

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου

Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

ΠΜΣ: Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του ανθρώπου

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

*Μελέτη της βιοτεχνολογικής παραγωγής της 2,3-βουτανοδιόλης με τη χρήση
ακατέργαστης ζάχαρης από ζαχαροκάλαμο ως πηγή άνθρακα*

Επιβλέπων:

Παπανικολάου Σεραφείμ, Αναπληρωτής καθηγητής

Ευφροσύνη Κ. Βογιατζή

ΑΘΗΝΑ 2016

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου

Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

ΠΜΣ: Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του ανθρώπου

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

*Μελέτη της βιοτεχνολογικής παραγωγής της 2,3-βουτανοδιόλης με τη χρήση
ακατέργαστης ζάχαρης από ζαχαροκάλαμο ως πηγή άνθρακα*

Εξεταστική Επιτροπή:

Παπανικολάου Σεραφείμ, Αναπληρωτής καθηγητής

Κουτίνας Απόστολος, Επίκουρος καθηγητής

Κούκος Ιωάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής

Επιβλέπων:

Παπανικολάου Σεραφείμ, Αναπληρωτής καθηγητής

Ευφροσύνη Κ. Βογιατζή

ΑΘΗΝΑ 2016

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια του Π.Μ.Σ. «Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου». Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στους κ. Παπανικολάου Σεραφείμ και κ. Κουτίνα Απόστολο για την καθοδήγηση και τη συνεργασία καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης καθώς επίσης και για την εμπιστοσύνη που έδειξαν στο πρόσωπο μου.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Κούκο Ιωάννη, μέλος της τριμελούς επιτροπής για τη βοήθεια του κατά τη διάρκεια του μεταπτυχιακού μου.

Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στις υποψήφιες διδάκτορες κα. Μάινα Σοφία και κα. Πατεράκη Χρυσάνθη για την πολύτιμη βοήθεια και υποστήριξη τους κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, καθώς και σε όλα τα μέλη των εργαστηρίων για την άψογη συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα που επικράτησε στο χώρο του εργαστηρίου.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στους δικούς μου ανθρώπους, τους γονείς μου, τον αδελφό μου και τον Παύλο για την στήριξη, την κατανόηση και την υπομονή που έδειξαν όλο αυτό το διάστημα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η επίδραση του αερισμού στην παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης μέσω μικροβιακών ζυμώσεων με χρήση του βακτηριακού στελέχους *Enterobacter sp.*, μέλους της οικογένειας των Enterobacteriaceae. Η επίδραση του αερισμού στην παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης εξετάστηκε μελετώντας διαφορετικές συνθήκες ανάδευσης και αερισμού. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση 2,3-βουτανοδιόλης (101.9 g/L) επιτεύχθηκε για ταχύτητα ανάδευσης 250 rpm και ρυθμό αερισμού 0.5 vvm, ο μεγαλύτερος συντελεστής απόδοσης παρατηρήθηκε για ταχύτητα ανάδευσης 150 rpm και ρυθμό αερισμού 1 vvm (0.43 g/g), ενώ η υψηλότερη τιμή παραγωγικότητας έφθασε στα 1.06 g/L/h για ταχύτητα ανάδευσης στις 400 rpm και ρυθμό αερισμού 1 vvm. Ωστόσο, κατά την καλλιέργεια του *Enterobacter sp.* σε ημι-συνεχή ζύμωση με μεταβαλλόμενη ταχύτητα ανάδευσης έτσι ώστε να διατηρείται σταθερό το επίπεδο του διαλυτού οξυγόνου στο 5 % η παραγωγή τόσο της 2,3-βουτανοδιόλης έφτασε τα 80.7 g/L, με συντελεστή απόδοσης 0.4 g/g και παραγωγικότητα 0.92 g/L/h, ενώ δεν παρατηρήθηκε παραγωγή οργανικών οξέων ως παραπροϊόντα.. Επιπλέον, μελετήθηκε η σύσταση του θρεπτικού μέσου με σκοπό τη βελτιστοποίηση της βιοδιεργασίας. Παρατηρήθηκε ότι η σύσταση του θρεπτικού μέσου έχει μεγάλη επίδραση στην παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης. Συγκεκριμένα, η ανόργανη πηγή αζώτου όσο και η επίδραση των φωσφορικών, Mg^{2+} αλάτων είχε θετική επίδραση τόσο στην παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης όσο και στο σχηματισμό των παραπροϊόντων. Στη συνέχεια, μελετήθηκε η σύσταση του υγρού μέσου της προκαλλιέργειας. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε μία σειρά κλειστών καλλιιεργειών του μικροοργανισμού σε ανακινούμενες φιάλες με χρήση θρεπτικών μέσων διαφορετικής σύστασης. Παρατηρήθηκε ότι η αντικατάσταση της οργανικής πηγής αζώτου από ανόργανο άζωτο στην προκαλλιέργεια, είχε αρνητική επίδραση καθώς καθυστέρησε την ανάπτυξη του μικροοργανισμού όπως φαίνεται από τις τιμές της οπτικής πυκνότητας και του μέγιστου ειδικού ρυθμού αύξησης. Τέλος, προκειμένου να επιβεβαιωθούν τα παραπάνω αποτελέσματα, πραγματοποιήθηκε μία ημι-συνεχής ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα με ταχύτητα ανάδευσης 150-400 rpm και ρυθμό αερισμού στο 1 vvm. Η συγκέντρωση της 2,3-βουτανοδιόλης έφτασε τα 84.4 g/L με συντελεστή απόδοσης 0.45 g/g και παραγωγικότητα 2.48 g/L/h. Η αντικατάσταση της οργανικής πηγής αζώτου με ανόργανη αλλά και η προσθήκη αλάτων συνέβαλε στην αύξηση της απόδοσης κατά 32.3 % και της παραγωγικότητας κατά 218 %.

Λέξεις κλειδιά: 2,3-βουτανοδιόλη, *Enterobacter sp.*, ημι-συνεχείς βακτηριακές ζυμώσεις, ταχύτητα ανάδευσης, ρυθμός αερισμού, ανόργανη-οργανική πηγή αζώτου

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the production of 2,3-butanediol by microbial fermentations using the bacterial strain *Enterobacter* sp., member of the Enterobacteriaceae family. The effect of aeration rate on 2,3-butanediol production was examined using different agitation and aeration rates. The higher concentration of 2,3-butanediol (101.9 g/L) was observed when the agitation speed was 250 rpm and aeration rate was 0.5 vvm, the higher yield (0.43 g/g) obtained using 150 rpm and aeration rate 1 vvm, while the higher productivity reached 1.06 g/L/h at 400 rpm and aeration rate of 1 vvm. However, when the agitation speed was maintained between 150-400 rpm in order to maintain the dissolved oxygen concentration at 5 %, 2,3-butanediol production reached 80.7 g/L with corresponding yield of 0.4 g/g and productivity of 0.92 g/L/h. The production of organic acids was low comparing with constant agitation rates. In addition, we studied the medium composition in order to optimize the bioprocess. It was observed that the medium has great influence on the production of 2,3-butanediol. Specifically, the inorganic nitrogen source and the effect of phosphates, Mg^{2+} salts had a positive effect both in the production of 2,3-butanediol and the formation of by-products. Then the composition of the preculture medium was studied. For this purpose, a series of batch fermentations of the microorganism took place in shake flasks using a nutrient media of different composition. It was observed that replacement of the organic nitrogen source from inorganic nitrogen in preculture, had a negative effect on growth. Finally, in order to validate the above results, a fed-batch fermentation with agitation cascade was conducted. The concentration of 2,3-butanediol reached 84.4 g/L with a corresponding yield of 0.45 g/g and productivity of 2.48 g/L/h, the replacement of organic nitrogen source with inorganic as well as the addition of elements have increased the yield and productivity by 32.3 % and 218 % respectively.

Key words: 2,3-butanediol, *Enterobacter* sp., fed-bach bacterial fermentations, agitation rate, aeration rate, inorganic-organic nitrogen source

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή	9
1.1 2,3- βουτανοδιόλη	9
1.1.1 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά	9
1.1.2 Βιομηχανικές εφαρμογές	10
1.1.3 Χημική και βιοτεχνολογική παραγωγή	11
1.2 Βιοτεχνολογική παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης	11
1.3 Μικροοργανισμοί	13
1.4 Υποστρώματα	14
1.5 Παράγοντες που επιδρούν στην παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης	15
1.5.1 Αερισμός και ανάδευση	15
1.5.2 Θερμοκρασία	17
1.5.3 pH	18
1.5.4 Σύσταση θρεπτικού μέσου	20
1.5.5 Αρχική συγκέντρωση σακχάρων	21
1.6 Σκοπός της μελέτης	22
2. Υλικά και Μέθοδοι	23
2.1 Βιολογικό υλικό	23
2.2 Παρασκευή υγρού εμβολίου	23
2.3 Θρεπτικό μέσο για την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης	24
2.4 Συνθήκες ζύμωσης	24
2.4.1 Επίδραση αερισμού και ανάδευσης	24
2.4.2 Μελέτη της σύστασης του θρεπτικού μέσου ζύμωσης	25
2.4.3 Μελέτη της σύστασης του υγρού εμβολίου	26
2.4.4 Συνθήκες ζύμωσης στις βέλτιστες συνθήκες	27
2.5 Αναλυτικές μέθοδοι	28
2.5.1 Προσδιορισμός βιομάζας	28
2.5.2 Προσδιορισμός σακχάρων και μεταβολιτών	29
3. Αποτελέσματα	30
3.1 Επίδραση διαφορετικών συνθηκών ανάδευσης και αερισμού	30
3.2 Επίδραση θρεπτικού μέσου ζύμωσης	45
3.3 Μελέτη της σύστασης του υγρού εμβολίου	47
3.4 Ημι-συνεχής ζύμωση προς παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης στις βέλτιστες συνθήκες αερισμού με χρήση ανόργανης πηγής αζώτου	50

4 Συμπεράσματα	51
Βιβλιογραφία	58

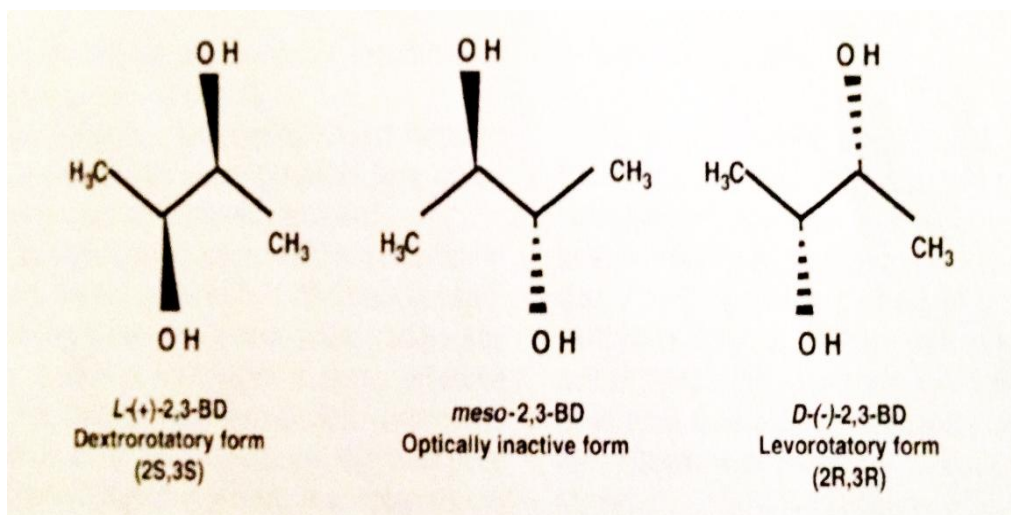
1. Εισαγωγή

Στις μέρες μας, λόγω έλλειψης ορυκτών καυσίμων και κατά συνέπεια λόγω αύξησης των τιμών του πετρελαίου, το ενδιαφέρον της βιομηχανίας στρέφεται στην παραγωγή χημικών ενώσεων μέσω βιοχημικών οδών, αντί των κλασικών χημικών μεθόδων που χρησιμοποιούνται στην πετροχημική βιομηχανία. Η ζύμωση της περίσσειας βιομάζας ή των αποβλήτων από γεωργικά και αγρο-βιομηχανικά υπολείμματα για την παραγωγή χημικών ουσιών ή ενέργειας, αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική μέθοδο, καθώς εκτός του προβλήματος που προκύπτει από την έλλειψη των ορυκτών καυσίμων, εξίσου σημαντική είναι και η σωστή διαχείριση των αποβλήτων (Celińska and Grajek, 2009). Η παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης μέσω μικροβιακών ζυμώσεων έχει μία ιστορία μεγαλύτερη από 100 έτη. Για πρώτη φορά μελετήθηκε το 1906 από τους Harden και Walpote σε καλλιέργεια του μικροοργανισμού *Klebsiella pneumonia* (Ji et al., 2011). Είκοσι χρόνια αργότερα μελετήθηκε η παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης σε καλλιέργεια του μικροοργανισμού *Bacillus polymyxa* από τον Donker (Garg, S.K and Jain, A., 1995). Η παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης σε βιομηχανική κλίμακα πιστεύεται ότι προτάθηκε το 1933 από τον Fulmer και τους συνεργάτες του (Garg and Jain, 1995; Ji et al., 2011). Όπως και στην περίπτωση των περισσότερων χημικών ουσιών, η παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης τη δεκαετία του 1970 γινόταν μέσω χημικών μεθόδων. Ωστόσο, το υψηλό κόστος της χημικής σύνθεσης περιόρισε σε μεγάλη κλίμακα την παραγωγή της. Αν και η παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης μέσω μικροβιακών ζυμώσεων δεν πραγματοποιείται σε βιομηχανική κλίμακα, ωστόσο έχει μελετηθεί αρκετά και αποκτά ολοένα και περισσότερο ενδιαφέρον παγκοσμίως, καθώς οι ανανεώσιμοι πόροι αποτελούν μία καλή εναλλακτική για την παραγωγή χημικών ενώσεων (Ji et al., 2011; Xiu and Zeng, 2008; Zeng et al., 1994)

1.1 2,3- βουτανοδιόλη

1.1.1 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά

Η 2,3-βουτανοδιόλη γνωστή και ως 2,3-βουτυλενογλυκόλη ή διμέθυλο γλυκόλη έχει μοριακό βάρος 90.121 g/mol και μοριακό τύπο $C_4H_{10}O_2$. Απαντάται σε τρεις ισομερής μορφές: D(-), L(+) και στη μέσο μορφή (Σχήμα 1), το σημείο βρασμού της είναι υψηλό και παρουσιάζει μικρές διαφορές για τα τρία διαφορετικά ισομερή (177 °C-182 °C), ενώ έχει και πολύ χαμηλό σημείο τήξης στους -60 °C. Εμφανίζεται είτε ως άχρωμο και άοσμο υγρό είτε με τη μορφή κρυστάλλων (Syu, 2001).



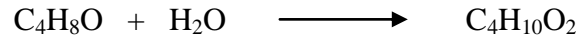
Σχήμα 1 Στερεοϊσομερή 2,3-βουτανοδιόλης (L-(+), meso- και D-(-)), (Celińska and Grajek, 2009)

1.1.2 Βιομηχανικές εφαρμογές

Η 2,3-βουτανοδιόλη είναι ένα προϊόν υψηλής προστιθέμενης αξίας το οποίο παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της μεγάλης πληθώρας εφαρμογών της στη βιομηχανία. Συγκεκριμένα, η 2,3-βουτανοδιόλη με αφυδρογόνωση παράγει διακετύλιο το οποίο χρησιμοποιείται στη βιομηχανία τροφίμων ως ενισχυτικό γεύσης λόγω της βουτυρώδους γεύσης που προσδίδει (Bartowsky and Henschke, 2004). Το διακετύλιο χρησιμοποιείται επίσης και ως συντηρητικό τροφίμων λόγω της βακτηριοστατικής του ικανότητας, καθώς παρεμποδίζει την ανάπτυξη ορισμένων μικροοργανισμών. Μία άλλη χρήση της 2,3-βουτανοδιόλης είναι η μετατροπή της σε 1,3-βουταδιένιο το οποίο χρησιμοποιείται στην παραγωγή συνθετικού καουτσούκ. Λόγω του χαμηλού σημείου τήξης (-60°C), η 2,3-βουτανοδιόλη χρησιμοποιείται και ως αντιψυκτικός παράγοντας (Soltys et al., 2001). Με αφυδάτωση η 2,3-βουτανοδιόλη δίνει μέθυλο-αίθυλο-κετόνη (MEK), η οποία χρησιμοποιείται ως πρόσθετο στα καύσιμα καθώς επίσης και ως διαλύτης στην παραγωγή ρητινών. Η 2,3-βουτανοδιόλη έχει μεγάλη θερμαντική αξία (27198 J/g) σε σχέση με άλλα υγρά καύσιμα όπως η μεθανόλη (22081 J/g) και η αιθανόλη (29055 J/g), ενώ χάρη στον υψηλό αριθμό οκτανίων χρησιμοποιείται και ως ενισχυτής οκτανίων στη βενζίνη (Celińska and Grajek, 2009). Η 2,3-βουτανοδιόλη καθώς και τα παράγωγα της παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών όπως η παραγωγή εκτυπωτικών μελανιών, καπνογόνων, πλαστικών καθώς επίσης αρωμάτων και φαρμακευτικών σκευασμάτων (Garg and Jain, 1995).

1.1.3 Χημική και βιοτεχνολογική παραγωγή

Η 2,3-βουτανοδιόλη μπορεί να παραχθεί χημικά από την πετροχημική βιομηχανία με υδρόλυση του 2,3-βουτένιου οξειδίου. Η στοιχειομετρική αντίδραση παραγωγής είναι η εξής:



Ωστόσο τις τελευταίες δεκαετίες λόγω της αυξημένης βιομηχανικής παραγωγής στις αναπτυγμένες χώρες, το ενδιαφέρον στρέφεται προς την αξιοποίηση των αποβλήτων των βιομηχανιών κυρίως τροφίμων προς παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας μέσω μικροβιακών ζυμώσεων. Η βιοτεχνολογική παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης στηρίζεται στη ζύμωση παραπροϊόντων της βιομηχανίας τροφίμων από μικροοργανισμούς και κυρίως από βακτήρια. Παρακάτω περιγράφεται αναλυτικά η διαδικασία της βιοτεχνολογικής παραγωγής της 2,3-βουτανοδιόλης.

1.2 Βιοτεχνολογική παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης

Η βιοτεχνολογική παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης στηρίζεται κυρίως σε μικροβιακές ζυμώσεις με χρήση διαφόρων υποστρωμάτων. Μία ποικιλία μονοσακχαριτών (εξόζες ή πεντόζες) μπορούν να ζυμωθούν προς παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης (Syu, 2001). Ως πηγή άνθρακα των ζυμώσεων συνήθως χρησιμοποιείται γλυκόζη ή σουκρόζη (Jansen et al., 1984).

Η στοιχειομετρική αντίδραση μετατροπής της γλυκόζης σε βουτανοδιόλη δίνεται παρακάτω:

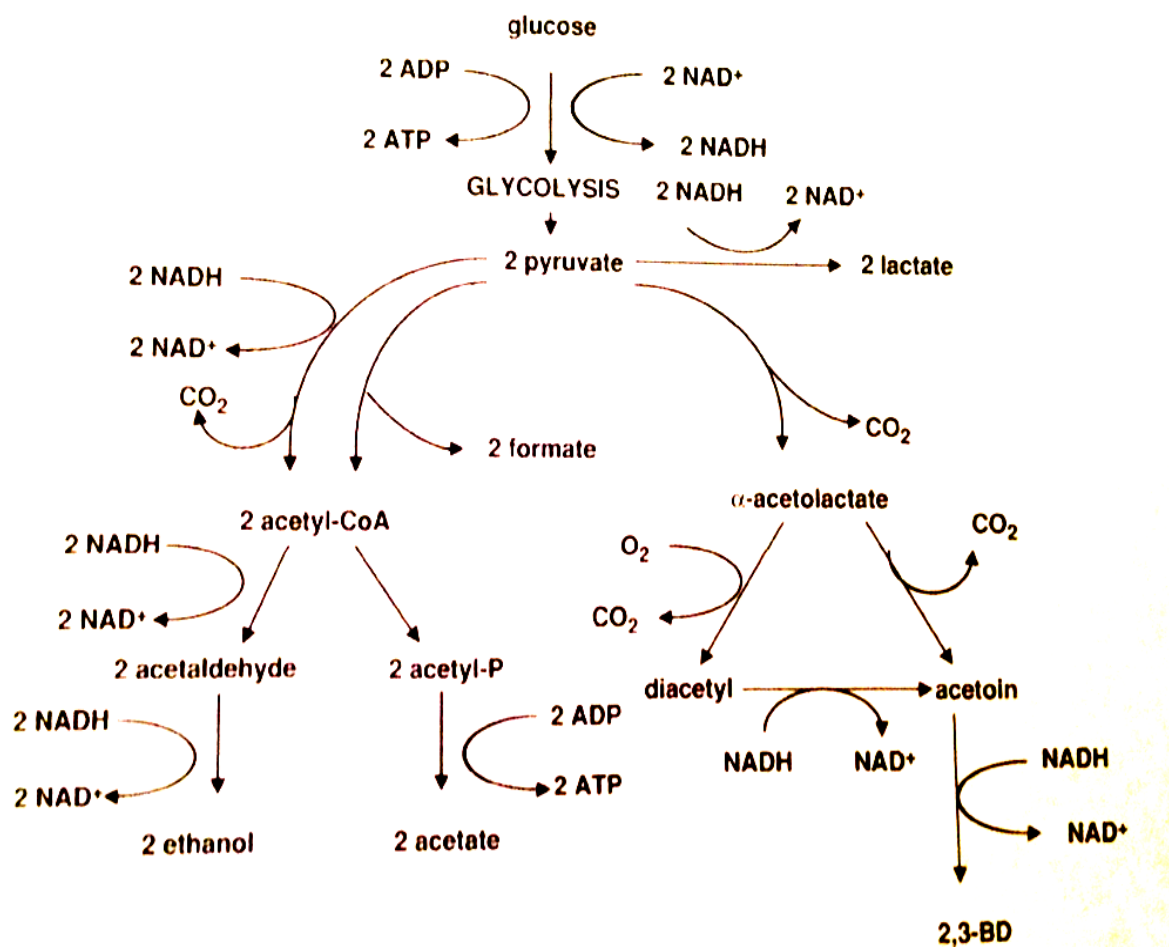


Ο μέγιστος θεωρητικός συντελεστής παραγόμενης 2,3-βουτανοδιόλης ανά καταναλισκόμενη γλυκόζη είναι 0.5 g/g (Jansen et al., 1984; Mccall and Georgi, 1954).

Αρχικά οι μονοσακχαρίτες μεταβολίζονται από τα βακτήρια σε πυροσταφυλικό πριν τον σχηματισμό των κύριων προϊόντων. Το πυροσταφυλικό σχηματίζεται από την γλυκόζη μέσω της πορείας της γλυκόλυσης (οδός Embden-Meyerhof-Parnas), ενώ στην περίπτωση των πεντοζών το πυροσταφυλικό σχηματίζεται μέσω συνδυασμού του κύκλου των φωσφορικών πεντοζών και της οδού Embden-Meyerhof-Parnas (Jansen et al., 1984). Ο σχηματισμός πυροσταφυλικού οδηγεί στην παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης αλλά και σε μίγμα παραπροϊόντων όπως οξικό, γαλακτικό, μυρμηκικό και ηλεκτρικό οξύ καθώς επίσης

αιθανόλης και ακετοΐνης (Ye Q, Bao Jie, n.d.). Για τη βιοσύνθεση της 2,3-βουτανοδιόλης από το πυροσταφυλικό εμπλέκονται τρία βασικά ένζυμα, η συνθετάση του α-ακετογαλακτικού, η αποκαρβοξυλάση του α-ακετογαλακτικού και η αφυδρογονάση της 2,3-βουτανοδιόλης (Ji et al., 2011).

Αρχικά το πυροσταφυλικό από τη γλυκόλυση μπορεί να μετατραπεί είτε σε γαλακτικό οξύ μέσω μιας αντίδρασης η οποία απαιτεί NADH, είτε μετά από αποκαρβοξυλίωση σε α-ακετογαλακτικό, το οποίο παράγεται υπό χαμηλή διαθεσιμότητα σε NADH. Στη συνέχεια, υπό αναερόβιες συνθήκες το α-ακετογαλακτικό με τη δράση του ενζύμου αποκαρβοξυλάση του α-ακετογαλακτικού, μετατρέπεται σε ακετοΐνη, ενώ παρουσία οξυγόνου αποκαρβοξυλιώνεται παράγοντας διακετύλιο. Έπειτα με δράση του ενζύμου αφυδρογονάση της ακετοΐνης, το διακετύλιο μετατρέπεται σε ακετοΐνη, η οποία τελικά μετατρέπεται σε 2,3-βουτανοδιόλη από το ένζυμο αφυδρογονάση της 2,3-βουτανοδιόλης. Η τελική συγκέντρωση 2,3-βουτανοδιόλης καθώς και των παραπροϊόντων εξαρτάται από το μικροοργανισμό και τις συνθήκες της εκάστοτε ζύμωσης (Celińska and Grajek, 2009).



Σχήμα 2 Μεταβολισμός πυροσταφυλικού οξέος από τον *Lactococcus lactis* προς παραγωγή 2,3-βουτανودیολης, αιθανόλης, οξικού, γαλακτικού και μυρμηκικού οξέος (Celińska and Grajek, 2009).

1.3 Μικροοργανισμοί

Πολλοί μικροοργανισμοί κατά κύριο λόγο στελέχη βακτηρίων μπορούν να παράξουν 2,3-βουτανودیολη μέσω μικροβιακών ζυμώσεων. Παρ' όλα αυτά λίγοι είναι εκείνοι οι οποίοι μπορούν να δώσουν αξιόλογες ποσότητες 2,3-βουτανودیολης. Τα είδη που ανήκουν στο γένος *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Bacillus* και *Serratia* θεωρούνται ως οι πιο υποσχόμενοι για τη βιοτεχνολογική παραγωγή της 2,3-βουτανودیολης. Οι περισσότερες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην μελέτη των *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter aerogenes*, *Bacillus polymyxa* και *Serratia marcescens* για την παραγωγή της 2,3-βουτανودیολης λόγω της υψηλής παραγωγικότητας. Ωστόσο και άλλα βακτηριακά στελέχη μπορούν να παράξουν 2,3-βουτανودیολη όπως: *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus Subtilis*, *Brevibacillus brevis* S1, *Corynebacterium glutamicum*, *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc lactis*, *Klebsiella terrigena*, *Streptococcus faecalis* (Mallonee and Speckman, 1988), *Enterobacter cloacae* (Saha and Bothast, 1999), *Bacillus licheniformis* (Perego et al., 2000), *Bacillus amyloliquefaciens* (Alam et al., 1990), *Aerobacter indologenes* (Mickelson and Werkman, 1938), *rhizobacterium Pseudomonas chlororaphis* O6 (Cho et al., 2008) και *Chlamydomonas perigranulata* (Celińska and Grajek, 2009).

Μερικές ζύμες επίσης έχουν τη δυνατότητα να συνθέσουν 2,3-βουτανودیολη, επειδή όμως η παραγωγικότητα είναι πολύ μικρή, προς το παρόν μόνο τα βακτήρια παρουσιάζουν βιομηχανικό ενδιαφέρον για την παραγωγή 2,3-βουτανودیολης μέσω ζυμώσεων (Garg and Jain, 1995).

Ένας από τους πολλά υποσχόμενος μικροοργανισμός είναι ο *E. aerogenes* ο οποίος ανήκει στην οικογένεια των *Enterobacteriaceae* και υπό αυστηρά αναερόβιες συνθήκες παράγει υδρογόνο, ενώ υπό μικροαερόφιλες συνθήκες δίνει 2,3-βουτανودیολη με παρόμοιο τρόπο όπως και ο *K. Oxytoca* (Perego et al., 2000). Ανάλογα με το μικροοργανισμό μπορούν να παραχθούν διαφορετικά στερεοϊσομερή, τις περισσότερες φορές σχηματίζεται ένα μίγμα δύο στερεοϊσομερών (Celińska and Grajek, 2009; Ji et al., 2011). Πιο συγκεκριμένα, τα βακτηριακά στελέχη *Klebsiella* sp. και *Enterobacter* sp. (μέλη της οικογένειας των *Enterobacteriaceae*) παράγουν το L(+)- και το meso-στερεοϊσομερές της 2,3-βουτανودیολης,

ενώ το στέλεχος *B. polymyxa* υπό αναερόβιες συνθήκες δύναται να παράξει D(-)- 2,3-βουτανοδιόλη (Hespell R.B., 1996).

1.4 Υποστρώματα

Διάφορες πηγές άνθρακα έχουν χρησιμοποιηθεί για τη βιοτεχνολογική παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης όπως εξόζες και πεντόζες (γλυκόζη, μαννόζη, γαλακτόζη, ξυλόζη, λακτόζη και σακχαρόζη), μη κυτταρινούχα και κυτταρινούχα υποστρώματα. Ωστόσο για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας μέσω διεργασιών βιομετατροπής, σημαντικός παράγοντας είναι το κόστος του υποστρώματος καθώς και η τιμή του τελικού προϊόντος, η οποία επηρεάζεται από το κόστος της πρώτης ύλης. Απαραίτητη είναι λοιπόν η χρήση μιας οικονομικής πηγής υδατανθράκων για την βιοτεχνολογική παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης. Ιδανική λύση αποτελεί η βιομετατροπή των αποβλήτων (όπως γλυκερόλη, ορός γάλακτος, ή γεωργικά υπολείμματα) και της περίσσειας βιομάζας (όπως προϊόντα υδρόλυσης ξύλου) (Celińska and Grajek, 2009).

Οι κύριες κατηγορίες υποστρωμάτων, οι οποίες χρησιμοποιούνται για τη βιοτεχνολογική παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης κατατάσσονται σε δυο υποκατηγορίες τα λιγνοκυτταρινούχα και τα μη κυτταρινούχα.

Η λιγνοκυτταρίνη είναι η πιο άφθονη βιομάζα στη γη και αποτελεί μία εναλλακτική πρώτη ύλη για τις βιοδιεργασίες λόγω της μεγάλης διαθεσιμότητάς της. Η πιο ελκυστική χρήση της λιγνοκυτταρίνης είναι η παραγωγή χημικών μέσω βιοτεχνολογικών διεργασιών (Ji et al., 2011). Τα κύρια συστατικά των λιγνοκυτταρινούχων υποστρωμάτων είναι η λιγνίνη, η κυτταρίνη και η ημικυτταρίνη. Η κυτταρίνη είναι ένα πολυμερές της γλυκόζης, ενώ η ημικυτταρίνη είναι ένα πολυμερές το οποίο αποτελείται κυρίως από πεντόζες συμπεριλαμβανομένων της ξυλόζης, αραβινόζης και ριβόζης (Saha B.C., 2003). Διάφορα λιγνοκυτταρινούχα υποστρώματα έχουν χρησιμοποιηθεί για παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης, όπως απόβλητα από την επεξεργασία του καλαμποκιού καθώς και υδρολύματα ξύλου (Celińska and Grajek, 2009; Ji et al., 2011).

Τα μη-κυτταρινούχα υποστρώματα αποτελούν επίσης εναλλακτική πηγή για την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης και κυρίως υπολείμματα της βιομηχανίας τροφίμων. Σε αυτά κατατάσσονται τα υγρά απόβλητα της βιομηχανίας τροφίμων που είναι πλούσια σε σάκχαρα όπως το υδρολυμένο άμυλο, η μελάσα από το ζαχαροκάλαμο και ο ορός γάλακτος από τη βιομηχανία παραγωγής τυριών (Converti et al., 2003; Perego et al., 2000). Εξόζες

(ινουλίνη και σακχαρόζη) που περιέχονται σε φυτά όπως η αγκινάρα της Ιερουσαλήμ (*Helianthus tuberosus*) αποτελούν εξαιρετική πηγή ζυμώσιμων σακχάρων για την εν λόγω διεργασία (Ji et al., 2011). Επίσης, η γλυκερόλη ως παραπροϊόν της βιομηχανίας βιοντίζελ έχει αξιοποιηθεί για την βιοτεχνολογική παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης (Reimann et al., 1998).

Ένα άλλο παραπροϊόν της βιομηχανίας τροφίμων το οποίο επίσης χρησιμοποιείται στις μικροβιακές ζυμώσεις και ανήκει στην κατηγορία των μη-κυτταρινούχων υποστρωμάτων είναι η μελάσα. Η μελάσα είναι παραπροϊόν της βιομηχανίας ζάχαρης το οποίο προέρχεται μετά την κρυστάλλωση της σακχαρόζης (κοινώς ζάχαρης) από τον χυμό του ζαχαροκάλαμου (Afschar et al., 1993; Afschar et al., 1991; Wang et al., 2010). Έχει μεγάλη περιεκτικότητα σε σάκχαρα (50% σάκχαρα επί ξηρού, κυρίως σακχαρόζη και αξιόλογες ποσότητες γλυκόζης και φρουκτόζης) ενώ επίσης περιέχει και ικανοποιητικές ποσότητες διαφόρων ιχνοστοιχείων, το σκούρο καφέ χρώμα της οφείλεται στην ύπαρξη μελανοϊδινών. Η ακριβής σύσταση της διαφέρει και εξαρτάται από την πηγή από την οποία προέρχεται (ζαχαροκάλαμα ή ζαχαρότευτλα). Λόγω της υψηλής της περιεκτικότητας σε σάκχαρα αποτελεί ιδανικό υπόστρωμα στις βιοδιεργασίες για παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης καθώς και άλλων παραπροϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Κύρια πλεονεκτήματα χρήσης της μελάσας ως υπόστρωμα στις μικροβιακές ζυμώσεις αποτελούν το χαμηλό κόστος καθώς και η ευρεία διαθεσιμότητα της.

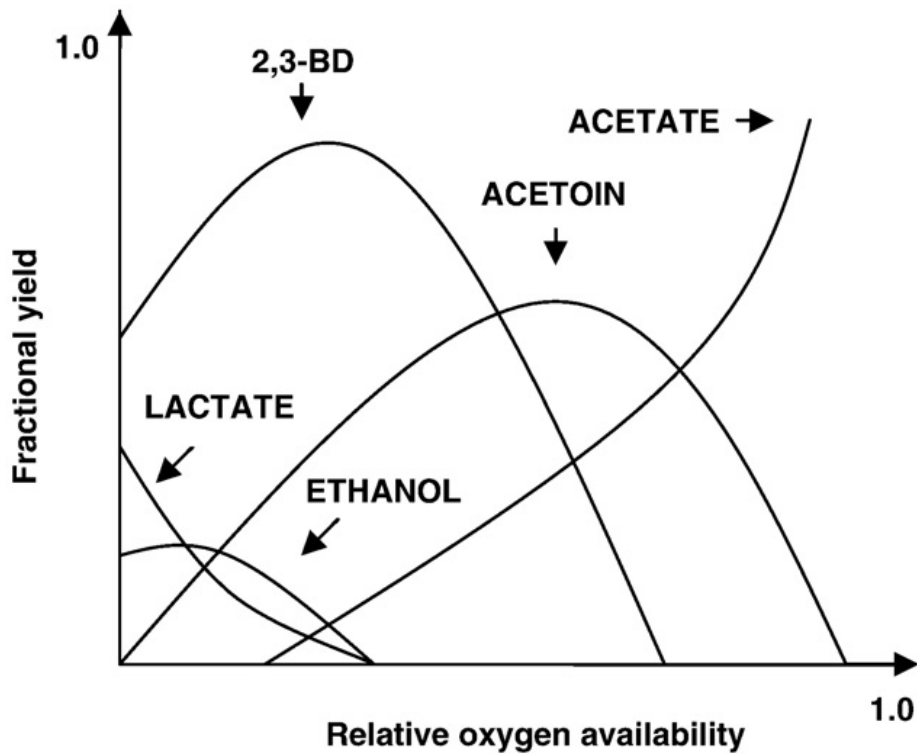
1.5 Παράγοντες που επιδρούν στην παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης

Οι κύριοι παράγοντες οι οποίοι επιδρούν στην παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης είναι ο αερισμός, το pH, η θερμοκρασία, η σύσταση του θρεπτικού μέσου και η αρχική συγκέντρωση του υποστρώματος.

1.5.1 Αερισμός και ανάδευση

Η διαθεσιμότητα σε οξυγόνο είναι ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες στην παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης, η οποία παράγεται υπό χαμηλή διαθεσιμότητα οξυγόνου και αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα αναερόβιας ή μικροαερόφιλης ζύμωσης (Converti et al., 2003). Οι περισσότερες μελέτες για την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης έχουν γίνει με τους μικροοργανισμούς *Klebsiella sp.* και *B. polymyxa*, οι οποίοι είναι και οι δύο προαιρετικά αναερόβιοι. Οι μικροοργανισμοί αυτοί μπορούν να αποκτήσουν ενέργεια είτε μέσω της αναπνοής ή μέσω της ζύμωσης. Σε συνθήκες περιορισμένης διαθεσιμότητας σε

οξυγόνο, είναι ενεργοποιημένες και οι δύο παραπάνω οδοί. Η απόδοση σε 2,3-βουτανοδιόλη μπορεί να μεγιστοποιηθεί με ελαχιστοποίηση της παροχής οξυγόνου, καθώς με αυτόν τον τρόπο περιορίζεται η διαδικασία της αναπνοής. Όμως, μείωση της διαθεσιμότητας του οξυγόνου οδηγεί σε μείωση της βιομάζας, με αποτέλεσμα να μειώνεται και ο συντελεστής απόδοσης της 2,3-βουτανοδιόλης. Ως εκ τούτου, αύξηση της διαθεσιμότητας του οξυγόνου οδηγεί σε υψηλότερη πυκνότητα κυττάρων και σε υψηλότερες αποδόσεις σε 2,3-βουτανοδιόλη. Συμπερασματικά παρατηρείται ότι, μείωση του ρυθμού παροχής οξυγόνου οδηγεί σε αύξηση της απόδοσης της 2,3-βουτανοδιόλης, αν και το συνολικό ποσοστό μετατροπής μειώνεται λόγω της χαμηλότερης παραγωγής βιομάζας (Celińska and Grajek, 2009). Σε γενικές γραμμές, η υψηλή παροχή οξυγόνου ευνοεί την παραγωγή βιομάζας καθώς και CO₂, γεγονός το οποίο λειτουργεί εις βάρος της παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης. Απουσία οξυγόνου, παράγεται συνήθως αιθανόλη σχεδόν σε ισομοριακές ποσότητες με 2,3-βουτανοδιόλη, ενώ επίσης σχηματίζονται μυρμηκικό οξύ, οξικό οξύ, γαλακτικό οξύ και ακετοΐνη. Υπό συνθήκες ελεγχόμενου αερισμού, μπορεί να προληφθεί ο σχηματισμός αιθανόλης και μυρμηκικού οξέος, και έτσι το υπόστρωμα μπορεί να μετατραπεί πλήρως σε 2,3-βουτανοδιόλη (Zeng et al., 1990). Προκειμένου λοιπόν να μεγιστοποιηθεί η σύνθεση της 2,3-βουτανοδιόλης, κρίνεται απαραίτητη μία περιορισμένη αλλά μη μηδενική διαθεσιμότητα οξυγόνου. Η βέλτιστη παροχή οξυγόνου ελαχιστοποιεί επίσης τον σχηματισμό παραπροϊόντων, τα οποία μπορεί να δρουν ανασταλτικά παρεμποδίζοντας το σχηματισμό της 2,3-βουτανοδιόλης (Xiu and Zeng, 2008).



Σχήμα 3 Η επίδραση της διαθεσιμότητας οξυγόνου στην παραγωγή των μεταβολικών προϊόντων (Celińska and Grajek, 2009)

Η διαθεσιμότητα σε οξυγόνο συνδέεται άμεσα με την ταχύτητα ανάδευσης. Η ανάδευση αυξάνει σημαντικά την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης. Σε καλλιέργειες των στελεχών *E. aerogenes* και *K. pneumoniae* σε θρεπτικό μέσο με υπόστρωμα τη γλυκόζη ή τη λακτόζη, υπό ρυθμό ανάδευσης στις 220 rpm, η παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης αυξήθηκε έως και 5 φορές στην περίπτωση της γλυκόζης και έως και 15 φορές στην περίπτωση της λακτόζης, σε σχέση με καλλιέργειες υπό μηδενική ανάδευση (Celińska and Grajek, 2009). Σε καλλιέργειες του στελέχους *B. polymyxa* σε ανακινούμενες φιάλες, παρατηρήθηκε ότι η υπερβολική διαθεσιμότητα σε οξυγόνο ήταν επιζήμια για την παραγωγή, δεδομένου ότι ο σχηματισμός 2,3-βουτανοδιόλης ήταν σημαντικά μεγαλύτερος για συνθήκες ανάδευσης στις 120 rpm σε σχέση με τις καλλιέργειες όπου ο ρυθμός ανάδευσης ήταν 300 rpm (Laube et al., 1984a).

1.5.2 Θερμοκρασία

Η απόδοση των βιοδιεργασιών εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη θερμοκρασία καθώς αυτή επηρεάζει την ενζυμική δραστηριότητα αλλά και την κυτταρική ανάπτυξη γενικότερα

(Garg and Jain, 1995). Γενικά, ένα εύρος θερμοκρασιών μεταξύ 30-35 °C θεωρείται βέλτιστο καθώς σε αυτό το εύρος η παραγωγή βιομάζας είναι η μέγιστη δυνατή. Για τιμές θερμοκρασιών μικρότερες ή μεγαλύτερες από τις παραπάνω παρατηρείται μείωση της κυτταρικής ανάπτυξης.

Η τιμή της βέλτιστης θερμοκρασίας για την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης εξαρτάται από τον εκάστοτε μικροοργανισμό. Για βακτηριακές καλλιέργειες του *K. pneumonia* παρατηρήθηκε ότι με μείωση της θερμοκρασίας από τους 35 °C στους 30 °C μειώθηκε η παραγωγή αιθανόλης ενώ αυξήθηκε η παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης (Bielb et al., 1998). Οι καλύτερες συνθήκες για την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης από τα βακτηριακά στελέχη *K. pneumonia* είναι η μη ελεγχόμενη αύξηση της οξύτητας σε αρχική τιμή pH όχι μικρότερη από 7 καθώς και θερμοκρασία η οποία δεν υπερβαίνει τους 30 °C. Για τα βακτηριακά στελέχη *E. aerogenes* βέλτιστες συνθήκες για την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης παρατηρήθηκαν σε θερμοκρασία 39 °C (Converti et al., 2003), ενώ για τα στελέχη *B. Polymyxa* η βέλτιστη θερμοκρασία ήταν στους 30 °C (Hespell R.B., 1996; Nakashimada et al., 2000). Δεδομένου ότι διαφορετικά στελέχη παρουσιάζουν διαφορετικές βέλτιστες θερμοκρασίες, η βέλτιστη τιμή θερμοκρασιών για παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης πρέπει να καθορίζεται ξεχωριστά ανάλογα με το βακτηριακό στέλεχος και το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται κάθε φορά.

1.5.3 pH

Ένας ακόμη παράγοντας που επηρεάζει την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης είναι το pH. Συγκεκριμένα σε αλκαλικές συνθήκες ευνοείται η παραγωγή οργανικών οξέων εις βάρος της 2,3-βουτανοδιόλης, ενώ σε όξινες συνθήκες η παραγωγή οργανικών οξέων είναι μειωμένη και παρατηρείται αύξηση στη σύνθεση της διόλης (Garg and Jain, 1995). Γενικά, η βέλτιστη τιμή pH για τη παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον μικροοργανισμό και το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται.

Οι περισσότερες αναερόβιες ζυμώσεις οδηγούν στο σχηματισμό οργανικών οξέων. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης παρατηρείται σταδιακή κατανάλωση του υποστρώματος, ενώ ο μικροοργανισμός αδρανοποιείται λόγω παραγωγής τοξικών προϊόντων από τον ίδιο (Biebl et al., 1999). Μερικοί μικροοργανισμοί έχουν αναπτύξει αμυντικές στρατηγικές, όπως αλλαγή του μεταβολισμού τους έτσι ώστε να παράγουν λιγότερες τοξικές ενώσεις, όπως αλκοόλες ή γλυκόλες. Σε μελέτη των Maddox et al., 1996 αναφέρεται ότι πιθανή αιτία επαγωγής της 2,3-

βουτανοδιόλης είναι η συσσώρευση των όξινων προϊόντων στο μέσο της ζύμωσης και όχι η μεταβολή της αρχικής τιμής του pH.

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω η τιμή του pH εξαρτάται από τον μικροοργανισμό που χρησιμοποιείται σε κάθε ζύμωση. Έτσι κατά την εκθετική αύξηση του στελέχους *C. acetobutylicum* παρατηρήθηκε ότι παράγεται οξικό οξύ καθώς επίσης και βουτυρικό οξύ. Κατά τη διάρκεια της στάσιμης φάσης της ανάπτυξης του (όπου παρατηρείται μεγάλη αύξηση της οξύτητας), παράγονται προϊόντα, όπως ακετόνη, βουτανόλη και αιθανόλη (Pinzi et al., 2011). Ένα παρόμοιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και για τα στελέχη *Klebsiella sp.*, όπου σε ουδέτερο pH παρήγαγαν οξικό οξύ και αιθανόλη, ενώ σε pH χαμηλότερο από 6 παρήγαγαν 2,3-βουτανοδιόλη και αιθανόλη (Biebl et al., 1999). Σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν για ζυμώσεις με υπόστρωμα τη γλυκερόλη από το βακτηριακό στέλεχος *K. pneumoniae* σε χαμηλό pH (περίπου 5.5), παρατηρήθηκε ότι μόλις το 10 % περίπου του υποστρώματος κατευθύνθηκε προς την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης, ενώ ένα ποσοστό της τάξης του 44 % προς την παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης (Ji et al., 2011; Reimann et al., 1998). Σε περίπτωση που το pH του μέσου είναι σταθερό (τιμή 5 ή 7), παρατηρείται ότι όσο χαμηλότερη είναι η τιμή του pH τόσο μεγαλύτερη είναι η τελική συγκέντρωση της 2,3-βουτανοδιόλης (Reimann et al., 1998). Ωστόσο, η υψηλότερη συγκέντρωση 2,3-βουτανοδιόλης επιτεύχθηκε όταν το pH δεν ρυθμιζόταν (συνεχής μεταβολή της αρχικής τιμής του pH από 7 έως 5.5 τελικά). Ωστόσο, πολλοί ερευνητές υποστηρίζουν πως η τιμή του pH δεν επηρεάζει τόσο πολύ την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης όσο η παρουσία οξικού οξέος. Παρ' όλα αυτά ισχυρίζονται ότι η συσσώρευση οξέος δεν είναι ο μόνος παράγοντας που επηρεάζει τον σχηματισμό της 2,3-βουτανοδιόλης, καθώς μπορεί να παραχθεί και σε ουδέτερο pH από γλυκερόλη (Biebl et al., 1998), καθώς και μέσω συνεχούς ζύμωσης από τη γλυκόζη (Zeng et al., 1990). Η βέλτιστη τιμή pH για την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης από τον μικροοργανισμό *K. oxytoca* κυμαίνεται από 5 έως 6, ενώ για το στέλεχος *E. aerogenes* ιδανική τιμή pH είναι το 6 (Perego et al., 2003).

Ο συντελεστής απόδοσης σε 2,3-βουτανοδιόλη είναι σχεδόν σταθερός για ένα στενό εύρος pH από 5 έως 6.5, ενώ παρουσιάζει απότομη μείωση για χαμηλότερες ή υψηλότερες τιμές pH. Η ισχυρότερη επίδραση παρατηρήθηκε υπό όξιμες συνθήκες, καθώς η χαμηλότερη τιμή pH συνήθως αναστέλλει τόσο την παραγωγή βιομάζας όσο και την ίδια τη βιοδιεργασία (Perego et al., 2000).

1.5.4 Σύσταση θρεπτικού μέσου

Η σύσταση του θρεπτικού μέσου της καλλιέργειας αποτελεί ακόμα ένα παράγοντα που επηρεάζει επίσης την παραγωγή της 2,3 βουτανοδιόλης. Το μέσο της καλλιέργειας πρέπει να περιέχει όλα τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξη και συντήρηση του εκάστοτε μικροοργανισμού. Έτσι, εκτός από τις πηγές άνθρακα και αζώτου, ένα θρεπτικό μέσο πρέπει να περιλαμβάνει επίσης βιταμίνες, ιχνοστοιχεία, κλπ, η συγκέντρωση των οποίων καθορίζεται από τα επιθυμητά προϊόντα της ζύμωσης (Garg and Jain, 1995). Το εκχύλισμα ζύμης αποτελεί μία εξαιρετική πηγή αζώτου, αν και το αρκετά υψηλό κόστος του το καθιστά απαγορευτικό για χρήση σε βιομηχανική κλίμακα. Μία αζωτούχα ένωση που είναι φθηνή αλλά ταυτόχρονα και επαρκής για ζυμώσεις διολών είναι η ουρία, η οποία έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε ποικίλα υποστρώματα, όπως προϊόντα υδρόλυσης ξύλου. Όπως προαναφέρθηκε, η ακριβής σύσταση του θρεπτικού μέσου της καλλιέργειας εξαρτάται άμεσα από τις ανάγκες του μικροοργανισμού που χρησιμοποιείται για τη διαδικασία της ζύμωσης. Έτσι, ο μικροοργανισμός *K. pneumoniae* καθώς και συναφή είδη, δεν είναι τόσο πολύ απαιτητικά στις διατροφικές τους ανάγκες, ενώ παράλληλα δίνουν ικανοποιητικά ποσά διόλης καλλιεργούμενα σε θρεπτικά μέσα τα οποία περιέχουν ζάχαρη και ανόργανα άλατα. Ωστόσο, σε καλλιέργειες του μικροοργανισμού *Bacillus licheniformis* παρατηρήθηκε ότι προσθήκη πεπτόνης καθώς και εκχυλίσματος κρέατος στο θρεπτικό μέσο, ενίσχυσαν την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης σε σχέση με αντίστοιχες καλλιέργειες των *K. oxytoca* και *B. polymyxa* (Nilegaonkar et al., 1992).

Προκειμένου όμως να μειωθεί το κόστος των βιοδιεργασιών για την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης, κρίνεται απαραίτητη η αντικατάσταση ενός μέρους ή ίσως και ολόκληρου της οργανικής πηγής αζώτου από κάποια ανόργανη πηγή. Για το λόγο αυτό, έχει παρατηρηθεί ότι ορισμένα μεταλλικά ιόντα μπορούν να βελτιώσουν την απόδοση ως προς τη σύνθεση της 2,3-βουτανοδιόλης. Μελέτες έδειξαν ότι τα κύρια ιχνοστοιχεία που οδηγούν σε αυξημένες αποδόσεις 2,3-βουτανοδιόλης είναι τα κατιόντα Fe^{2+} και Mn^{2+} (Laube et al., 1984a). Η προσθήκη Fe^{2+} , Mn^{2+} και Fe^{2+} με Mn^{2+} σε θρεπτικό μέσο που περιείχε 0.5 % εκχύλισμα ζύμης, οδήγησε σε παραγωγή της τάξης των 8.7 g/L, 12.6 g/L και 13 g/L αντίστοιχα για τον μικροοργανισμό *B. polymyxa*. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι προσθήκη φωσφορικού οξέος υπό τη μορφή φωσφορικού καλίου ή φωσφορικού νατρίου σε θρεπτικό μέσο που περιείχε 0.5% εκχύλισμα ζύμης, βελτίωσε την απόδοση της 2,3-βουτανοδιόλης (13.8 g/L) για συγκέντρωση γλυκόζης 5% (Celińska and Grajek, 2009). Συνδυασμός λοιπόν των παραπάνω παραγόντων (Fe^{2+} , Mn^{2+} και φωσφορικού οξέος) είχε ως αποτέλεσμα αύξηση της απόδοσης

της 2,3-βουτανοδιόλης (15.4 g/L) κατά 89 % σε σχέση με αυτή που λαμβάνεται όταν στο θρεπτικό μέσο το εκχύλισμα ζύμης είναι 1.5 % (Laube et al., 1984a). Συμπερασματικά λοιπόν φαίνεται ότι, χαμηλές συγκεντρώσεις εκχυλίσματος ζύμης (0.5 %) σε συνδυασμό με φωσφορικά ιόντα καθώς και Fe^{2+} και Mn^{2+} μπορούν να αντικαταστήσουν 1.5% του εκχυλίσματος ζύμης του μέσου, ενώ παράλληλα αυξάνουν και την απόδοση σε 2,3-βουτανοδιόλη. Σε καλλιέργειες του μικροοργανισμού *K. pneumoniae* σε υδρόλυμα ξύλου, εξετάστηκε η πιθανή παρεμποδιστική δράση των περιεχόμενων στο υπόστρωμα της ζύμωσης οξέων και παρατηρήθηκε ότι το οξικό οξύ (1.6 % w/v.) είχε θετική επίδραση στην παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης, ενώ το θειικό οξύ (έως 0.2% w/v) δεν επηρέασε την ανάπτυξη αλλά μείωσε την απόδοση της βουτανοδιόλης κατά 30 %. Παρόμοια αποτελέσματα στην ανάπτυξη φαίνεται να είχε και η παρουσία φουρφουράλης (έως 0.2% w/v) με λίγο υψηλότερες αποδόσεις σε 2,3-βουτανοδιόλης, ενώ τέλος ανασταλτική παρατηρήθηκε ότι ήταν η παρουσία φαινολικών ενώσεων (0.05 - 0.1% w/v) τόσο για την ανάπτυξη όσο και για το σχηματισμό της 2,3-βουτανοδιόλης (Celińska and Grajek, 2009).

1.5.5 Αρχική συγκέντρωση σακχάρων

Στις περισσότερες βιοδιεργασίες παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης, η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη αρχική συγκέντρωση σακχάρων, σε υποστρώματα τα οποία προέρχονται κυρίως από απόβλητα της βιομηχανίας τροφίμων, κυμαίνεται μεταξύ 5-10 % (Garg and Jain, 1995). Οι σχετικά χαμηλές αυτές συγκεντρώσεις οφείλονται κυρίως στις τοξικές ουσίες των πρώτων υλών, οι οποίες χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα σε διεργασίες ζυμώσεων προς παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Η συγκέντρωση των τοξικών αυτών ουσιών αυξάνεται παράλληλα με την αύξηση της συγκέντρωσης της πηγής άνθρακα του υποστρώματος. Συνεπώς, σε χαμηλές συγκεντρώσεις σακχάρων (4-6 %), η ζύμωση της σακχαρόζης σε μελάσα ζαχαρότευτλου πραγματοποιείται ταχέως, ενώ για μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σακχάρων (πάνω από 17 %) η ζύμωση δεν ολοκληρώνεται (Mccall and Georgi, 1954). Στην περίπτωση όπου γίνεται χρήση συνθετικών μέσων, τα οποία είναι εμπλουτισμένα με καθαρά σάκχαρα (π.χ. γλυκόζη), δεν παρατηρείται ύπαρξη τοξικών ουσιών και επομένως ακόμα και υψηλές αρχικές συγκεντρώσεις σακχάρων (έως και 200 g/L) μπορούν να ζυμωθούν. Περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης των σακχάρων μπορεί να βελτιώσει την απόδοση 2,3-βουτανοδιόλης, ενώ για συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 20 g/L παρατηρείται μείωση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης. Όσο αφορά την παραγωγικότητα της 2,3-βουτανοδιόλης, αυτή φαίνεται να επηρεάζεται σε μικρότερο βαθμό από την αρχική

συγκέντρωση σακχάρων και να λαμβάνει μέγιστη τιμή για συγκεντρώσεις περίπου 100 g/L (Celińska and Grajek, 2009).

Σε καλλιέργειες του *E. aerogenes* όπου η αρχική συγκέντρωση γλυκόζης κυμαινόταν μεταξύ 9 - 72 g/L, η παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης δεν φαίνεται να επηρεάστηκε από την αρχική συγκέντρωση των σακχάρων (Converti et al., 2003), ενώ σε καλλιέργειες του *B. polymyxa* παρατηρήθηκε αναστολή της παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης για αρχική συγκέντρωση σακχάρων μεγαλύτερη από 150 g/L (De Mas et al., 1988). Για συνεχείς καλλιέργειες του στελέχους *K. pneumoniae* σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 60 g/L, παρατηρήθηκε ότι μόνο τα 9.2 g/L γλυκερόλης ήταν ικανά να ζυμωθούν σε χρονικό διάστημα 12 ωρών. Μετά τις 12 ώρες της ζύμωσης η ανάπτυξη του μικροοργανισμού καθώς και η παραγωγή προϊόντων σταμάτησε (Reimann et al., 1998). Μελέτες επίσης πραγματοποιήθηκαν με χρήση αποβλήτων της βιομηχανίας τροφίμων (υδρόλυμα αμύλου αραβοσίτου ή μελάσα) ως υποστρώματα για την βιοτεχνολογική παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης από το στέλεχος *E. aerogenes*, σε αρχική συγκέντρωση γλυκόζης ή σουκρόζης 20 g/L. Παρατηρήθηκε ότι αυξάνοντας την αρχική συγκέντρωση σακχάρων, υπήρξε σταδιακή αύξηση του χρόνου της ζύμωσης ενώ παράλληλα μειώθηκε η απόδοση σε 2,3-βουτανοδιόλη (Perego et al., 2000).

Συμπερασματικά λοιπόν, παρατηρούμε ότι το είδος καθώς και η αρχική συγκέντρωση του υποστρώματος επηρεάζουν την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης, ανάλογα βέβαια και με το είδος του μικροοργανισμού που χρησιμοποιείται κάθε φορά.

1.6 Σκοπός της μελέτης

Τα τελευταία χρόνια η βιομηχανία έχει στρέψει το ενδιαφέρον της προς την παραγωγή χημικών ενώσεων μέσω βιοχημικών διεργασιών με σκοπό τη μείωση του κόστους της παραγωγικής διαδικασίας, έναντι των κλασικών χημικών μεθόδων που χρησιμοποιούνται ευρέως μέχρι σήμερα. Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει η παραγωγή χημικών μέσω βιοτεχνολογικών μεθόδων με χρήση διαφόρων μικροοργανισμών και ιδιαίτερα η παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης μέσω μικροβιακών ζυμώσεων, λόγω της ευρείας χρήσης και εφαρμογών της στη βιομηχανία.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η βιοτεχνολογική παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης, αξιοποιώντας ακατέργαστη σακχαρόζη ως υπόστρωμα με τη χρήση του βακτηριακού στελέχους *Enterobacter* sp.. Η επίδραση των συνθηκών της ζύμωσης μελετήθηκε με σκοπό την βελτιστοποίηση της διεργασίας της ζύμωσης. Συγκεκριμένα, διαφορετικές συνθήκες

αερισμού και ανάδευσης καθώς και η σύσταση του θρεπτικού μέσου τόσο στην κύρια καλλιέργεια όσο και στην προκαλλιέργεια μελετήθηκε με σκοπό την βελτιστοποίηση της διεργασίας.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Βιολογικό υλικό

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το βακτήριο της οικογένειας *Enterobacteriaceae* και συγκεκριμένα το στέλεχος *Enterobacter sp.* για την βιοτεχνολογική παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης. Το εν λόγω βακτήριο ανήκει στη συλλογή του εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογία Τροφίμων του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Το βακτηριακό στέλεχος διατηρούνταν μακροχρόνια στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ σε υγρό θρεπτικό μέσο με σύσταση (σε g/L): 5 πεπτόνη, 5 εκχύλισμα κρέατος, 2.5 εκχύλισμα ζύμης, 2 K_2HPO_4 , 5 CH_3COONa , 0.8 $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05 $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ με γλυκερόλη.

2.2 Παρασκευή υγρού εμβολίου

Η παρασκευή του υγρού εμβολίου πραγματοποιήθηκε σε κωνικές φιάλες των 500 mL πληρωμένες με 200 mL υγρό θρεπτικό μέσο με την ακόλουθη σύσταση (σε g/L): 5 πεπτόνη, 5 εκχύλισμα κρέατος, 2.5 εκχύλισμα ζύμης, 2 K_2HPO_4 , 5 CH_3COONa , 0.8 $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05 $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ καθώς και 10 γλυκόζη ή σουκρόζη ως πηγή άνθρακα. Οι κωνικές εμβολιάστηκαν με ένα φιαλίδιο που περιείχε το εναιώρημα κυττάρων και επώαστηκαν για 15-16 ώρες στους $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, υπό ανάδευση 180 rpm. Τα υλικά και θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν αποστειρώθηκαν στους $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 20 min.



Εικόνα 1 Παρασκευή υγρού εμβολίου με χρήση γλυκόζης και σουκρόζης ως πηγών άνθρακα.

2.3 Θρεπτικό μέσο για την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης

Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για την βιοτεχνολογική παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης είχε την εξής σύσταση (σε g/L) : 5 πεπτόνη, 5 εκχύλισμα κρέατος, 2.5 εκχύλισμα ζύμης, 2 K_2HPO_4 , 5 CH_3COONa , 0.8 $MgSO_4 \times 7H_2O$, 0.05 $MnSO_4 \times H_2O$ και 50 ακατέργαστη ζάχαρη ως πηγή άνθρακα. Τα υλικά και θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν αποστειρώθηκαν στους 121 °C για 20 min. Η πηγή αζώτου καθώς και η πηγή αλάτων αποστειρώθηκαν ξεχωριστά και προστέθηκαν στο θρεπτικό μέσο υπό ασηπτικές συνθήκες.

2.4 Συνθήκες ζύμωσης

2.4.1 Επίδραση αερισμού και ανάδευσης

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν μία σειρά ημι-συνεχών βακτηριακών ζυμώσεων σε βιοαντιδραστήρα όγκου 3.7 L στους 30 °C και τιμή pH 6.4 με χρήση ακατέργαστης σακχαρόζης ως πηγή άνθρακα. Συγκεκριμένα μελετήθηκε η επίδραση του ρυθμού ανάδευσης (150, 250, 400 και 600 rpm) με σταθερό αερισμό (1 vvm). Στη συνέχεια, διεξήχθη μια ζύμωση με ρυθμό ανάδευσης 250 rpm και ρυθμό αερισμού 0.5 vvm. Τέλος, τρεις ημι-συνεχείς ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν με σταθερό ρυθμό αερισμού στα 1 vvm και ρυθμό ανάδευσης από 150-300 rpm, 150-400 και 150-600 rpm προκειμένου να διατηρηθεί το επίπεδο του διαλυτού οξυγόνου στο 5 %. Ο ενεργός όγκος της καλλιέργειας ήταν 1 L όπου

εμβολιάστηκε με εμβόλιο 10 % (v/v). Σε όλα τα πειράματα, πυκνό διάλυμα ακατέργαστης σακχαρόζης με 1 % εκχύλισμα ζύμης προστέθηκε όταν η συγκέντρωση των σακχάρων ήταν μικρότερη από 20 g/L έτσι ώστε να διατηρηθεί η συγκέντρωση των σακχάρων από 10 έως 20 g/L.

2.4.2 Μελέτη της σύστασης του θρεπτικού μέσου ζύμωσης

Στη συνέχεια προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της σύστασης του θρεπτικού μέσου στην παραγωγή της 2,3-βουτανολίου, πραγματοποιήθηκε μια σειρά ασυνεχών βακτηριακών ζυμώσεων χρησιμοποιώντας διαφορετικής σύστασης θρεπτικά μέσα (Πίνακας 1) με ακατέργαστη σακχαρόζη ως πηγή άνθρακα αρχικής συγκέντρωσης 50 g/L. Τα πειράματα διεξήχθησαν σε κωνικές φιάλες των 500 mL με ενεργό όγκο ζύμωσης 100 mL, υπό ανάδευση 180 rpm, θερμοκρασία στους 30 °C, ενώ το pH ρυθμίστηκε στο 6.3 (NaOH 5M).

Πίνακας 1 Σύσταση των διαφορετικών θρεπτικών μέσων ζυμώσης

Συστατικό	A	B	C	Συστατικό	D	E	F
		(g/L)				(g/L)	
K ₂ HPO ₄		2		(NH ₄) ₂ SO ₄		7.2	
CH ₃ COONa		5		(NH ₄) ₂ HPO ₄		6	
MgSO ₄ × 7H ₂ O		0.84		KOH		0.45	
MnSO ₄ × H ₂ O		0.05		EDTA		0.51	
Peptone	-	5	-	MgSO ₄ .7H ₂ O		0.3	
Yeast extract	2.5	2.5	5	CaCl ₂ .2H ₂ O		0.09	
				FeSO ₄ .7H ₂ O		0.0225	
				ZnSO ₄ .7H ₂ O		0.0075	
				MnSO ₄ .H ₂ O		0.0038	
				Yeast extract	-	2.5	-
				CH ₃ COONa	-	-	5

2.4.3 Μελέτη της σύστασης του υγρού εμβολίου

Μετά από τα αποτελέσματα για τη σύσταση του θρεπτικού μέσου, κρίθηκε σκόπιμη και η μελέτη της σύστασης του εμβολίου για την επίδραση του στην παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης. Για το λόγο αυτό διαφορετικής σύστασης θρεπτικά μέσα χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη του υγρού εμβολίου. Συγκεκριμένα, δύο διαφορετικά θρεπτικά συστατικά μελετήθηκαν μεταβάλλοντας την ποσότητα της πηγής άνθρακα και την πηγή αζώτου (Πίνακας 2). Η σύσταση των θρεπτικών συστατικών A-G ήταν (σε g/L): 2 K₂HPO₄, 5 CH₃COONa, 0.8 MgSO₄ × 7H₂O, 0.05 MnSO₄ × H₂O, ενώ για τα H-N η σύσταση ήταν (σε g/L): 7.2 (NH₄)₂SO₄, 6 (NH₄)₂HPO₄, 0.45 KOH, 0.51 EDTA, 0.3 MgSO₄.7H₂O, 0.09 CaCl₂.2H₂O, 0.0225 FeSO₄.7H₂O, 0.075 ZnSO₄.7H₂O, 0.0038 MnSO₄.H₂O. Αρχικά, εμβολιάστηκε ενεργή καλλιέργεια κυττάρων (10 % v/v) σε κελιά μικρού όγκου (200 μL). Το pH των θρεπτικών υλικών ρυθμίστηκε στο 7 πριν την αποστείρωση και έπειτα μεταφέρθηκε υπό ασυπτικές

συνθήκες στα κελιά. Η οπτική πυκνότητα μετρήθηκε στα 650 nm ανά 10 λεπτά κατά τη διάρκεια 48 ωρών με τη χρήση ειδικού εξοπλισμού (Microplate reader). Για κάθε μια περίπτωση έγιναν έξι επαναλήψεις.

Στη συνέχεια και έπειτα από ανάλυση των αποτελεσμάτων υπολογίζοντας τον ειδικό ρυθμό αύξησης για κάθε περίπτωση επιλέχθηκαν τα θρεπτικά μέσα που έδωσαν τον μεγαλύτερο ειδικό ρυθμό αύξησης και επιβεβαιώθηκαν σε κωνικές φιάλες των 500 mL πληρωμένες με 200 mL υγρό θρεπτικό μέσο. Οι κωνικές εμβολιάστηκαν με ένα φιαλίδιο που περιείχε το εναιώρημα κυττάρων και επωάστηκαν για 15-16 ώρες στους 30 °C, υπό ανάδευση 180 rpm.

Πίνακας 2 Σύσταση θρεπτικών μέσων της προκαλλιέργειας

Συστατικό	A	B	C	D	E	F	G
Glucose	10	-	-	-	-	-	-
Sugar cane	-	10	20	10	10	10	10
Peptone	5	5	5	5	-	2.5	-
Meat extract	5	5	5	-	-	-	-
Yeast extract	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	5
Συστατικό	H	I	J	K	L	M	N
Glucose	10	-	-	-	-	-	-
Sugar cane	-	10	20	10	10	10	10
Peptone	-	-	-	5	-	2.5	-
Yeast extract	-	-	-	2.5	2.5	2.5	5

2.4.4 Συνθήκες ζύμωσης στις βέλτιστες συνθήκες

Τέλος, με βάση τα προηγούμενα αποτελέσματα μια ημι-συνεχής ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα 3.7 L πραγματοποιήθηκε στις βέλτιστες συνθήκες. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε μια ημι-συνεχής ζύμωση με σταθερό ρυθμό αερισμού 1 vvm και ρυθμό ανάδευσης από 150-400 rpm έτσι ώστε να διατηρηθεί το επίπεδο του διαλυτού οξυγόνου στο 5 %. Ο ενεργός όγκος της καλλιέργειας ήταν 1 L όπου εμβολιάστηκε με εμβόλιο 10 % (v/v). Η σύσταση του υγρού εμβολίου ήταν η εξής (σε g/L): 5 πεπτόνη, 5 εκχύλισμα κρέατος, 2.5

εκχύλισμα ζύμης, 2 K₂HPO₄, 5 CH₃COONa, 0.8 MgSO₄ × 7H₂O, 0.05 MnSO₄ × H₂O καθώς και 10 σουκρόζη ως πηγή άνθρακα, ενώ το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε είχε σύσταση σε (g/L): 7.2 (NH₄)₂SO₄, 6 (NH₄)₂HPO₄, 0.45 KOH, 0.51 EDTA, 0.3 MgSO₄ × 7H₂O, 0.0038 MnSO₄ × H₂O, 0.09 CaCl₂ × 2H₂O, 0.0225 FeSO₄ × 7H₂O, 0.0075 ZnSO₄ × 7H₂O και 50 ακατέργαστη ζάχαρη ως πηγή άνθρακα. Πυκνό διάλυμα ακατέργαστης σακχαρόζης προστέθηκε όταν η συγκέντρωση των σακχάρων ήταν μικρότερη από 20 g/L έτσι ώστε να διατηρηθεί η συγκέντρωση των σακχάρων από 10 έως 20 g/L.



Εικόνα 2 Ημι-συνεχής ζύμωση του *Enterobacter* sp. σε βιοαντιδραστήρα όγκου 3.7 L με συνεχόμενη τροφοδοσία.

2.5 Αναλυτικές μέθοδοι

2.5.1 Προσδιορισμός βιομάζας

Ο προσδιορισμός της βιομάζας έγινε έμμεσα με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (Optical Density, OD) και άμεσα με μέτρηση του ξηρού βάρους. Πιο συγκεκριμένα, για διάφορα χρονικά σημεία της ζύμωσης έγινε λήψη 4 mL δείγματος εκ των οποίων τα 0.5mL έπειτα από κατάλληλη αραιώση με απιονισμένο νερό τοποθετήθηκαν σε κυψελίδα των 2 mL

και ακολούθησε μέτρηση της οπτικής πυκνότητας σε μήκος κύματος 650 nm με χρήση φασματοφωτομέτρου διπλής θέσεως τύπου Hitachi U-2000 (Japan). 1.5mL δείγματος τοποθετήθηκε σε erpendorf των 2 mL και ακολούθησε φυγοκέντρηση των κυττάρων σε φυγόκεντρο τύπου Hettich Universal 320-R (Germany) (9000 rpm, 10 min, 4°C). Έπειτα ακολούθησε έκπλυση των κυττάρων με απιονισμένο νερό και εκ νέου φυγοκέντρηση. Στη συνέχεια έγινε μεταφορά της βιομάζας σε προζυγισμένα φιαλίδια τα οποία τοποθετήθηκαν σε φούρνο προς ξήρανση (90 ± 5 °C) μέχρι σταθεροποίησης του βάρους. Το ξηρό υπόλειμμα ζυγίστηκε σε ζυγό ακριβείας τύπου Sartorius basic (ακρίβειας 4 δεκαδικών ψηφίων) και εκφράζεται σε g/L.

2.5.2 Προσδιορισμός σακχάρων και μεταβολιτών

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των σακχάρων και των μεταβολιτών της ζύμωσης πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) με χρήση του συστήματος SHIMADZU UFLC XR. Για την ταυτοποίηση των παραγόμενων προϊόντων έγινε σύγκριση του χρόνου κατακράτησης τους με πρότυπα διαλύματα αυτών. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε υδατικό διάλυμα H_2SO_4 10 mM. Η στήλη με την οποία έγινε ο διαχωρισμός του δείγματος ήταν τύπου Phenomenex Rezex ROA (300 mm × 7.8 mm) με ταχύτητα ροής 0.6 mL/min και θερμοκρασία στήλης 65 °C.

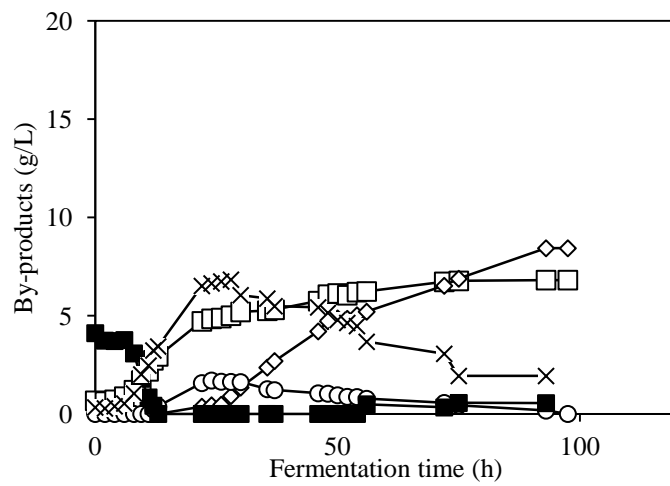
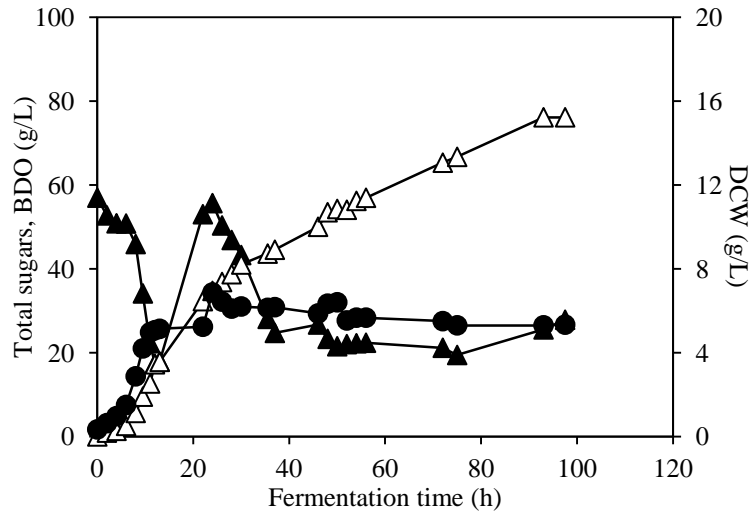
3. Αποτελέσματα

3.1 Επίδραση διαφορετικών συνθηκών ανάδευσης και αερισμού

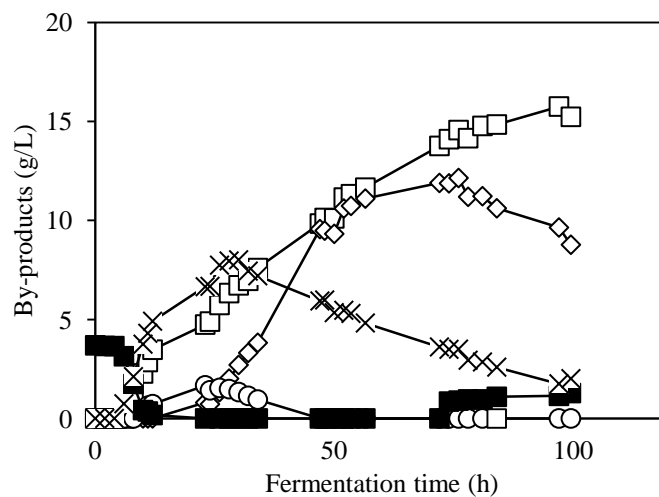
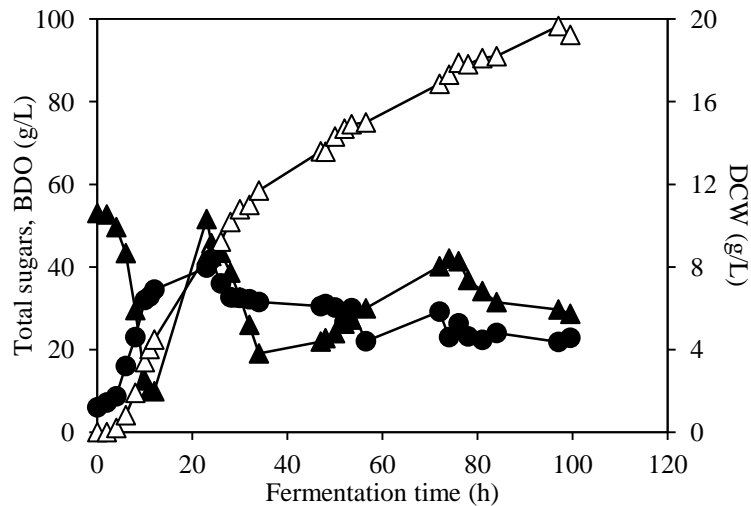
Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της παροχής οξυγόνου για την βιοτεχνολογική παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης από το βακτηριακό στέλεχος *Enterobacter* sp. 1, πραγματοποιήθηκε μια σειρά ημι-συνεχών ζυμώσεων σε διαφορετικές συνθήκες ανάδευσης και αερισμού. Συγκεκριμένα, τέσσερις ημι-συνεχείς ζυμώσεις διεξήχθησαν με διαφορετικούς ρυθμούς ανάδευση (150, 250, 400, 600 rpm) και σταθερή παροχή αερισμού στο 1 vvm. Στη συνέχεια, μία ημι-συνεχής ζύμωση διεξήχθη με ανάδευση στις 250 rpm και αερισμό στα 0.5 vvm. Τέλος, πραγματοποιήθηκαν τρεις ημι-συνεχείς ζυμώσεις με αυτόματη ρύθμιση της ταχύτητας ανάδευσης στην περιοχή των 150-300 rpm, 150-400 rpm και 150-600 rpm, προκειμένου να διατηρηθεί το διαλυτό οξυγόνο (DO) στο 5% και συνεχή παροχή αερισμού στο 1 vvm.

Κατά την ημι-συνεχή καλλιέργεια με ταχύτητα ανάδευσης 150 rpm και ρυθμό αερισμού 1 vvm η συγκέντρωση της 2,3-βουτανοδιόλης έφτασε τα 76.1 g/L, με συντελεστή απόδοσης 0.43 g/g, παραγωγικότητα 0.82 g/L/h και συνολική συγκέντρωση παραπροϊόντων 17.3 g/L (ηλεκτρικό οξύ 6.8 g/L και γαλακτικό οξύ 8.4 g/L). Παρατηρώντας το διάγραμμα παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης καθώς επίσης και αυτό των παραπροϊόντων (Σχήμα 1), παρατηρείται ότι η παραγωγή ηλεκτρικού οξέος αρχίζει ταυτόχρονα με την παραγωγή της βουτανοδιόλης σε αντίθεση με το γαλακτικό οξύ το οποίο αρχίζει να παράγεται όταν η συγκέντρωση της βουτανοδιόλης είναι μεγαλύτερη από 40 g/L.

Αυξάνοντας την ταχύτητα ανάδευσης στα 250 rpm και διατηρώντας σταθερό τον αερισμό στα 1 vvm παρατηρήθηκε αύξηση της βιομάζας λαμβάνοντας τη μέγιστη τιμή (7.3 g/L) μετά τις 12 ώρες. Η μέγιστη συγκέντρωση 2,3-βουτανοδιόλης (98.3 g/L) επιτεύχθηκε στις 97 h με αντίστοιχο συντελεστή απόδοσης 0.35 g/g (Σχήμα 2). Και σε αυτή την περίπτωση η παραγωγή ηλεκτρικού οξέος είναι ταυτόχρονη με αυτή της βουτανοδιόλης, ενώ η παραγωγή γαλακτικού οξέος αρχίζει όταν η συγκέντρωση της 2,3-βουτανοδιόλης είναι μεγαλύτερη από 40 g/L.



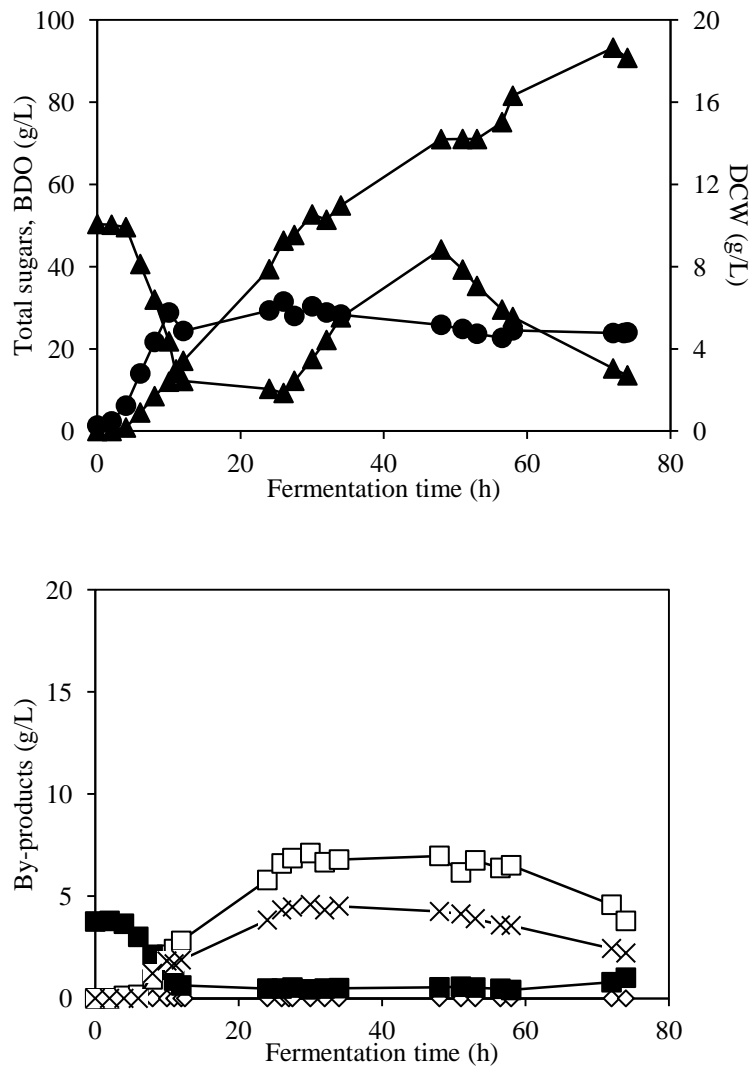
Σχήμα 1 BDO (Δ), DCW (●), οξικό οξύ (■), ηλεκτρικό οξύ (□), γαλακτικό οξύ (◇), μυρμηκικό οξύ (ο) και αιθανόλη (×) παραγωγή καθώς επίσης και κατανάλωση σακχάρων (▲) κατά τη διάρκεια ημι-συνεχούς ζύμωσης με χρήση ακατέργαστης σακχαρόζης, 1 vvm αερισμό, 150 rpm ρυθμό ανάδευσης.



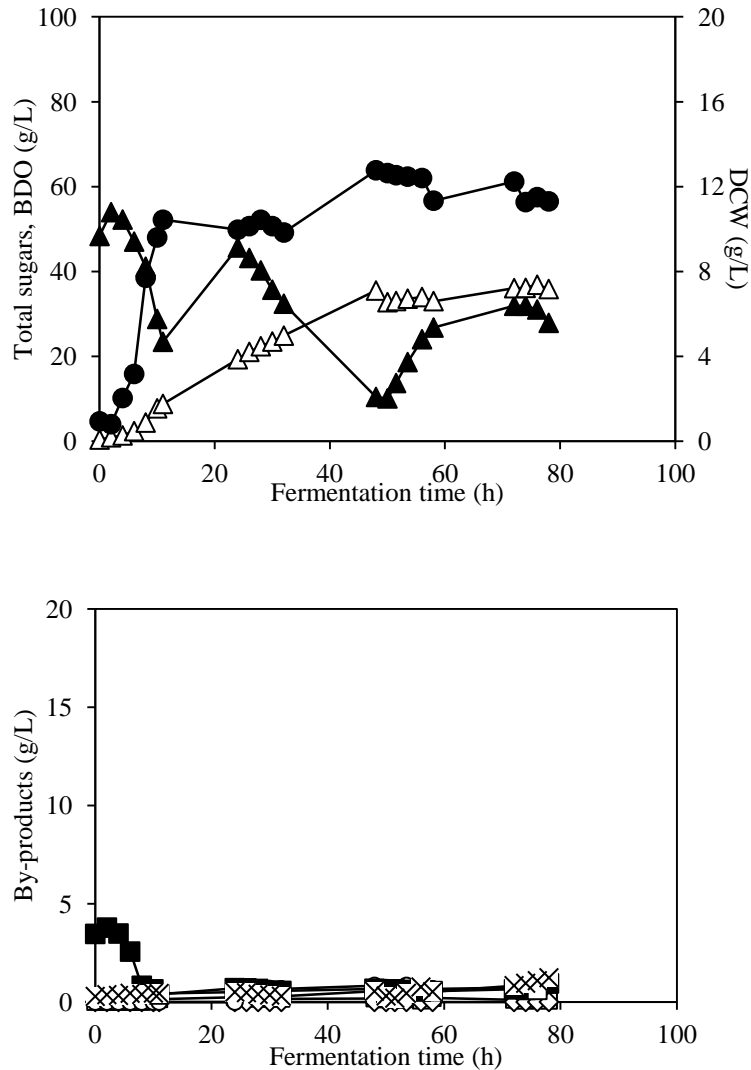
Σχήμα 2 BDO (Δ), DCW (●), οξικό οξύ (■), ηλεκτρικό οξύ (□), γαλακτικό οξύ (◇), μυρμηκικό οξύ (ο) και αιθανόλη (×) παραγωγή καθώς επίσης και κατανάλωση σακχάρων (▲) κατά τη διάρκεια ημι-συνεχούς ζύμωσης με χρήση ακατέργαστης σακχαρόζης, 1 vvm αερισμό, 250 rpm ρυθμό ανάδευσης

Η αύξηση της ταχύτητας ανάδευσης (400 rpm και 600 rpm) και κατά συνέπεια του διαλυτού οξυγόνου στο μέσο της καλλιέργειας επιδρά σημαντικά τόσο στην παραγωγή της 2,3-βουτανολίου όσο και στην παραγωγή των παραπροϊόντων και την αύξηση της βιομάζας. Συγκεκριμένα στην περίπτωση όπου η ανάδευση ήταν 400 rpm η μέγιστη συγκέντρωση 2,3-βουτανολίου ήταν 76 g/L (Σχήμα 3). Σε αυτή την περίπτωση η συγκέντρωση του ηλεκτρικού οξέος μειώθηκε σημαντικά (4.6 g/L) ενώ παρατηρήθηκε παραγωγή ακετοΐνης (17.2 g/L). Σε υψηλότερη ταχύτητα ανάδευσης στα 600 rpm ευνοήθηκε

η παραγωγή βιομάζας και η παραγωγή της ακετοΐνης σε βάρος της 2,3-βουτανοδιόλης (Σχήμα 4).



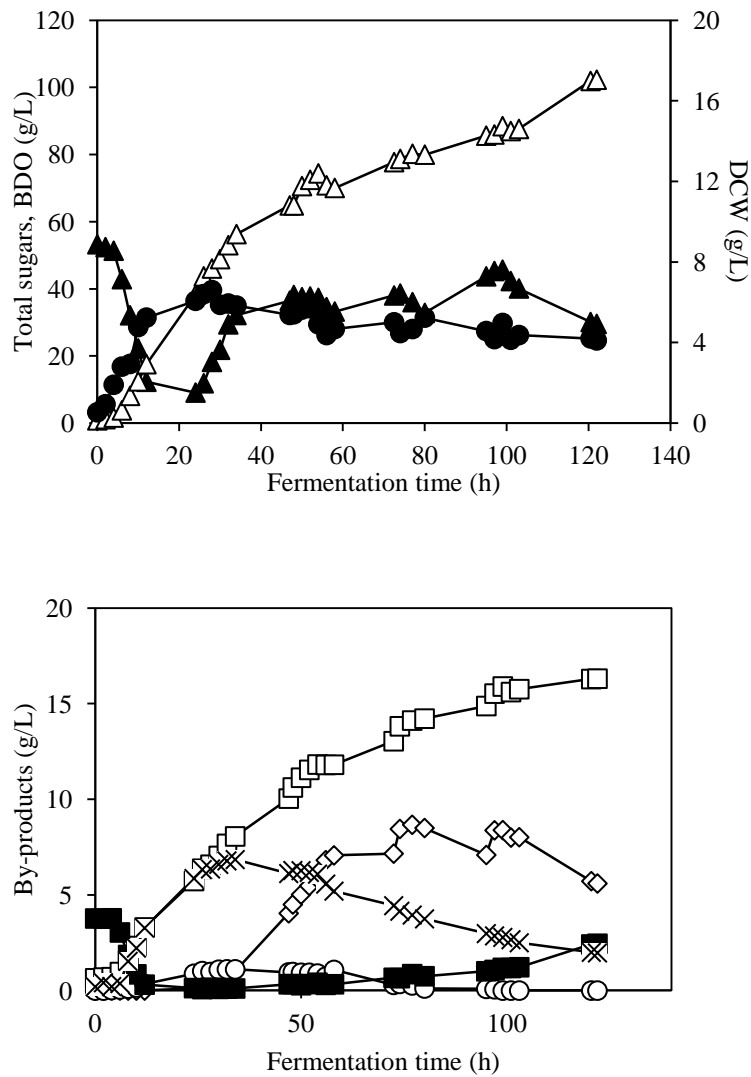
Σχήμα 3 BDO (Δ), DCW (●), οξικό οξύ (■), ηλεκτρικό οξύ (□), γαλακτικό οξύ (◇), μυρμηκικό οξύ (ο) και αιθανόλη (×) παραγωγή καθώς επίσης και κατανάλωση σακχάρων (▲) κατά τη διάρκεια ημι-συνεχούς ζύμωσης με χρήση ακατέργαστης σακχαρόζης, 1 vvm αερισμό, 400 rpm ρυθμό ανάδευσης.



Σχήμα 4 BDO (▲), DCW (●), οξικό οξύ (■), ηλεκτρικό οξύ (□), γαλακτικό οξύ (◇), μυρμηκικό οξύ (○) και αιθανόλη (×) παραγωγή καθώς επίσης και κατανάλωση σακχάρων (▲) κατά τη διάρκεια ημι-συνεχούς ζύμωσης με χρήση ακατέργαστης σακχαρόζης, 1 vvm αερισμό, 600 rpm ρυθμό ανάδευσης.

Συγκρίνοντας τους διαφορετικούς ρυθμούς ανάδευσης σε σταθερό αερισμό 1 vvm, παρατηρούμε ότι η αύξηση της ταχύτητας ανάδευσης ευνοεί την παραγωγή βιομάζας και αύξηση της παραγωγής της ακετοΐνης καθώς και μείωση του συντελεστή απόδοσης της 2,3-βουτανодиόλης. Δεδομένου του γεγονότος ότι η υψηλότερη συγκέντρωση 2,3-βουτανодиόλης επιτεύχθηκε σε ταχύτητα ανάδευσης 250 rpm κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί η επίδραση χαμηλότερης παροχής οξυγόνου. Συγκεκριμένα μια ημι-συνεχής ζύμωση μελετήθηκε με σταθερό αερισμό 0.5 vvm και ταχύτητα ανάδευσης 250 rpm κατά την οποία η συγκέντρωση 2,3-βουτανодиόλης έφθασε τα 101.9 g/L, με συντελεστή απόδοσης 0.35 g/g και

παραγωγικότητα 0.85 g/L/h (Σχήμα 5). Συγκρίνοντας με τα αποτελέσματα από την ημι-συνεχή ζύμωση με ρυθμό αερισμού 1 vvm παρατηρείται μείωση της παραγωγικότητας και ίδιος συντελεστής απόδοσης. Και στις δύο περιπτώσεις τα κύρια παραπροϊόντα είναι το ηλεκτρικό και το γαλακτικό οξύ.



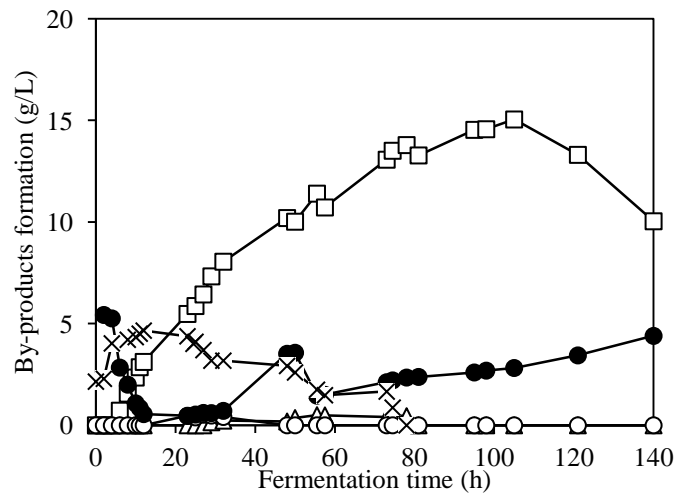
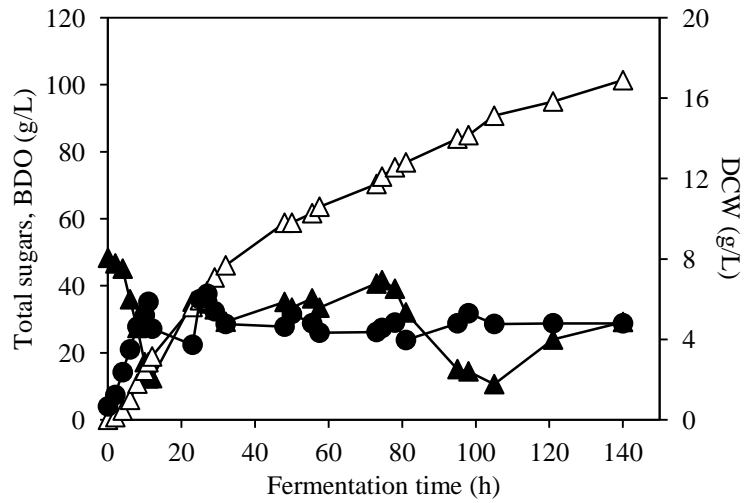
Σχήμα 5 BDO (Δ), DCW (●), οξικό οξύ (■), ηλεκτρικό οξύ (□), γαλακτικό οξύ (◇), μυρμηκικό οξύ (ο) και αιθανόλη (×) παραγωγή καθώς επίσης και κατανάλωση σακχάρων (▲) κατά τη διάρκεια ημι-συνεχούς ζύμωσης με χρήση ακατέργαστης σακχαρόζης, 0.5 vvm αερισμό, 250 rpm ρυθμό ανάδευσης.

Αντίστοιχα αποτελέσματα έχουν παρατηρηθεί σε μελέτες που έχουν γίνει για την παραγωγή 2,3-βουτανολίου μέσω μικροβιακών ζυμώσεων με τη χρήση διαφορετικών βακτηριακών στελεχών. Συγκεκριμένα, σε μελέτη των Ji et al., 2009 σε κλειστές καλλιέργειες

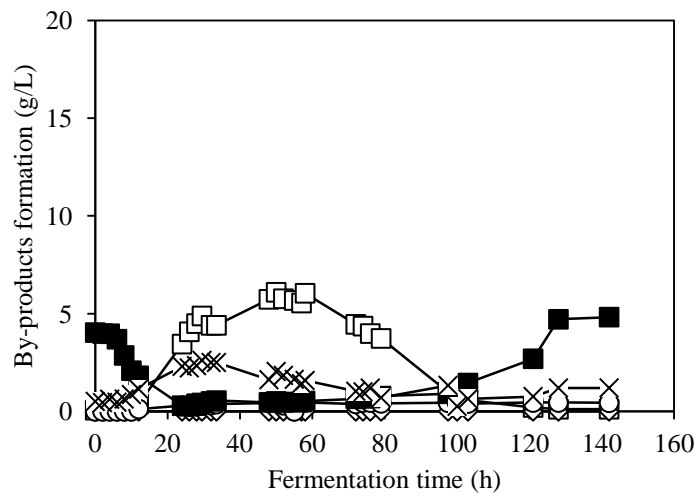
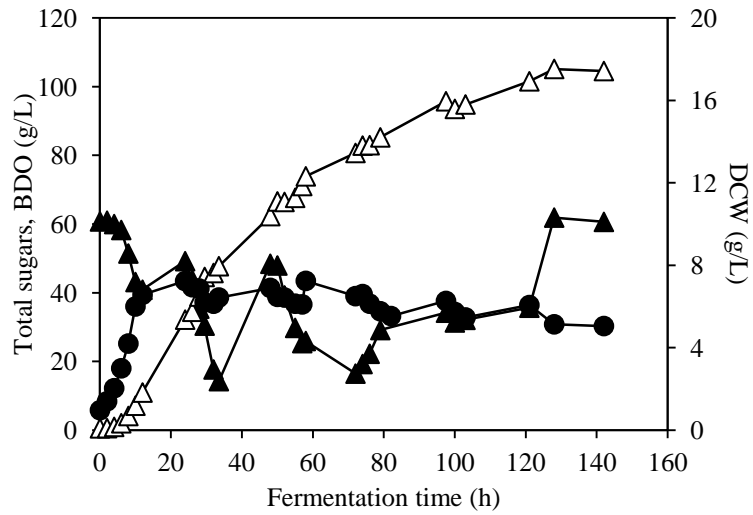
του μικροοργανισμού *Klebsiella oxytoca* με χρήση γλυκόζης ως πηγή άνθρακα παρατηρήθηκε ότι για ταχύτητα ανάδευσης 200 rpm η τελική συγκέντρωση βουτανοδιόλης έφθασε τα 89.9 g/L με παραγωγικότητα 1.4 g/L/h, ενώ στην περίπτωση όπου η ταχύτητα ανάδευσης αυξήθηκε στις 300 rpm παρατηρήθηκε μείωση στην παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης (86.2 g/L) ενώ αντίθετα αυξήθηκε η παραγωγικότητα (1.44 g/L/h). Κύρια παραπροϊόντα της ζύμωσης ήταν αιθανόλη και ακετοΐνη, ωστόσο υψηλότερα ποσοστά ακετοΐνης παρατηρήθηκαν σε υψηλότερη ταχύτητα ανάδευσης (400 rpm). Επίσης, σε ημι-συνεχείς καλλιέργειες του στελέχους *Paenibacillus polymyxa* DSM 365 με χρήση σακχαρόζης ως πηγή άνθρακα, παρατηρήθηκε ότι σε υψηλή διαθεσιμότητα οξυγόνου αυξήθηκε η συγκέντρωση της ακετοΐνης, ενώ μειώθηκε η συγκέντρωση της 2,3-βουτανοδιόλης και των υπόλοιπων παραπροϊόντων κυρίως γαλακτικό οξύ και αιθανόλη (Häßler et al., 2012). Σε μελέτη των Saha and Bothast, 1999 σε καλλιέργειες ανακινούμενων φιαλών του *Enterobacter cloacae* και χρήση αραβινόζης ως πηγή άνθρακα παρατηρήθηκε ότι με αύξηση της ταχύτητας ανάδευσης από 100 σε 400 rpm υπήρξε σταδιακή μείωση του συντελεστή απόδοσης, ενώ αντίθετα η βιομάζα αυξήθηκε.

Στη συνέχεια των πειραμάτων και με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα μελετήθηκε η επίδραση του αερισμού στην παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης σε συνθήκες με σταθερό αερισμό 1 vvm και μεταβολή της ταχύτητας ανάδευσης έτσι ώστε να παραμένει το διαλυτό οξυγόνο στο 5 %. Συγκεκριμένα τρία διαφορετικά εύρη ανάδευσης μελετήθηκαν σε ημι-συνεχείς ζυμώσεις (150-300 rpm, 150-400 rpm και 150-600 rpm).

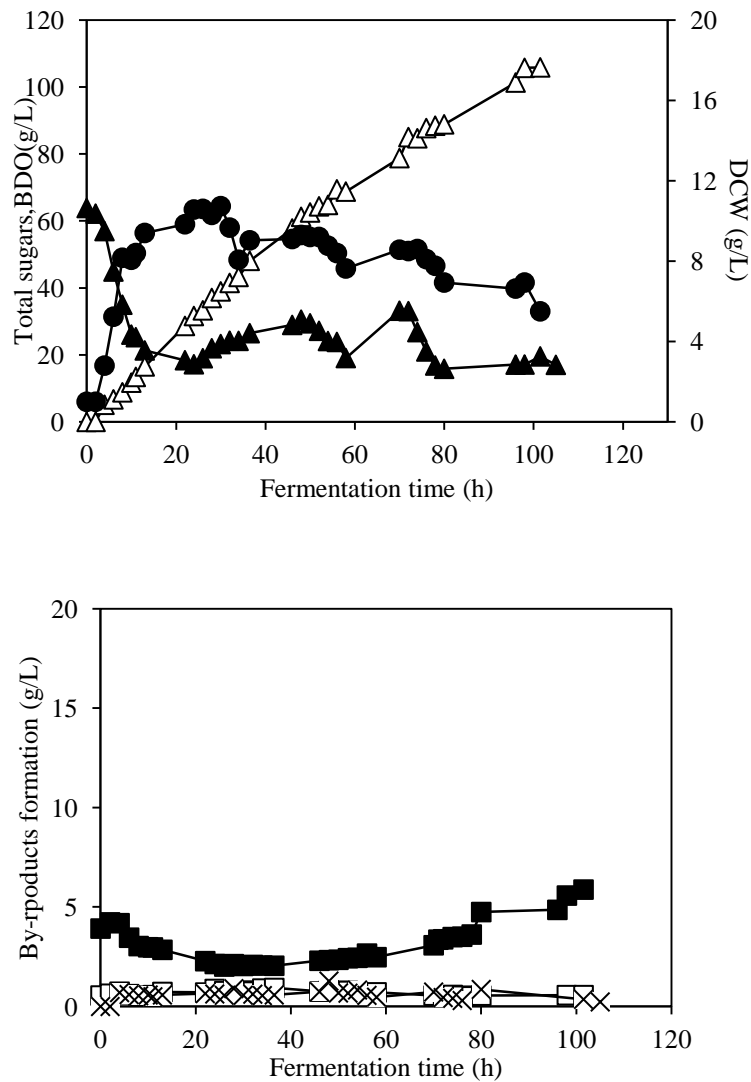
Σε συνθήκες ανάδευσης 150-300 rpm (Σχήμα 6) η τελική συγκέντρωση 2,3-βουτανοδιόλης έφθασε τα 90.75 g/L με συντελεστή απόδοσης 0.36 g/g και παραγωγικότητα 0.86 g/L/h. Στις συγκεκριμένες συνθήκες παρατηρήθηκε υψηλή συγκέντρωση ηλεκτρικού οξέος που έφτασε τα 15.1 g/L. Στην περίπτωση που το εύρος της ανάδευσης κυμάνθηκε από 150-400 rpm (Σχήμα 7) η παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης έφτασε τα 80.7 g/L, με συντελεστή απόδοσης 0.34 g/g και παραγωγικότητα 0.78 g/L/h. Σε αυτή την περίπτωση δεν παρατηρήθηκε παραγωγή οργανικών οξέων αλλά παραγωγή ακετοΐνης (14.1 g/L) ως κύριο παραπροϊόν της ζύμωσης. Για την ημι-συνεχή καλλιέργεια σε συνθήκες αερισμού 1 vvm και εύρος ανάδευσης 150-600 rpm (Σχήμα 8), η συγκέντρωση 2,3-βουτανοδιόλης έφθασε τα 81.6 g/L με συντελεστή απόδοσης 0.16 g/g και παραγωγικότητα 0.8 g/L/h. Σε αυτή την περίπτωση ευνοήθηκε η παραγωγή βιομάζας και η παραγωγή ακετοΐνης φτάνοντας τα 24.1 g/L.



Σχήμα 6 BDO (Δ), DCW (\bullet), οξικό οξύ (\blacksquare), ηλεκτρικό οξύ (\square), γαλακτικό οξύ (\diamond), φορμικό οξύ, (\circ) και αιθανόλη (\times) παραγωγή καθώς επίσης και κατανάλωση σακχάρων (\blacktriangle) κατά τη διάρκεια ημι-συνεχούς ζύμωσης με χρήση ακατέργαστης σακχαρόζης, 1 vvm αερισμό, ρυθμό ανάδευσης 150-300 rpm



Σχήμα 7 BDO (Δ), DCW (\bullet), οξικό οξύ (\blacksquare), ηλεκτρικό οξύ (\square), γαλακτικό οξύ (\diamond), μυρμηκικό οξύ (\circ) και αιθανόλη (\times) παραγωγή καθώς επίσης και κατανάλωση σακχάρων (\blacktriangle) κατά τη διάρκεια ημι-συνεχούς ζύμωσης με χρήση ακατέργαστης σακχαρόζης, 1 vvm αερισμό, ρυθμό ανάδευσης 150-400 rpm

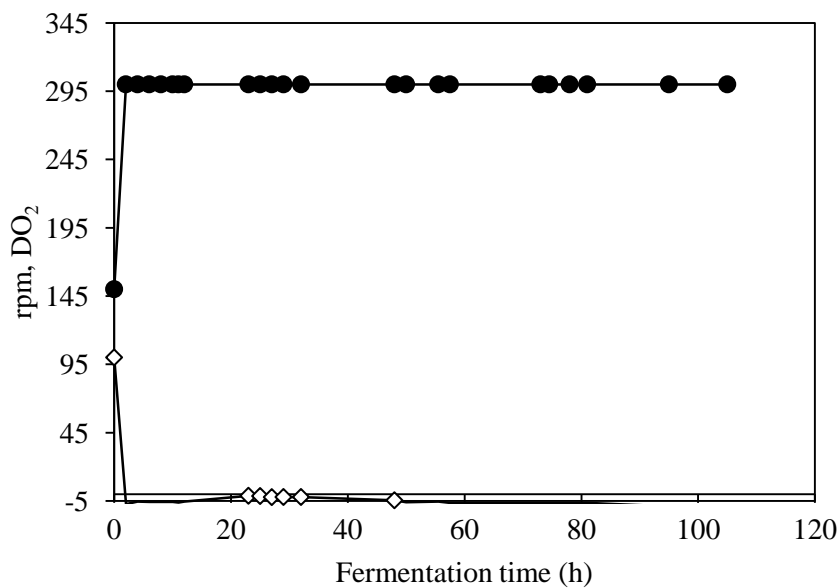


Σχήμα 8: BDO (Δ), DCW (\bullet), οξικό οξύ (\blacksquare), ηλεκτρικό οξύ (\square), γαλακτικό οξύ (\diamond), φορμικό οξύ, (\circ) και αιθανόλη (\times) παραγωγή καθώς επίσης και κατανάλωση σακχάρων (\blacktriangle) κατά τη διάρκεια ημι-συνεχούς ζύμωσης με χρήση ακατέργαστης σακχαρόζης, 1 vvm αερισμό, ρυθμό ανάδευσης 150-600 rpm

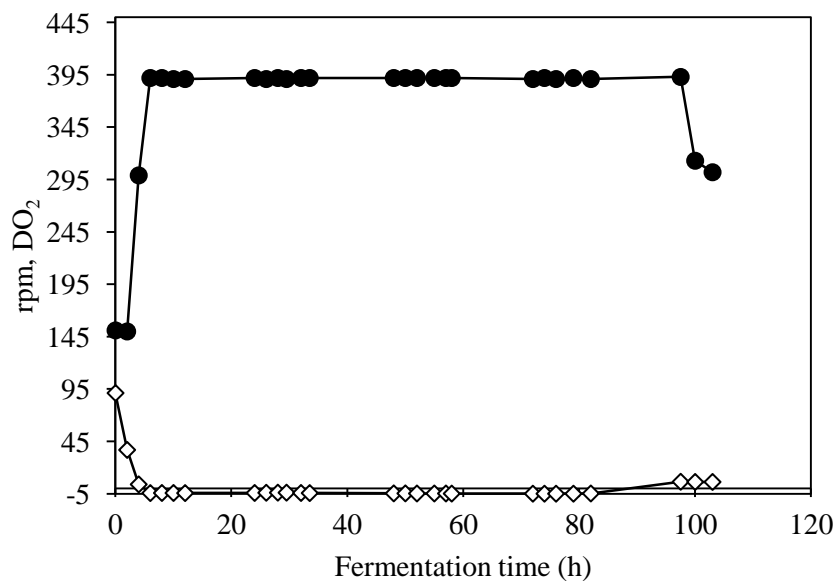
Συγκρίνοντας τα παραπάνω παρατηρούμε ότι αυξάνοντας το έυρος ανάδευσης από 150-300 σε 150-600 rpm ο συντελεστής απόδοσης 2,3-βουτανολιόλης προς καταναλωθέν υπόστωμα μειώνεται κατά 55.5 %. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στην αυξημένη παραγωγή βιομάζας. Συγκεκριμένα, η μέγιστη παραγωγή βιομάζας παρατηρήθηκε για συνθήκες ανάδευσης 150-600 rpm (10.2 g/L), ενώ μικρότερη ήταν η παραγωγή βιομάζας τόσο σε ταχύτητα ανάδευσης 150-400 rpm (6.5 g/L) όσο και για τις 150-300 rpm (4.7 g/L). Αξίζει να σημειωθεί ότι και στις τρεις περιπτώσεις η ταχύτητα ανάδευσης διατηρήθηκε στις 150 rpm

για τις πρώτες τέσσερις ώρες της ζύμωσης, ενώ αυξήθηκε σταδιακά στο μέγιστο ποσοστό (300 rpm, 400 rpm και 600 rpm) μετά τις τέσσερις πρώτες ώρες και μέχρι το τέλος της ζύμωσης (Σχήμα 9α, 9β, 9γ). Ο καλύτερος συντελεστής απόδοσης για αυτή τη σειρά πειραμάτων επιτεύχθηκε για συνθήκες ανάδευσης 150-300 rpm, ωστόσο παρατηρήθηκε παραγωγή ηλεκτρικού οξέος ως κύριο παραπροϊόν της ζύμωσης. Αντίθετα, κατά την καλλιέργεια με εύρος ταχύτητας ανάδευσης από 150-400 rpm δεν παρατηρήθηκε παραγωγή οργανικών οξέων αλλά κύριο παραπροϊόν της ζύμωσης ήταν η ακετοΐνη.

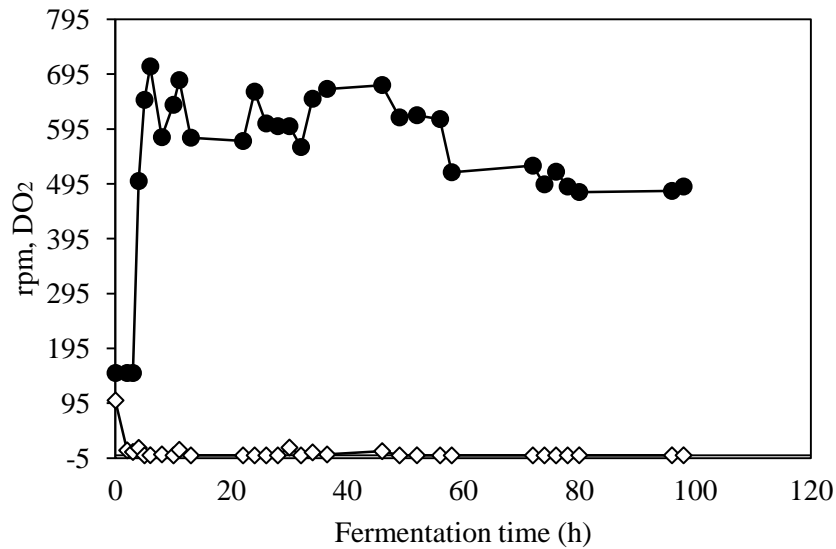
α



β



γ



Σχήμα 9 Μεταβολή της ταχύτητας ανάδευσης (●) και διαλυτό οξυγόνο (◇) κατά τις καλλιέργειες με μεταβολή του εύρους ταχύτητας ανάδευσης 150-300 (α), 150-400 (β) και 150-600 (γ).

Στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τις διαφορετικές συνθήκες αερισμού που μελετήθηκαν. Όπως παρατηρείται, η παραγωγή τόσο της 2,3-βουτανοδιόλης όσο και το προφίλ των παραπροϊόντων επηρεάζεται άμεσα με τη διαθεσιμότητα του οξυγόνου. Σε χαμηλή ταχύτητα ανάδευσης και συνεπώς χαμηλότερο ποσοστό διαθέσιμου οξυγόνου ο συντελεστής απόδοσης ευνοείται. Ο υψηλότερος συντελεστής απόδοσης ήταν 0.43 g/g και επιτεύχθηκε όταν η ταχύτητα ανάδευσης και ο ρυθμός αερισμού ήταν 150 rpm και 1 vvm, αντίστοιχα. Όσο αφορά το σχηματισμό παραπροϊόντων στις καλλιέργειες που πραγματοποιήθηκαν με ρυθμό ανάδευσης χαμηλότερη από 400 rpm οδήγησαν στο σχηματισμό υψηλής συγκέντρωσης οργανικών οξέων ως παραπροϊόντα της ζύμωσης. Στους ρυθμούς ανάδευσης 150 και 250 rpm τα κύρια παραπροϊόντα είναι το ηλεκτρικό οξύ και το γαλακτικό οξύ, ενώ αυξάνοντας την ταχύτητα ανάδευσης πάνω από 400 rpm ευνοείται η παραγωγή ακετοΐνης και παρατηρείται μικρότερη παραγωγή ηλεκτρικού οξέος.

Γενικότερα, η συγκέντρωση του επιθυμητού προϊόντος βελτιώθηκε με αύξηση του ρυθμού αερισμού, ωστόσο υψηλά ποσοστά αερισμού οδήγησαν κυρίως στην παραγωγή βιομάζας σε βάρος της παραγωγής βουτανοδιόλης. Υψηλή διαθεσιμότητα οξυγόνου με ταχύτητα ανάδευσης 600 rpm μείωσε την παραγωγή βουτανοδιόλης, ενώ ο μικροοργανισμός

άρχισε να λαμβάνει ενέργεια μέσω της αναπνοής και όχι μέσω της ζύμωσης με αποτέλεσμα η πηγή άνθρακα να χρησιμοποιείται για την παραγωγή βιομάζας (Σχήμα 10 και 11).

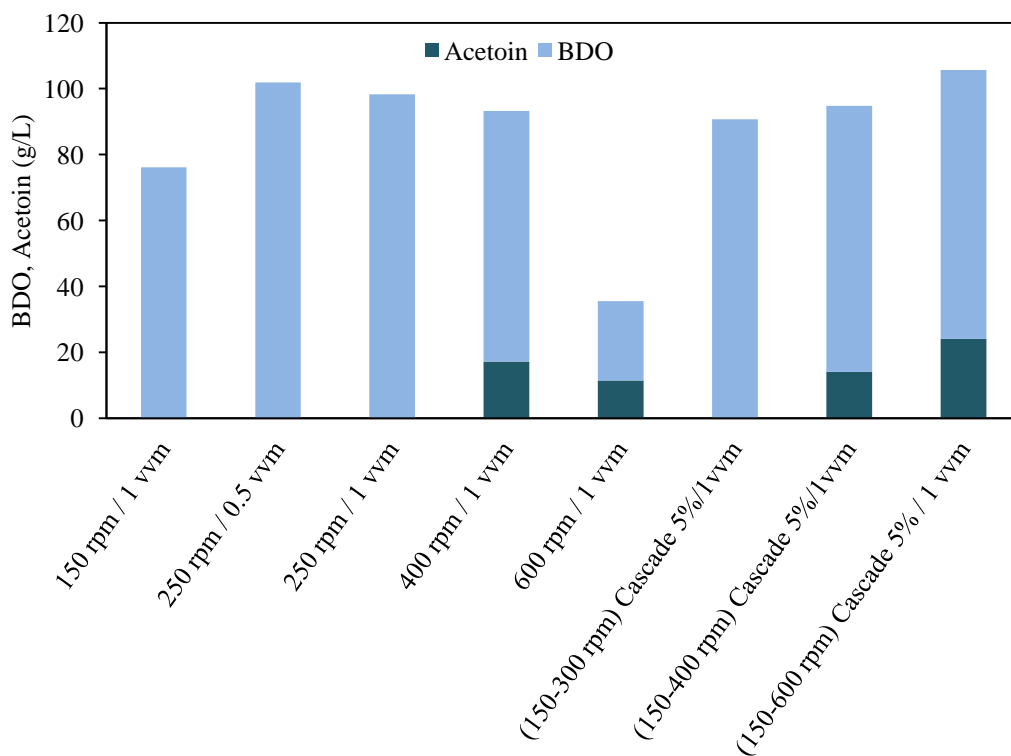
Υψηλότερη συγκέντρωση 2,3-βουτανοδιόλης που επιτεύχθηκε ήταν 101.9 g/L κατά την καλλιέργεια σε ταχύτητα ανάδευσης 250 rpm και ρυθμό αερισμού 0.5 vvm. Ωστόσο, υψηλότερη παραγωγικότητα που παρατηρήθηκε ήταν 1.01 g/L/h, όσον αφορά την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης, όταν η ταχύτητα ανάδευσης ήταν 250 rpm και ο ρυθμός αερισμού 1 vvm. Συγκρίνοντας του διαφορετικούς ρυθμούς ανάδευσης, ικανοποιητικότερα αποτελέσματα τόσο στην παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης όσο και την παραγωγή των παραπροϊόντων παρατηρήθηκαν κατά την καλλιέργεια με μεταβαλλόμενη ταχύτητα ανάδευσης από 150-400 rpm διατηρώντας σταθερό το διαλυτό οξυγόνο στο 5 %.

Συγκριτικά με άλλες μελέτες, η παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης επιτυγχάνεται με τη μεταβολή της ταχύτητας ανάδευσης κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Πιο συγκεκριμένα, έχουν πραγματοποιηθεί πειράματα δύο ή ακόμα και τριών φάσεων για τον ρυθμό της ταχύτητας ανάδευσης (Afschar et al., 1991b; Yang et al., 2015; Zhang et al., 2010), κατά τα οποία για τις πρώτες ώρες της ζύμωσης (συνήθως για τις πρώτες 15 ώρες) η ταχύτητα ανάδευσης ήταν υψηλή, ενώ μετά μειωνόταν. Με τον τρόπο αυτό φαίνεται ότι επιτεύχθηκε μέγιστη συγκέντρωση 2,3-βουτανοδιόλης και παραγωγικότητας, καθώς επίσης και αύξηση του συντελεστή απόδοσης συγκριτικά με τα αποτελέσματα πειραμάτων όπου η ταχύτητα ανάδευσης διατηρείται σταθερή. Για να μπορέσουν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για το βέλτιστο ρυθμό ανάδευσης σε μελέτη τους οι Ji et al., 2009 πραγματοποίησαν πειράματα δύο-φάσεων ως προς τον ρυθμό της ταχύτητας ανάδευσης. Σε κλειστές καλλιέργειες του μικροοργανισμού *Klebsiella oxytoca* με χρήση γλυκόζης ως υπόστρωμα, αρχικά η ανάδευση για τις πρώτες 15 ώρες της ζύμωσης ρυθμίστηκε στις 300 rpm έτσι ώστε να επιτευχθεί ο μέγιστος ρυθμός κυτταρικής αύξησης (μ), ενώ σε δεύτερο στάδιο για μεγιστοποίηση της συγκέντρωσης της 2,3-βουτανοδιόλης, ο ρυθμός ανάδευσης μειώθηκε στις 200 rpm, ενώ καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης ο ρυθμός αερισμού παρέμεινε σταθερός στο 1 vvm. Τελικά, η συγκέντρωση της 2,3-βουτανοδιόλης έφθασε τα 95.5 g/L με συντελεστή απόδοσης 0.478 g/g και παραγωγικότητα 1.71 g/L/h.

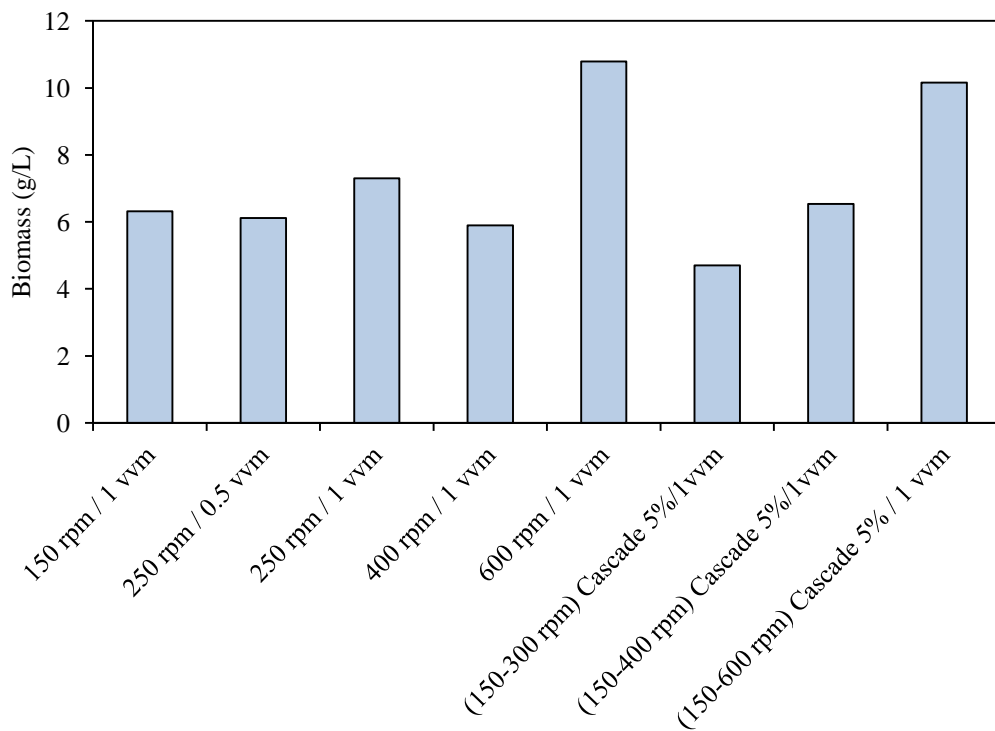
Πίνακας 3 Ημι-συνεχείς ζυμώσεις υπό διαφορετικές συνθήκες αερισμού και ανάδευσης

Rpm	Vvm	Mmax (h ⁻¹)	Xmax (g/L)	BDO & Acetoin (g/L)	Yield* (g/g)	Productivity* (g/L/h)	BDO (g/L)	Yield (g/g)	Productivity (g/L/h)	Main by-products (g/L)
150	1	0.24	6.3	76.1	0.43	0.82	76.1	0.43	0.82	SA: 6.8, LA:8.4,
250	0.5	0.32	6.1	101.9	0.35	0.85	101.9	0.35	0.85	SA: 16.3, LA:5.7
250	1	0.28	7.3	98.3	0.35	1.01	98.3	0.35	1.01	SA: 15.7, LA:9.6
400	1	0.45	5.9	93.2	0.36	1.3	76.0	0.29	1.06	SA: 4.6, Acet:17.2
600	1	0.33	10.8	35.5	0.25	0.74	24.0	0.17	0.50	Acet: 11.5
150-300	1	0.28	4.7	90.75	0.36	0.86	90.75	0.36	0.86	SA: 15.1
150-400	1	0.18	6.5	94.8	0.40	0.92	80.7	0.34	0.78	Acet: 14.1,
150-600	1	0.27	10.2	105.7	0.21	1.04	81.6	0.16	0.80	Acet: 24.1

* εκφρασμένο ως συνολικά παραγόμενη meso-BDO, 2R3R-BDO και ακετοΐνη



Σχήμα 10 Παραγωγή BDO ■ και ακετοΐνης για διαφορετικές συνθήκες ανάδευσης.



Σχήμα 11 Μέγιστη παραγωγή βιομάζας για τις διαφορετικές συνθήκες ανάδευσης.

3.2 Επίδραση θρεπτικού μέσου ζύμωσης

Η σύσταση του θρεπτικού μέσου παίζει εξίσου σημαντικό ρόλο στην παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης. Δεδομένου του γεγονότος ότι τα παραπάνω πειράματα διεξήχθησαν με σύνθετο θρεπτικό μέσο ζύμωσης, κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθούν διαφορετικής σύστασης θρεπτικά μέσα για την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης. Στον Πίνακα 4 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα κατά τις ασυνεχείς ζυμώσεις στα διαφορετικά θρεπτικά μέσα καλλιέργειας. Για τη ζύμωση που πραγματοποιήθηκε με χρήση του θρεπτικού μέσου σύστασης A (Πίνακας 1) με οργανική πηγή αζώτου εκχύλισμα ζύμης (2.5 g/L), η τελική συγκέντρωση βουτανοδιόλης έφθασε τα 15 g/L με συντελεστή απόδοσης 0.42 g/g και παραγωγικότητα 0.37 g/L/h., η συνολική συγκέντρωση παραπροϊόντων ήταν 3.3 g/L (με κύρια παραπροϊόντα το ηλεκτρικό οξύ 1.2 g/L και την αιθανόλη 1.2 g/L), ενώ παρατηρείται στο τέλος της ζύμωσης και αξιόλογη ποσότητα μη καταναλωθέντων σακχάρων (18 g/L). Κατά τη ζύμωση με το θρεπτικό μέσο σύστασης B, όπου η πηγή αζώτου ήταν εκχύλισμα ζύμης (2.5 g/L) και πεπτόνη (5 g/L), η τελική συγκέντρωση βουτανοδιόλης που παράχθηκε ήταν 23 g/L με συντελεστή απόδοσης 0.40 g/g και παραγωγικότητα 1.09 g/L/h. Εδώ παρατηρήθηκε μεγαλύτερη παραγωγή παραπροϊόντων τα οποία έφθασαν τα 6.9 g/L, ενώ στο τέλος της ζύμωσης είχαμε πλήρη κατανάλωση του υποστρώματος. Για το πείραμα που πραγματοποιήθηκε με το θρεπτικό μέσο C, με μεγαλύτερη συγκέντρωση εκχυλίσματος ζύμης (5 g/L) η συγκέντρωση βουτανοδιόλης έφθασε τα 23.2 g/L με συντελεστή απόδοσης 0.39 g/g και παραγωγικότητα 0.86 g/L/h. Η συγκέντρωση παραπροϊόντων ήταν 6.5 g/L με κύριο παραπροϊόν το ηλεκτρικό οξύ (3.4 g/L), ενώ η κατανάλωση σακχάρων ήταν σχεδόν πλήρης. Στο θρεπτικό μέσο D, στο οποίο έγινε χρήση ανόργανης πηγής αζώτου, η τελική συγκέντρωση 2,3-βουτανοδιόλης έφθασε τα 24.3 g/L με συντελεστή απόδοσης 0.42 g/g και παραγωγικότητα 1.01 g/L/h. Η τελική συγκέντρωση παραπροϊόντων έφθασε τα 3.8 g/L, ενώ στο τέλος της ζύμωσης δεν παρέμειναν ακατανάλωτα σάκχαρα. Για τη ζύμωση που πραγματοποιήθηκε με το θρεπτικό μέσο E, όπου έγινε συνδυασμός ανόργανου αζώτου με εκχύλισμα ζύμης (2.5 g/L), η τελική συγκέντρωση βουτανοδιόλης έφθασε τα 23.3 g/L με συντελεστή απόδοσης 0.40 g/g και παραγωγικότητα 0.95 g/L/h. Τέλος για το πείραμα όπου χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο F, ανόργανη πηγή αζώτου μαζί με οξικό νάτριο (5 g/L), η τελική συγκέντρωση βουτανοδιόλης ήταν αρκετά χαμηλή (12.3 g/L), με συντελεστή απόδοσης 0.38 g/g και αρκετά χαμηλή παραγωγικότητα (0.5 g/L/h). Παρατηρήθηκε σχηματισμός μικρής συγκέντρωσης παραπροϊόντων (2.9 g/L), ενώ μεγάλη ήταν η συγκέντρωση των σακχάρων που δεν καταναλώθηκαν μέχρι το τέλος της ζύμωσης (26.2 g/L).

Για όλα τα παραπάνω θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν η παραγωγή βιομάζας ήταν πανομοιότυπη (4.5 ± 0.5 g/L).

Πίνακας 4 Επίδραση της σύστασης του θρεπτικού μέσου στην παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης από τον *Enterobacter* sp. 1.

Media	Time (h)	DCW (g/L)	Final sugars (g/L)	BDO (g/L)	Yield (g/g)	Productivity (g/L/h)	By-products (g/L)
A	41	4.0	18.1	15.0	0.42	0.37	SA:1.2, EtOH:1.2
B	21	5.2	0.6	23.0	0.40	1.09	SA:3.7, EtOH:2.9
C	27	4.0	1.1	23.2	0.39	0.86	SA:3.4, EtOH:2.5
D	24	4.5	0.0	24.3	0.42	1.01	SA:1.3, EtOH: 2
E	25	4.3	0.2	23.3	0.40	0.95	SA:1.5, EtOH: 2.3
F	25	4.3	26.2	12.3	0.38	0.50	SA:0.6, EtOH: 1.2

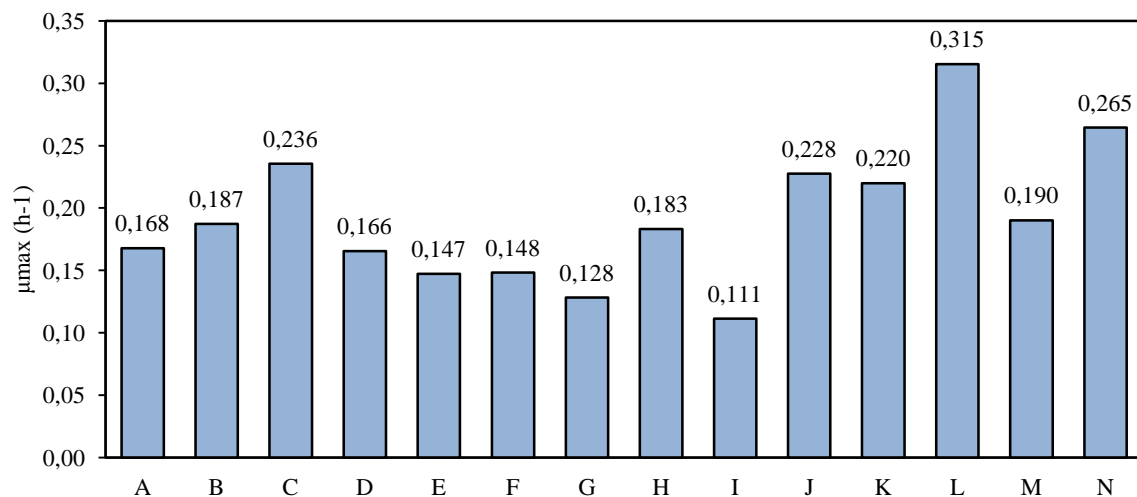
Τα αποτελέσματα όπως φαίνεται και παραπάνω, δείχνουν ότι ο *Enterobacter* sp. επηρεάστηκε από τη σύσταση του θρεπτικού μέσου όσον αφορά την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης και το σχηματισμό παραπροϊόντων (Πίνακας 3). Τα θρεπτικά μέσα A και F φαίνεται να έχουν αρνητικές επιπτώσεις όχι μόνο ως προς την παραγωγή βουτανοδιόλης, αλλά και ως προς το ποσοστό κατανάλωσης των σακχάρων (μετά από 24 ώρες περίπου 20 g/L σακχάρων παρέμειναν ακατανάλωτα). Συγκρίνοντας την πηγή οργανικού αζώτου (θρεπτικά μέσα B και C) με την ανόργανη πηγή αζώτου (θρεπτικό μέσο D) η τελική συγκέντρωση 2,3-βουτανοδιόλης ήταν παρόμοια (περίπου 24 g/L) σε όλες τις περιπτώσεις. Ωστόσο, υψηλή συγκέντρωση ηλεκτρικού οξέως παρατηρήθηκε όταν χρησιμοποιήθηκαν πηγές οργανικού αζώτου.

Σε σχετική μελέτη των Tian et al., 2016, σε κλειστή καλλιέργεια του μικροοργανισμού *Bacillus subtilis* SF4-3 με χρήση γλυκόζης ως πηγή άνθρακα παρατηρήθηκε ότι σημαντική ήταν η επίδραση της πηγής αζώτου στο θρεπτικό μέσο της ζύμωσης. Συγκεκριμένα αντικατάσταση της οργανικής πηγής αζώτου από ανόργανο άζωτο είχε θετική επίδραση στην παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης. Επιπλέον, σε μελέτη με το στέλεχος *Bacillus polymyxa* η παραγωγή και η απόδοση της 2,3-βουτανοδιόλης αυξήθηκε με την αντικατάσταση 1.5 % εκχύλισματος ζύμης με 0.5 % εκχύλισμα ζύμης μαζί με φωσφορικά άλατα, Mn^{2+} και Fe^{2+}

(Garg and Jain, 1995; Laube et al., 1984b). Σε μελέτες βελτιστοποίησης του θρεπτικού έχει αποδειχθεί ότι οι σημαντικότεροι παράγοντες για την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης είναι η συγκέντρωση των φωσφορικών αλάτων υπό τη μορφή $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ καθώς και των Fe^{2+} και Mg^{2+} , ωστόσο η βέλτιστη σύσταση εξαρτάται από τον μικροοργανισμό.

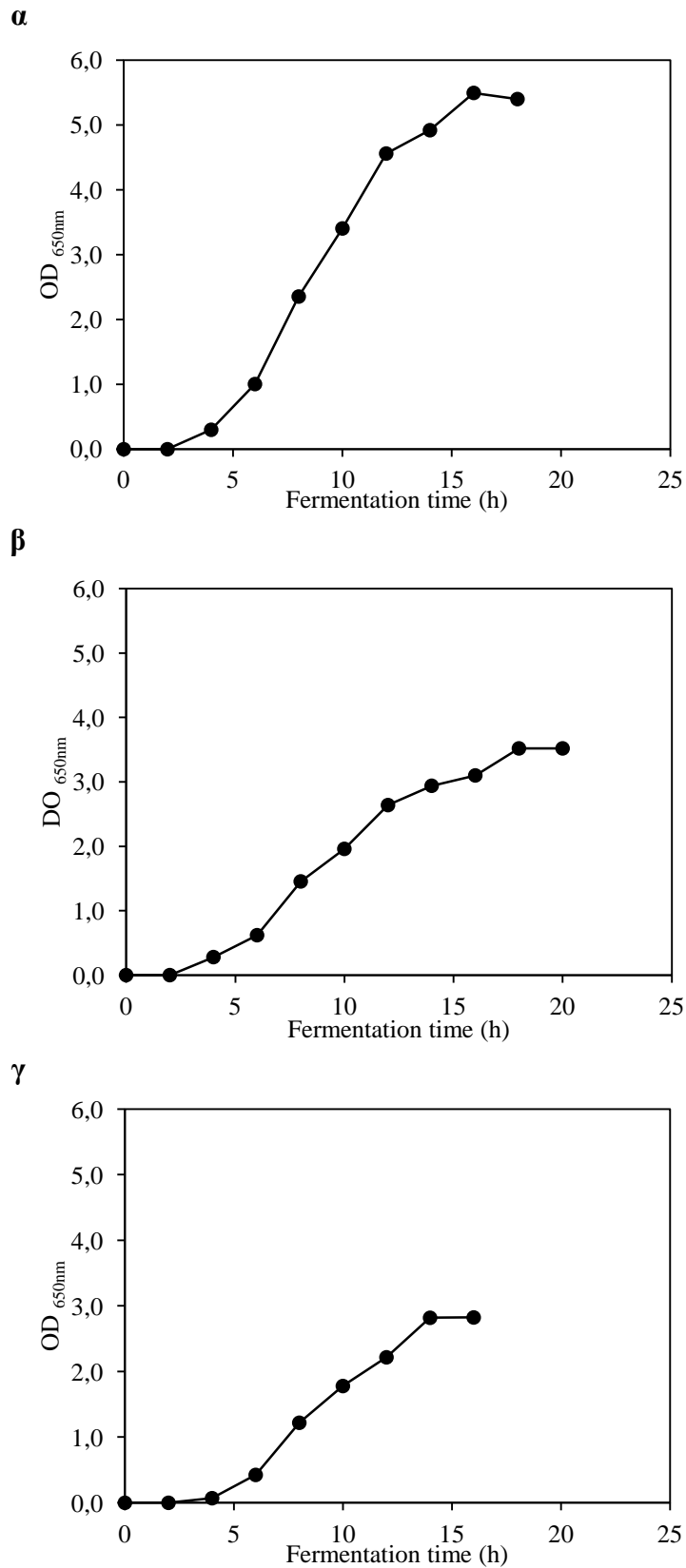
3.3 Μελέτη της σύστασης του υγρού εμβολίου

Για τη βελτιστοποίηση της διεργασίας και με βάση τα προηγούμενα αποτελέσματα κρίθηκε σκόπιμη η μελέτη του εμβολίου. Αρχικά, διαφορετικής σύστασης θρεπτικά μέσα μελετήθηκαν σε μικροκαλλιέργειες με τη χρήση ειδικού μηχανισμού (Microplate Reader) κατά τα οποία μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. Στη συνέχεια, υπολογίστηκε για κάθε περίπτωση ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης τα αποτελέσματα των οποίων παρουσιάζονται στο Σχήμα 11.



Σχήμα 11 Μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης για τις διαφορετικής σύστασης προκαλλιέργειες

Όπως παρατηρείται από το Σχήμα 11, ο μεγαλύτερος ειδικός ρυθμός αύξησης στα θρεπτικά μέσα με οργανική πηγή αζώτου (A-G) αντιστοιχεί σε 0.236 h^{-1} κατά την καλλιέργεια του *Enterobacter* sp. στο θρεπτικό μέσο C. Ενώ, για τα θρεπτικά μέσα με συνδιασμό ή μη οργανικής και ανόργανης πηγής αζώτου (H-N) υψηλούς ειδικούς ρυθμούς αύξησης παρατηρήθηκαν κατά την καλλιέργεια στο θρεπτικό μέσο J (0.228 h^{-1}) όπου δεν περιέχει οργανική πηγή άνθρακα καθώς και στα L και N όπου έχει γίνει συνδιασμός ανόργανης και οργανικής πηγής αζώτου (2.5 και 5 g/L εκχύλισμα ζύμης αντίστοιχα). Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα επιλέχθηκαν τα θρεπτικά μέσα C, J και L για περαιτέρω μελέτη σε κωνικές φιάλες. Η κινητική της αύξησης για κάθε μια περίπτωση παρουσιάζεται στα Σχήματα 12α, 12β και 12γ.



Σχήμα 12 Κινητική ανάπτυξης υγρού εμβολίου κατά την καλλιέργεια στα θρεπτικά μέσα C (α), J (β) και L (γ).

Η τιμή μέγιστου ειδικού ρυθμού αύξησης καθώς και οι μέγιστες οπτικές πυκνότητες παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5 Επίδραση της σύστασης του υγρού εμβολίου στο μέγιστο ειδικό ρυθμό αύξησης και την οπτική πυκνότητα στις καλλιέργειες του *Enterobacter* sp.

Σύσταση Προκαλλιέργειας*	Χρόνος Εκθετικής Αύξησης (h)	μ_{\max} (h^{-1})	OD_{\max}
C	5-10	0.257	5.50
J	6-15	0.206	3.52
L	6-14	0.357	2.83

* Θρεπτικό μέσο C οργανική πηγή αζώτου, θρεπτικό μέσο J ανόργανη πηγή αζώτου, θρεπτικό μέσο L συνδιασμός ανόργανης και οργανικής πηγής αζώτου

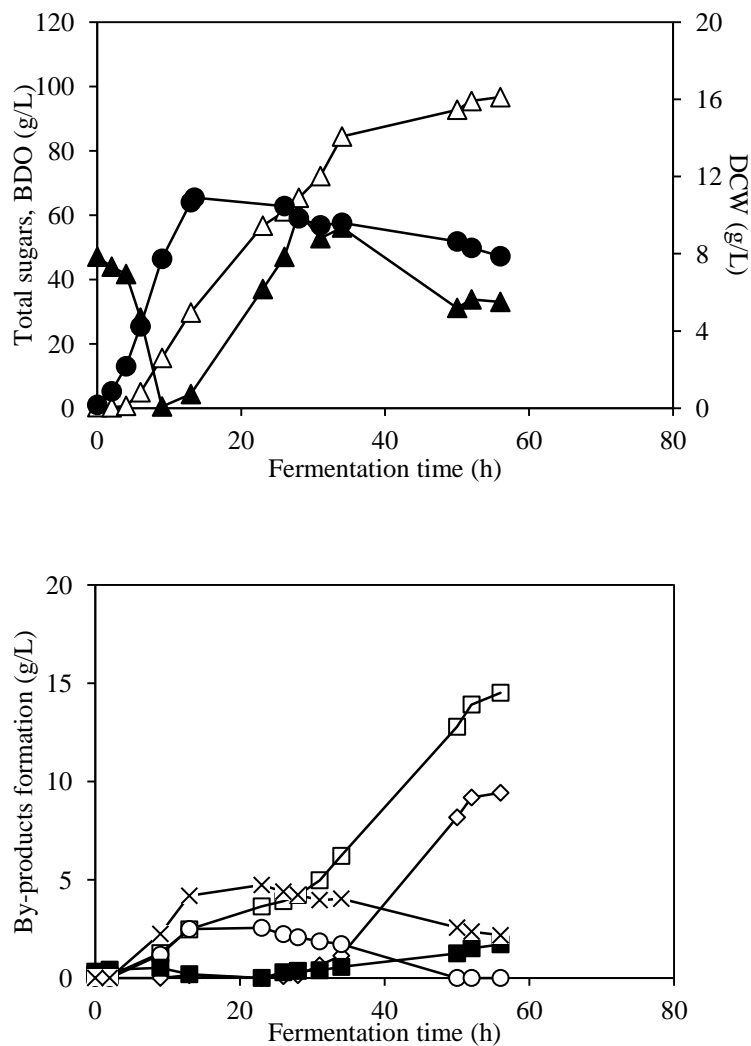
Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι η ανάπτυξη του μικροοργανισμού είναι πιο γρήγορη για το θρεπτικό μέσο όπου έγινε χρήση αποκλειστικά οργανικής πηγής αζώτου, καθώς ο χρόνος της εκθετικής αύξησης επιτυγχάνεται μεταξύ 5-10 ωρών. Επιπλέον, οι τιμές οπτικής πυκνότητας στην περίπτωση τόσο του ανόργανου αζώτου όσο και του συνδιασμού ανόργανου και οργανικού αζωτού ήταν αρκετά χαμηλότερες σε σχέση με εκείνες που παρατηρήθηκαν όταν έγινε χρήση οργανικής πηγής αζώτου. Συμπερασματικά, φαίνεται πως στην περίπτωση της προκαλλιέργειας η αντικατάσταση της οργανικής πηγής αζώτου από άλλη πηγή (π.χ ανόργανο άζωτο), έχει αρνητική επίδραση στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού καθώς καθυστερεί την ανάπτυξη τ

3.4 Ημι-συνεχής ζύμωση προς παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης στις βέλτιστες συνθήκες αερισμού με χρήση ανόργανης πηγής αζώτου

Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα από την επίδραση του αερισμού καθώς και από τα διαφορετικά θρεπτικά μέσα κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί η επίδραση της ανόργανης πηγής αζώτου στις βέλτιστες συνθήκες αερισμού. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε μία ημι-συνεχής ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα σε εύρος ανάδευσης 150-400 rpm και ρυθμό αερισμού 1 vvm, ενώ ως θρεπτικό μέσο της ζύμωσης χρησιμοποιήθηκε το μέσο με τη D σύσταση.

Τα αποτελέσματα της ημι-συνεχούς ζύμωσης για τις παραπάνω συνθήκες φαίνονται στο Σχήμα 9. Στις 34 ώρες η συγκέντρωση της 2,3-βουτανοδιόλης έφτασε τα 84.4 g/L, με συντελεστή απόδοσης 0.45 g/g και παραγωγικότητα 2.48 g/L/h. Μετά τις 34 ώρες παρατηρήθηκε μειούμενος ρυθμός παραγωγής της 2,3-βουτανοδιόλης με ταυτόχρονη αύξηση της παραγωγής παραπροϊόντων (ηλεκτρικό και γαλακτικό οξύ). Συγκεκριμένα, η συγκέντρωση του ηλεκτρικού οξέος έφτασε τα 14.5 g/L ενώ το γαλακτικό οξύ 9.4 g/L.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα αυτού του πειράματος με το αντίστοιχο πείραμα στο οποίο έγινε χρήση οργανικής πηγής αζώτου (Σχήμα 7), παρατηρούμε ότι στην περίπτωση της ανόργανης πηγής αζώτου στο μέσο της καλλιέργειας η τελική συγκέντρωση βουτανοδιόλης, ο συντελεστής απόδοσης καθώς και η παραγωγικότητα (84.4 g/L, 0.45g/g, 2.48 g/L/h αντίστοιχα) φαίνεται να αυξήθηκαν σημαντικά σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές οι οποίες παρατηρήθηκαν όταν έγινε χρήση οργανικής πηγής αζώτου (80.7 g/L, 0.34 g/g, 0.78g/L/h αντίστοιχα). Στην περίπτωση της ανόργανης πηγής αζώτου δεν παρατηρήθηκε παραγωγή ακετοΐνης σε αντίθεση με το οργανικό άζωτο όπου η ακετοΐνη έφθασε τα 14.1 g/L, ενώ στην περίπτωση της ανόργανης πηγής αζώτου τα κύρια παραπροϊόντα της ζύμωσης ήταν το ηλεκτρικό οξύ (6.2 g/L) καθώς και γαλακτικό οξύ (1.1 g/L).



Σχήμα 9 BDO (Δ), DCW (●), οξικό οξύ (■), ηλεκτρικό οξύ (□), γαλακτικό οξύ (◇), μυρμηκικό οξύ (ο) και αιθανόλη (×) παραγωγή καθώς επίσης και κατανάλωση σακχάρων (▲) κατά τη διάρκεια ημι-συνεχούς ζύμωσης με χρήση ακατέργαστης σακχαρόζης και ανόργανη πηγή αζώτου, 1 vvm αερισμό, ρυθμό ανάδευσης 150-400 rpm

4 Συμπεράσματα

Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον της βιομηχανίας έχει στραφεί προς την παραγωγή χημικών μέσω βιοχημικών διεργασιών, με τη χρήση διαφόρων μικροοργανισμών (βακτήρια, ζύμες, μύκητες). Για τις μικροβιακές ζυμώσεις χρησιμοποιούνται υποστρώματα τα οποία προέρχονται κυρίως από απόβλητα της βιομηχανίας τροφίμων. Η αξιοποίηση αυτή των αποβλήτων οδηγεί στη μείωση του κόστους της παραγωγικής διαδικασίας έναντι των

κλασικών χημικών μεθόδων που εφαρμόζονται στην πετροχημική βιομηχανία, ενώ ταυτόχρονα συμβάλει σημαντικά στη μείωση της ρύπανσης του περιβάλλοντος.

Η 2,3-βουτανοδιόλη είναι μία χημική ένωση υψηλής προστιθέμενης αξίας, η οποία παράγεται σε μεγάλες ποσότητες ετησίως και βρίσκει μεγάλη πληθώρα εφαρμογών στη βιομηχανία τροφίμων, καυσίμων, φαρμακευτικών και καλλυντικών σκευασμάτων. Μπορεί να παραχθεί μέσω μικροβιακών ζυμώσεων με τη χρήση διαφόρων μικροοργανισμών και κυρίως βακτηρίων και διαφόρων υποστρωμάτων (λιγνοκυτταρινούχα και μη-κυτταρινούχα) ως πηγή άνθρακα. Το κυριότερο υπόστρωμα που έχει χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης είναι η γλυκόζη, ενώ μελέτες έχουν γίνει και με χρήση παραπροϊόντων και αποβλήτων της βιομηχανίας τροφίμων τα οποία είναι πλούσια σε σάκχαρα (π.χ. μελάσα, υδρόλυμα αμύλου, ορός γάλακτος, κλπ). Η παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης μέσω βιοτεχνολογικών οδών, επηρεάζεται από πληθώρα παραγόντων όπως ο αερισμός, η ανάδευση, η θερμοκρασία, το pH, η σύσταση του θρεπτικού μέσου, κ.α.

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η επίδραση του αερισμού στην βιοτεχνολογική παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης μέσω ζυμώσεων με χρήση του βακτηριακού στελέχους *Enterobacter sp. 1*. Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων φαίνεται ότι τόσο ο αερισμός όσο και η ανάδευση παίζουν σημαντικό ρόλο στην παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης. Για αυξημένες τιμές της ταχύτητας ανάδευσης παρατηρήθηκε αύξηση της παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης και μείωση της συγκέντρωσης των οργανικών οξέων. Ωστόσο, για υψηλές τιμές ταχύτητας ανάδευσης παρατηρήθηκε παραγωγή ακετοΐνης και σχηματισμός βιομάζας, η οποία έφθασε τα 10.8 g/L (στις 600 rpm), εις βάρος της βουτανοδιόλης. Η μέγιστη συγκέντρωση 2,3-βουτανοδιόλης ήταν 101.9 g/L, με συντελεστή απόδοσης 0.35 g/g και παραγωγικότητα 0.85 g/L/h, για ταχύτητα ανάδευσης 250 rpm και ρυθμό αερισμού 0.5 vvm, ενώ για τη σειρά πειραμάτων όπου έγινε αυτόματη ρύθμιση της ταχύτητα ανάδευσης η συγκέντρωση 2,3-βουτανοδιόλης έφθασε τα 90.75 g/L, με συντελεστή απόδοσης 0.36 g/g και παραγωγικότητα 0.86 g/L/h. Για περαιτέρω βελτιστοποίηση της διεργασίας μελετήθηκε η σύσταση του θρεπτικού μέσου και του εμβολίου. Παρατηρήθηκε ότι θετική ήταν η επίδραση της αντικατάστασης της οργανικής πηγής αζώτου από ανόργανο άζωτο στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας, στην παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης. Τα αποτελέσματα συμφωνούν με αντίστοιχες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί (Tian et al., 2016) και είναι ελπιδοφόρα καθώς με αυτό τον τρόπο μειώνεται σημαντικά το κόστος της παραγωγικής διαδικασίας. Ωστόσο, στην περίπτωση του εμβολίου παρατηρήθηκε ότι αντικατάσταση της οργανικής πηγής αζώτου από ανόργανο άζωτο είχε αρνητική επίδραση στην ανάπτυξη του

μικροοργανισμού. Οι μικρές τιμές του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης καθώς και της οπτικής πυκνότητας, δείχνουν ότι με χρήση ανόργανου αζώτου η ανάπτυξη του βακτηριακού στελέχους καθυστερεί σε αντίθεση με το οργανικό άζωτο. Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω πραγματοποιήθηκε μία ημι-συνεχής ζύμωση στις βέλτιστες συνθήκες αερισμού και ανάδευσης με χρήση ανόργανης πηγής αζώτου και τα αποτελέσματα ήταν πολύ ικανοποιητικά. Η συγκέντρωση της 2,3-βουτανοδιόλης έφθασε τα 84.4 g/L, με συντελεστή απόδοσης 0.45 g/g και παραγωγικότητα 2.48 g/L/h, παρατηρήθηκε παραγωγή οργανικών οξέων (κυρίως ηλεκτρικού οξέος, 6.2 g/L), ενώ σημαντικό είναι το γεγονός ότι δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός ακετοΐνης σε αντίθεση με το οργανικό άζωτο.

Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, η βιοτεχνολογική παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη χρήση διαφόρων βακτηριακών κυρίως στελεχών καθώς και διαφορετικών υποστρωμάτων. Στον Πίνακα 6 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα διαφόρων μελετών για την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης μέσω μικροβιακών ζυμώσεων.

Όπως παρατηρείται, η σύνθεση της 2,3-βουτανοδιόλης εξαρτάται όχι μόνο από το μικροοργανισμό αλλά και από το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται ως πηγή άνθρακα στο θρεπτικό μέσο της ζύμωσης. Επιπλέον μεγάλη φαίνεται να είναι και η επίδραση του αερισμού και της ανάδευσης, καθώς φαίνεται πως επηρεάζουν σημαντικά την παραγωγή της βουτανοδιόλης αλλά και των υπόλοιπων μεταβολικών προϊόντων. Οι περισσότερες μελέτες έχουν γίνει με χρήση γλυκόζης ως πηγή άνθρακα και οι συγκεντρώσεις βουτανοδιόλης φαίνεται να είναι αρκετά ικανοποιητικές. Συγκεκριμένα ο μικροοργανισμός *Klebsiella pneumoniae* παράγαγε 150 g/L 2,3-βουτανοδιόλης (Ma et al., 2009; Qin et al., 2006), ενώ αρκετά υψηλή ήταν και η συγκέντρωση της βουτανοδιόλης για την περίπτωση του στελέχους *Bacillus licheniformis*, η οποία έφθασε τα 144 g/L (Jurchescu et al., 2013). Γενικά φαίνεται πως η συγκέντρωση της 2,3-βουτανοδιόλης επηρεάζεται σημαντικά από τον μικροοργανισμό που χρησιμοποιείται κάθε φορά. Ωστόσο, εκτός από την παραγωγή της βουτανοδιόλης ενδιαφέρον παρουσιάζουν και οι παραγωγικότητες που επιτυγχάνονται σε κάθε περίπτωση. Σε ημι-συνεχή καλλιέργεια του *Enterobacter cloacae* η παραγωγικότητα έφθασε τα 3.3 g/L/h (Wang et al., 2012), ενώ σε ημι-συνεχείς καλλιέργειες του μικροοργανισμού *Klebsiella pneumoniae* η παραγωγικότητα έφθασε τα 4.21 g/L/h (Ma et al., 2009; Qin et al., 2006). Ο μέγιστος συντελεστής απόδοσης έφθασε τα 0.49 g/g και η μέγιστη παραγωγικότητα τα 5.4 g/L/h, για ημι-συνεχείς καλλιέργειες με ανακύκλωση κυττάρων του στελέχους *Enterobacter aerogenes* (Zeng et al., 1991), ενώ πολύ καλές τιμές συντελεστή απόδοσης (0.478 g/g) παρατηρήθηκαν και στην περίπτωση του μικροοργανισμού *Klebsiella oxytoca*, κατά την

ανάπτυξη του σε υπόστρωμα γλυκόζης (Ji et al., 2009). Από τα αποτελέσματα φαίνεται πως οι συνθήκες αερισμού και ανάδευσης είναι πολύ σημαντικές τόσο για την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης όσο και για την παραγωγή παραπροϊόντων. Σε μελέτη των Ji et al., 2009, για ημι-συνεχής καλλιέργειες του *Klebsiella oxytoca*, σε ταχύτητα ανάδευσης στις 200 rpm παρατηρήθηκε παραγωγή βουτανοδιόλης η οποία έφθασε τα 95.5 g/L αλλά και ακετοΐνης, η οποία ωστόσο δεν ξεπέρασε τα 1.9 g/L. Για ταχύτητα ανάδευσης 500 rpm (Ma et al., 2009; Qin et al., 2006) σε ημισυνεχείς καλλιέργειες του στελέχους *Klebsiella pneumoniae*, παρατηρήθηκαν μεγαλύτερη συγκέντρωση 2,3-βουτανοδιόλης (150 g/L), αυξήθηκε όμως και η συγκέντρωση της ακετοΐνης (10 g/L).

Πίνακας 6 Παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης με χρήση διαφορετικών μικροοργανισμών και υποστρωμάτων

Μικροοργανισμός	Υπόστρωμα	Τύπος Ζύμωσης	BDO (g/L)	Ακετοΐνη (g/L)	Συντελεστής απόδοσης (g/g)	Παραγωγικότητα (g/L/h)	Ανάδευση (rpm)	Αερισμός (vvm)	Αναφορά
			101.9	-	0.35	0.85	250	0.5	
			76	17.2	0.29	1.06	400	1	
<i>Enterobacter</i> sp. 1	Σακχαρόζη	Ημι-συνεχής	90.75	-	0.36	0.86	150-300	1	Παρούσα μελέτη
			84.4	-	0.45	2.48	150-400	1	
	Γλυκόζη	Ημι-συνεχής	150	10	-	4.21	500	1.5	Ma et al., 2009
	Γλυκερόλη	Ημι-συνεχής	49.2	-	0.356	-	200	0.44	Petrov and Petrova, 2009
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Ξυλόζη+	Ημι-συνεχής	88	113	0.212	-	-	-	Celińska and Grajek, 2009
	Γλυκόζη								
	Αγκινάρα της Ιερουσαλήμ	Ημι-συνεχής SSF	84	7.6	0.294	2.1	300	-	Sun et al., 2009
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Γλυκόζη	Ημι-συνεχής με ανακύκλωση κυττάρων	110	-	0.49	5.4	-	-	Zeng et al., 1990
<i>Enterobacter cloacae</i>	Cassava	Ημι-συνεχής	78	-	0.42	3.3	500	1	Wang et al., 2012
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Γλυκόζη	Ημι-συνεχής	95.5	1.9	0.478	1.71	200	-	Ji et al., 2009

<i>Serratia marcescens</i>	Σακχαρόζη	Κλειστή	152	-	0.41	2.67	500- 600	-	Cheng et al., 2010
<i>Bacillus licheniformis</i>	Γλυκόζη	Ημι-συνεχής	144	-	0.4	1.14	100	-	Jurchescu et al., 2013
	Καλαμπόκι	Ημι-συνεχής	74	-	-	2.1	400	1	Wang et al., 2010
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	Γλυκόζη	Ημι-συνεχής	50	-	-	0.8	200	0.5	Nakashimada et al., 2000
<i>Enterobacter cloacae</i> mutant	Γλυκόζη - Ξυλόζη	Ημι-συνεχής	152	-	-	3.5	500	1	Li et al., 2015

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης φαίνεται να είναι αρκετά ικανοποιητικά σε σχέση με αντίστοιχα αποτελέσματα μελετών της διεθνούς βιβλιογραφίας. Αφού μελετήθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες αερισμού, αντικαταστάθηκε στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας το οργανικό άζωτο με ανόργανο, γεγονός που φαίνεται να έχει διπλό όφελος. Εκτός από τη βελτιστοποίηση της παραγωγικής διαδικασίας όπου αυξήθηκε ο συντελεστής απόδοσης (0.45 g/g) αλλά και η παραγωγικότητα (2.48 g/L/h), η αντικατάσταση της οργανικής πηγής αζώτου από ανόργανο άζωτο μπορεί να μειώσει σημαντικά το κόστος της διεργασίας.

Συμπερασματικά, η βιοτεχνολογική παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης φαίνεται να επηρεάζεται από μια πληθώρα παραγόντων (π.χ. μικροοργανισμός, υπόστρωμα, συνθήκες αερισμού, κλπ). Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που επηρεάζει την παραγωγή της βουτανοδιόλης είναι ο αερισμός και η ανάδευση, που μελετήθηκαν εδώ. Η αύξηση του αερισμού είχε ως συνέπεια την αύξηση της συγκέντρωσης της 2,3-βουτανοδιόλης, τη βελτίωση της τιμής του συντελεστή απόδοσης και της παραγωγικότητας, καθώς και τη μείωση της συγκέντρωσης των οργανικών οξέων. Ωστόσο, υψηλές τιμές αερισμού οδηγούν σε αυξημένες τιμές ακετοΐνης και βιομαζας εις βάρος της 2,3-βουτανοδιόλης. Η βελτιστοποίηση της διεργασίας απαιτεί περαιτέρω μελέτη προκειμένου να βελτιωθεί η παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης χρησιμοποιώντας χαμηλού κόστους θρεπτικά μέσα και αξιοποιώντας υποπροϊόντα της βιομηχανίας τροφίμων.

Βιβλιογραφία

- Afschar A.S., C.E. Vaz Rosseli, R. Jonas, A.Q.C. 'and K.S., 1993. Microbial production and downstream processing Methyl-Ethyl I Polyurethane solvent I Isomers of I octane. J. Biotechnol. 27, 317–329.
- Afschar, A.S., Bellgardt, K.H., Rossell, C.E.V., Czok, A., Schaller, K., 1991a. The production of 2 , 3-butanediol by fermentation of high test molasses. Appl. Microbiol. Biotechnol. 582–585.
- Alam, S., Capit, F., Weigandg, W.A., Hongq, J., 1990. Kinetics of 2 , 3-Butanediol Fermentation by *Bacillus amyloliquejizciens* : Effect of Initial Substrate Concentration and Aeration 71–84.
- Bartowsky, E.J., Henschke, P.A., 2004. The “ buttery ” attribute of wine diacetyl desirability , spoilage and beyond. Int. J. Food Microbiol. 96, 235–252.
- Biebl, H., Menzel, K., Zeng, a.-P., Deckwer, W.-D., 1999. Microbial production of 1,3-propanediol. Appl. Microbiol. Biotechnol. 52, 289–297.
- Celińska, E., Grajek, W., 2009. Biotechnological production of 2,3-butanediol-Current state and prospects. Biotechnol. Adv. 27, 715–725.
- Cheng, K.K., Liu, Q., Zhang, J.A., Li, J.P., Xu, J.M., Wang, G.H., 2010. Improved 2,3-butanediol production from corncob acid hydrolysate by fed-batch fermentation using *Klebsiella oxytoca*. Process Biochem. 45, 613–616.
- Cho, S.M., Kang, B.R., Han, S.H., Anderson, A.J., Park, J., Lee, Y., Cho, B.H., Yang, K., Ryu, C., Kim, Y.C., 2008. 2R , 3R-Butanediol , a bacterial volatile produced by *Pseudomonas chlororaphis* O6 , Is Involved in Induction of Systemic Tolerance to Drought in *Arabidopsis thaliana* 21, 1067–1075.
- Converti, A., Perego, P., Del Borghi, M., 2003. Effect of specific oxygen uptake rate on *Enterobacter aerogenes* energetics: Carbon and reduction degree balances in batch cultivations. Biotechnol. Bioeng. 82, 370–377.
- Garg, S.K and Jain, A., 1995. Fermentative production of 2, 3-butanediol: a review. Bioresour. Technol. 51, 103–109.
- Garg, S.K., Jain, A., 1995. Fermentative production of 2.3-butanediol: A review. Bioresour. Technol. 51, 103–109.

- Häßler, T., Schieder, D., Pfaller, R., Faulstich, M., Sieber, V., 2012. Enhanced fed-batch fermentation of 2,3-butanediol by *Paenibacillus polymyxa* DSM 365. *Bioresour. Technol.* 124, 237–44.
- Hespell, R.B., 1996. Fermentation of Xylan, Corn Fiber, or Sugars to Acetoin and Butanediol by *Bacillus polymyxa* Strains. *Curr. Microbiol.* 32, 291–296.
- Jansen, N., Flickinger, M.C., Tsao, G.T., 1984. Production of 2,3-Butanediol from D-Xylose by XXVI, 362–369.
- Ji, X.-J., Huang, H., Du, J., Zhu, J.-G., Ren, L.-J., Hu, N., Li, S., 2009. Enhanced 2,3-butanediol production by *Klebsiella oxytoca* using a two-stage agitation speed control strategy. *Bioresour. Technol.* 100, 3410–4.
- Ji, X.-J., Huang, H., Ouyang, P.-K., 2011. Microbial 2,3-butanediol production: a state-of-the-art review. *Biotechnol. Adv.* 29, 351–64.
- Jurchescu, I., Hamann, J., Zhou, X., 2013. Enhanced 2, 3-butanediol production in fed-batch cultures of free and immobilized *Bacillus licheniformis* DSM 8785. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 6715–6723.
- Li, L., Li, K., Wang, Y., Chen, C., Xu, Y., Zhang, L., Han, B., Gao, C., Tao, F., Ma, C., Xu, P., 2015. Metabolic engineering of *Enterobacter cloacae* for high-yield production of enantiopure (2R, 3R)-2, 3-butanediol from lignocellulose-derived sugars. *Metab. Eng.* 28, 19–27.
- Ma, C., Wang, A., Qin, J., Li, L., Ai, X., Jiang, T., Tang, H., Xu, P., 2009. Enhanced 2,3-butanediol production by *Klebsiella pneumoniae* SDM. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82, 49–57.
- Mallonee, D. and S.R., 1988. Development of a Mutant Strain of *Bacillus polymyxa* showing Enhanced Production of 2, 3-Butanediol. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 168–171.
- Mccall, K.B., Georgi, C.E., 1954. The Production of 2, 3-Butanediol by Fermentation of sugar beet molasses1 355–359.
- Mickelson M. and Werkman H., 1938. Influence of pH on the dissimilation of glucose by *Aerobacter indologenes*.
- Nakashimada, Y., Mabwoto, B., Kashiwamuba, T., Kakizono, T., Nishio, N., 2000. *Paenibacillus polymyxa*. *J. Biosci. Bioeng.* 90, 661–664.

- Nilegaonkar, S., Bhosale, S.B., Kshirsagar, D.C., Kapadi, A.H., 1992. Production of 2,3-butanediol from glucose by. *Microbiol. Biotechnol.* 8, 378–381.
- Perego, P., Converti, a., Del Borghi, a., Canepa, P., 2000. 2,3-Butanediol production by *Enterobacter aerogenes*: selection of the optimal conditions and application to food industry residues. *Bioprocess Eng.* 23, 613–620.
- Perego, P., Converti, A., Borghi, M. Del, 2003. Effects of temperature , inoculum size and starch hydrolyzate concentration on butanediol production by *Bacillus licheniformis*. *Bioresour. Technol.* 89, 125–131.
- Petrov, K., Petrova, P., 2009. High production of 2,3-butanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* G31. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84, 659–65.
- Pinzi, S., Mata-Granados, J.M., Lopez-Gimenez, F.J., Luque de Castro, M.D., Dorado, M.P., 2011. Influence of vegetable oils fatty-acid composition on biodiesel optimization. *Bioresour. Technol.* 102, 1059–65.
- Reimann, a., Biebl, H., Deckwer, W.-D., 1998. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* in continuous culture with cell recycling. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49, 359–363.
- Saha B.C and Bothast R.J, 1999. Production of 2,3-butanediol by newly isolated *Enterobacter cloacae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1, 321–326.
- Saha, B.C., 2003. Hemicellulose bioconversion. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 279–291.
- Soltys, K.A., Batta, A.K., Ph, D., Koneru, B., 2001. Successful nonfreezing , subzero preservation of Rat Liver with 2 , 3-Butanediol and type I antifreeze protein. *J. Surg. Res.* 34, 30–34.
- Sun, L.-H., Wang, X.-D., Dai, J.-Y., Xiu, Z.-L., 2009. Microbial production of 2,3-butanediol from Jerusalem artichoke tubers by *Klebsiella pneumoniae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82, 847–52.
- Syu, M.-J., 2001. Biological production of 2,3-butanediol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55, 10–18.
- Tian, Y., Fan, Y., Liu, J., Zhao, X., Chen, W., 2016. Effect of nitrogen , carbon sources and agitation speed on acetoin production of *Bacillus subtilis* SF4-3. *EJBT* 19, 41–49.
- V.M. Laube, D.G. and S.M.M., 1984a. 2,3-butanediol production from xylose and other

- hemicellulosic componets by *Bacillus polymyxa*. *Biotechnol. Lett.* 6, 257–262.
- V.M. Laube, D.G. and S.M.M., 1984b. The effect of yeast extract on the fermentation of glucose to 2,3-butanediol by *Bacillus polymyxa*. *Biotechnol. Lett.* 6, 535–540.
- Wang, A., Wang, Y., Jiang, T., Li, L., Ma, C., Xu, P., 2010. Production of 2,3-butanediol from corncob molasses, a waste by-product in xylitol production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 965–70.
- Wang, A., Xu, Y., Ma, C., Gao, C., Li, L., Wang, Y., Tao, F., Xu, P., 2012. Efficient 2, 3-Butanediol Production from Cassava Powder by a Crop-Biomass-Utilizer, *Enterobacter cloacae* subsp. *dissolvens* SDM. *PLoS One* 7, 1–8.
- Xiu, Z.-L., Zeng, A.-P., 2008. Present state and perspective of downstream processing of biologically produced 1,3-propanediol and 2,3-butanediol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78, 917–26.
- Yang, T., Rao, Z., Zhang, X., Xu, M., Xu, Z., Yang, S.T., 2015. Enhanced 2,3-butanediol production from biodiesel - derived glycerol by engineering of cofactor regeneration and manipulating carbon flux in *Bacillus amyloliquefaciens*. *Microb. Cell Fact.* 1–11.
- Ye Q, Bao Jie, Z.J., n.d. *Bioreactor Engineering Research and Applications I*.
- Zeng, A., Biebl, H., Deckwer, W., 1990. 2,3-Butanediol production by 264–268.
- Zeng, A., Byun, T., Posten, C., Deckwer, W., 1994. Use of Respiratory Quotient as a Control Parameter for Optimum Oxygen Supply Production under Microaerobic Conditions. *Biotechnol. Bioeng.*
- Zhang, L., Yang, Y., Sun, J., Shen, Y., Wei, D., Zhu, J., Chu, J., 2010. Microbial production of 2,3-butanediol by a mutagenized strain of *Serratia marcescens* H30. *Bioresour. Technol.* 101, 1961–7.