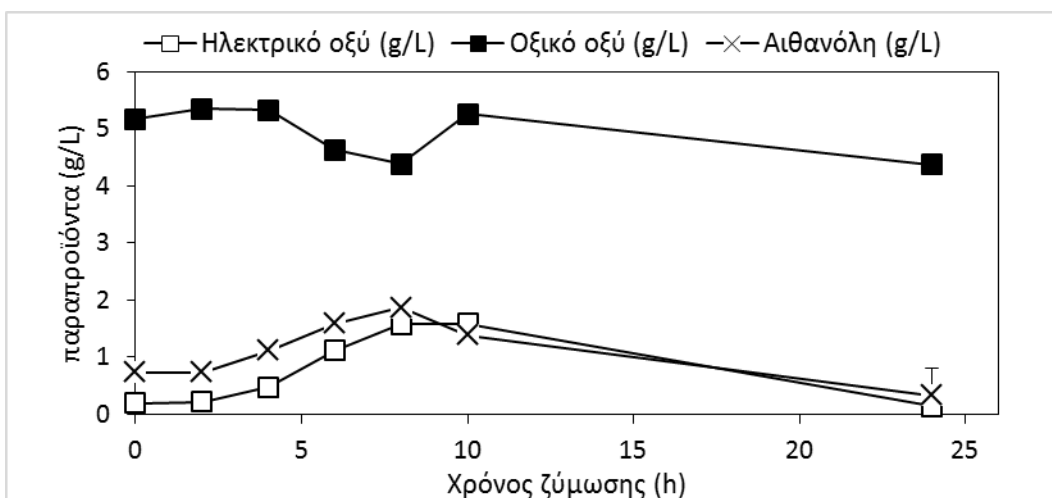
Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των πινάκων 3.3.6.2 και 3.3.6.3 παρατηρούμε ότι γενικότερα οι τιμές του συντελεστή αποδόσεως σε όλες τις περιπτώσεις κυμάνθηκαν στα ίδια επίπεδα καθώς στις ζυμώσεις της συγκεκριμένης μελέτης ο συντελεστής αποδόσεως κυμάνθηκε από 0,31g/g έως 0,38g/g ενώ στη βιβλιογραφία από 0,33g/g έως 0,39g/g με εξαίρεση τέσσερις περιπτώσεις όπου ο συντελεστής αποδόσεως έφτασε πάνω από 0,4g/g. Ο συντελεστής αποδόσεως σχετίζεται με το είδος του μικροοργανισμού και την ικανότητά του να καταναλώνει την πηγή άνθρακα γεγονός που δικαιολογεί τις διαφορές στην τιμή του. Ως προς την παραγωγικότητα, στα πειράματα της συγκεκριμένης μελέτης, αυτή κυμάνθηκε από 0,33g/L*h έως 1,01g/L*h. Οι χαμηλότερες τιμές παρατηρήθηκαν για τα στελέχη *Enterobacter aerogenes* 9 και *Enterobacter* sp. 208 με τιμές που κυμάνθηκαν από 0,3g/L*h έως 0,64g/L*h. Γενικότερα η παραγωγικότητα σε όλα τα πειράματα προσέγγισε την τιμή στη βιβλιογραφία με εξαίρεση τα πειράματα των Saha et al (1999), στους οποίους η τιμές παραγωγικότητας σε όλα τα πειράματα ήταν πολύ χαμηλές από 0,006g/L*h έως 0,01g/L*h καθώς η κατανάλωση όλων των πηγών άνθρακα από το συγκεκριμένο στέλεχος ολοκληρώθηκε σε μεγάλο χρονικό διάστημα άνω των εξήντα ωρών. Τέλος στα πειράματα που διεξήχθησαν με πηγή άνθρακα τη γλυκερόλη τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν παρήγαγαν από 1,5g/L έως 4,3g/L 2,3-βουτανοδιόλη με την παραγωγικότητα να κυμαίνεται από 0,0038g/L*h έως 0,005g/L*h (Metsoviti et al., 2012).

3.4 Παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης με χρήση του στελέχους *Enterobacter* sp. σε υπόστρωμα εκχυλίσματος φρούτων 20g/L

Μετά τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από τις ζυμώσεις με τα συνθετικά υποστρώματα εμπορικών σακχάρων το στέλεχος *Enterobacter* sp. χρησιμοποιήθηκε για ζύμωση με πηγή άνθρακα το εκχύλισμα φρούτων, συγκεντρώσεως 20g/L, προς παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης στις κωνικές φιάλες των 500mL με ενεργό όγκο 100mL σε ίδιες συνθήκες θερμοκρασίας, pH και αερισμού. Στόχος ήταν να εξετασθεί η ικανότητά του να επιβιώσει και να καταναλώσει το συγκεκριμένο υπόστρωμα παράγοντας βουτανοδιόλη



Σχήμα 3.4.1: Γράφημα κατανάλωσης εκχυλίσματος φρούτων, παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης, παραγωγής βιομάζας με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter* sp.

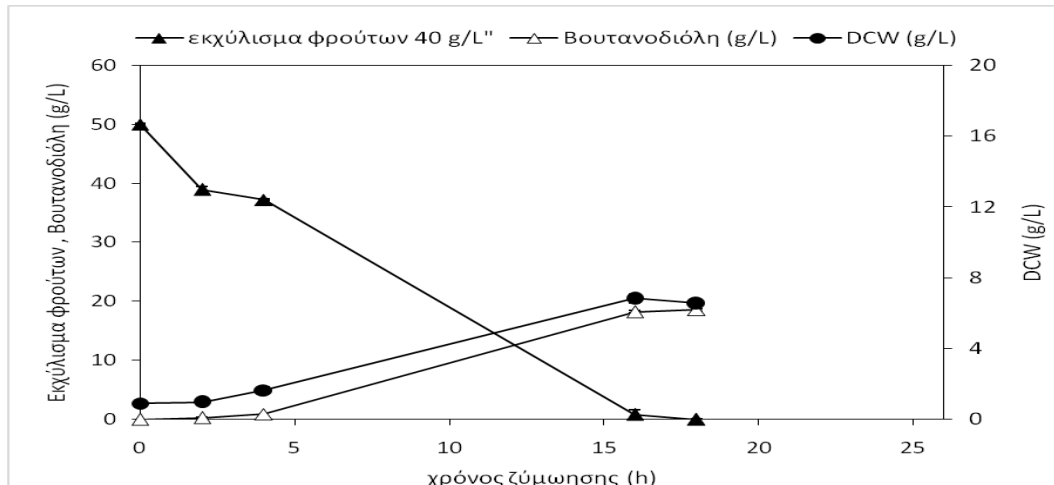


Σχήμα 3.4.2: Γράφημα παραγωγής παραπροϊόντων με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter* sp.

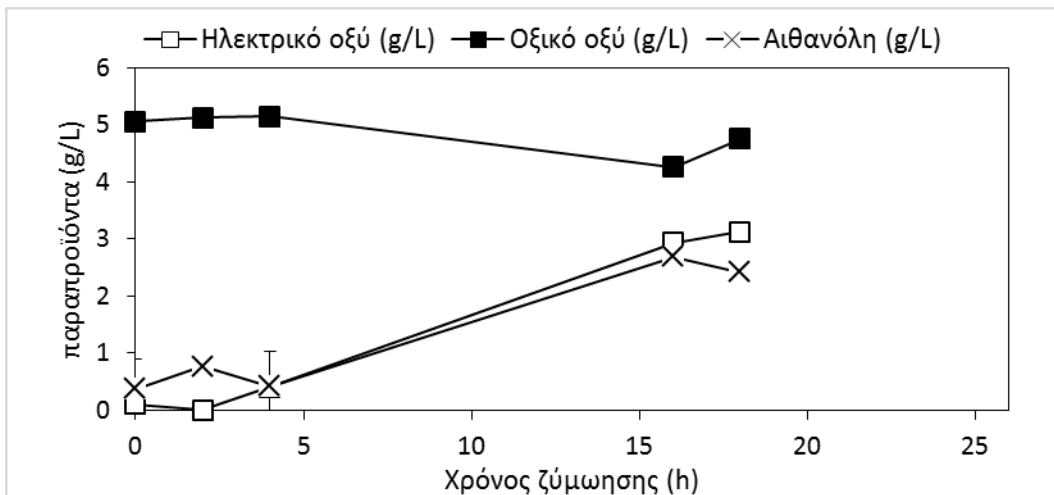
Από το παραπάνω γράφημα παρατηρούμε ότι η κατανάλωση των σακχάρων του εκχυλίσματος φρούτων πραγματοποιήθηκε ταχέως και ολοκληρώθηκε στις οχτώ ώρες ζύμωσης. Η παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης ξεκινά από τις δύο πρώτες ώρες της ζύμωσης και λαμβάνει τη μέγιστη τιμή συγκεντρώσεως στις οχτώ ώρες στα 10g/L με συντελεστή αποδόσεως $Y = 0,36\text{g/g}$ και παραγωγικότητα $P = 1,19\text{g/L}\cdot\text{h}$. Η παραγωγή βιομάζας αρχίζει επίσης στην αρχή της ζύμωσης και λαμβάνει μέγιστη τιμή συγκεντρώσεως στα 5g/L στο τέλος της ζύμωσης στις οχτώ ώρες. Η συγκέντρωση του οξικού οξέος μειώθηκε από 5.17 στο 4.38g/L, του ηλεκτρικού οξέος έφτασε τα 1,58g/L, και της αιθανόλης τα 1,88g/L.

3.5 Παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης με χρήση του στελέχους *Enterobacter* sp. σε υπόστρωμα εκχυλίσματος φρούτων 40g/L.

Οι ίδιες ζυμώσεις με το εκχύλισμα φρούτων ως πηγή άνθρακα επαναλήφθηκαν με συγκέντρωση 40g/L προς παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης.



Σχήμα 3.5.1: Γράφημα κατανάλωσης εκχυλίσματος φρούτων, παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης, παραγωγής βιομάζας με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter* sp.



Σχήμα 3.5.2: Γράφημα παραγωγής παραπροϊόντων με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter* sp.

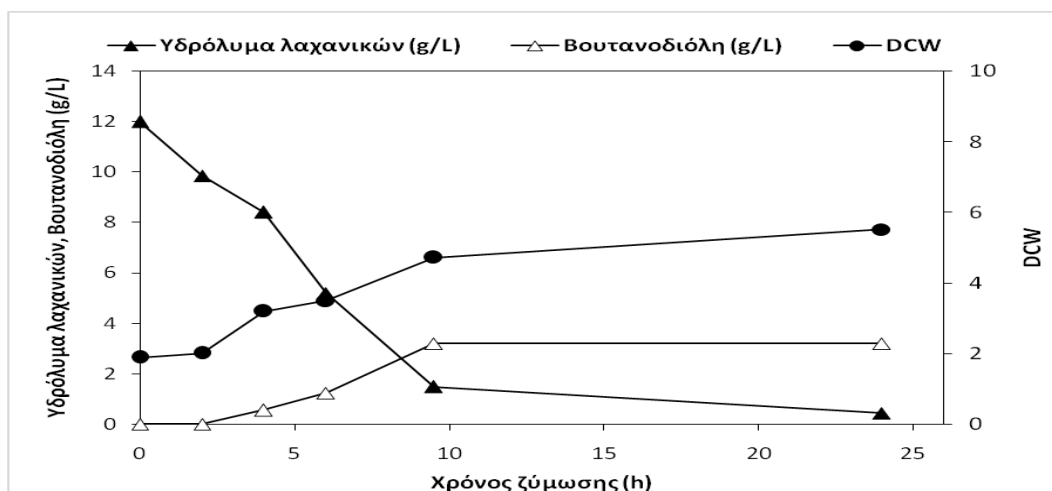
Από το παραπάνω γράφημα παρατηρούμε ότι η κατανάλωση των σακχάρων του εκχυλίσματος φρούτων συγκεντρώσεως 40g/L ολοκληρώθηκε στις δέκα έξι ώρες ζύμωσης.

Η παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης ξεκινά από τις δύο πρώτες ώρες της ζύμωσης και λαμβάνει τη μέγιστη τιμή συγκεντρώσεως στις δεκαοχτώ ώρες στα 18,57g/L με συντελεστή αποδόσεως $Y = 0,37\text{g/g}$ και παραγωγικότητα $P = 1,13\text{g/L}\cdot\text{h}$.

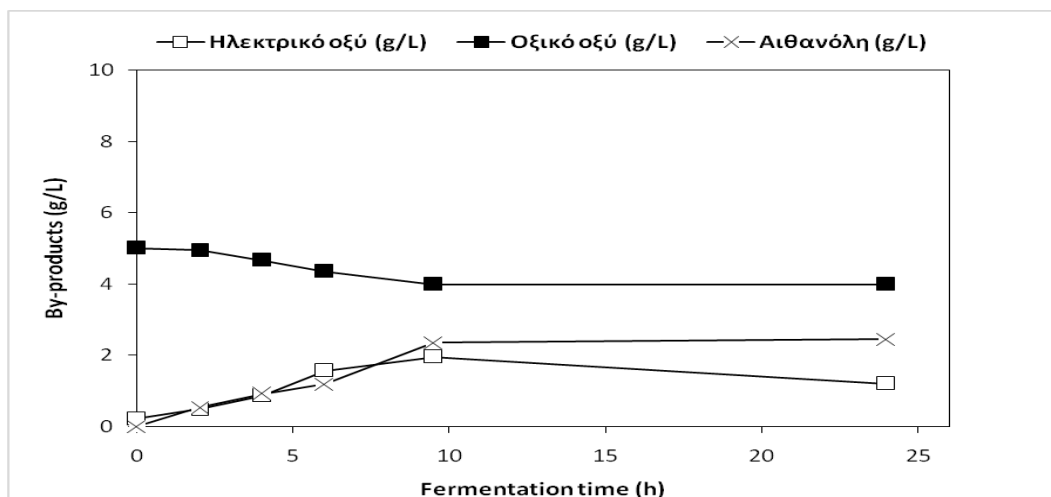
Η παραγωγή βιομάζας αρχίζει επίσης στην αρχή της ζύμωσης και λαμβάνει μέγιστη τιμή συγκεντρώσεως στα 6,8g/L στο τέλος της ζύμωσης στις δέκα έξι ώρες. Η συγκέντρωση του οξικού οξέος μειώθηκε από 5,06 στο 4,76g/L, του ηλεκτρικού οξέος έφτασε τα 2,94g/L, και της αιθανόλης τα 2,69g/L.

3.6 Παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης με χρήση του στελέχους *Enterobacter* sp. σε υπόστρωμα υδρολύματος λαχανικών 10g/L.

Το στέλεχος *Enterobacter* sp. δοκιμάστηκε επίσης και σε ζύμωση με πηγή άνθρακα το υδρόλυμα λαχανικών που λήφθηκε και ήταν δύο φορές συμπυκνωμένο ώστε τελικά να έχει συγκέντρωση 10g/L.



Σχήμα 3.6.1: Γράφημα κατανάλωσης υδρολύματος λαχανικών, παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης, παραγωγής βιομάζας με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter* sp.



Σχήμα 3.6.2: Γράφημα παραγωγής παραπροϊόντων με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter* sp.

Από το παραπάνω γράφημα παρατηρούμε ότι η κατανάλωση των σακχάρων του υδρολύματος λαχανικών πραγματοποιήθηκε στις εικοσιτέσσερις ώρες ζύμωσης. Γίνεται αντιληπτό ότι παρά τη μικρή συγκέντρωση σακχάρων του υποστρώματος ο μικροοργανισμός δυσκολεύτηκε να καταναλώσει ταχύτερα την πηγή άνθρακα. Αυτό δικαιολογείται λαμβάνοντας υπόψη ότι το υπόστρωμα προέκυψε ύστερα από υδρόλυση με 3% θειικό οξύ και θέρμανση στους 121°C, γεγονός που σημαίνει ότι λόγω της υδρόλυσης μέρος της ημικυτταρίνης μετετράπη απευθείας σε φουρφουράλη συγκεντρώσεως 1g/L, η οποία δρα παρεμποδιστικά σε βακτήρια και ζύμες σύμφωνα με τους Palmqvist, E. Hahn-Hagerdal B. 2000a.

Η παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης ξεκινά μετά τις δύο πρώτες ώρες της ζύμωσης και λαμβάνει τη μέγιστη τιμή συγκεντρώσεως στις εικοσιτέσσερις ώρες στα 3,2g/L με συντελεστή αποδόσεως $Y = 0,3\text{g/g}$ και παραγωγικότητα $P = 0,34\text{g/L}\cdot\text{h}$. Η βιομάζα υπολογίστηκε σύμφωνα με την οπτική πυκνότητα και ανήλθε στα 4,7g/L στις εικοσιτέσσερις ώρες. Η συγκέντρωση του οξικού οξέος μειώθηκε από 5 στα 3,99g/L, του ηλεκτρικού οξέος έφτασε τα 1,95g/L, και της αιθανόλης τα 2,35g/L.

3.7 Ζυμώσεις ημισυνεχούς καλλιέργειας σε βιοαντιδραστήρα με χρήση του στελέχους *Enterobacter* sp. σε υπόστρωμα εκχυλίσματος φρούτων.

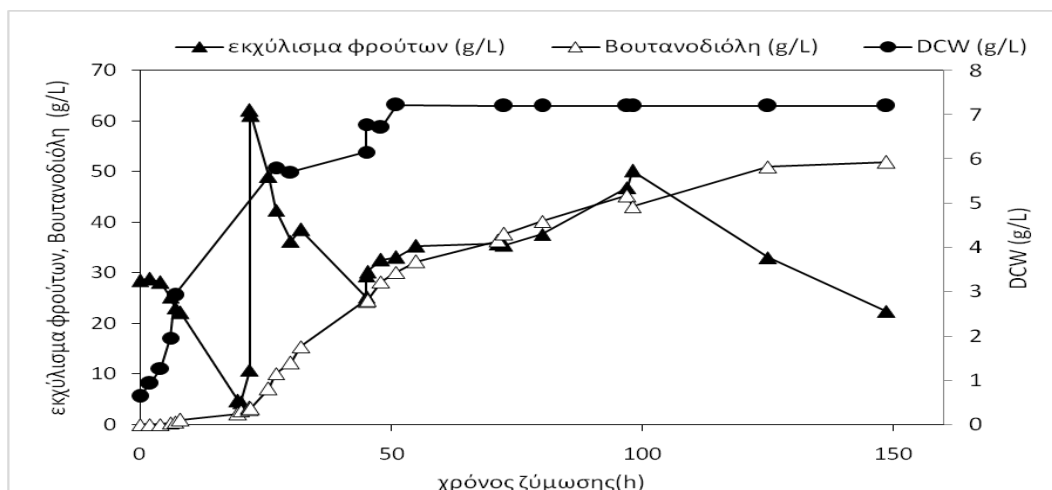
Το στέλεχος *Enterobacter* sp. καλλιεργήθηκε σε υγρό θρεπτικό μέσο με πηγή άνθρακα φυγοκεντρημένο, χωρίς περαιτέρω επεξεργασία, εκχύλισμα φρούτων, αποτελούμενο από μήλα-αχλάδια και βανίλιες και εμπορικές πηγές αζώτου και αλάτων. Η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 30°C, το pH στο 6,3, ελεγχόμενο με

προσθήκη καυστικού νατρίου 5M και θεικού οξέος 1M. Η παροχή αέρα ρυθμίστηκε στο 1vvm, ενώ το διαλυτό οξυγόνο διατηρούνταν στο 0,5% με αυτόματη ρύθμιση της ανάδευσης (cascade) από 150-250rpm. Η τροφοδοσία του μικροοργανισμού αποτελούνταν από συμπυκνωμένο εκχύλισμα φρούτων συγκέντρωσης 690g/L και εκχύλισμα ζύμης 1%. Χρησιμοποιήθηκε βιοαντιδραστήρας 1L με ενεργό όγκο 600mL και οι παράμετροι της μικροβιακής αύξησης που μετρήθηκαν ήταν: το pH της καλλιέργειας, η παραγωγή βιομάζας X (g/L), η κατανάλωση του εκχυλίσματος φρούτων ως πηγή άνθρακα, η παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης και των παραπροϊόντων ηλεκτρικό οξύ, αιθανόλη, γαλακτικό οξύ και οξικό οξύ όλα εκφρασμένα σε g/L. Επίσης υπολογίστηκαν ο συντελεστής αποδόσεως παραγωγής της 2,3-βουτανοδιόλης $Y_{2,3\text{BDO/S}}$ (g παραχθείσας 2,3-βουτανοδιόλης ανά g καταναλωθέντος σακχάρου του εκχυλίσματος φρούτων) και η παραγωγικότητα της 2,3-βουτανοδιόλης, $P_{2,3\text{-BDO}}$ (g/L παραχθείσας 2,3-βουτανοδιόλης ανά ώρα)

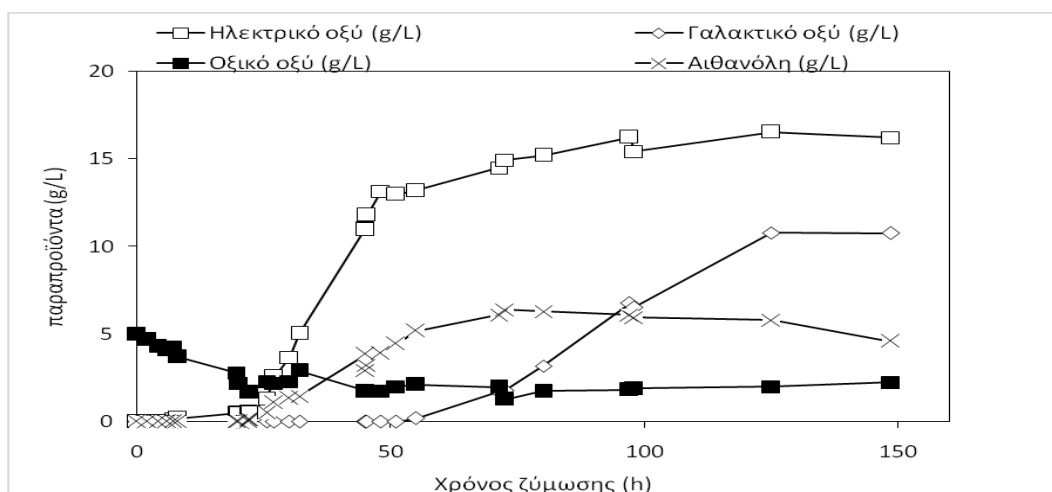
Πίνακας 3.7.1: Συγκεντρώσεις προϊόντος και παραπροϊόντων, απόδοση και παραγωγικότητα στο τέλος της ζύμωσης στις 148,5 ώρες.

Βουτανοδιόλη (g/L)	Ηλεκτρικό οξύ (g/L)	Γαλακτικό οξύ (g/L)	Αιθανόλη (g/L)	Απόδοση (g/g)	Παραγωγικότητα (g/L*h)
51,85	16,23	10,78	4,59	0.29	0.41

Η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων ήταν 30g/L, η τροφοδοσία του θρεπτικού μέσου με συμπυκνωμένο εκχύλισμα φρούτων ήταν συνεχόμενη και ο ρυθμός της τροφοδοσίας εξαρτιόταν από το ρυθμό κατανάλωσης σακχάρων του μικροοργανισμού. Η αυξομείωση της συγκέντρωσης των σακχάρων σε ορισμένες χρονικές στιγμές, οφείλεται στη μεταβολή του ρυθμού κατανάλωσης σακχάρων του μικροοργανισμού καθώς ο ρυθμός τροφοδοσίας παρέμενε σταθερός. Καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης παρατηρήθηκε συσσώρευση της φρουκτόζης καθώς το βακτήριο παρουσίασε μία προτίμηση στην κατανάλωση γλυκόζης και όταν αυτή εξαντλούταν κατανάλωνε τη φρουκτόζη, φαινόμενο γνωστό ως καταστολή καταβολισμού. Ωστόσο όταν σταματούσε η τροφοδοσία για ορισμένο χρονικό διάστημα, το βακτήριο στρεφόταν και πάλι προς την κατανάλωση της φρουκτόζης.



Σχήμα 3.7.1: Γράφημα μεταβολής της συγκέντρωσης των σακχάρων, παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης και παραγωγή της βιομάζας DCW.



Σχήμα 3.7.2: Γράφημα παραγωγής παραπροϊόντων με χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter* sp.

Από το γράφημα 3.5.1 παρατηρούμε ότι η παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης ξεκινά από τις πρώτες ώρες έναρξης της ζύμωσης με έναν ωστόσο χαμηλό ρυθμό παραγωγής μέχρι και τις πρώτες 20 ώρες ενώ από την άλλη μεριά το DCW, που εκφράζει την παραγόμενη βιομάζα, παρουσιάζει μία εκθετική αύξηση τις πρώτες αυτές ώρες. Μετά τις 20 ώρες, που η συγκέντρωση του οξυγόνου έχει μειωθεί πάρα πολύ (1,7% διαλυτό οξυγόνο), παρατηρείται παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης εν αντιθέσει με την παραγόμενη βιομάζα, η συγκέντρωση της οποίας αυξάνεται ελάχιστα όπου τελικά από τις 50 ώρες ζύμωσης σταθεροποιείται. Από τα παραπάνω γίνεται αντιληπτή και η επιρροή της συγκέντρωσης του οξυγόνου στην κατεύθυνση

του μεταβολισμού όπως αναφέρθηκε και το κεφάλαιο 1.5 της εισαγωγής. Μεγάλη συγκέντρωση οξυγόνου προκαλεί μείωση του συντελεστή απόδοσης παραγωγής βουτανοδιόλης καθώς ο μικροοργανισμός στρέφεται προς την αερόβια διεργασία (αναπνοή), χρησιμοποιώντας και μεγάλο μέρος της πηγής άνθρακα, παράγοντας βιομάζα (Alam S., et al 1990). Η συγκέντρωση της βουτανοδιόλης λαμβάνει τη μέγιστη τιμή συγκεντρώσεως στις 148 ώρες ζύμωσης στα 52g/L με συντελεστή απόδοσης παραγωγής 0,29g/g και παραγωγικότητα 0,41g/L*h.

Αυτό που αρχικά μπορούμε ευκρινώς να παρατηρήσουμε, ως προς τα παραπροϊόντα, είναι η μεγάλη συγκέντρωση ηλεκτρικού οξέος, συγκριτικά με τα υπόλοιπα, η οποία λαμβάνει μία μέγιστη τιμή των 16,5g/L στις 125 ώρες της ζύμωσης. Το γεγονός αυτό πλέον καθιστά το ηλεκτρικό οξύ ως κύριο προϊόν μαζί με τη 2,3-βουτανοδιόλη, καθώς έχει συγκέντρωση μεγαλύτερη του 10% της συγκέντρωσης του κύριου προϊόντος της ζύμωσης. Επίσης στις 22 ώρες αρχίζει να παράγεται αιθανόλη, φτάνοντας στις 72 ώρες, μέγιστη συγκέντρωση τα 6,4g/L, ακολουθώντας από εκεί και μετά μία πτωτική τάση μέχρι και το πέρας της ζύμωσης. Όσο για το οξικό οξύ, από το γράφημα παρατηρούμε ότι η συγκέντρωσή του παραμένει σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης στα 2,5g/L, γεγονός που μαρτυρά συνεχόμενη κατανάλωση και παραγωγή από το βακτήριο. Η συνολικά αυξημένη συγκέντρωση παραπροϊόντων που παρατηρείται ήδη από τις 40 ώρες της ζύμωσης σε συνδυασμό με τη μεγάλη πτώση της συγκέντρωσης του διαθέσιμου οξυγόνου, μεταβάλλοντας τις αερόβιες συνθήκες που αρχικά επικρατούσαν, δημιουργούν ένα περιβάλλον που δυσκολεύει την ανάπτυξη του μικροοργανισμού, γεγονός που δικαιολογεί και την παραγωγή γαλακτικού οξέος που παρατηρείται μετά τις 50 ώρες της ζύμωσης.

Πίνακας 3.7.2: Στελέχη και υποστρώματα σε ζυμώσεις ημισυνεχούς καλλιέργειας προς παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης από βιβλιογραφία.

Στέλεχος	Υπόστρωμα	2,3-βουτανοδιόλη	Συντελεστής αποδόσεως Y(g/g)	Παραγωγικότητα P(g/L*h)	Βιβλιογραφική πηγή
<i>K. pneumoniae</i>	Γλυκόζη	150	0,43	4,21	Ma et al (2009)
<i>K. pneumoniae</i>	Γλυκόζη	92,4	0,49	2,1	Qin et al (2006)
<i>K. pneumoniae</i>	Μελάσα από στάχυ καλαμποκιού	78,9	0,41	1,35	Wang et al (2010)
<i>K. pneumoniae</i>	Γλυκερόλη	49,2	0,36	0,18	Petrov and Petrova (2009)
<i>K. pneumoniae</i>	Γλυκερόλη	70	0,39	0,47	Petrov and Petrova (2009)
<i>K. pneumoniae</i>	Βολβός αγκινάρας	84	0,32	2,29	Sun et al (2009b)
<i>K. pneumoniae</i>	Ρίζα-βολβός αγκινάρας	67,4	1,81	1,18	Li et al (2010a)
<i>K. oxytoca</i>	Υδρόλυμα στάχυ καλαμποκιού	35,7	0,5	0,59	Cheng et al (2010)
<i>K. oxytoca</i>	γλυκόζη	130	0,48	1,64	Ji et al (2010)
<i>K. pneumoniae</i>	Γλυκόζη	85,5	0,5	3,22	Qureshi and Sheryan (1989b)
<i>E. aerogenes</i>	Γλυκόζη	110	0,49	5,4	Zeng et al (1991)
<i>S. marcescens</i>	Σακχαρόζη	152	0,41	2,67	Zhang et al (2010a)
<i>S. marcescens</i>	Σακχαρόζη	139,9	0,47	3,49	Zhang et al (2010b)

Γενικότερα στη ζύμωση ημισυνεχούς καλλιέργειας οι συνθήκες θερμοκρασίας και pH διατηρήθηκαν ίδιες με τις ζυμώσεις στις κωνικές φιάλες, ενώ τα επίπεδα οξυγόνου και η ανάδευση ρυθμίστηκαν βάσει βιβλιογραφίας. Η συγκέντρωση των 52g/L 2,3-βουτανοδιόλης που παρήχθησαν κατά τη ζύμωση εκχυλίσματος φρούτων με το μικροοργανισμό *Enterobacter* sp. συγκριτικά με αυτή από τη βιβλιογραφία, που παρατίθεται στον πίνακα 3.5.2 δεν είναι αρκετά υψηλή, ωστόσο πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι στόχος του συγκεκριμένου πειράματος ήταν να εξετασθεί η ικανότητα του μικροοργανισμού να επιβιώσει στις συγκεκριμένες συνθήκες και να καταφέρει να καταναλώσει την πηγή άνθρακα προς παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης χωρίς να υπάρχουν οι βέλτιστες συνθήκες στο μέσο ανάπτυξης. Έτσι λοιπόν η συγκέντρωση της παραγόμενης 2,3-βουτανοδιόλης είναι πολύ ικανοποιητική ως μία πρώτη προσπάθεια ζύμωσης του συγκεκριμένου υποστρώματος. Αξίζει ακόμη να σημειωθεί

ότι πέραν του προσδόκιμου προϊόντος, της 2,3-βουτανοδιόλης, παράχθηκε σε συγκέντρωση 16,5g/L και ηλεκτρικό οξύ αποτελώντας ένα ακόμη προϊόν της ζύμωσης. Τέλος σχετικά με τα αποτελέσματα που λήφθηκαν βιβλιογραφικά ζυμώσεις ημισυνεχούς καλλιέργειας για παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης πραγματοποιήθηκαν σε υποστρώματα όπως η γλυκόζη, η σακχαρόζη, η γλυκερόλη, υδρόλυμα καλαμποκιού και τμήματα του φυτού της αγκινάρας. Η μεγαλύτερη παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης επιτεύχθηκε σε υπόστρωμα γλυκόζης από το στέλεχος *Klebsiella pneumoniae* φτάνοντας τη συγκέντρωση των 150g/L ενώ η μικρότερη συγκέντρωση των 35,7g/L λήφθηκε από υδρόλυμα σταχίου με χρήση του μικροοργανισμού *Klebsiella oxytoca*.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις ως προς το λιγνοκυτταρινούχο περιεχόμενο των λαχανικών από όπου προέκυψε ότι τα λαχανικά περιέχουν κυρίως κυτταρίνη και ημικυτταρίνη και λιγότερο λιγνίνη. Η περιεκτικότητά τους σε υδατάνθρακες -κυτταρίνη, ημικυτταρίνη- αποτέλεσε το έναυσμα για τις περαιτέρω υδρολύσεις με στόχο να χρησιμοποιηθούν ως θρεπτικό υπόστρωμα σε ζυμώσεις. Για να βρεθούν οι κατάλληλες συνθήκες υδρόλυσης του κυτταρινούχου περιεχομένου των λαχανικών έγιναν δοκιμές όξινης υδρόλυσης με θειικό οξύ και τελικά επελέγησαν οι συνθήκες 3% (w/w) θειικό οξύ στους 121°C για 30 λεπτά με 50g/L αρχικά στερεά. Στα φρούτα πραγματοποιήθηκε μόνο εκχύλιση των σακχάρων και παραμονή σε θερμοκρασία 4°C.

Ακόμη διεξήχθησαν ζυμώσεις σε κωνικές φιάλες, με πηγές άνθρακα εφτά εμπορικά σάκχαρα, γλυκόζη, φρουκτόζη, αραβινόζη, γαλακτόζη, μαννόζη, ξυλόζη και σακχαρόζη από πέντε στελέχη της οικογένειας *Enterobacteriaceae* από όπου τελικά το στέλεχος *Enterobacter* sp. επελέγη από τα υπόλοιπα, λόγω μεγαλύτερης παραγωγικότητας από 0,69g/L*h έως 1,01g/L*h, και χρησιμοποιήθηκε για ζυμώσεις, σε κωνικές φιάλες, του υδρολύματος λαχανικών που προέκυψε καθώς και του εκχυλίσματος φρούτων στις ίδιες συνθήκες, θερμοκρασίας, pH και αερισμού, με τις ζυμώσεις των εμπορικών σακχάρων. Αφού διαπιστώθηκε η ικανότητα του συγκεκριμένου στελέχους να καταναλώνει τις συγκεκριμένες πηγές άνθρακα στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε για ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα εκχυλίσματος φρούτων όπου και κατανάλωσε εξίσου όλη την πηγή άνθρακα και παρήγαγε εκτός της 2,3-βουτανодиόλης, σε συγκέντρωση 52g/L και ηλεκτρικό οξύ, σε συγκέντρωση 16g/L ως κύρια προϊόντα.

Τα αποτελέσματα αυτά θεωρούνται πολύ ελπιδοφόρα καθώς μέσω της βιομετατροπής μπορούμε να εκμεταλλευτούμε απόβλητα τροφίμων και ιδιαίτερα φρούτων και λαχανικών που διατίθενται ετησίως σε παγκόσμιο επίπεδο σε πολύ μεγάλες ποσότητες.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ajani A O, Agarry S E, Agbede O. A comparative kinetic study of acidic hydrolysis of wastes cellulose from agricultural derived biomass. J. Appl. Sci. Environ. Manage. 2011, 15, 531-537

Alam S, Capit F, Weigands WA, Hong J. Kinetics of 2,3-butanediol fermentation by *Bacillus amyloliquefaciens*: effect of initial substrate concentration and aeration. J

Chem Technol Biotechnol 1990;47:71–84.

Bakker R, van Ree R, 2015. From the sugar platform to biofuels and biochemicals. Final report for the European Commission Directorate-General Energy N° ENER/C2/423

2012/SI2.673791.

Barret EL, Collins EB, Hall BJ, Matoi SH. Production of 2,3-butylene glycol from whey by *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter aerogenes*. J Dairy Sci 1983, 66:2507–2514.

Biebl H, Zeng AP, Menzel K, Deckwer WD. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol and 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. Appl Microbiol Biotechnol 1998, 50:24–29.

Blomqvist K, Nikkola M, Lehtovaara P, Suihko ML, Airaksinen U, Straby KB, et al. Characterization of the genes of the 2,3-butanediol operons from *Klebsiella*

terrigena and *Enterobacter aerogenes*. J Bacteriol 1993;175:1392–404.

Caspi R. Acetoin biosynthesis I; Acetoin biosynthesis II; Butanediol biosynthesis.

MetaCyc encyclopedia of metabolic pathways; 2008. Available via: <http://metacyc.org/>. Accessed 12 Jan 2009.

Celińska E, Grajek W. Biotechnological production of 2,3-butanediol—Current state and prospects. Biotechnol Adv 2009, in press.

Cho SM, Kang BR, Han SH, Anderson AJ, Park JY, Lee YH, et al. 2R,3R-butanediol, a bacterial volatile produced by *Pseudomonas chlororaphis* O6, is involved in induction

of systemic tolerance to drought in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant-Microb Interact* 2008;21:1067–75.

Converti A, Perego P. Use of carbon and energy balances in the study of the anaerobic

metabolism of *Enterobacter aerogenes* at variable starting glucose concentrations.

Appl Microbiol Biotechnol 2002;59:303–9.

Converti A, Perego P, Del Borghi M. Effect of specific oxygen uptake rate on *Enterobacter aerogenes* energetics: carbon and reduction degree balances in batch cultivations. *Biotechnol Bioeng* 2003, 82:370–377.

Dauthy Mircea Enachescu. Fruit and vegetable processing, FAO Agricultural Services Bulletin No.119. 1995. <http://www.fao.org/docrep/V5030E/V5030E00.htm>.

De Mas C, Jansen NB, Tsao T. Production of optically active 2,3-butanediol by *Bacillus polymyxa*. *Biotechnol Bioeng* 1988, 31:366–377.

Demers A. Doane R. Guzman S. Enzymatic Hydrolysis of Cellulosic Biomass for the Production of Second Generation Biofuels. 2009.

Dussán Kelly J., Silva Débora D. V, Moraes Elisângela J. C,

Arruda Priscila V, Felipe Maria G. A. Dilute-acid Hydrolysis of Cellulose to Glucose from Sugarcane Bagasse. *Chemical Engineering Transactions*. 2014, 38.

Flickinger MC. Current biological research in conversion of cellulosic carbohydrates into liquid fuels: how far have we come? *Biotechnol Bioeng* 1980, 22:27–48.

Garg SK, Jain A. Fermentative production of 2,3-butanediol: a review. *Bioresour Technol* 1995, 51:103–109.

Gottshalk G. (1986). *Bacterial metabolism*. New York: Springer-Verlag.

Gustavsson J. Cederberg C. Sonesson Ulf. Otterdijk R. Meybeck A.FAO. Global Food Losses and Food Waste- Extent causes and prevention. 2011

Hespell RB. Fermentation of xylan, corn fiber, or sugars to acetoin and butanediol by *Bacillus polymyxa* strains. *Curr Microbiol* 1996, 32:291–296.

Hon-Nami K. A unique feature of hydrogen recovery in endogenous starch-to-alcohol fermentation of the marine microalga, *Chlamydomonas perigranulata*. *Appl Biochem Biotechnol* 2006;131:808–28

Jansen NB, Tsao GT. Bioconversion of pentoses to 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 1983;27:85–99.

Lie S. (1973). The EBC-ninhydrin method for determination of free alpha amino nitrogen. *Journal of the Institute of Brewing* 79, 37–41.

Lintas C. Nutritional aspects of fruit and vegetables consumption. *CIHEAM Options Mediterraneennes*. 1992, 79-87. http://om.ciheam.org/article.php?ID_PDF=CI920812

Long SK, Patrick R. The present status of the 2,3-butylen glycol fermentation. *Adv Appl Microbiol* 1963, 5:135–155

Lopez-Contreras AM, Claassen PAM, Mooibroek H, De Vos WM. Utilisation of saccharides in extruded domestic organic wastes by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824for production of acetone, butanol and ethanol. *Appl Microbiol Biotechnol* 2000, 54:162–167.

Mallonee DH, Speckman RA. Development of a mutant strain of *Bacillus polymyxa* showing enhanced production of 2,3-butanediol. *Appl Environ Microbiol* 1988;54:168–71

Maddox IS. (1996). Microbial production of 2,3-butanediol. In: Rehm HJ, Reed G, editors. *Biotechnology*, Vol. 6. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH; p. 269–91.

Magee RJ, Kosaric N. The microbial production of 2,3-butanediol. *Adv Appl Microbiol*1987;32:89-161.

Mayer D, Schlensog V, Böck A. Identification of the transcriptional activator controlling the butanediol fermentation pathway in *Klebsiella terrigena*. *J Bacteriol* 1995;177:5261–9.

Menzel K, Zeng AP, Deckwer WD. Enzymatic evidence for an involvement of pyruvate dehydrogenase in the anaerobic glycerol metabolism of *Klebsiella pneumoniae*. *J Biotechnol* 1997, 56:135–142.

Mickelson M, Werkman CH. Influence of pH on the dissimilation of glucose by *Aerobacter dolegensis*. *J Bacteriol* 1938;36:67–76

Metsoviti M, Paraskevaidi K, Koutinas A, Zeng A, Papanikolaou S. Production of 1,3-propanediol, 2,3-butanediol and ethanol by a newly isolated *Klebsiella oxytoca* strain growing on biodiesel-derived glycerol based media, 2012, *Process Biochemistry* 47 1872–1882

Metsoviti M, Zeng A, Koutinas A, Papanikolaou S. Enhanced 1,3-propanediol production by a newly isolated *Citrobacter freundii* strain cultivated on biodiesel-derived waste glycerol through sterile and non-sterile bioprocesses*

Metsoviti M, Paramithiotis S, Drosinos E, Galiotou- Panayotou M, Nychas G, Zeng A, Papanikolaou S. Screening of bacterial strains capable of converting biodiesel-derived raw glycerol into 1,3-propanediol, 2,3-butanediol and ethanol. 2012 *Eng. Life Sci.*, 12, No. 1, 57–68

Nakashimada Y, Marwoto B, Kashiwamura T, Kakizono T, Nishio N. Enhanced 2,3-butanediol production by addition of acetic acid in *Paenibacillus polymyxa*. *J Biosci Bioeng* 2000, 90:661–664.

Nilegaonkar SS, Bhosale SB, Kshirsagar DC, Kapadi AH. (1992). Production of 2,3-butanediol from glucose by *Bacillus licheniformis*. *World J Microbiol Biotechnol*; 8:378–81.

Palmqvist, E. Hahn-Hagerdal, B. 2000a, Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresour Technol*. 74, 17-24.

Palmqvist, E. Hahn-Hagerdal, B. 2000b, Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresour Technol*. 74, 25-33.

Perego P, Converti A, Del Borghi A, Canepa P. 2,3-Butanediol production by *Enterobacter aerogenes*: selection of the optimal conditions and application to food industry residues. *Bioprocess Eng* 2000, 23:613–620.

Rani B. Kawatra A. Fibre constituents of some foods. *Plant Foods for Human Nutrition*. 1994, 45, 343–347

Saha BC, Bothast RJ. Production of 2,3-butanediol by newly isolated *Enterobacter cloacae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 1999;52:321–6.

Silvia Morales-delaRosa, Jose M. Campos-Martin* and Jose L. G. Ferro. Optimization of the process of chemical hydrolysis of cellulose to glucose. Sustainable Energy and Chemistry Group (EQS), Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, CSIC, Marie Curie, 2 Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain, <http://www.icp.csic.es/eqsgroup/>

Stormer FC. Evidence for induction of the 2,3-butanediol-forming enzymes in *Aerobacter aerogenes*. *FEBS Lett* 1968b;2:36–8.

Speckman RA, Collins EB. Microbial production of 2,3-butylene glycol from cheese whey. *Appl Environ Microbiol* 1982;43:1216–8.

Syu MJ. Biological production of 2,3-butanediol. *Appl Microbiol Biotechnol* 2001;55:10–8.

Taylor R, Natrass L, Alberts G, Robson P, Chudziak C, Bauen A, Libelli IM, Lotti G, Prussi M, Nistri R, Chiaramonti D, Contreras AL, Bos H, Eggink G, Springer J, Van Houdt R, Aertsen A, Michiels CW. Quorum-sensing-dependent switch to butanediol fermentation prevents lethal medium acidification in *Aeromonas hydrophila* AH-1N. *Res Microbiol* 2007, 158:379–385

Voloch M, Jansen NB, Ladish MR, Tsao GT, Narayan R, Rodwell VW. 2,3 Butanediol. In: Blanch HW, Drew S, Wang DIC, editors. *Comprehensive biotechnology; the principles, applications and regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine*. Oxford: Pergamon/Elsevier; 1985, 933–944.

Vicente Ariel R. Manganaris George A. Sozzi Gabriel O. Postharvest Handling. A System Approach. 2009 Second Edition v5 academic press.

Venture L. The food we waste. Food waste report v2. 2008.

Xiao-Jun Ji, He Huang, Ping-Kai Ouyang. Microbial 2,3-butanediol production: A state-of the-art review. Biotechnology 2011 Advances 29 351–364

Yu EK, Saddler JN. Enhanced production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumonia* grown on high sugar concentrations in the presence of acetic acid. Appl Environ Microbiol 1982a;44:777–84.

Yu EK, Saddler JN. Power of solvent production by *Klebsiella pneumoniae* grown on sugars present in wood hemicelluloses. Biotechnol Lett 1982b;4:121–6.

Yu EK, Deschatelets L, Louis-Seize G, Saddler JN. Butanediol production from cellulose and hemicellulose by *Klebsiella pneumoniae* grown in sequential coculture with *Trichoderma harzianum*. Appl Environ Microbiol 1985;50:924–9.

Zeng AP, Biebl H, Deckwer WD. Effect of pH and acetic acid on growth and 2,3 butanediol production of *Enterobacter aerogenes* in continuous culture. Appl Microbiol Biotechnol 1990, 33:485–489.