

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου

Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

ΠΜΣ: Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του Ανθρώπου



Μεταπτυχιακή διατριβή

*«Μελέτη της βιοτεχνολογικής παραγωγής της
2,3-βουτανοδιόλης με χρήση ακατέργαστης ζάχαρης που παράγεται
από βιομηχανία επεξεργασίας ζαχαροκάλαμου»*

ΕΛΕΝΗ Α. ΣΤΥΛΙΑΝΟΥ

Επιβλέπων καθηγητής:

Κουτίνας Απόστολος, Επίκουρος Καθηγητής

Αθήνα, Ιούνιος 2017

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου

Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

ΠΜΣ: Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του Ανθρώπου

Μεταπτυχιακή διατριβή

*«Μελέτη της βιοτεχνολογικής παραγωγής της
2,3-βουτανοδιόλης με χρήση ακατέργαστης ζάχαρης που παράγεται
από βιομηχανία επεξεργασίας ζαχαροκάλαμου»*

ΕΛΕΝΗ Α. ΣΤΥΛΙΑΝΟΥ

Επιβλέπων καθηγητής:

Κουτίνας Απόστολος, Επίκουρος Καθηγητής

Αθήνα, Ιούνιος 2017

Μεταπτυχιακή Διατριβή

«Μελέτη της βιοτεχνολογικής παραγωγής της 2,3-βουτανοδιόλης με χρήση ακατέργαστης ζάχαρης που παράγεται από βιομηχανία επεξεργασίας ζαχαροκάλαμου»

ΕΛΕΝΗ Α. ΣΤΥΛΙΑΝΟΥ

Επιβλέπων καθηγητής:

Κουτίνας Απόστολος, Επίκουρος Καθηγητής

Εξεταστική επιτροπή:

Κουτίνας Απόστολος, Επίκουρος Καθηγητής
Παπανικολάου Σεραφείμ, Αναπληρωτής Καθηγητής
Κούκος Ιωάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου».

Φτάνοντας στο τέλος των μεταπτυχιακών μου σπουδών, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στο κ. Κουτίνα Απόστολο για την ανάθεση της συγκεκριμένης μεταπτυχιακής μελέτης, για την καθοδήγηση και συνεργασία, καθώς και για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου καθ' όλη την διάρκεια της μελέτης.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τους κ. Παπανικολάου Σεραφείμ και κ. Κούκο Ιωάννη για την πολύτιμη βοήθεια τους κατά την διάρκεια του μεταπτυχιακού μου, καθώς και για τη συμμετοχή τους στην τριμελή εξεταστική επιτροπή.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Σοφία Μάινα για το ενδιαφέρον που μου έδειξε και την ουσιαστική βοήθεια που μου προσέφερε στα εργαστήρια, αλλά και τις πολύτιμες συμβουλές της που ήταν καθοριστικές για την εκπόνηση της συγκεκριμένης μελέτης. Επίσης, ευχαριστώ τον μεταδιδακτορικό ερευνητή Ανέστη Βλυσίδη για την ενασχόληση του με το στατιστικό κομμάτι της παρούσας μελέτης καθώς και την καθοδήγησή του όσον αφορά το κομμάτι αυτό. Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την πολύτιμη βοήθεια τους και υποστήριξη τους κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου και στους δικούς μου ανθρώπους για την συνεχή στήριξη τους όλο αυτό το διάστημα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η επίδραση της ανάδευσης, του pH και της θερμοκρασίας στην παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης μέσω μικροβιακών ζυμώσεων με τη χρήση του μικροοργανισμού *Enterobacter ludwigii* της οικογένειας *Enterobacteriaceae*.

Αρχικά, σε πρώτο στάδιο μελετήθηκε η επίδραση του οξυγόνου στην παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης σε ημι-συνεχείς καλλιέργειες με τους ρυθμούς ανάδευσης να κυμαίνονται σε διαφορετικά όρια (150-250 rpm, 150-300 rpm, 150-400 rpm), προκειμένου να διατηρηθεί το επίπεδο του διαλυτού οξυγόνου στο 5%, με σταθερό αερισμό στο 1 vvm. Τα ικανοποιητικότερα αποτελέσματα ως προς τη παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης παρουσιάστηκαν κατά την ημι-συνεχή καλλιέργεια με ρυθμό ανάδευσης 150-400 rpm. Η συγκέντρωση της 2,3-βουτανοδιόλης έφτασε τα 117 g.L⁻¹ με παραγωγικότητα 1.18 g.L⁻¹.h⁻¹.

Ακολούθως, το δεύτερο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας είχε ως στόχο να διερευνηθεί η επίδραση της θερμοκρασίας και pH στη βιοτεχνολογική παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης, βιομάζας και των παραπροϊόντων της ζύμωσης. Μια σειρά από ημι-συνεχείς ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν με διαφορετικούς συνδυασμούς pH και θερμοκρασίας σύμφωνα με το μοντέλο του Κεντρικού Σύνθετου Σχεδιασμού. Με βάση τους υπολογισμούς που πραγματοποιήθηκαν από το πρόγραμμα, η μέγιστη παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης (87.5 g.L⁻¹) επιτεύχθηκε όταν η θερμοκρασία ήταν 33.9°C και η τιμή pH 6.3 pH.

Λέξεις κλειδιά: 2,3-βουτανοδιόλη, *Enterobacter ludwigii*, pH, Θερμοκρασία, αερισμός

ABSTRACT

Biotechnological production of 2,3-butanediol using raw sugar cane, a product from sugar cane industry

The influence of the agitation, pH and temperature on 2,3-butanediol production was studied by microbial fermentation using the microorganism *Enterobacter ludwigii* of the *Enterobacteriaceae* family.

In the first stage, the effect of the aeration rates was studied in fed-batch cultures by applying different agitation rates in the range of 150-250 rpm, 150-300 rpm, 150-400 rpm, in order to maintain the dissolved oxygen concentration at 5%, with aeration rate of 1 vvm. The higher 2,3-butanediol production of 117 g.L⁻¹ was obtained during the fed-batch culture when the agitation rate was between 150-400 rpm. Also, high productivity was achieved during the fermentation 1.18 (g.L⁻¹.h⁻¹)

The optimization of temperature and pH on the biotechnological production of 2,3-butanediol, biomass and by-products formation was investigated in fed-batch fermentation mode. A central composite design was employed for experimental design and analysis of the results. The optimum pH and temperature for enhanced 2,3-butanediol production were 6.3 and 33.9°C respectively. Maximum 2,3-butanediol production of 87.5 g.L⁻¹ was achieved at the optimum process conditions.

Keywords: 2,3-butanediol, *Enterobacter ludwigii*, pH, Temperature, Agitation

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ABSTRACT.....	6
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	7
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	9
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	10
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	12
1 Εισαγωγή	13
1.1 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά 2,3-βουτανοδιόλης	14
1.2 Βιομηχανικές εφαρμογές 2,3-βουτανοδιόλης	15
1.3 Παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης μέσω της βιοτεχνολογικής οδού.....	16
1.4 Υποστρώματα για την βιοτεχνολογική παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης	18
1.5 Μικροοργανισμοί	20
1.6 Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης.....	21
1.7 Ανάκτηση 2,3-βουτανοδιόλης.....	26
1.8 Σκοπός της μελέτης.....	27
2 Μεθοδολογία Έρευνας.....	28
2.1 Βιολογικό υλικό	28
2.2 Προετοιμασία υγρού εμβολίου	28
2.3 Θρεπτικό μέσο για βιοτεχνολογική παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης.....	29
2.4 Συνθήκες ζύμωσης	29
2.5 Μέθοδοι ανάλυσης.....	33
3 Αποτελέσματα.....	34
3.1 Επίδραση διαφορετικών συνθηκών ανάδευσης στη ζύμωση	34
3.2 Βελτιστοποίηση του pH και της θερμοκρασίας στη βιοτεχνολογική παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης.....	40

4	Συζήτηση	56
	BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	63

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Εξεταζόμενες τιμές εύρους των παραμέτρων pH και θερμοκρασίας του CCD	32
Πίνακας 2: Σύνοψη αποτελεσμάτων για τις ημι-συνεχείς ζυμώσεις υπό διαφορετικές συνθήκες ανάδευσης.....	38
Πίνακας 3: Κωδικοποιημένες και πραγματικές τιμές των εξεταζόμενων μεταβλητών pH και θερμοκρασίας.	41
Πίνακας 4: Πειραματικές τιμές και προβλέψεις μοντέλου ως προς την βιοτεχνολογική παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης.	50
Πίνακας 5: Αποτελέσματα με τη μορφή ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA)	51
Πίνακας 6: Αποτελέσματα με τη μορφή ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) καθώς και οι εκτιμήσεις των παραμέτρων που υπολογίστηκαν μέσω της εξίσωσης 2.	52
Πίνακας 7: Βέλτιστες τιμές των παραμέτρων και προβλεπόμενη παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης	52
Πίνακας 8: Σύνοψη αποτελεσμάτων για τις ημι-συνεχείς ζυμώσεις υπό διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και pH, τελικά σημεία ζύμωσης.	58
Πίνακας 9: Βιοτεχνολογική παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης υπό διαφορετικές συνθήκες ζύμωσης.	62

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

- Διάγραμμα 1: 2,3-Βουτανοδιόλη (Δ), ηλεκτρικό οξύ (\square), γαλακτικό οξύ (\diamond), μυρμηγκικό οξύ (\circ), και αιθανόλη (\times) παραγωγή καθώς επίσης και κατανάλωση σακχάρων (\blacktriangle),σακχαρόζη (\bullet), γλυκόζη (+), φρουκτόζη (\blacksquare) κατά τη διάρκεια ημι-συνεχούς ζύμωσης με χρήση ακατέργαστης σακχαρόζης, 1 vvm αερισμό, ρυθμό ανάδευσης 150-250 rpm. 35
- Διάγραμμα 2: 2,3-Βουτανοδιόλη (Δ), ηλεκτρικό οξύ (\square), γαλακτικό οξύ (\diamond), μυρμηγκικό οξύ (\circ), και αιθανόλη (\times) παραγωγή καθώς επίσης και κατανάλωση σακχάρων (\blacktriangle),σακχαρόζη (\bullet), γλυκόζη (+), φρουκτόζη (\blacksquare) κατά τη διάρκεια ημι-συνεχούς ζύμωσης με χρήση ακατέργαστης σακχαρόζης, 1 vvm αερισμό, ρυθμό ανάδευσης 150-300 rpm. 36
- Διάγραμμα 3: 2,3-Βουτανοδιόλη (Δ), ηλεκτρικό οξύ (\square), γαλακτικό οξύ (\diamond), μυρμηγκικό οξύ (\circ), οξικό οξύ (\blacklozenge) και αιθανόλη (\times) παραγωγή καθώς επίσης και κατανάλωση σακχάρων (\blacktriangle),σακχαρόζη (\bullet), γλυκόζη (+), φρουκτόζη (\blacksquare) κατά τη διάρκεια ημι-συνεχούς ζύμωσης με χρήση ακατέργαστης σακχαρόζης, 1 vvm αερισμό, ρυθμό ανάδευσης 150-400 rpm. 37
- Διάγραμμα 4: Κινητική εξέλιξη της παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης για τις διαφορετικές συνθήκες ανάδευσης 150-250 rpm(\blacktriangle), 150-300 rpm (\circ) και 150-400 rpm (\blacksquare) σε συνάρτηση με το χρόνο..... 39
- Διάγραμμα 5: Ρυθμός παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης για τις διαφορετικές συνθήκες ανάδευσης 150-250 rpm(\blacktriangle), 150-300 rpm (\circ) και 150-400 rpm (\blacksquare) σε συνάρτηση με το χρόνο..... 40
- Διάγραμμα 6: Συνθήκες ζύμωσης 28°C_5.8 pH (\blacksquare), 26°C_6.5 pH (\bullet), 28°C_7.2 pH (\blacktriangle)..... 42
- Διάγραμμα 7: Συνθήκες ζύμωσης 33°C_5.5 pH (\blacksquare), 33°C_6.5 pH (\bullet), 33°C_7.5 pH (\blacktriangle)..... 44
- Διάγραμμα 8: Συνθήκες ζύμωσης 38°C_5.8 pH (\blacksquare), 40°C_6.5 pH (\bullet), 38°C_7.2 pH (\blacktriangle)..... 46
- Διάγραμμα 9: Συνθήκες ζύμωσης 28°C_5.8 pH (\blacksquare), 33°C_5.5 pH (\bullet), 38°C_5.8 pH (\blacktriangle)..... 47

Διάγραμμα 10: Συνθήκες ζύμωσης 26°C_6.5 pH (■), 33°C_6.5 pH (●), 40°C_6.5 pH (▲).....	48
Διάγραμμα 11: Συνθήκες ζύμωσης 33°C_7.5 pH, 38°C_7.2 pH και 28°C_7.2 pH για παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης (■), βιομάζας (■), ηλεκτρικού (■) και γαλακτικού οξέος (■) κατά τη διάρκεια ημι-συνεχούς ζύμωσης με χρήση ακατέργαστης σακχαρόζης, 1 nvm αερισμό, ρυθμό ανάδευσης 150-250 rpm.....	49
Διάγραμμα 12: Απεικόνιση ισοϋψών καμπυλών για την προβλεπόμενη συγκέντρωση της 2,3-βουτανοδιόλης για διαφορετικούς συνδυασμούς pH και θερμοκρασίας.....	53
Διάγραμμα 13: Τρισδιάστατη απεικόνιση της απόκρισης συγκέντρωσης 2,3-βουτανοδιόλης για διαφορετικούς συνδυασμούς pH και θερμοκρασίας	54
Διάγραμμα 14: 2,3-Βουτανοδιόλη (Δ), ηλεκτρικό οξύ (□), οξικό οξύ (◇), μυρμηγκικό οξύ (ο), και αιθανόλη (×) παραγωγή καθώς επίσης και κατανάλωση σακχάρων (▲),σακχαρόζη (●), γλυκόζη (+), φρουκτόζη (■) κατά τη διάρκεια ημι-συνεχούς ζύμωσης με χρήση ακατέργαστης σακχαρόζης, 1 nvm αερισμό, ρυθμό ανάδευσης 150-250 rpm, 33.9°C και 6.3 pH.....	55

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Στερεοϊσομερή 2,3-βουτανοδιόλης, δομή Haworth (Celińska & Grajek 2009).	15
Εικόνα 2: Στερεοϊσομερή 2,3-βουτανοδιόλης, δομή Haworth (Celińska & Grajek 2009).	15
Εικόνα 3: Απεικόνιση μεταβολισμού πυροσταφυλικού οξέος από τον μικροοργανισμό <i>Lactococcus lactis</i> προς παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης, αιθανόλης, γαλακτικού, οξικού και μυρμηκικού οξέος (Celińska & Grajek 2009).	18
Εικόνα 4: Ημι-συνεχής ζύμωση του μικροοργανισμού <i>Enterobacter ludwigii</i> σε βιοαντιδραστήρα όγκου 3.7 L.....	30
Εικόνα 5: Ημι-συνεχής ζύμωση του μικροοργανισμού <i>Enterobacter ludwigii</i> σε βιοαντιδραστήρα όγκου 1 L.....	31

1 Εισαγωγή

Η παραγωγή χημικών και καυσίμων στηρίζεται αποκλειστικά στη πετροχημική βιομηχανία, ωστόσο η μέθοδος αυτή δεν είναι βιώσιμη και φιλική προς το περιβάλλον (Kamm & Kamm 2006). Καθώς τα αποθέματα του αργού πετρελαίου γίνονται όλο και πιο σπάνια, παρατηρούμε ότι τα βιο-δουλιστήρια ενσωματώνουν διαδικασίες και εξοπλισμό για μετατροπή της βιομάζας σε καύσιμα, ενέργεια και χημικά προϊόντα από ανανεώσιμες πηγές (Kamm & Kamm 2004). Η χρονική περίοδος που διανύουμε χαρακτηρίζεται σε μεγάλο βαθμό από την έλλειψη ορυκτών καυσίμων, με αποτέλεσμα το ενδιαφέρον της βιομηχανίας να στρέφεται πλέον σε εναλλακτικούς μεθόδους παραγωγής αλλά και πηγές. Πιο συγκεκριμένα, στην παραγωγή χημικών ενώσεων μέσω των βιοτεχνολογικών οδών με χρήση ανανεώσιμων πηγών ενέργειας έναντι των κλασσικών χημικών μεθόδων (Celińska & Grajek 2009). Η σύγχρονη βιοτεχνολογική τεχνολογία αποτελεί υποσχόμενη εναλλακτική μέθοδο για την αντικατάσταση χημικών τεχνικών που βασίζονται σε ανανεώσιμες πηγές ενέργειας με σημαντικά πλεονεκτήματα. Το περιβαλλοντικό όφελος που προκύπτει είναι τεράστιο, καθώς οι χημικές τεχνικές διεργασίες συχνά παράγουν ένα ευρύ φάσμα ανεπιθύμητων/επιβλαβή υποπροϊόντων ή αποβλήτων. Το κόστος παραγωγής ωστόσο εξακολουθεί να είναι ένας σημαντικός περιοριστικός παράγοντας. Το κόστος παραγωγής επηρεάζεται άμεσα από το κόστος της πρώτης ύλης και την μέθοδο ανάκτησης του τελικού προϊόντος. Όσο το κόστος των ορυκτών πρώτων υλών είναι πιο φθηνό, εναλλακτικές λύσεις με χρήση ανανεώσιμων πρώτων υλών δύσκολα θα μπορεί να τα αντικαταστήσει. Υπολείμματα και απορρίμματα όμως τα οποία είναι διαθέσιμα χωρίς κόστος αγοράς αποτελούν εξαίρεση (Willke & Vorlop 2004).

Όπως γίνεται αντιληπτό, το περιβάλλον και η οικονομία είναι στενά συνδεδεμένα μεταξύ τους. Έως τώρα η οικονομία λειτουργούσε σύμφωνα με το μοντέλο «παίρνω-φτιάχνω-απορρίπτω», ένα μοντέλο από το οποίο κάθε προϊόν φτάνει στο τέλος της ωφέλιμης ζωής του. Το 1990 εισήχθη για πρώτη φορά η έννοια της κυκλικής οικονομίας από τους Pearce και Turner (Pearce 1990). Η μετάβαση αυτή προς τη κυκλική οικονομία υποστηρίζεται πλέον ολοένα από μεγαλύτερο αριθμό πολιτικών και πρωτοβουλιών. Η κυκλική οικονομία εισάγει την αρχή της επαναχρησιμοποίησης, επισκευής, ανανέωσης και ανακύκλωσης των υφιστάμενων υλικών, αλλά και προϊόντων. Ό,τι προηγουμένως θεωρείτο απόβλητο μπορεί να μετατραπεί σε πρώτη ύλη. Στόχος της κυκλικής οικονομίας

είναι τα υλικά να σχεδιάζονται με τρόπο ώστε η προστιθέμενη αξία τους να διατηρείται όσο το δυνατό περισσότερο, ενώ τα υπολειμματικά απόβλητα να προσεγγίζουν το μηδέν.

Πολλές βιοτεχνολογικές διεργασίες έχουν αναπτυχθεί, με επικρατέστερες τις μικροβιακές ζυμώσεις, για την αξιοποίηση των παραπροϊόντων/αποβλήτων που προκύπτουν από τις διάφορες γραμμές παραγωγής. Τα παραπροϊόντα μπορούν να αντικαταστήσουν σε πλήρη βαθμό την πηγή άνθρακα στις μικροβιακές ζυμώσεις, συμβάλλοντας παράλληλα στην μείωση του κόστους των βιοδιεργασιών (Peters 2007).

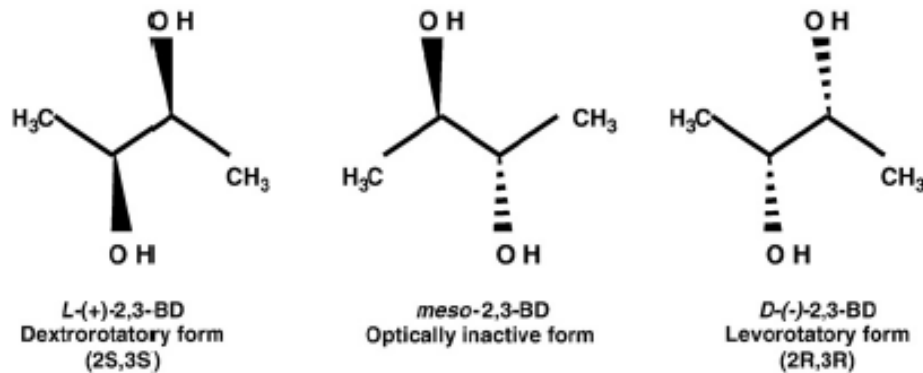
Η μικροβιακή παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης είναι ένα τέτοιο παράδειγμα, στο οποίο υπάρχει αυξημένο ενδιαφέρον όσον αφορά την παραγωγή της λόγω του μεγάλου αριθμού βιομηχανικών εφαρμογών της (Wu et al. 2008). Χαρακτηρίζεται ως ένα προϊόν υψηλής προστιθέμενης αξίας το οποίο παράγεται μέσω βιομετατροπής από σακχαρούχα κυρίως υποστρώματα.

Η παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης μέσω της βιοτεχνολογικής οδού για πρώτη φορά μελετήθηκε από τους Harden και Walpote το 1906 σε καλλιέργεια του μικροοργανισμού *Klebsiella pneumoniae*, και το 1912 από τους Harden και Norris (Magee & Kosaric 1987). Ακολούθησε ο Donker 20 χρόνια μετά με χρήση διαφορετικού μικροοργανισμού, του *Bacillus polymyxa*. Στην δεκαετία το 1970 η παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης προκύπτει αποκλειστικά μέσω χημικών μεθόδων. Παρ' όλα αυτά το υψηλό κόστος λειτουργεί ως περιοριστικός παράγοντας με αποτέλεσμα να στρέφει το ενδιαφέρον στη παραγωγή της μέσω μικροβιακών ζυμώσεων (Ji et al. 2011). Η παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης σε βιομηχανικό επίπεδο πραγματοποιήθηκε πρώτη φορά από τον Fulmer και τους συνεργάτες του το 1993 (Ji et al. 2011; Garg & Jain 1995). Στις μέρες μας όμως δεν πραγματοποιείται βιομηχανική παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης, ωστόσο έχει μελετηθεί σε μεγάλο ποσοστό και αξίζει να σημειωθεί ότι αποκτά ολοένα και περισσότερο ενδιαφέρον (Celińska & Grajek 2009).

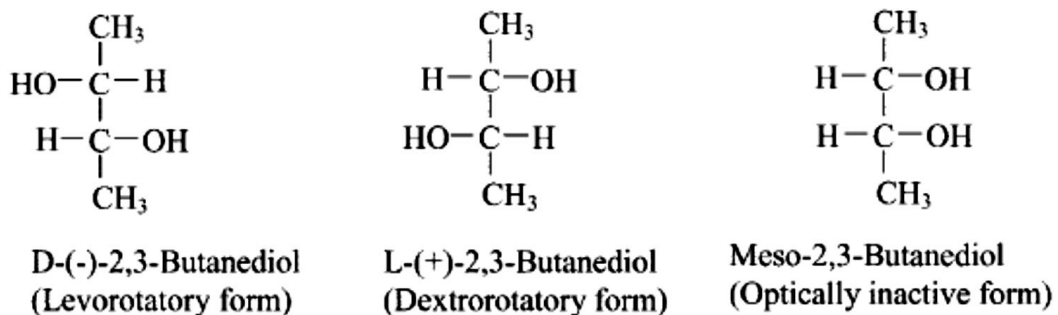
1.1 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά 2,3-βουτανοδιόλης

Η 2,3-βουτανοδιόλη γνωστή αλλιώς και ως 2,3-βουτυλενογλυκόλη, διμεθυλενογλυκόλη, ή διμεθυλαιθυλένιο γλυκόλη είναι μία οργανική ένωση με μοριακό τύπο $C_4H_{10}O_2$ και μοριακό βάρος ίσο με 90.121 ($g \cdot mol^{-1}$). Η 2,3-βουτανοδιόλη υπάρχει σε τρεις ισομερείς μορφές: D-(-)-2,3-BD, L-(+)-2,3-BD και meso-2,3-BD (Σχήμα 1, 2). Πρόκειται για ένα άχρωμο και άοσμο υγρό ή ακόμα και σε κρυσταλλική μορφή, με σημείο τήξης στους $-60^{\circ}C$ και τα σημεία βρασμού των τριών στερεοϊσομερή να

διαφέρουν ελαφρώς και να κυμαίνονται από 180 έως 184°C. Παρ' όλα αυτά και στις τρεις περιπτώσεις είναι πολύ υψηλότερα από το σημείο βρασμού του νερού (Celińska & Grajek 2009; Syu 2001; Garg & Jain 1995).



Εικόνα 1: Στερεοϊσομερή 2,3-βουτανοδιόλης, δομή Haworth (Celińska & Grajek 2009).



Εικόνα 2: Στερεοϊσομερή 2,3-βουτανοδιόλης, δομή Haworth (Celińska & Grajek 2009).

1.2 Βιομηχανικές εφαρμογές 2,3-βουτανοδιόλης

Όπως έχει προαναφερθεί, η 2,3-βουτανοδιόλη χαρακτηρίζεται ως ένα προϊόν υψηλής προστιθέμενης αξίας με πληθώρα εφαρμογών και χρήσεων. Συγκεκριμένα, η 2,3-βουτανοδιόλη μπορεί να μετατραπεί σε 1,3-βουταδιένιο, το οποίο με περαιτέρω επεξεργασία μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην παραγωγή συνθετικού καουτσούκ. Η σύνθεση της, αυτή κρίθηκε ιδιαίτερα σημαντική κατά την διάρκεια του 2^{ου} παγκοσμίου πολέμου όταν οι απαιτήσεις σε καουτσούκ ήταν υψηλές (Celińska & Grajek 2009). Επίσης λόγω του χαμηλού σημείου τήξεως (-60°C), η 2,3-βουτανοδιόλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αντιψυκτικός παράγοντας (Soltys et al. 2001). Ωστόσο, η εμπορική

εφαρμογή της δεν περιορίζεται μόνο σε αυτές τις εφαρμογές. Με αφυδρογόνωση η 2,3-βουτανοδιόλη μετατρέπεται σε διακετύλιο το οποίο προσδίδει βουτυρώδης γεύση, επομένως μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρόσθετο στη βιομηχανία τροφίμων (Bartowsky & Henschke 2004). Το διακετύλιο επίσης στην βιομηχανία τροφίμων μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως συντηρητικό λόγω της βακτηριοστατικής δράσης του (Soltys et al. 2001). Επιπρόσθετα, η 2,3-βουτανοδιόλη μπορεί να θεωρηθεί πολύτιμο πρόσθετο καυσίμου με θερμαντική αξία 27198 Jg^{-1} , συγκρίνοντας το με άλλα υγρά καύσιμα όπως την αιθανόλη και μεθανόλη με θερμαντική αξία 29055 Jg^{-1} και 22081 Jg^{-1} αντίστοιχα (Garg & Jain 1995). Σύμφωνα με τους Yu και Saddler η παρουσία αιθανόλης δεν επηρεάζει τη χρησιμότητα της 2,3-βουτανοδιόλης ως καύσιμο αφού ένα ισομοριακό μείγμα μεταξύ αιθανόλης και 2,3-βουτανοδιόλης μπορεί να παρέχει ένα υγρό θέρμανσης αξίας 27660 Jg^{-1} (Yu & Saddler 1982). Εκτός από καύσιμο μπορεί να μετατραπεί σε μέθυλο-αίθυλο-κετόνη (MEK) μέσω αφυδάτωσης, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρόσθετο στα καύσιμα αλλά και ως διαλύτης στη παραγωγή ρητινών. Περαιτέρω, η 2,3-βουτανοδιόλη έχει υψηλό αριθμό οκτανίων, και η συμπύκνωση της ως προς MEK σε συνδυασμό με επακόλουθη υδρογόνωση δίνει ισομερή οκτανίων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή υψηλής ποιότητας καυσίμων (Villet 1981). Εστεροποίηση της 2,3-βουτανοδιόλης έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή ουσιών για χρήση σε φάρμακα και προϊόντα καλλυντικών. Τέλος, έχει αποδειχθεί ότι έχει πιθανή εφαρμογή στην κατασκευή μελανιών εκτύπωσης, καπνογόνα καθώς και πλαστικών (Garg & Jain 1995).

1.3 Παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης μέσω της βιοτεχνολογικής οδού

Η παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης μέσω της βιοτεχνολογικής οδού στηρίζεται κυρίως σε μικροβιακές ζυμώσεις με χρήση διαφορετικών υποστρωμάτων, κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες. Αρχικά, μια ποικιλία από μονοσακχαρίτες (πεντόζες ή εξόζες) μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως υλικό έναρξης για την παραγωγή της (Syu 2001). Σε πρώτο στάδιο οι μονοσακχαρίτες μετατρέπονται σε πυροσταφυλικό οξύ ώστε στην συνέχεια να παραχθεί η 2,3-βουτανοδιόλη και άλλα μεταβολικά προϊόντα όπως το οξικό, γαλακτικό, ηλεκτρικό και μυρμηκικό οξύ καθώς επίσης ακετοΐνη και αιθανόλη (Magee & Kosaric 1987). Στην περίπτωση της γλυκόζης (Σχήμα 3), αρχικά θα μετατραπεί σε πυροσταφυλικό οξύ μέσω της οδού Embden–Meyerhof–Parnas (EMP) (γλυκόλυση) και

στην συνέχεια θα ακολουθήσει η σύνθεση των κύριων προϊόντων (Ji et al. 2011). Αντίθετα, η παραγωγή του πυροσταφυλικού οξέος από πεντόζες πρέπει να προχωρήσει μέσω ενός συνδυασμού του κύκλου των φωσφορικών πεντοζών και της οδού Embden–Meyerhof–Parnas (Jansen et al. 1984). Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι για την βιοσύνθεση της 2,3-βουτανοδιόλης από το πυροσταφυλικό εμπλέκονται τρία βασικά ένζυμα. Η συνθετάση του α-ακετογαλακτικού (ALS, EC 4.1.3.18), η αποκαρβοξυλάση του α-ακετογαλακτικού (ALDC, EC 4.1.1.5) και η αφυδρογονάση της 2,3-βουτανοδιόλης (BDH, EC 1.1.1.76) (Ji et al. 2011).

Σε μετέπειτα στάδιο, το πυροσταφυλικό οξύ που παράγεται μπορεί να μετατραπεί είτε σε γαλακτικό οξύ, αντίδραση που απαιτεί την κατανάλωση NADH, ή σε α-ακετογαλακτικό από την α-ALS, η οποία παράγεται όταν η διαθεσιμότητα σε NADH δεν είναι επαρκής. Ακολούθως, κάτω από αναερόβιες συνθήκες το α-ακετογαλακτικό μπορεί να μετατραπεί σε ακετοΐνη, ενώ σε παρουσία οξυγόνου υφίσταται αποκαρβοξυλίωση και παράγεται διακετύλιο και ακολούθως με την αφυδρογονάση της ακετοΐνης το διακετύλιο μετατρέπεται σε ακετοΐνη. Τέλος, η ακετοΐνη μετατρέπεται σε 2,3-βουτανοδιόλη με το ένζυμο αφυδρογονάση της 2,3-βουτανοδιόλης (Celińska & Grajek 2009).

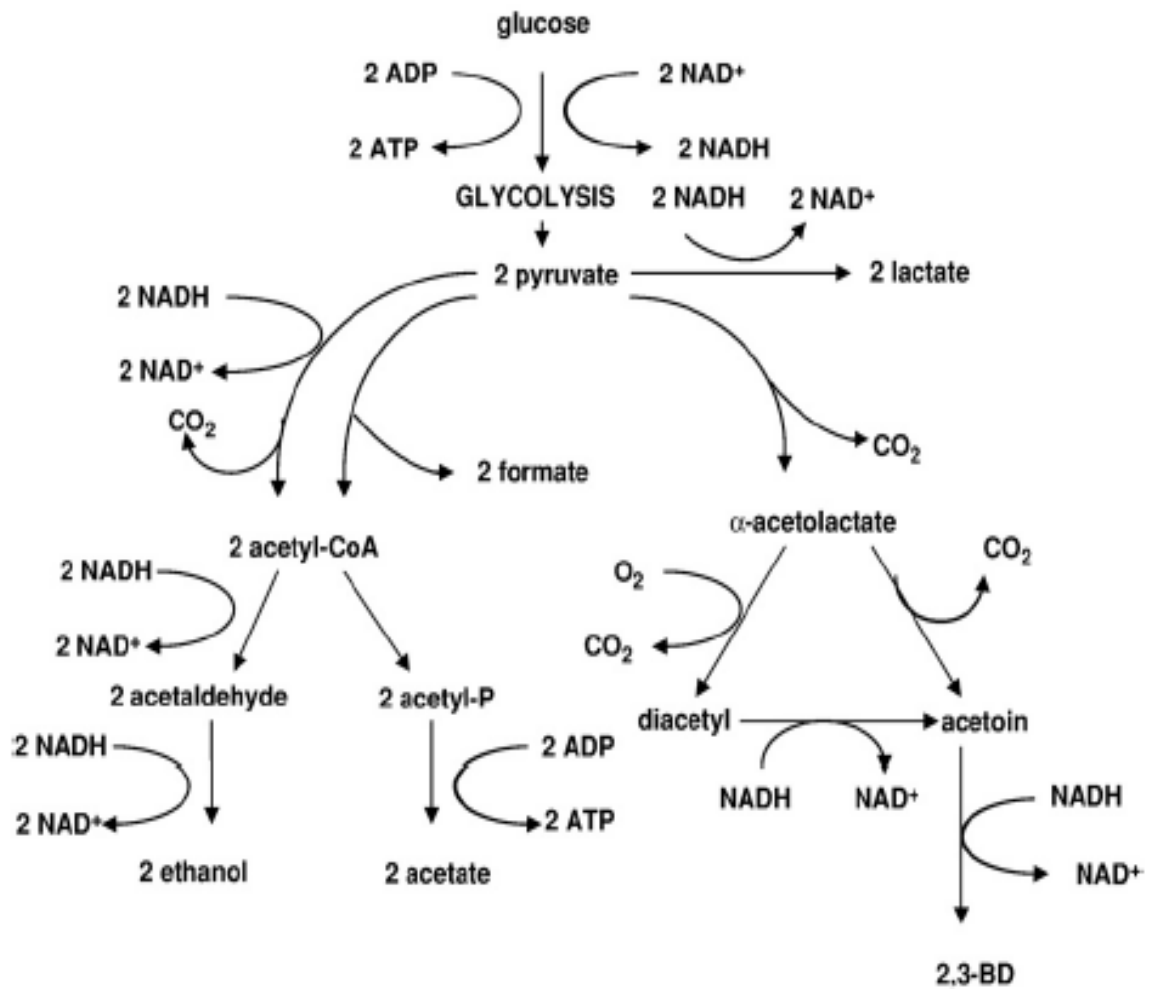
Ο μέγιστος θεωρητικός συντελεστής παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης ανά καταναλωθείσα γλυκόζη που προκύπτει μέσω της βιοτεχνολογικής οδού είναι 0.5 g.g^{-1} (Nilegaonkar et al. 1992). Η στοιχειομετρία για τη μετατροπή της γλυκόζης σε 2,3-βουτανοδιόλη δίνεται από την εξίσωση (1):



Στην περίπτωση των πεντοζών όπως ξυλόζη και αραβινόζη, η μέγιστη θεωρητική απόδοση της 2,3-βουτανοδιόλης είναι επίσης 0.5 g.g^{-1} και δίνεται από την εξίσωση (2):



(Jansen et al. 1984)



Εικόνα 3: Απεικόνιση μεταβολισμού πυροσταφυλικού οξέος από τον μικροοργανισμό *Lactococcus lactis* προς παραγωγή 2,3-βουτανодиόλης, αιθανόλης, γαλακτικού, οξικού και μυρμηκικού οξέος (Celińska & Grajek 2009).

1.4 Υποστρώματα για την βιοτεχνολογική παραγωγή της 2,3-βουτανодиόλης

Διάφορες πηγές άνθρακα έχουν χρησιμοποιηθεί για την βιοτεχνολογική παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Σημαντικό ρόλο στη περίπτωση του υποστρώματος έχει το κόστος (Voloch M, Jansen NB, Ladisch MR, Tsao GT, Narayan R 1985), εφόσον η τιμή του τελικού προϊόντος επηρεάζεται από την τιμή των πρώτων υλών (Willke & Vorlop 2004). Σε προηγούμενες δεκαετίες το υψηλό κόστος των συμβατικών υποστρωμάτων από σάκχαρα ή άμυλο είχε ταυτοποιηθεί ως ένας

παράγοντας που επηρέαζε σε σημαντικό βαθμό την οικονομική βιωσιμότητα της παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης (Ji et al. 2011). Απαραίτητο θα ήταν επομένως η χρήση μιας οικονομικής πηγής υδατανθράκων.

Όσον αφορά την βιοτεχνολογική παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης, τα υποστρώματα που χρησιμοποιούνται μπορούμε να τα ταξινομήσουμε σε δύο κύριες κατηγορίες: τα μη-κυτταρινούχα και τα λιγνοκυτταρινούχα υποστρώματα.

Στα μη-κυτταρινούχα υποστρώματα κατατάσσονται υπολείμματα της βιομηχανίας τροφίμων. Κυρίως είναι τα υγρά απόβλητα των βιομηχανιών τροφίμων που είναι πλούσια σε σάκχαρα, όπως ο ορός γάλακτος από την παραγωγή τυριών, η μελάσα από την παραγωγή ζαχαροκάλαμου και το υδρολυμένο άμυλο από την επεξεργασία καλαμποκιού (Perego et al. 2000). Αναφορά γίνεται και για χρήση εξοζών που προέρχονται από το φυτό με το επιστημονικό όνομα *Helianthus tuberosus*, κοινώς γνωστό ως αγκινάρα της Ιερουσαλήμ. Στο συγκεκριμένο φυτό περιέχονται υψηλές ποσότητες υδατανθράκων, ινουλίνης και σουκρόζης, ποσοστό που αντιστοιχεί στο 85% του ξηρού βάρους στο κόνδυλο του φυτού. Το ποσοστό αυτό του προσδίδει την ικανότητα να θεωρείται μία εξαιρετική πηγή ζυμώσιμων σακχάρων, και να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτική λύση για φθηνά υποστρώματα στην παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης (Ji et al. 2011). Επίσης, χαμηλού κόστους μη-κυτταρινούχο υπόστρωμα είναι και η γλυκερόλη, παραπροϊόν από την διαδικασία παραγωγής βιοντίζελ. Με την εφαρμογή καυσίμων βιοντίζελ σε εμπορική κλίμακα, τεράστιες ποσότητες γλυκερόλης θα είναι διαθέσιμες στην αγορά στο εγγύς μέλλον. Επομένως, μετατροπή της γλυκερόλης σε διάφορα προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας προσελκύει το ενδιαφέρον (Paranikolaou et al. 2008). Σύμφωνα με τους Biebl et al. η γλυκερόλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πηγή άνθρακα για τη μετατροπή σε 2,3-βουτανοδιόλη, 1,3-προπανοδιόλη αλλά και αιθανόλη (Biebl, H.; Zeng, A. P.; Menzel, K.; Deckwer 1998).

Από την άλλη, τα λιγνοκυτταρινούχα υποστρώματα αποτελούν την πιο άφθονη βιομάζα στη γη, και έχουν τεράστιο ενδιαφέρον λόγω της υψηλής διαθεσιμότητας τους (Ji et al. 2011). Η μεγαλύτερη εφαρμογή των λιγνοκυτταρινούχων υποστρωμάτων είναι η παραγωγή χημικών μέσω βιοτεχνολογικών οδών (Ragauskas et al. 2006). Οι Wang et al. το 2010 χρησιμοποιώντας στάχυ καλαμποκιού ως υπόστρωμα για την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης, ένα απόβλητο από τη παραγωγή ξυλιτόλης το οποίο περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις αραβινόζης και ξυλόζης, επιτεύχθηκε συγκέντρωση 2,3-βουτανοδιόλης 78,9 gL⁻¹ μετά από 61h σε ημι-συνεχής καλλιέργεια με χρήση του μικροοργανισμού *K.*

pneumoniae. Αυτή η προσέγγιση για την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης, όχι μόνο μείωσε το κόστος της πρώτης ύλης αλλά και προέβλεπε μία μέθοδο εκμετάλλευσης υποπροϊόντων της βιομηχανίας ξυλιτόλης, η οποία θα μπορούσε να μειώσει τη ρύπανση του περιβάλλοντος (Wang et al. 2010).

Τα κύρια συστατικά τους είναι κυτταρίνη (30-50%), ημι-κυτταρίνη (15-35%) και λιγνίνη (10-20%) (Limayem & Ricke 2012). Η κυτταρίνη είναι ένα πολυμερές της γλυκόζης, ενώ η ημι-κυτταρίνη περιέχει κυρίως πεντόζες συμπεριλαμβανομένων ξυλόζης, αραβινόζης και ριβόζης (Saha 2003). Κυτταρίνη και ημι-κυτταρίνη αποτελούν περίπου το 70% της συνολικής βιομάζας και είναι στενά συνδεδεμένες μέσω ομοιοπολικών δεσμών και δεσμών υδρογόνου με τη λιγνίνη (Mielenz 2001). Πιο αναλυτικά, η κυτταρίνη είναι ένα δομικό γραμμικό συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος του φυτού, το οποίο αποτελείται από μακρά αλυσίδα μονομερών γλυκόζης που συνδέονται μεταξύ τους με β (1-4)-γλυκοσιδικούς δεσμούς. Από την άλλη η ημι-κυτταρίνη σχηματίζεται από ετεροπολυμερή μόρια συμπεριλαμβανομένων εξοζών όπως D-γλυκόζης, D-γαλακτόζης και D-μαννόζης αλλά και πεντοζών όπως D-ξυλόζης και L-αραβινόζης. Επίσης μπορεί να περιλαμβάνει D-γαλακτουρονικό και D-γλυκουρονικό οξύ (Saha 2003). Τέλος, η λιγνίνη θεωρείται αρωματικό και άκαμπτο βιοπολυμερές με μοριακό βάρος ίσο με 10.000 Da. Είναι συνδεδεμένο μέσω ομοιοπολικών δεσμών με ξυλάνες που προσδίδει στο φυτικό κύτταρο ακαμψία (Limayem & Ricke 2012).

1.5 Μικροοργανισμοί

Υπάρχει πληθώρα μικροοργανισμών και κυρίως βακτήρια, οι οποίοι μπορούν να ζυμώσουν το πυροσταφυλικό οξύ σε 2,3-βουτανοδιόλη. Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι και αρκετές ζύμες έχουν την ικανότητα να συνθέσουν 2,3-βουτανοδιόλη, παρ' όλα αυτά με αρκετά χαμηλή παραγωγικότητα. Σύμφωνα με τους Caspi et al. μικροοργανισμοί που είναι ικανοί να παράγουν 2,3-βουτανοδιόλη είναι: *Aeromonas hydrophila*, *B. subtilis*, *Brevibacillus brevis* S1, *Corynebacterium glutamicum*, *E. aerogenes*, *K. pneumoniae* γνωστό και ως *Aerobacter aerogenes*, *K. oxytoca*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis subsp. lactis* bv. *diacetylactis*, *Leuconostoc lactis*, *Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris*, *Oenococcus oeni*, *Pediococcus pentosaceus*, *Raoultella terrigena*, *Serratia marcescens* (Caspi R. 2008). Επιπλέον μικροοργανισμοί είναι οι *B.*

polymyxa (Hespell 1996), *Klebsiella terrigena* (Mayer et al. 1995), *Bacillus licheniformis* (Perego et al. 2000), *Bacillus amyloliquefaciens*, αλλά και θαλάσσια μικροάλγη έχουν βρεθεί ότι μπορούν να παράγουν και συγκεκριμένα ο μικροοργανισμός *Chlamydomonas perigranulata* (Hon-Nami 2006). Παρ' όλα αυτά, το βιομηχανικό ενδιαφέρον στρέφεται κυρίως στα βακτήρια για την σύνθεση της (Garg & Jain 1995). Συγκεκριμένα γένη και είδη βακτηρίων επιλέγονται για την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης. Η επιλογή αυτή καθορίζεται από την απόδοση που παρουσιάζει ο κάθε μικροοργανισμός στην παραγωγή της. Οι μικροοργανισμοί οι οποίοι είναι πιο αποδοτικοί στην παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης σύμφωνα με τη βιβλιογραφία είναι οι *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, και ο *B. polymyxa*. Επίσης και το στέλεχος *Enterobacter aerogenes* είναι ένας αρκετά υποσχόμενος μικροοργανισμός όπου κάτω από μικροαερόφιλες συνθήκες παράγει 2,3-βουτανοδιόλη (Perego et al. 2000). Να αναφερθεί ότι το στέλεχος *B. polymyxa* υπό αναερόβιες συνθήκες δύναται να παράγει 2,3-βουτανοδιόλη και συγκεκριμένα (D-)-2,3-βουτανοδιόλη (Hespell 1996).

1.6 Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης

Μία σειρά από διάφορους παραμέτρους έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζουν την βιοτεχνολογική παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης. Στο παρών κεφάλαιο οι διάφοροι παράγοντες θα αναπτυχθούν πιο αναλυτικά.

1.6.1 Αερισμός

Η παροχή οξυγόνου μπορεί να θεωρηθεί ως η πιο σημαντική μεταβλητή στην ζύμωση της 2,3-βουτανοδιόλης (Converti et al. 2003), εφόσον η παραγωγή της θεωρείται ένα προϊόν αναερόβιας ζύμωσης. Το οξυγόνο λειτουργεί ως αποδέκτης ηλεκτρονίων και ως ρυθμιστής του ενζύμου στις διαδικασίες αυτές (Zeng et al. 1994). Πιο συγκεκριμένα, το οξυγόνο είναι ο τελικός αποδέκτης των ηλεκτρονίων στη παραγωγή ATP κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Το ATP στην συνέχεια παρέχει την ενέργεια που απαιτείται για την σύνθεση και συντήρηση των κυττάρων, τη παραγωγή του προϊόντος αλλά και των παραπροϊόντων. Από διάφορες μελέτες διαπιστώνεται ότι μειώνοντας την παροχή οξυγόνου αυξάνει η απόδοση της 2,3-βουτανοδιόλης, αλλά παράλληλα μειώνεται το συνολικό ποσοστό μετατροπής σε βιομάζα, δεν ευνοείται δηλαδή η κυτταρική ανάπτυξη (Garg & Jain 1995). Επίσης σε περίπτωση απουσίας αέρα η ανάπτυξη του μικροοργανισμού αλλά και η παραγωγή μειώνονται (Sablayrolles & Goma 1984),

συνήθως παράγεται αιθανόλη και 2,3-βουτανودیολη σε ισομοριακές ποσότητες (Voloch M, Jansen NB, Ladisch MR, Tsao GT, Narayan R 1985). Στην αντίθετη περίπτωση, με επάρκεια αερισμού σύμφωνα με τους Alam et al. 1990 και πάλι μειώνεται η απόδοση της 2,3-βουτανودیολης καθώς οι μικροοργανισμοί αρχίζουν να αποκτούν ενέργεια μέσω της αναπνοής και όχι μέσω της ζύμωσης (Alam et al. 1990). Επιπρόσθετα, η διαθεσιμότητα σε οξυγόνο είναι άμεσα συνδεδεμένη με την ταχύτητα ανάδευσης. Αυτή η ενέργεια αυξάνει την αποτελεσματικότητα της ζύμωσης λόγω της συνεχής έκθεσης της καλλιέργειας σε νέο υπόστρωμα και τη διάδοση των μεταβολικών προϊόντων και υποπροϊόντων σε ολόκληρο το μέσο (Garg & Jain 1995). Επομένως, με όσα έχουν προαναφερθεί διαπιστώνεται ότι η διαθεσιμότητα σε οξυγόνο είναι ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες για την παραγωγή της 2,3-βουτανودیολης, λόγω του ότι η ζύμωση της αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα αναερόβιας ή μικροαερόφιλης ζύμωσης (Converti et al. 2003). Ωστόσο, για να πραγματοποιηθεί όσο το δυνατό μεγαλύτερη παραγωγή της 2,3-βουτανودیολης κρίνεται απαραίτητη η ρύθμιση του αερισμού σε ιδανικό επίπεδο. Με την βέλτιστη παροχή επιτυγχάνεται η μειωμένη παραγωγή υποπροϊόντων, τα οποία δρουν ανασταλτικά στον σχηματισμό της 2,3-βουτανودیολης (Xiu & Zeng 2008), αλλά εμποδίζουν και την ανάκτηση του προϊόντος (Celińska & Grajek 2009).

1.6.1.1 Έλεγχος παροχής οξυγόνου

Όπως έχει ήδη σημειωθεί, η παροχή οξυγόνου είναι ένας κρίσιμος παράγοντας που επηρεάζει την παραγωγή της 2,3-βουτανودیολης, την απόδοση και την παραγωγικότητα της.

Σε ερευνητική μελέτη των Beronio και Tsao (1993) μελετήθηκε η επίδραση του ρυθμού μεταφοράς οξυγόνου (Oxygen transfer rate, OTR) στο σχηματισμό 2,3-βουτανودیολης με τον μικροοργανισμό *K. oxytoca*. Ο ρυθμός μεταφοράς οξυγόνου (OTR) χρησιμοποιήθηκε για να διατηρήσει το ρυθμό ανάπτυξης και το ρυθμό πρόσληψης οξυγόνου (OUR). Σε ζυμώσεις με ελεγχόμενο το ρυθμό μεταφοράς οξυγόνου παρατηρήθηκε η αύξηση της παραγωγικότητας της 2,3-βουτανودیολης κατά 18% (Beronio & Tsao 1993).

Επιπρόσθετα, μελέτη για την επίδραση του ογκομετρικού συντελεστή μεταφοράς οξυγόνου (K_{la}) πραγματοποιήθηκε με χρήση του μικροοργανισμού *P. polymyxa*.

Συγκεκριμένα το K_{la} ρυθμίστηκε σε τρία διαφορετικά επίπεδα κατά την διάρκεια της ζύμωσης, $40h^{-1}$ (0-19h), $21h^{-1}$ (19-41h) και τέλος $8h^{-1}$ (41-55h). Το αποτέλεσμα ήταν να επιτευχθούν $44gL^{-1}$ 2,3-βουτανοδιόλης με παραγωγικότητα $0.79gL^{-1}h^{-1}$ (Fages et al. 1986). Ο Zeng et al. (1994) επιχείρησε την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης υπολογίζοντας το αναπνευστικό πηλίκιο (Respiratory quotient, RQ), και φάνηκε ότι μια τιμή RQ μεταξύ 4.0 και 4.5 αποτελεί τη βέλτιστη για παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης. Αυτά τα αποτελέσματα ήταν σύμφωνα με τη βέλτιστη τιμή RQ 4.0, που λαμβάνεται μέσω της στοιχειομετρίας. Επομένως, υπολογίζοντας το αναπνευστικό πηλίκιο σε ημι-συνεχείς ζυμώσεις επιτεύχθηκε παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης $100g.L^{-1}$ με το μικροοργανισμό *E. aerogenes* (Zeng et al. 1994). Αντίθετα ο Zhang et al. με βάση στοιχειομετρικούς υπολογισμούς ορίζει τιμή RQ από 1-1.5 για την κυτταρική ανάπτυξη και 1.8-2 για την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης (Zhang et al. 2010).

1.6.2 Θερμοκρασία

Η θερμοκρασία μπορεί να θεωρηθεί ως η κινητήρια δύναμη σε κάθε ζύμωση. Είναι ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες που καθορίζουν το ρυθμό ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Επομένως, η απόδοση των βιολογικών διεργασιών εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη θερμοκρασία. Αυτό οφείλεται στο ότι η θερμοκρασία είναι άμεσα συνδεδεμένη και σε μεγάλο βαθμό με την ενζυμική δραστηριότητα αλλά και την συντήρηση των κυττάρων. Σε γενικές γραμμές, αναφέρεται ότι η βέλτιστη θερμοκρασία για τη μικροβιακή ζύμωση της 2,3-βουτανοδιόλης είναι μεταξύ $30-35^{\circ}C$ (Celińska & Grajek 2009; Garg & Jain 1995). Σημαντική είναι η αναφορά των Garg & Jain, όσον αφορά την επίδραση της θερμοκρασίας στην διαδικασία της ζύμωσης. Συγκεκριμένα, αναφέρουν ότι δεδομένου ότι η σύνθεση 2,3-BD είναι ένα φαινόμενο που σχετίζεται με την ανάπτυξη, η βέλτιστη θερμοκρασία για το σχηματισμό του προϊόντος πρέπει να είναι παρόμοια με την βέλτιστη θερμοκρασία για τη μέγιστη απόδοση βιομάζας (Garg & Jain 1995).

Παρ' όλα αυτά, η τιμή της βέλτιστης θερμοκρασίας για τη ζύμωση της 2,3-βουτανοδιόλης διαφέρει ανάλογα με το μικροοργανισμό. Συγκεκριμένα, σε καλλιέργεια του μικροοργανισμού *Klebsiella pneumonia* πραγματοποιήθηκε μείωση της θερμοκρασίας από τους $35^{\circ}C$ στους $30^{\circ}C$ με αποτέλεσμα να προκύψει μείωση της παραγωγής αιθανόλης και αύξηση της 2,3-βουτανοδιόλης (Biebl, H.; Zeng, A. P.; Menzel, K.; Deckwer 1998). Οι Barrett et al. το 1983 εξέτασαν τις επιδράσεις της

θερμοκρασίας στην περιοχή από 30-37 °C για παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης από τους μικροοργανισμούς *K. pneumoniae* και *E. aerogenes*. Παρατηρήθηκε ότι για τον μικροοργανισμό *K. pneumoniae* οι 33 °C φαίνεται να είναι η βέλτιστη θερμοκρασία για την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης. Όσον αφορά τον *E. aerogenes*, μικρή επίδραση είχε η αλλαγή της θερμοκρασίας για τον σχηματισμό της 2,3-βουτανοδιόλης, παρ' όλα αυτά πρέπει να αναφερθεί ότι στους 37 °C η 2,3-βουτανοδιόλη παράχθηκε ταχύτερα (Barret EL, Collins EB, Hall BJ 1983). Σε άλλη περίπτωση, για τα βακτηριακά στελέχη *E. aerogenes* έχει αναφερθεί ως βέλτιστη θερμοκρασία οι 39 °C (Converti et al. 2003), και για τα στελέχη *B. polymyxa* στους 30 °C (Hespell 1996). Φαίνεται ξεκάθαρα με βάση τα όσα έχουν προαναφερθεί ότι διαφορετικά στελέχη έχουν διαφορετικές βέλτιστες θερμοκρασίες, οι οποίες θα πρέπει σε μετέπειτα στάδιο να καθοριστούν ξεχωριστά για κάθε στέλεχος και υπόστρωμα που χρησιμοποιείται (Celińska & Grajek 2009).

Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι πάνω από την βέλτιστη θερμοκρασία η υποβάθμιση των κυττάρων κυριαρχεί την διαδικασία ανάπτυξη τους. Με τη τιμή της θερμοκρασίας να αποκλίνει αρκετά από τη βέλτιστη θερμοκρασία να λαμβάνει χώρα κατά την διάρκεια της ζύμωσης η ρύθμιση του μεταβολισμού είναι πιθανό να μην επιτευχθεί (Pirt 1985).

1.6.3 pH

Ο τρίτος παράγοντας που επηρεάζει σημαντικά την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης είναι το pH. Θεωρείται σημαντική παράμετρος στη σύνθεση της βιομάζας αλλά και στη ρύθμιση του μεταβολισμού των μικροοργανισμών, με ιδιαίτερη επιρροή στις διαδικασίες σχηματισμού του τελικού προϊόντος. Σύμφωνα με τους Garg και Jain, οι αλκαλικές συνθήκες ευνοούν το σχηματισμό των οργανικών οξέων, με ταυτόχρονη μείωση στην απόδοση της 2,3-βουτανοδιόλης (Garg & Jain 1995). Σε αντίθεση με αυτό, κάτω από όξινες συνθήκες η παραγωγή των οργανικών οξέων μειώνεται και η σύνθεση της 2,3-βουτανοδιόλης αυξάνεται. Μερικά μικροβιακά στελέχη έχουν αναπτύξει μηχανισμό άμυνας ενάντια στο όξινο περιβάλλον με μεταγωγή του μεταβολισμού από την παραγωγή οξέος προς τη σύνθεση των λιγότερο τοξικών ενώσεων όπως αλκοόλες και 2,3-βουτανοδιόλης (Van Houdt et al. 2007). Ο Pirt το 1975 αναφέρει ότι στο βέλτιστο εύρος pH η μεταβολική αποδοτικότητα του μικροοργανισμού είναι υψηλή (Pirt 1985). Στη περίπτωση παραγωγής της 2,3-βουτανοδιόλης, το βέλτιστο pH εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το μικροοργανισμό και το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται (Celińska &

Grajek 2009). Για τα περισσότερα υποστρώματα, συμπεριλαμβανομένου και το υδρολυμένο ξύλο, η βέλτιστη περιοχή του pH έχει αναφερθεί ότι είναι 6-6.2 (Grover et al. 1990).

Όπως και στην περίπτωση της θερμοκρασίας, η βέλτιστη τιμή για pH εξαρτάται από το μικροοργανισμό και υπόστρωμα που χρησιμοποιείται (Celińska & Grajek 2009). Ωστόσο, αρκετοί ερευνητές αναφέρουν ότι η τιμή του pH δεν επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης, όσο η παρουσία του οξικού οξέος στο υγρό της ζύμωσης. Από την άλλη όμως, αναφέρεται ότι η συσσώρευση του οξικού οξέος δεν μπορεί να θεωρηθεί ως ο μόνος παράγοντας που επηρεάζει την παραγωγή της, εφόσον έχει παραχθεί με χρήση υποστρώματος γλυκερόλης σε ουδέτερο pH (Biebl, H.; Zeng, A. P.; Menzel, K.; Deckwer 1998).

1.6.4 Σύνθεση του θρεπτικού μέσου

Απαραίτητη προϋπόθεση για την ανάπτυξη και συντήρηση του μικροοργανισμού είναι το μέσο της καλλιέργειας να περιέχονται όλα τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά. Πιο συγκεκριμένα, ένα θρεπτικό μέσο εκτός από πηγή άνθρακα και αζώτου μπορεί να περιλαμβάνει και κάποια πρόσθετα όπως βιταμίνες και ιχνοστοιχεία (Ji et al. 2011; Garg & Jain 1995), η επιλογή των οποίων γίνεται σε ένα βαθμό ανάλογα με τα επιθυμητά προϊόντα της ζύμωσης (Garg & Jain 1995). Εκχύλισμα ζύμης, ουρία, άλατα αμμωνίου και ιχνοστοιχεία θεωρούνται σημαντικά όσον αφορά την πρωτεϊνική σύνθεση, όπου επηρεάζουν την βιομάζα που παράγεται (Ji et al. 2011). Το εκχύλισμα ζύμης αποτελεί εξαιρετική πηγή αζώτου, παρ' όλα αυτά το υψηλό κόστος του το καθιστά απαγορευτικό για χρήση του σε βιομηχανική κλίμακα (Garg & Jain 1995). Γενικότερα, τα σύνθετα θρεπτικά συστατικά έχουν υψηλό κόστος, επομένως εναλλακτική λύση αποτελεί η ουρία και το θειϊκό αμμώνιο (Sivakumar A, Swaminathan T 1995).

Οι Nakashimada et al. το 2000 αναφέρουν ότι επιτεύχθηκε ικανοποιητική παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης σε θρεπτικό μέσο το οποίο περιείχε οξικό, ηλεκτρικό και πυροσταφυλικό χρησιμοποιώντας το μικροοργανισμό *P. Polymyxa*. Με την παρουσία του οξικού στο μέσο έχει αποδειχθεί ότι είναι ο καλύτερος επαγωγέας δίνοντας έτσι υψηλότερη απόδοση και συγκέντρωση προϊόντων. Από την άλλη, η προσθήκη μηλικού, μυρμηκικού, γαλακτικού και βουτυρικού έδειξε να μην επιδρά στην παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης (Celińska & Grajek 2009). Οι Bryen et al. το 1973 αναφέρουν ότι το οξικό έχει πολλαπλές επιδράσεις στο μεταβολικό μονοπάτι της 2,3-βουτανοδιόλης. Πιο

συγκεκριμένα, επάγει την συνθετάση του α-ακετογαλακτικού, την αποκαρβοξυλάση του α-ακετογαλακτικού και την αναγωγή της ακετοΐνης. Ρυθμίζει επίσης την ισορροπία μεταξύ ακετοΐνης και 2,3-βουτανοδιόλης (Bryn et al. 1973).

Στην περίπτωση του μικροοργανισμού *K. pneumoniae*, δεν θεωρείται απαιτητικός όσον αφορά τις διατροφικές του ανάγκες. Παρουσιάζει ικανοποιητικά αποτελέσματα όσον αφορά τη παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης όταν καλλιεργείται σε θρεπτικά μέσα που περιέχουν σάκχαρα και ανόργανα άλατα. Επιπρόσθετα σε καλλιέργειες του μικροοργανισμού *B. licheniformis* με την προσθήκη πεπτόνης και εκχυλίσματος κρέατος παρατηρήθηκε υψηλότερη παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης σε σχέση με αντίστοιχες καλλιέργειες με την χρήση των μικροοργανισμών *B. polymyxa* και *K. oxytoca* (Nilegaonkar et al. 1992).

Επομένως, με όσα έχουν προαναφερθεί πιο πάνω γίνεται αντιληπτό ότι η σύσταση του θρεπτικού μέσου καθορίζεται σύμφωνα με τις ανάγκες του εκάστοτε μικροοργανισμού που θα λάβει μέρος στη ζύμωση, αλλά και τα επιθυμητά προϊόντα στο τέλος κάθε ζύμωσης.

1.7 Ανάκτηση 2,3-βουτανοδιόλης

Τα βιοτεχνολογικά προϊόντα είναι γνωστό ότι περιέχονται σε ένα πολύπλοκο ρευστό υγρό ζύμωσης το οποίο περιέχει υπόστρωμα, μεταβολικά προϊόντα αλλά και βιομάζα στο τέλος κάθε ζύμωσης. Επομένως η ανάκτηση του επιθυμητού τελικού προϊόντος είναι μια διαδικασία κλειδί η οποία μπορούμε να πούμε ότι καθορίζει σε μεγάλο βαθμό αν είναι εφικτή η παραγωγή του προϊόντος σε βιομηχανική κλίμακα.

Στην περίπτωση της 2,3-βουτανοδιόλης υπάρχουν μεγάλες δυσκολίες στην ανάκτηση της. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες της 2,3-βουτανοδιόλης κάνουν την ανάκτησή της από το υγρό ζύμωσης ένα εξαιρετικά δύσκολο έργο με συμβατικές μεθόδους (Magee & Kosaric 1987). Το υψηλό σημείο ζέσεως που την χαρακτηρίζει, η μεγάλη συγγένεια της με το νερό και η παρουσία διαλυτών και στερεών συστατικών στο υγρό της ζύμωσης καθιστούν δύσκολη την διαδικασία ανάκτησης της (Garg & Jain 1995). Πιο συγκεκριμένα, το υψηλό σημείο ζέσεως καθιστά την απόσταξη υπό κενό μη αποτελεσματική για την ανάκτηση της (Underkofler, L. A. & Hickey 1954). Σύμφωνα με τους Magee (1987) εάν στο υγρό ζύμωσης προστεθεί υγρό με αρκετά υψηλό σημείο ζέσεως όπως για παράδειγμα η γλυκερόλη διευκολύνεται η απόσταξη της 2,3-

βουτανοδιόλης (Magee & Kosaric 1987). Επιπρόσθετα, τα διαλυτά συστατικά στο υγρό δημιουργούν ένα παχύ στρώμα το οποίο δεσμεύει και επιβραδύνει την εξάτμιση της 2,3-βουτανοδιόλης (Underkofler, L. A. & Hickey 1954). Η επαναλαμβανόμενη εκχύλιση με διαλύτη είναι μία μέθοδος ανάκτησης η οποία έχει χρησιμοποιηθεί με κάποια επιτυχία. Ένας αριθμός διαλυτών είναι κατάλληλοι για την διαδικασία αυτή. Συγκεκριμένα από τον Johnson το 1944 είχαν προταθεί ο οξικός αιθυλεστέρας, διαίθυλαιθέρας και n-βουτανόλη (Johnson 1944). Μέθοδοι με διαλύτες εκχύλισης έχουν χρησιμοποιηθεί με μικρή επιτυχία σε εργαστηριακή κλίμακα. Ο Tsao το 1978 διαπίστωσε ότι το 75% της 2,3-βουτανοδιόλης που είναι παρών στο υγρό ζύμωσης μπορεί να ανακτηθεί με εκχύλιση με χρήση διαίθυλαιθέρα. Επίσης, η ανάκτηση των παραπροϊόντων, και πιο συγκεκριμένα αιθανόλης και ακετοΐνης είχε επιτυχία 65% και 25% αντίστοιχα. Παρ' όλα αυτά η πιο πρακτική μέθοδος ανάκτησης της 2,3-βουτανοδιόλης φαίνεται να περιλαμβάνει μεταφορά μάζας με ρεύμα αντίθετης ροής (Countercurrent steam stripping) (Garg & Jain 1995; Magee & Kosaric 1987). Η μέθοδος αυτή είχε αναπτυχθεί από τους Wheat et al. (1948) σε πιλοτική μονάδα. Το μεγάλο ποσοστό ενέργειας όμως που απαιτείται για τη διαδικασία αυτή αποτρέπει την εφαρμογή της σήμερα. Σύμφωνα με τον Sridhar 1989 μια διαδικασία με αντίστροφη ώσμωση και απόσταξη μπορεί να μειώσει ελαφρώς το κόστος επεξεργασίας (Sridhar S. 1989).

Μέχρι σήμερα δεν έχει αναπτυχθεί οικονομική ανάκτηση της 2,3-βουτανοδιόλης. Η εύρεση μιας εφαρμόσιμης και οικονομικής μεθόδου για την ανάκτηση της είναι βέβαιο ότι θα βοηθήσει στην ανάπτυξη της διαδικασίας σε βιομηχανική κλίμακα (Garg & Jain 1995). Επομένως με όσα έχουν προαναφερθεί γίνεται αντιληπτό ότι όσον αφορά τον τομέα της ανάκτησης χρειάζεται περαιτέρω έρευνα ώστε το προϊόν να αποκτήσει εμπορική βιωσιμότητα.

1.8 Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης είναι η βιοτεχνολογική παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης αξιοποιώντας ακατέργαστη ζάχαρη που παράγεται κατά την επεξεργασία του ζαχαροκάλαμου. Πιο συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκαν ημι-συνεχείς βακτηριακές ζυμώσεις σε βιοαντιδραστήρα με τη χρήση του βακτηριακού στελέχους *Enterobacter ludwigi*, σε υπόστρωμα ακατέραστης ζάχαρης και εμπορικά σκευάσματα αζώτου και αλάτων. Μελετήθηκε η επίδραση του οξυγόνου στις μεταβολικές ανάγκες

του μικροοργανισμού καθώς και η θερμοκρασία και το pH να αποτελεί το κύριο μέρος της μελέτης, με σκοπό τη βελτιστοποίηση της παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης. Αναλυτικά, διαφορετικές συνθήκες αερισμού και ανάδευσης, pH και θερμοκρασίας μεταβάλλονταν με σκοπό τη βελτιστοποίηση της διεργασίας. Επίσης, έμφαση έχει δοθεί στον συντελεστή μεταφοράς μάζας του οξυγόνου (KLa) και την επίδρασή του στην ανάπτυξη της βιομάζας και την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης, σαν κύριο μεταβολικό προϊόν.

2 Μεθοδολογία Έρευνας

2.1 Βιολογικό υλικό

Ο μικροοργανισμός που χρησιμοποιήθηκε για την παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη είναι ο *Enterobacter ludwigii*, ο οποίος ανήκει στην οικογένεια *Enterobacteriaceae*. Το συγκεκριμένο βακτήριο ανήκει στην τράπεζα του εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Στο συγκεκριμένο μικροοργανισμό, μακροχρόνια αποθήκευση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία -80°C σε διάλυμα γλυκερόλης προκειμένου να διατηρηθούν βιώσιμα τα κύτταρα για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα, εφόσον κάτω από τέτοιες συνθήκες οι διάφορες λειτουργίες αναστέλλονται.

2.2 Προετοιμασία υγρού εμβολίου

Η παρασκευή και ανάπτυξη του υγρού εμβολίου, ή αλλιώς προκαλλιέργειας πραγματοποιήθηκε σε κωνικές φιάλες των 500 mL πληρωμένες μέχρι τα 200 mL, με θρεπτικό μέσο αποτελούμενο από (g.L⁻¹):10 ακατέργαστης ζάχαρης, 2 K₂HPO₄, 5 CH₃COONa, 0.84 MgSO₄ x 7H₂O, 0.06 MnSO₄ x H₂O, 5 πεπτόνη, 5 εκχύλισμα κρέατος και 2.5 εκχύλισμα ζύμης. Τα διάφορα υλικά και θρεπτικά που χρησιμοποιήθηκαν αποστειρώθηκαν για 20 min στους 121°C. Τέλος, οι κωνικές φιάλες εμβολιάστηκαν με ένα φιαλίδιο (Cryo Vial), στο οποίο φυλασσόταν το εναιώρημα κυττάρων. Ακολούθως οι κωνικές επώαστηκαν για 12-14 ώρες στους 30°C με ανάδευση 180 rpm. Στη συνέχεια κάτω από ασηπτικές συνθήκες το εμβόλιο (10%, v/v) προτίθεται στο θρεπτικό μέσο της ζύμωσης.

2.3 Θρεπτικό μέσο για βιοτεχνολογική παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης

Για την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης και άλλων δευτερογενών μεταβολίτων ο μικροοργανισμός καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό μέσο με σύσταση ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): 50 ακατέργαστης ζάχαρης ως πηγή άνθρακα, 7.2 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 6 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0.45 KOH, 0.51 EDTA, 0.3 $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0.09 $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0.0225 $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0075 $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ και 0.0038 $\text{MnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$. Και σε αυτή τη περίπτωση τα υλικά και θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν αποστειρώθηκαν για 20 min στους 121°C , με την πηγή άνθρακα να αποστειρώνεται ξεχωριστά.

2.4 Συνθήκες ζύμωσης

2.4.1 Επίδραση του ρυθμού αερισμού στη βιοτεχνολογική παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης

Κατά το πρώτο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας μελετήθηκε η επίδραση του ρυθμού ανάδευσης με τους ρυθμούς ανάδευσης να κυμαίνονται σε διαφορετικά όρια (150-250 rpm, 150-300 rpm, 150-400 rpm), προκειμένου να διατηρηθεί το επίπεδο του διαλυτού οξυγόνου στο 5%, με σταθερό αερισμό στο 1 vvm σε ημι-συνεχείς καλλιέργειες. Οι συνθήκες που επικρατούσαν για την πραγματοποίηση των συγκεκριμένων πειραμάτων ήταν οι 30°C και το pH να διατηρείται σταθερό σε τιμή 6.8 ± 0.2 . Ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκε ακατέργαστη ζάχαρη. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε βιοαντιδραστήρα (Labfors, Infors4) χωρητικότητας 3.7 L με συνολικό ενεργό όγκο στο 1 L σε ημι-συνεχείς ζυμώσεις, με πυκνό διάλυμα ακατέργαστης ζάχαρης να προστίθεται όταν η συγκέντρωση των σακχάρων στο υγρό της ζύμωσης ήταν περίπου στα $20 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ με σκοπό να διατηρείται σε αυτό το επίπεδο καθ' όλη τη διάρκεια.



Εικόνα 4: Ημι-συνεχής ζύμωση του μικροοργανισμού *Enterobacter ludwigii* σε βιοαντιδραστήρα όγκου 3.7 L.

2.4.2 Βελτιστοποίηση των παραμέτρων pH και θερμοκρασίας για τη βιοτεχνολογική παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης

Όσον αφορά τη ζύμωση της 2,3-βουτανοδιόλης, έχει αναφερθεί ότι η παροχή οξυγόνου θεωρείται ως η πιο σημαντική μεταβλητή της ζύμωσης (Converti et al. 2003). Παρ' όλα αυτά παράγοντες όπως το pH και θερμοκρασία, δεν έχουν μελετηθεί αρκετά ούτως ώστε να καθοριστεί η βαρύτητα και η σημασία τους στη παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης αλλά και των υπό-προϊόντων της ζύμωσης.

Ακολούθως, το δεύτερο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας είχε ως στόχο να διερευνηθεί η επίδραση της θερμοκρασίας και pH στη βιοτεχνολογική παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης, βιομάζας και των παραπροϊόντων της ζύμωσης. Επομένως μια σειρά από ημι-συνεχείς ζυμώσεις πραγματοποιούνται με διαφορετικούς συνδυασμούς pH και θερμοκρασίας. Στην παρούσα σειρά πειραμάτων πραγματοποιήθηκαν ημι-συνεχείς καλλιέργειες με ρυθμό ανάδευσης από 100-250 rpm, προκειμένου να διατηρηθεί το επίπεδο του διαλυτού οξυγόνου στο 5% και σταθερό αερισμό στο 1 vvm με πηγή άνθρακα ακατέργαστη ζάχαρη. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε βιοαντιδραστήρα (New Brunswick Scientific Co, USA) χωρητικότητας 1 L με συνολικό

ενεργό όγκο στο 0.6 L, με πυκνό διάλυμα ακατέργαστης ζάχαρης να προστίθεται όταν η συγκέντρωση των σακχάρων στο υγρό της ζύμωσης ήταν περίπου στα 20 g.L⁻¹ με σκοπό να διατηρείται σε αυτό το επίπεδο καθ' όλη τη διάρκεια.



Εικόνα 5: Ημι-συνεχής ζύμωση του μικροοργανισμού *Enterobacter ludwigii* σε βιοαντιδραστήρα όγκου 1 L.

2.4.2.1 Σχεδιασμός έρευνας-Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός (CCD)

Επομένως, κατά το δεύτερο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας πραγματοποιήθηκε πειραματικός σχεδιασμός με τη βοήθεια του λογισμικού JMP 8. Η παρούσα διαδικασία είχε ως στόχο τον προσδιορισμό των συνθηκών όσον αφορά το pH και θερμοκρασία, που επηρεάζουν την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης και των υπό-προϊόντων στη ζύμωση. Πιο αναλυτικά, ένα κεντρικό σχέδιο υλοποιήθηκε (CCD) για ένα εύρος θερμοκρασιών και pH. Ένα 3² κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός (CCD) αναπτύχθηκε έτσι ώστε να εισάγει τετραγωνικούς όρους, και ως εκ τούτου, να επιτρέπει την εκτίμηση της καμπυλότητας για την πρόβλεψη της βέλτιστης συγκέντρωσης της 2,3-βουτανοδιόλης και των υπό-προϊόντων της ζύμωσης. Για την υλοποίηση του συγκεκριμένου μοντέλου πραγματοποιήθηκαν στο σύνολο δέκα πειράματα, τα οποία αντιπροσωπεύουν όλους τους πιθανούς συνδυασμούς του CCD. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν από μία φορά, με εξαίρεση τα δύο πειράματα (επαναλήψεις) που έγιναν στο επίπεδο, ούτως ώστε να αποδειχθεί ότι το μοντέλο είναι επαρκές. Ο Πίνακας 1 παρουσιάζει το σχεδιασμό των πειραμάτων και τα αντίστοιχα εύρη των δύο εξεταζόμενων παραγόντων.

Πίνακας 1: Εξεταζόμενες τιμές εύρους των παραμέτρων pH και θερμοκρασίας του CCD

Επίπεδο	pH	Θερμοκρασία (°C)
1.414	7.5	40
1	7.2	38
0	6.5	33
-1	5.8	28
-1.414	5.5	26

Για την κωδικοποίηση των εξεταζόμενων μεταβλητών χρησιμοποιήθηκε η Εξίσωση 1:

$$x_i = \frac{X_i - X_i^{CP}}{\Delta X_i} \quad \text{Εξίσωση 1.}$$

Όπου: i είναι οι ανεξάρτητες μεταβλητές (pH και θερμοκρασία), x_i είναι η κωδικοποιημένη τιμή, X_i είναι η πραγματική τιμή, X_i^{CP} είναι η πραγματική τιμή της εξεταζόμενης μεταβλητής στο βασικό επίπεδο και ΔX_i είναι η τιμή του βήματος αλλαγής.

Η απόκριση του μοντέλου προβλέφθηκε χρησιμοποιώντας μια πολυωνυμική εξίσωση 2ου βαθμού (Εξίσωση 2).

$$Y = b_1 + b_2 x_1 + b_3 x_2 + b_4 x_1 x_2 + b_5 x_1^2 + b_6 x_2^2 \quad \text{Εξίσωση 2.}$$

Όπου: το Y είναι η απόκριση του μοντέλου η οποία στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι η συγκέντρωση της παραγόμενης 2,3-βουτανοδιόλης σε g.L^{-1} , b_1 είναι το σημείο τομής, b_2 και b_3 είναι οι γραμμικές επιδράσεις των παραμέτρων θερμοκρασίας αντίστοιχα, b_4 είναι η παράμετρος αλληλεπίδρασης και b_5 και b_6 είναι οι τετραγωνικές παράμετροι για το pH και τη θερμοκρασία αντίστοιχα. Οι παράμετροι υπολογίστηκαν με την μέθοδο της γραμμικής παλινδρόμησης ελαχιστοποιώντας τις προβλεπόμενες με τις πειραματικές τιμές.

2.5 Μέθοδοι ανάλυσης

2.5.1 Προσδιορισμός σακχάρων και δευτερογενών μεταβολίτων με υγρή χρωματογραφία υψηλής αποδόσεως (HPLC)

Ο προσδιορισμός των σακχάρων και των δευτερογενών μεταβολίτων της ζύμωσης πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια της υγρής χρωματογραφίας υψηλής αποδόσεως (HPLC) με τη χρήση του συστήματος SHIMADZU UFLC XR. Συγκεκριμένα, η στήλη με την οποία επιτεύχθηκε ο διαχωρισμός του δείγματος ήταν τύπου Phenomenex Rezex ROA (300mm x 7.8mm). Η ταυτοποίηση των διάφορων χημικών ενώσεων, καταναλωθέντων σακχάρων και παραγόμενων προϊόντων ζύμωσης, βασίστηκε στο χρόνο κατακράτησης, ο οποίος συγκρίθηκε με γνωστά πρότυπα αυτών. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε διάλυμα H₂SO₄ (10mM), η ροή κατά την ανάλυση των δειγμάτων ήταν καθορισμένη στο 0.6 mL min⁻¹, με τη θερμοκρασία στήλης να είναι στους 65 °C. Από τη στήλη περνούσαν 10 μL δείγματος και η διάρκεια της ανάλυσης ήταν 24 min.

2.5.2 Προσδιορισμός βιομάζας

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της βιομάζας πραγματοποιήθηκε με μέτρηση του ξηρού βάρους. Πιο αναλυτικά, για τα διάφορα σημεία της ζύμωσης όπου γινόταν δειγματοληψία 4 mL, 1.5 mL δείγματος τοποθετήθηκε σε eppendorf χωρητικότητας 2 mL και ακολούθησε φυγοκέντρηση των κυττάρων για 5 min σε rpm σε φυγόκεντρο τύπου Hitachi U-2000 (Japan). Στη συνέχεια έγινε έκπληση των κυττάρων με χρήση απιονισμένου νερού και τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν για δεύτερη φορά. Έπειτα ακολούθησε μεταφορά της βιομάζας σε προ-ζυγισμένα φιαλίδια τα οποία τοποθετήθηκαν στο φούρνο ξήρανσης σε θερμοκρασία 70± 5 °C μέχρι σταθεροποίηση του βάρους τους. Το ξηρό υπόλειμμα ζυγίζόταν σε ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων και εκφραζόταν σε g.L⁻¹.

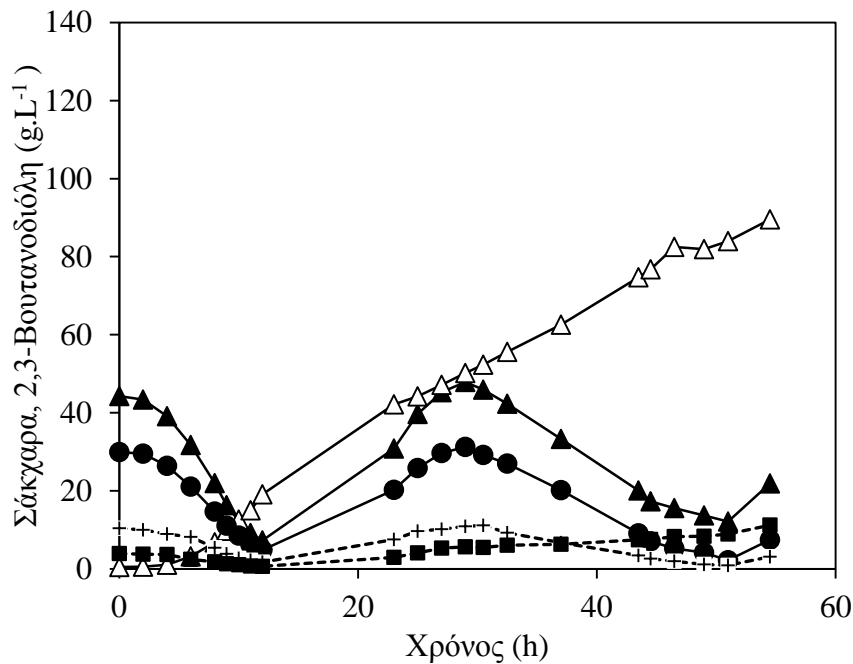
Επιπρόσθετα, προσδιορισμός της βιομάζας έγινε και έμμεσα με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας του δείγματος (Optical density, OD). Από τα 4 mL δείγματος, μικρή ποσότητα δείγματος μετά από κατάλληλη αραιώση με χρήση απιονισμένου νερού τοποθετήθηκαν σε κυψελίδα χωρητικότητας 2 mL. Τέλος πραγματοποιήθηκε μέτρηση της οπτικής πυκνότητας σε μήκος κύματος 650 nm σε φασματοφωτόμετρο διπλής θλάσεως τύπου Hitachi.

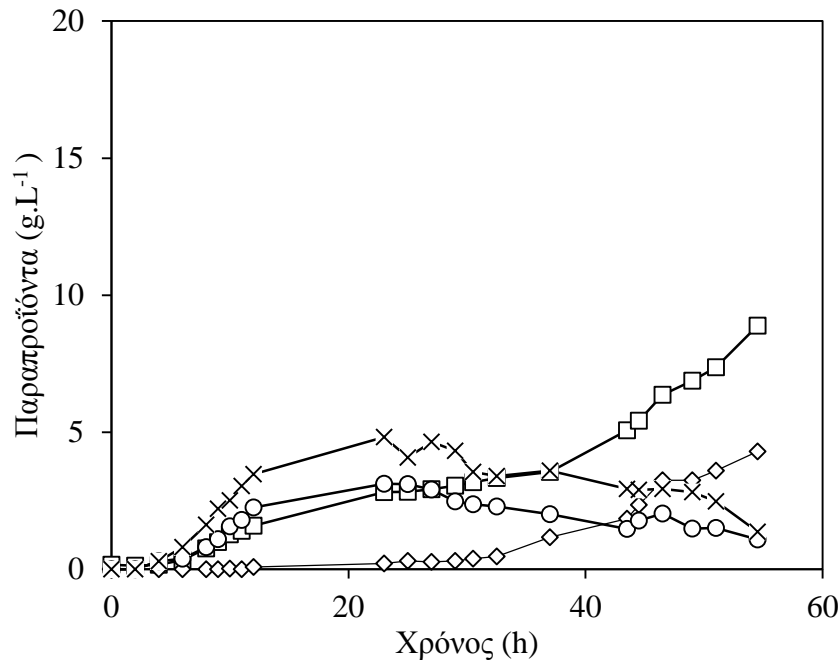
3 Αποτελέσματα

3.1 Επίδραση διαφορετικών συνθηκών ανάδευσης στη ζύμωση

Κατά το πρώτο στάδιο της μελέτης, που είχε ως στόχο τη διερεύνηση της επίδρασης αερισμού στη βιοτεχνολογική παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης, πραγματοποιήθηκαν τρεις ημι-συνεχείς ζυμώσεις. Στις εξής ζυμώσεις η ταχύτητα ανάδευσης κυμαινόταν από 150-250 rpm, 150-300 rpm και 150-400 rpm προκειμένου το επίπεδο του διαλυτού οξυγόνου να διατηρηθεί στο 5%, με σταθερή τη παροχή αερισμού στο 1 vvm. Στις ζυμώσεις η πηγή άνθρακα που χρησιμοποιήθηκε ήταν σε αρχική συγκέντρωση 50 g.L^{-1} . Αντίθετα στην ζύμωση με ρυθμό ανάδευσης 150-400 rpm η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων ήταν 80 g.L^{-1} .

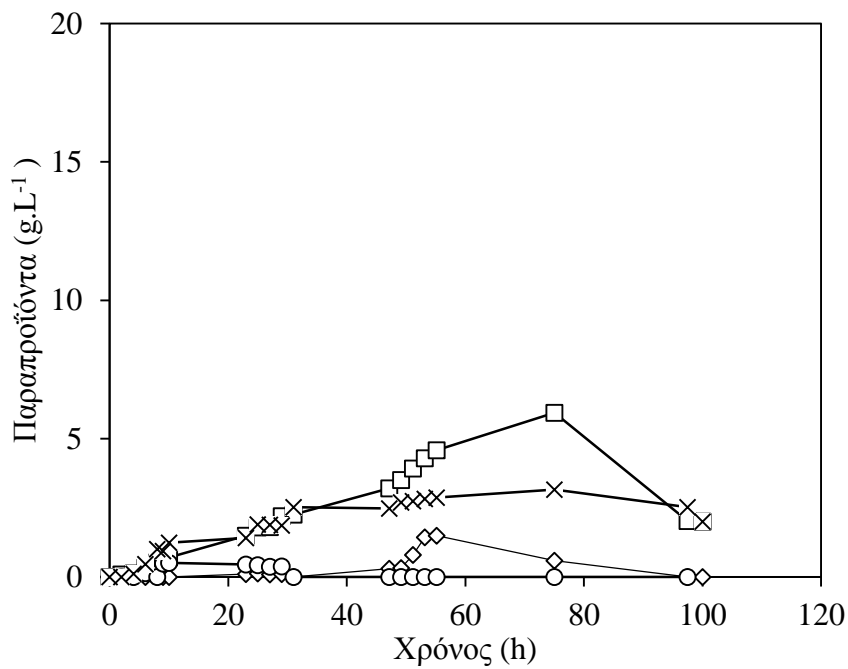
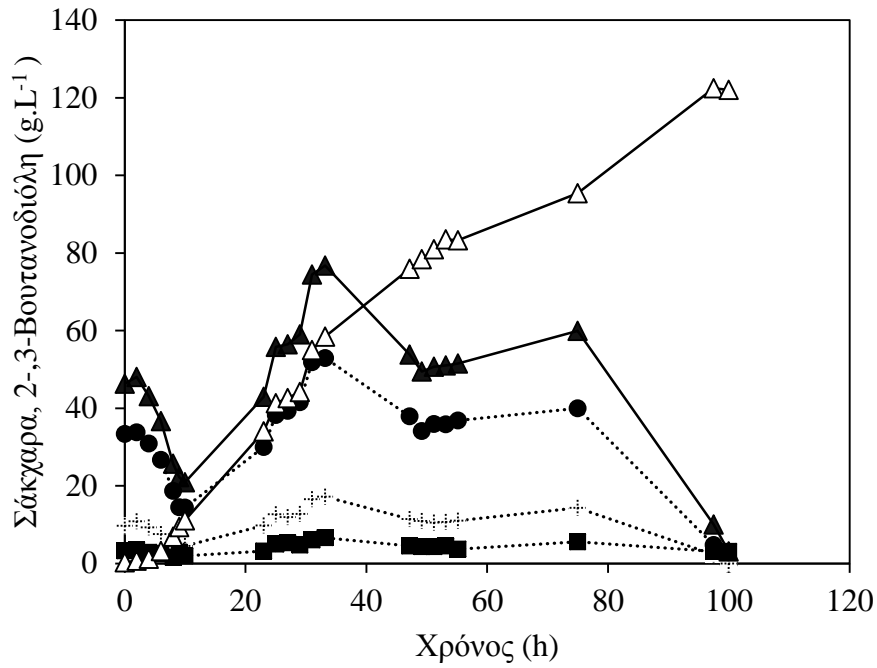
Κατά την ημι-συνεχή καλλιέργεια με τη ταχύτητα ανάδευσης να κυμαίνεται από 150-250 rpm (Διάγραμμα 1) η συγκέντρωση της 2,3-βουτανοδιόλης έφτασε τα 89.6 g.L^{-1} με συντελεστή απόδοσης 0.47 g.g^{-1} και παραγωγικότητα $1.64 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Η συγκεκριμένη συγκέντρωση επιτεύχθηκε στις 54.5h με τη συνολική συγκέντρωση των υπό-προϊόντων να ισούται με 16.51 g.L^{-1} .





Διάγραμμα 1: 2,3-Βουτανοδιόλη (Δ), ηλεκτρικό οξύ (□), γαλακτικό οξύ (◇), μυρμηγκικό οξύ (○), και αιθανόλη (×) παραγωγή καθώς επίσης και κατανάλωση σακχάρων (▲), σακχαρόζη (●), γλυκόζη (+), φρουκτόζη (■) κατά τη διάρκεια ημι-συνεχούς ζύμωσης με χρήση ακατέργαστης σακχαρόζης, 1 vvm αερισμό, ρυθμό ανάδευσης 150-250 rpm.

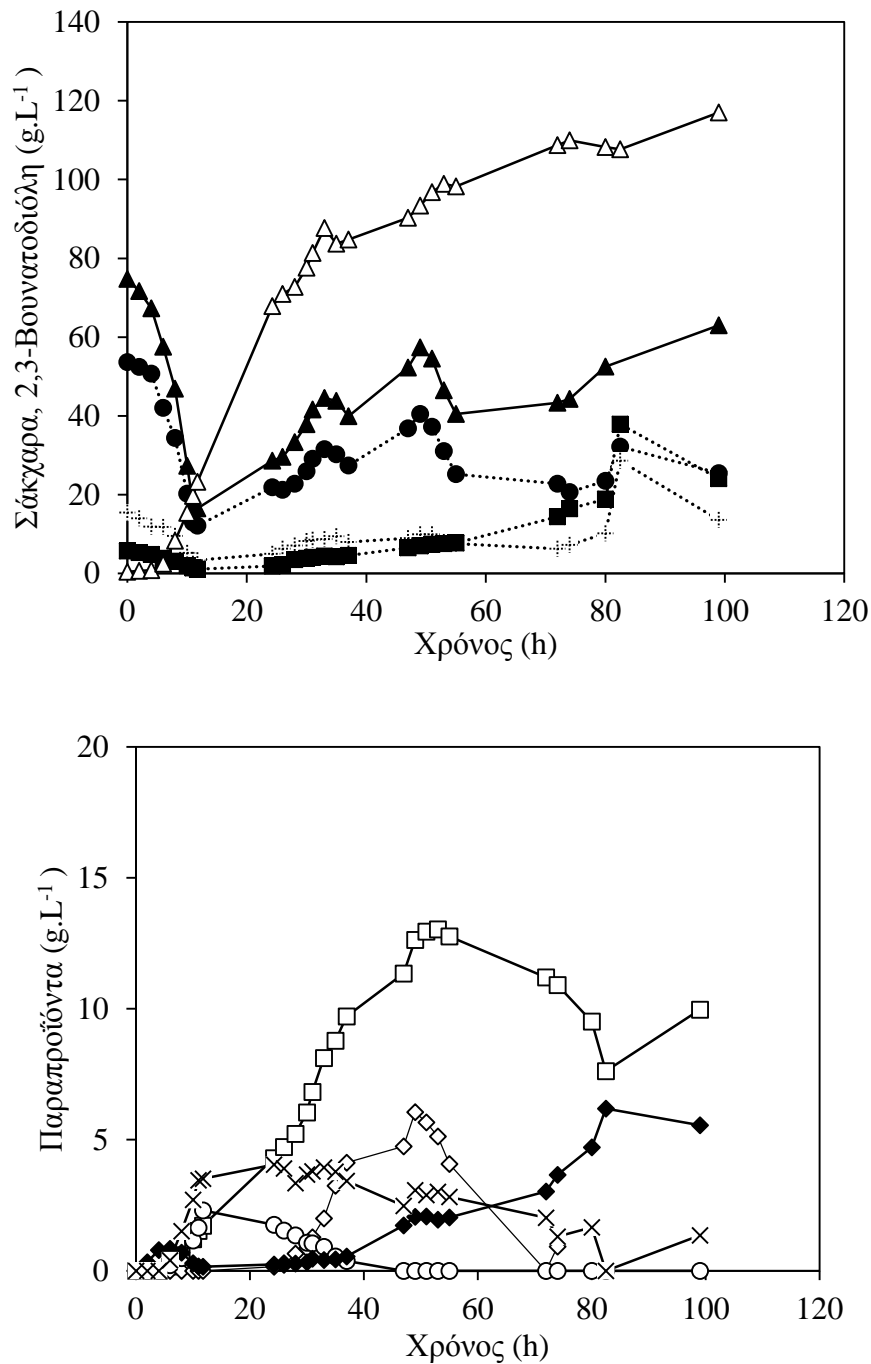
Ακολούθως, με μεταβολή της ταχύτητας ανάδευσης σε 150-300 rpm η ζύμωση είχε διάρκεια 100h με τη συγκέντρωση της 2,3-βουτανοδιόλης να φτάνει 122 g.L⁻¹ με το συντελεστή απόδοσης και τη παραγωγικότητα να είναι 0.44 g.g⁻¹ και 1.22 g.L⁻¹.h⁻¹ αντίστοιχα (Διάγραμμα 2). Στις συγκεκριμένες συνθήκες η συνολική συγκέντρωση των υπό-προϊόντων στο τέλος της ζύμωσης ήταν σε αρκετά χαμηλή συγκέντρωση 4 g.L⁻¹, σε ίση ποσότητα το ηλεκτρικό οξύ και η αιθανόλη, 4 φορές μικρότερη συγκέντρωση υπό-προϊόντων σε σχέση με το ρυθμό ανάδευσης 150-250 rpm.



Διάγραμμα 2: 2,3-Βουτανодиόλη (Δ), ηλεκτρικό οξύ (\square), γαλακτικό οξύ (\diamond), μυρμηγκικό οξύ (\circ), και αιθανόλη (\times) παραγωγή καθώς επίσης και κατανάλωση σακχάρων (\blacktriangle), σακχαρόζη (\bullet), γλυκόζη ($+$), φρουκτόζη (\blacksquare) κατά τη διάρκεια ημι-συνεχούς ζύμωσης με χρήση ακατέργαστης σακχαρόζης, 1 νπμ αερισμό, ρυθμό ανάδευσης 150-300 rpm.

Τέλος, σε συνθήκες ανάδευσης 150-400 rpm επιτεύχθηκε παραγωγή 2,3-βουτανодиόλης 117 g.L⁻¹ στις 99 h με συντελεστή απόδοσης 0.29 g.g⁻¹ και

παραγωγικότητα $1.18 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (Διάγραμμα 3). Σε αυτή την περίπτωση ευνοήθηκε περισσότερο η παραγωγή βιομάζας σε σύγκριση με τα προηγούμενα δύο πειράματα (Πίνακας 2), με τη συνολική συγκέντρωση να είναι 10.4 g.L^{-1} . Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι η ταχύτητα κατά τις πρώτες δύο ώρες της ζύμωσης διατηρήθηκε στις 150 rpm, ενώ στην συνέχεια αυξήθηκε στο μέγιστο για κάθε περίπτωση και παρέμεινε μέχρι το τέλος της ζύμωσης.



Διάγραμμα 3: 2,3-Βουτανοδιόλη (Δ), ηλεκτρικό οξύ (\square), γαλακτικό οξύ (\diamond), μυρμηγκικό οξύ (\circ), οξικό οξύ (\blacklozenge) και αιθανόλη (\times) παραγωγή καθώς επίσης και κατανάλωση

σακχάρων (▲),σακχαρόζη (●), γλυκόζη (+), φρουκτόζη (■) κατά τη διάρκεια ημι-συνεχούς ζύμωσης με χρήση ακατέργαστης σακχαρόζης, 1 vvm αερισμό, ρυθμό ανάδευσης 150-400 rpm.

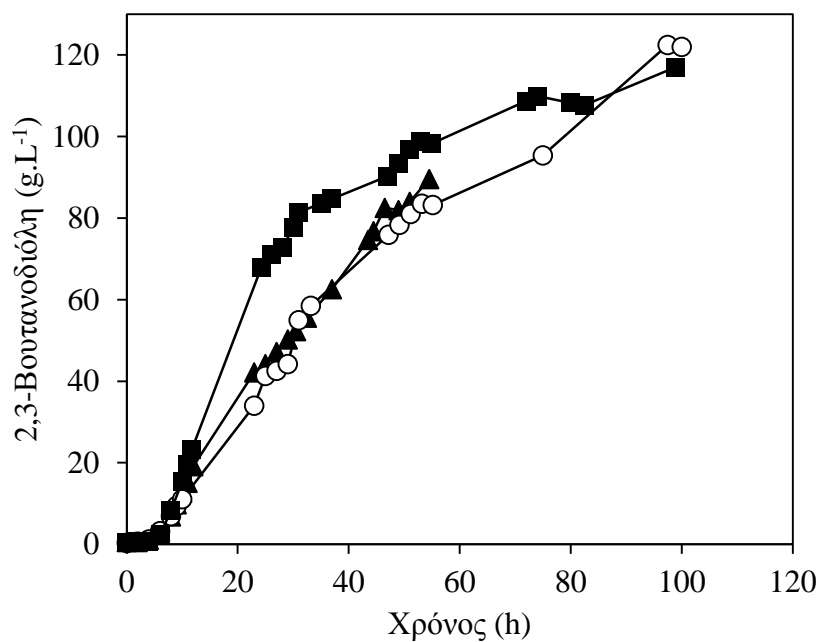
Στον Πίνακα 2 συνοψίζονται τα αποτελέσματα για τις διαφορετικές συνθήκες ανάδευσης που μελετήθηκαν. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτά προκύπτει ότι σε χαμηλό ρυθμό ανάδευσης, επομένως λιγότερη διαθεσιμότητα διαλυτού οξυγόνου στο υγρό της ζύμωσης επιτυγχάνεται υψηλότερος συντελεστής απόδοσης κατά την διάρκεια της ζύμωσης. Επιπλέον, όσον αφορά τα παραπροϊόντα, η ζύμωση που πραγματοποιήθηκε με το ρυθμό ανάδευσης να κυμαίνεται από 150-400 rpm, παρουσίασε την μεγαλύτερη συγκέντρωση σε παραπροϊόντα με το ηλεκτρικό οξύ να κυριαρχεί από τα υπόλοιπα (10 g.L⁻¹). Επιπρόσθετα παρατηρούμε ότι αυξάνοντας το εύρος ανάδευσης ευνοείται η παραγωγή βιομάζας. Για τις συνθήκες ανάδευσης 150-250 rpm (7.7 g.L⁻¹) και 150-300 rpm (6.7 g.L⁻¹) η συγκέντρωση βιομάζας κυμάνθηκε περίπου στο ίδιο επίπεδο. Αντίθετα, με ανάδευση 150-400 rpm η συγκέντρωση της βιομάζας ήταν 10.4 g.L⁻¹, παράλληλα όμως μειώνεται ο συντελεστής απόδοσης της 2,3-βουτανιοδιόλης.

Πίνακας 2: Σύνοψη αποτελεσμάτων για τις ημι-συνεχείς ζυμώσεις υπό διαφορετικές συνθήκες ανάδευσης.

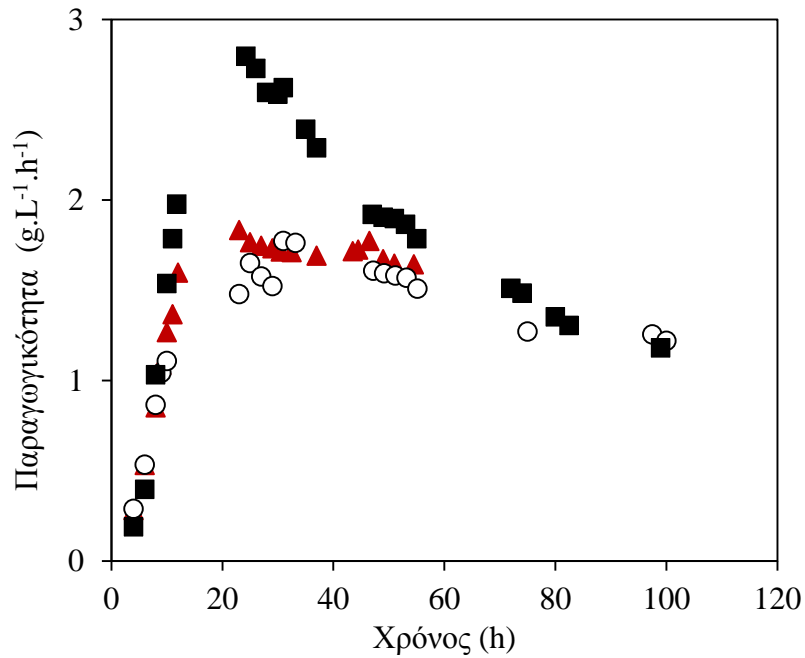
rpm	vvm	Time (h)	μ (h ⁻¹)	X _{max} (g.L ⁻¹)	BDO (g.L ⁻¹)	Y (g.g ⁻¹)	P (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	SA (g.L ⁻¹)	LA (g.L ⁻¹)	FA (g.L ⁻¹)	AA (g.L ⁻¹)	EtOH (g.L ⁻¹)
150-250	1	46.5	0.23	7.69	82.5	0.48	1.77	6.4	3.2	2.0	0.7	2.9
		54.5			89.6	0.47	1.64	8.9	4.3	1.1	0.9	1.4
150-300	1	53.17	0.23	6.73	83.5	0.48	1.57	4.3	1.4	0.0	0.0	2.8
		100			122	0.44	1.22	2.0	0.0	0.0	0.0	2.0
150-400	1	31	0.25	10.42	81.3	0.43	2.62	6.8	1.3	1.1	0.5	3.8
		51			96.8	0.32	1.90	13.0	5.7	0.0	2.1	2.9
		99			117	0.29	1.18	10.0	0.2	0.0	5.6	1.4

μ: Ειδικός ρυθμός ανάπτυξης, X_{max}: Βιομάζα, BDO:2,3-Βουτανιοδιόλη, Y: Απόδοση, P: Παραγωγικότητα, SA: Ηλεκτρικό οξύ, LA: Γαλακτικό οξύ, FA: Μυρμηγκικό οξύ, AA: Οξικό οξύ, EtOH: Αιθανόλη

Συγκρίνοντας τους διαφορετικούς ρυθμούς ανάδευσης, ικανοποιητικότερα αποτελέσματα ως προς την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης παρατηρήθηκαν κατά την ημι-συνεχή καλλιέργεια με ρυθμό ανάδευσης 150-400 rpm. Παρατηρούμε ότι επιτυγχάνεται υψηλότερη παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης σε πιο σύντομο χρονικό διάστημα σε σχέση με τα υπόλοιπα δύο πειράματα (Διάγραμμα 4). Το πιο πάνω συμπέρασμα φαίνεται πιο ξεκάθαρα από το Διάγραμμα 5, στο οποίο παρουσιάζει τη παραγωγικότητα της 2,3-βουτανοδιόλης κατά την διάρκεια των ζυμώσεων. Η συνθήκη ανάδευσης 150-400 rpm παρουσιάζει υψηλότερη παραγωγικότητα καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ζυμώσεις.



Διάγραμμα 4: Κινητική εξέλιξη της παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης για τις διαφορετικές συνθήκες ανάδευσης 150-250 rpm (▲), 150-300 rpm (○) και 150-400 rpm (■) σε συνάρτηση με το χρόνο.



Διάγραμμα 5: Ρυθμός παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης για τις διαφορετικές συνθήκες ανάδευσης 150-250 grm(▲), 150-300 grm (○) και 150-400 grm (■) σε συνάρτηση με το χρόνο.

3.2 Βελτιστοποίηση του pH και της θερμοκρασίας στη βιοτεχνολογική παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης

Όπως έχει προαναφερθεί για τη διερεύνηση της επίδρασης θερμοκρασίας και pH στη βιοτεχνολογική παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης πραγματοποιήθηκε ένας πειραματικός σχεδιασμός με σύνολο 10 πειράματα. Στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται οι κωδικοποιημένες και πραγματικές τιμές των εξεταζόμενων μεταβλητών (pH και θερμοκρασία).

Πίνακας 3: Κωδικοποιημένες και πραγματικές τιμές των εξεταζόμενων μεταβλητών pH και θερμοκρασίας.

Αριθμός πειραμάτων	Κωδικοποιημένες Τιμές		Πραγματικές τιμές	
	x ₁ (pH)	x ₂ (T°C)	X ₁ (pH)	X ₂ (T°C)
1	-1	-1	5.8	28
2	1	1	7.2	38
3	0	0	6.5	33
4	-1.414	0	5.5	33
5	1.414	0	7.5	33
6	0	-1.414	6.5	26
7	0	0	6.5	33
8	0	1.414	6.5	40
9	-1	1	5.8	38
10	1	-1	7.2	28

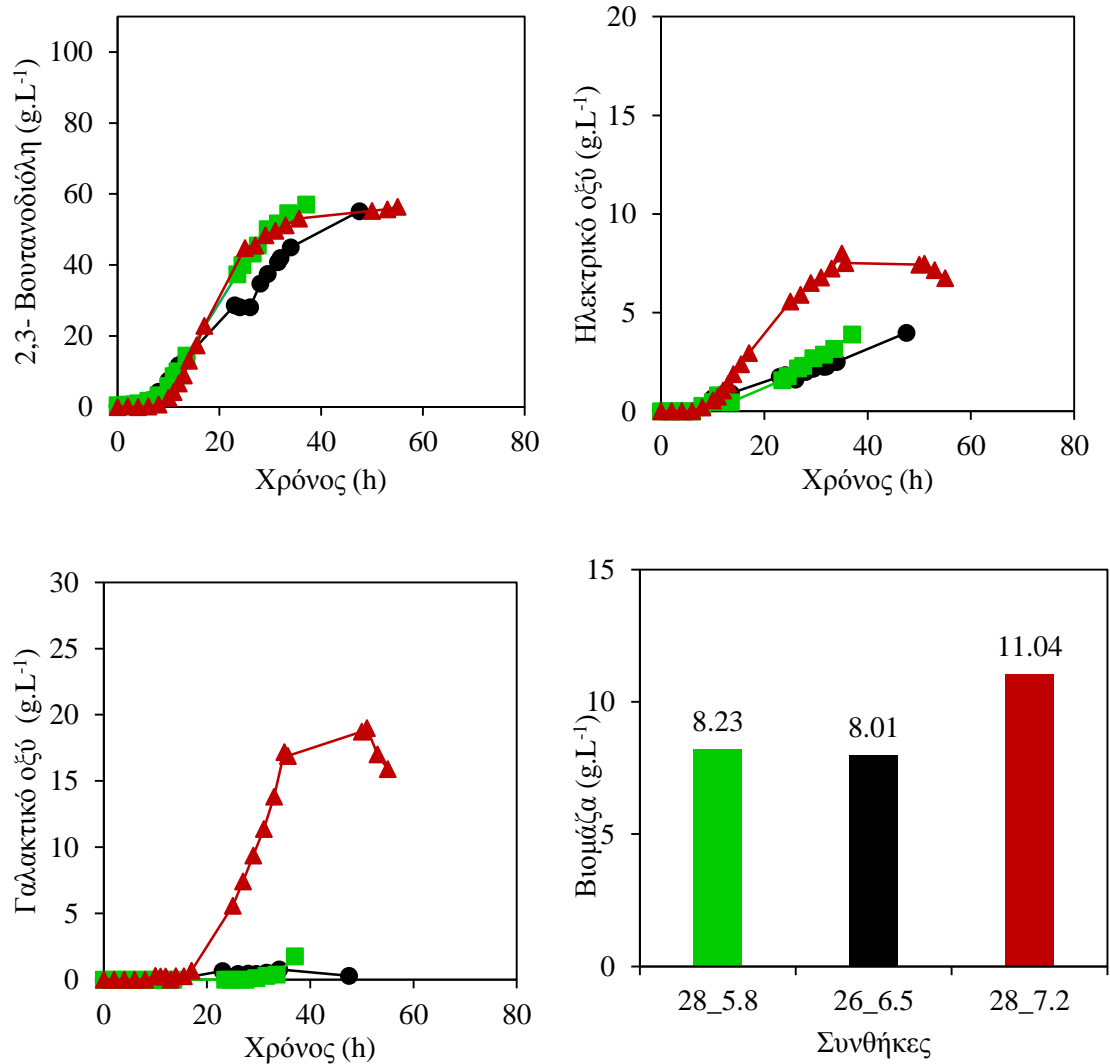
Για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων αρχικά θα συγκριθούν τα διαφορετικά πειράματα ως προς την επίδραση της θερμοκρασίας και ως προς την επίδραση του pH. Στη συνέχεια, θα αναλυθούν τα αποτελέσματα του στατιστικού μοντέλου. Τέλος, οι βέλτιστες τιμές των παραμέτρων θα επιβεβαιωθούν και θα συγκριθούν.

3.2.1 Σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας, σύγκριση ως προς την επίδραση του pH

3.2.1.1 Χαμηλό εύρος θερμοκρασιών (26-28°C)

Συγκρίνοντας τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε χαμηλή θερμοκρασία (26-28°C) με διαφορετικές τιμές pH δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές όσον αφορά την βιοτεχνολογική παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης ανάμεσα στα τρία πειράματα. Η μέγιστη παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης έφτασε τα 55-57 g.L⁻¹ (Διάγραμμα 6). Ωστόσο, σημαντικές διαφορές υπάρχουν στην παραγωγή των παραπροϊόντων. Όταν το pH διατηρείται σταθερό στο 7.2±0.2 παρατηρείται υψηλότερη παραγωγή ηλεκτρικού και γαλακτικού οξέος. Σημαντική είναι η αύξηση του γαλακτικού οξέος μετά τις 17 ώρες μέχρι το τέλος της ζύμωσης όπου φτάνει έως και 19 g.L⁻¹. Η παραγωγή της βιομάζας ευνοήθηκε σε αλκαλικό περιβάλλον (11 g.L⁻¹) στο συγκεκριμένο εύρος θερμοκρασίας,

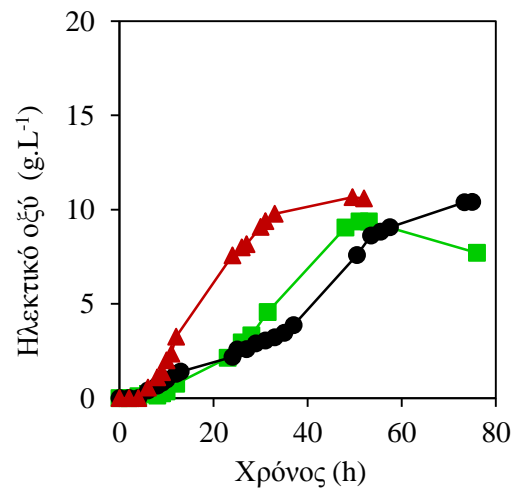
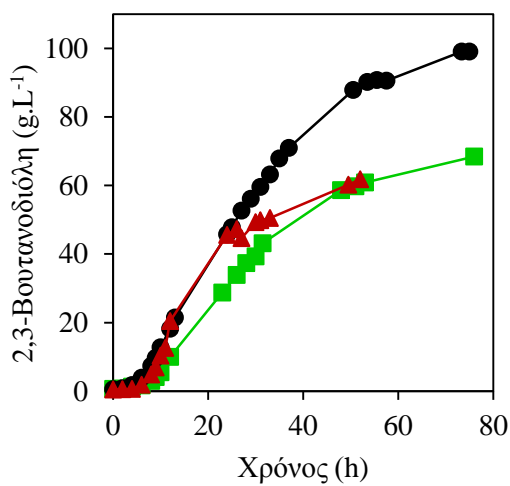
έναντι των άλλων συνθηκών όπου η βιομάζα κυμάνθηκε στο ίδιο περίπου επίπεδο ($8 \sim \text{g.L}^{-1}$).

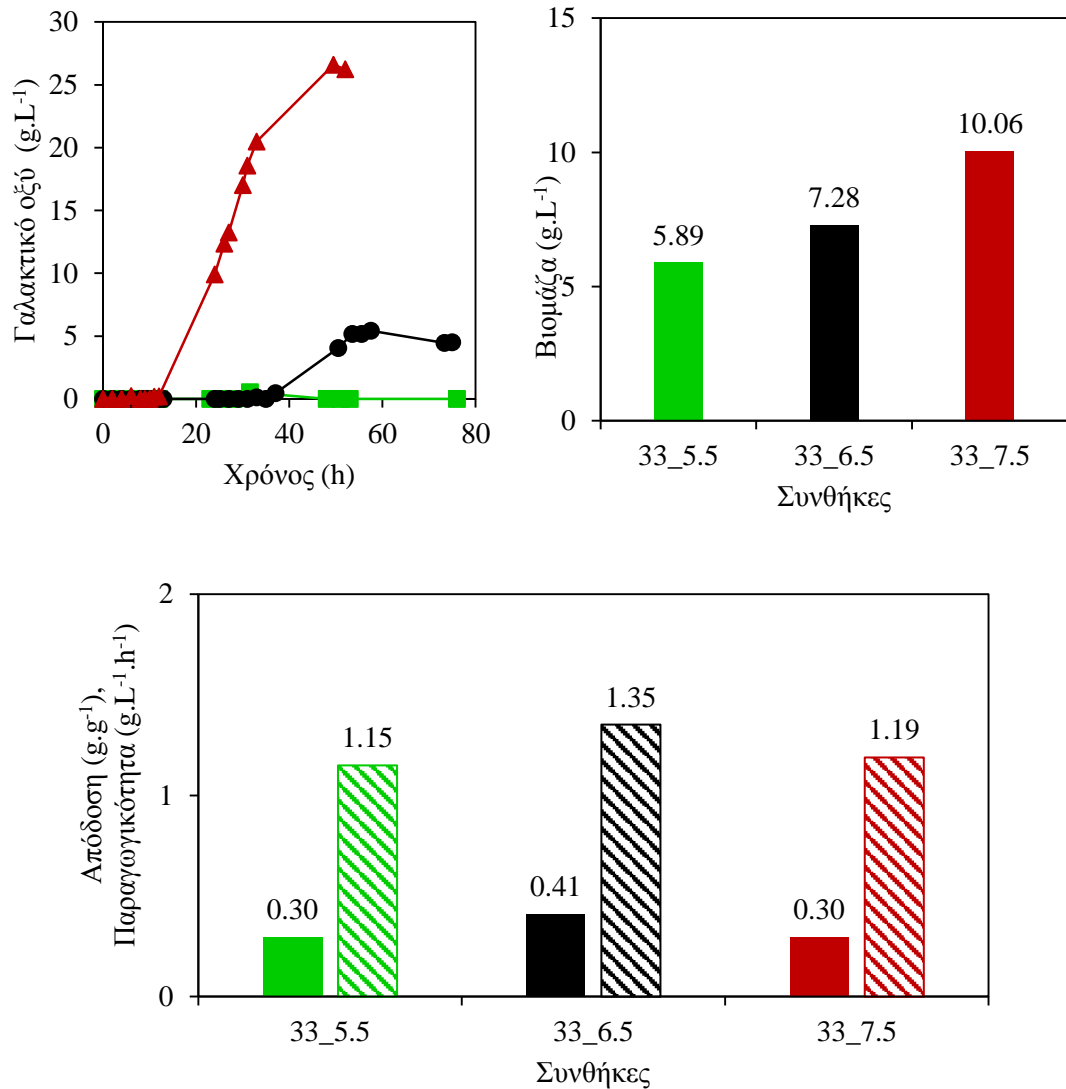


Διάγραμμα 6: Συνθήκες ζύμωσης 28°C_5.8 pH (■), 26°C_6.5 pH (●), 28°C_7.2 pH (▲)

3.2.1.2 Θερμοκρασία 33°C

Με σταθερή τη θερμοκρασία στου 33°C πραγματοποιήθηκαν τρία πειράματα με το pH να διαφέρει σε κάθε περίπτωση (pH 5.5, 6.5 και 7.5). Από το διάγραμμα 7, φαίνεται ξεκάθαρα ότι η παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης ευνοείται όταν η τιμή του pH είναι 6.5 φτάνοντας 99.1 g.L⁻¹, αντίθετα σε όξινες ή αλκαλικές τιμές pH, η τελική συγκέντρωση 2,3-βουτανοδιόλης κυμαίνεται από 60-62 g.L⁻¹. Επίσης, παρατηρείται στις αλκαλικές συνθήκες να ευνοείται περισσότερο ο σχηματισμός των οργανικών οξέων και η βιομάζα (10.1 g.L⁻¹), με αποτέλεσμα τη μείωση απόδοσης της 2,3-βουτανοδιόλης (Διάγραμμα 7). Σημαντική επίσης είναι η εκθετική αύξηση του γαλακτικού οξέος όταν το pH είναι 7.5±0.2 μετά τις 12 ώρες της ζύμωσης με τη τελική συγκέντρωση να είναι 26.3 g.L⁻¹.



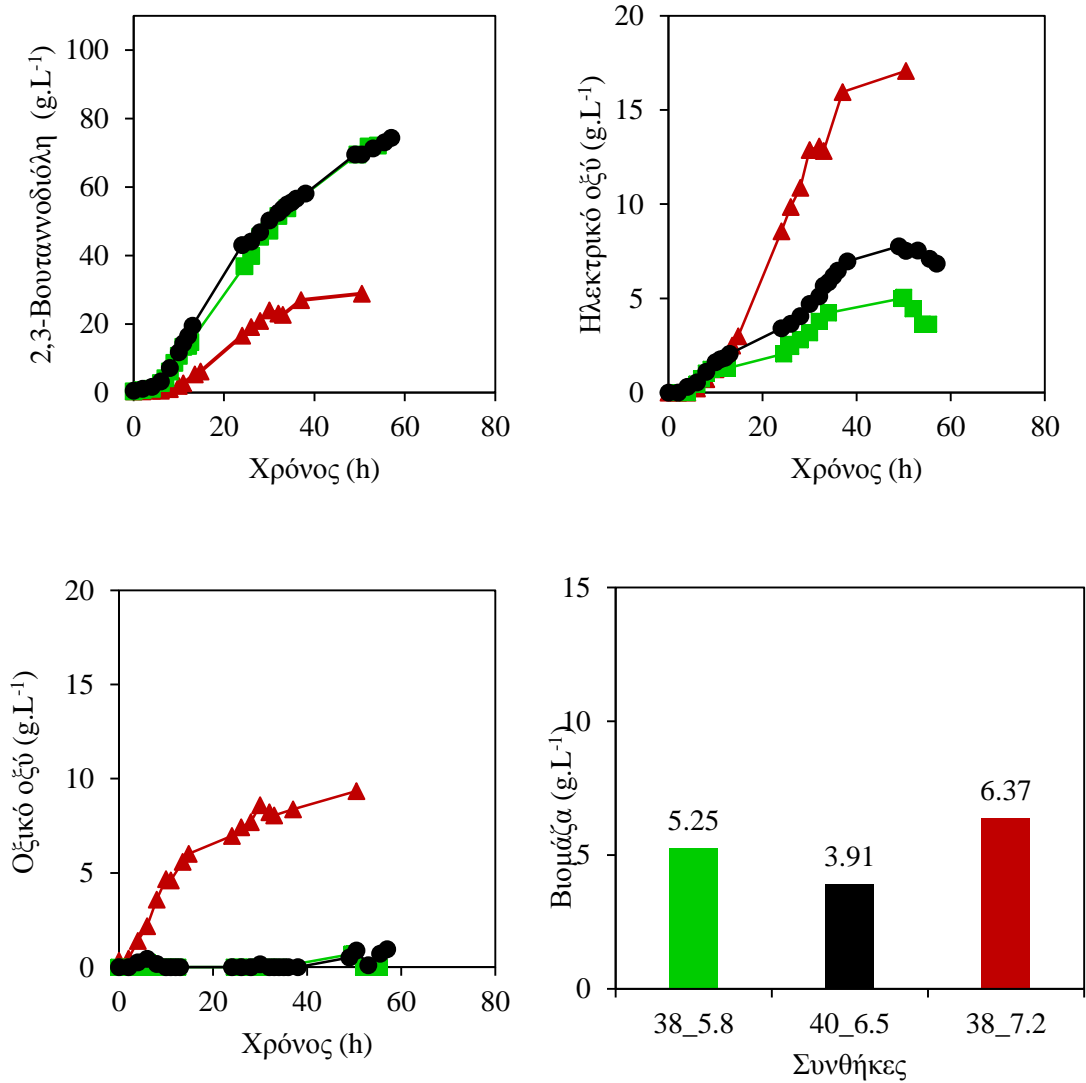


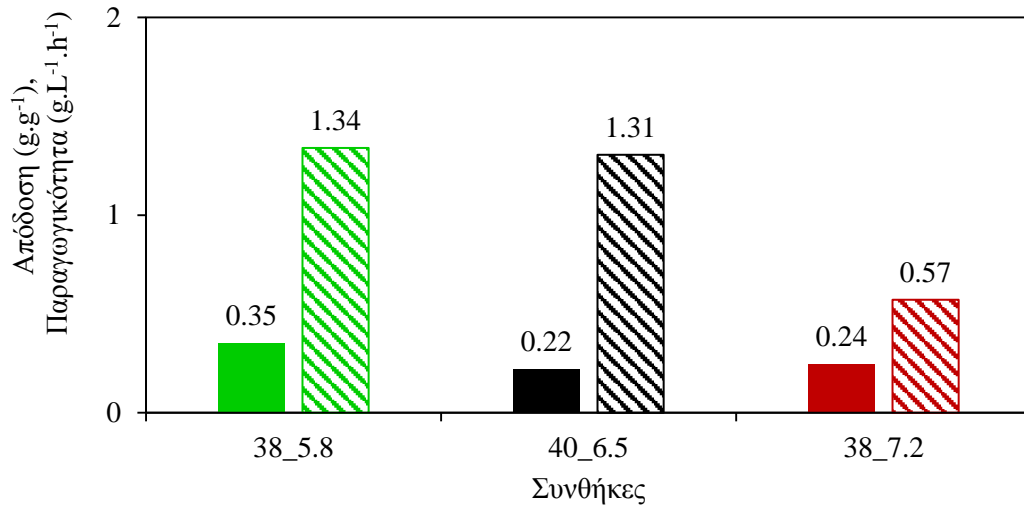
Διάγραμμα 7: Συνθήκες ζύμωσης 33°C_5.5 pH (■), 33°C_6.5 pH (●), 33°C_7.5 pH (▲).

3.2.1.3 Υψηλό εύρος θερμοκρασιών (38-40 °C)

Για τη συνέχεια των πειραμάτων, πραγματοποιήθηκαν τρία πειράματα σε υψηλό εύρος θερμοκρασίας. Σύμφωνα με το Διάγραμμα 8, συμπεραίνεται ότι σε αλκαλικές συνθήκες (pH 7.2) ευνοείται η παραγωγή βιομάζας και οργανικών οξέων με αποτέλεσμα να παρεμποδίζει την βιοτεχνολογική παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης. Τα αποτελέσματα των ημι-συνεχών ζυμώσεων σε ουδέτερο και όξινο pH ήταν καλύτερα ως προς την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης. Στην περίπτωση που το pH διατηρούνταν σταθερό στο 5.8 ± 0.2 δίνει λίγο καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης με παραγωγικότητα και συντελεστή απόδοσης να ισούται $1.34 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ και 0.35 g.g^{-1} αντίστοιχα. Στις συγκεκριμένες συνθήκες υπήρχε μηδαμινή παραγωγή γαλακτικού οξέος. Επίσης, σημαντική είναι η παραγωγή του οξικού οξέος μετά τις δύο

ώρες της ζύμωσης στους 38°C και αλκαλικό pH, με τη τελική συγκέντρωση να είναι 9.4 g.L⁻¹. Αντίθετα, στη περίπτωση του ηλεκτρικού οξέος, η παραγωγή ξεκινά μετά τις 6 ώρες ζύμωσης, παρ' όλα αυτά τελική συγκέντρωση του προϊόντος είναι σχεδόν διπλάσια από του οξικού οξέος (17.1 g.L⁻¹).



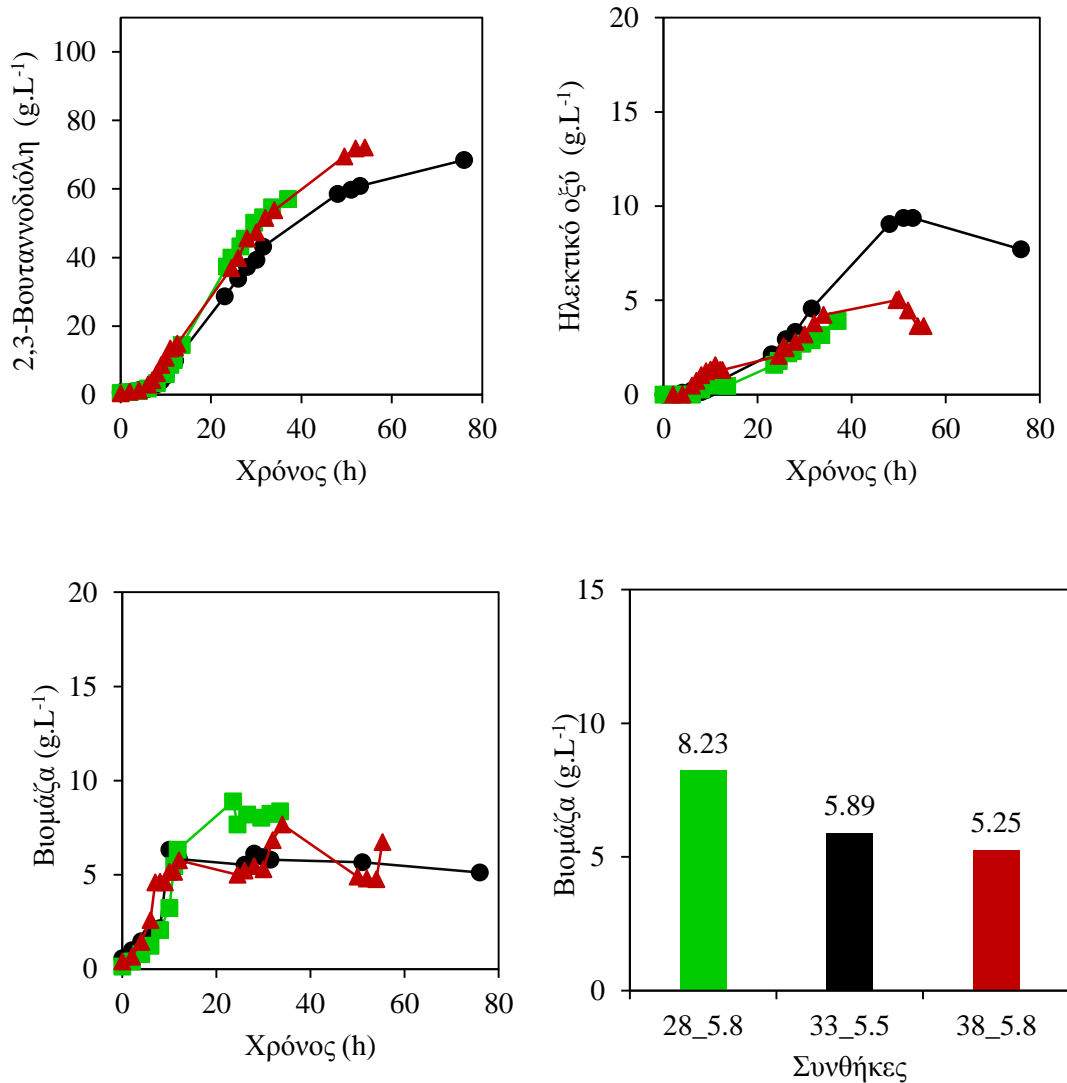


Διάγραμμα 8: Συνθήκες ζύμωσης 38°C_5.8 pH (■), 40°C_6.5 pH (●), 38°C_7.2 pH (▲).

3.2.2 Σταθερές συνθήκες pH, σύγκριση ως προς την επίδραση της θερμοκρασίας

3.2.2.1 Οξινό περιβάλλον

Διατηρώντας το pH σε όξινες συνθήκες και διαφοροποίηση της θερμοκρασία στους 28, 33 και 38°C, δεν υπάρχουν ουσιαστικές διαφορές όσον αφορά τη παραγωγή 2,3-βουτανολίου και των κύριων υπό-προϊόντων μεταξύ των ζυμώσεων. Σημαντικό είναι ότι στους 38°C και 5.8 pH δεν υπάρχει καθόλου παραγωγή γαλακτικού οξέος. Παράλληλα όμως και στις άλλες δύο συνθήκες η παραγωγή είναι μηδαμινή (μικρότερη από 2 g.L⁻¹). Όσον αφορά τη παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος, οι δύο ζυμώσεις ακολουθούν την ίδια πορεία με τη παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος να φτάνει μέχρι τα 5 g.L⁻¹, με εξαίρεση τους 33°C και 5.5 pH να φτάνει στο τέλος της ζύμωσης 7.7 g.L⁻¹ (Διάγραμμα 9). Συγκρίνοντας την παραγωγή βιομάζας στις τρεις περιπτώσεις παρατηρείται ότι σε όξινο περιβάλλον και χαμηλή θερμοκρασία (28°C) η παραγωγή βιομάζας τις πρώτες 10 ώρες της ζύμωσης είναι σε χαμηλότερη συγκέντρωση, ενώ υψηλότερη είναι σε υψηλή θερμοκρασία. Παρόλα αυτά, η τελική συγκέντρωση βιομάζας που παράγεται στη ζύμωση με τη χαμηλότερη θερμοκρασία είναι περισσότερη στο τέλος της ζύμωσης (8.23 g.L⁻¹).

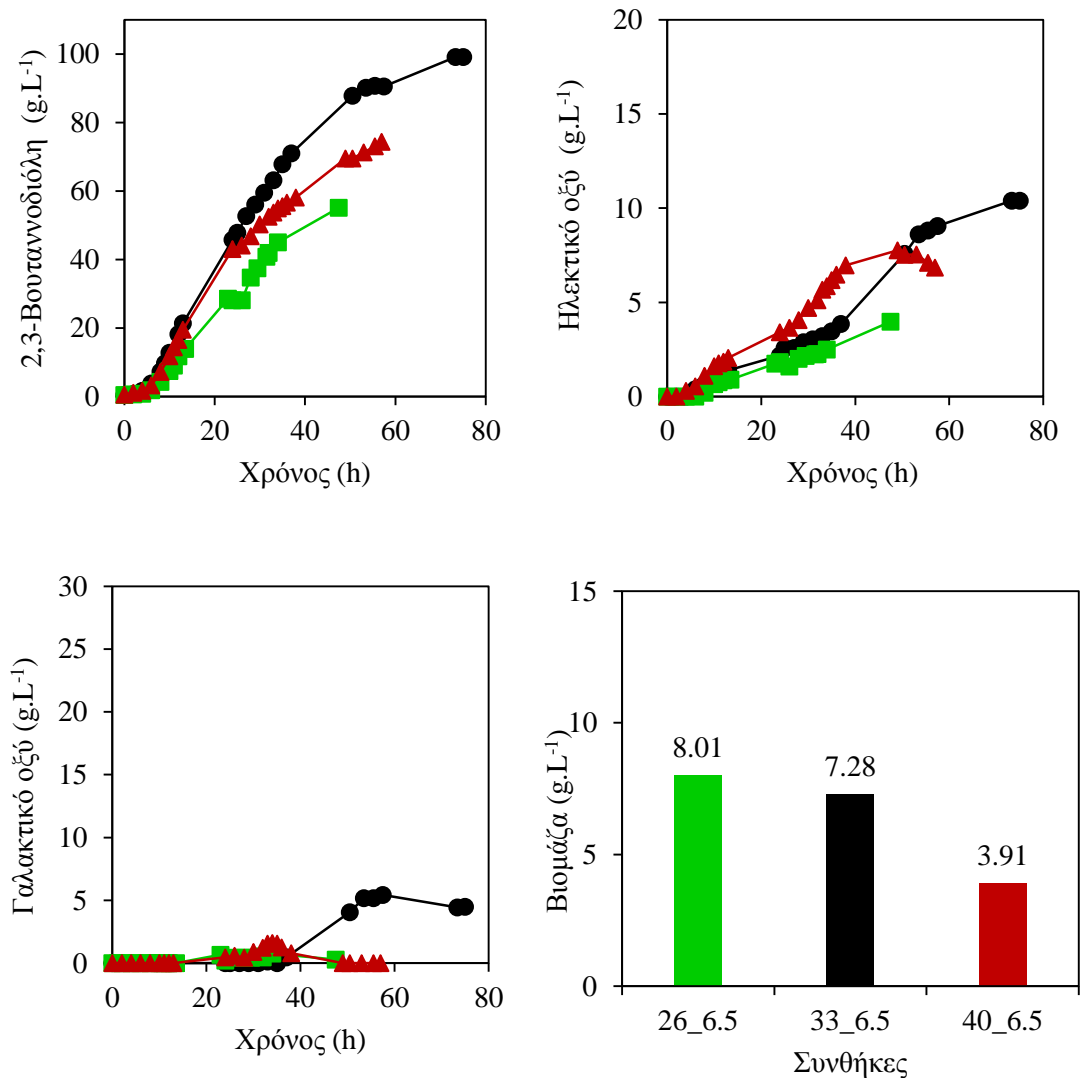


Διάγραμμα 9: Συνθήκες ζύμωσης 28°C_5.8 pH (■), 33°C_5.5 pH (●), 38°C_5.8 pH (▲).

3.2.2.2 Ουδέτερο περιβάλλον

Με τη διατήρηση του pH στο 6.5 ± 0.2 παρατηρούμε ότι στους 33°C υπάρχει μεγαλύτερη παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης (99.1 g.L^{-1}) σε σύγκριση με τους 26°C και 40°C (55.1 g.L^{-1} και 74.4 g.L^{-1} αντίστοιχα), με τους 26°C να παρουσιάζουν τη χαμηλότερη συγκέντρωση. Η παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος, και στις τρεις περιπτώσεις ξεκινά ταυτόχρονα με τη παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης. Παρ' όλα αυτά ο συνδυασμός 40°C και 6.5 ± 0.2 pH δίνει την περισσότερη παραγωγή ηλεκτρικού οξέος, όπου προς το τέλος της ζύμωσης φαίνεται από το Διάγραμμα 14 ότι ξεκινά να καταναλώνεται από τον μικροοργανισμό. Όσον αφορά την παραγωγή του γαλακτικού οξέος, υπάρχουν συνεχείς αυξομειώσεις στην παραγωγή και κατανάλωση του από τον μικροοργανισμό από την δεύτερη μέρα της ζύμωσης (24 h) και μετά, με τη συγκέντρωση

του να παραμένει σε χαμηλά επίπεδα. Εξαιρέση αποτελούν οι 33°C, όπου η παραγωγή του γαλακτικού οξέος ξεκινά στις 38 h της ζύμωσης και η συγκέντρωση να φτάνει κοντά στα 6 g.L⁻¹. Επίσης, σημαντικό το συμπέρασμα που προκύπτει όσον αφορά τη παραγωγή βιομάζας. Με αύξηση της θερμοκρασίας σε ουδέτερο περιβάλλον η παραγωγή της βιομάζας σε κάθε ζύμωση βρίσκεται σε χαμηλότερο επίπεδο.

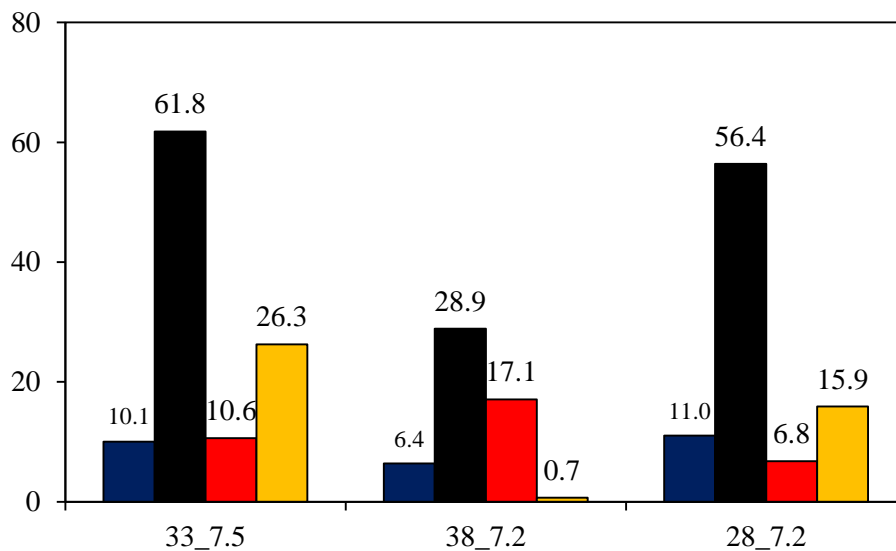


Διάγραμμα 10: Συνθήκες ζύμωσης 26°C_6.5 pH (■), 33°C_6.5 pH (●), 40°C_6.5 pH (▲).

3.2.2.3 Αλκαλικό περιβάλλον

Πραγματοποίηση της ζύμωσης σε αλκαλικό περιβάλλον και τις ακραίες θερμοκρασίες να απέχουν μεταξύ τους 10 °C παρατηρούμε σημαντικές διαφορές στην παραγωγή των κύριων υπό-προϊόντων της ζύμωσης (Διάγραμμα 11). Συγκεκριμένα με μείωση της θερμοκρασίας από 38°C στους 28°C προκύπτει μείωση παραγωγής ηλεκτρικού οξέος σε ποσοστό 60.23%, ωστόσο μια ενδιάμεση τιμή παραγωγής υπάρχει

στον 33°C (10.6 g.L⁻¹). Αντίθετα, η παραγωγή γαλακτικού οξέος είναι μηδαμινή στους 38°C ενώ σε πιο χαμηλή θερμοκρασία στους 33°C η παραγωγή φτάνει γύρω στα 26 g.L⁻¹. Σχετικά με τη παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης, η χαμηλότερη θερμοκρασία δίνει τη διπλάσια συγκέντρωση 2,3-βουτανοδιόλης από την υψηλή θερμοκρασία στο τέλος της ζύμωσης. Παρ' όλα αυτά, την καλύτερη παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης δίνουν οι συνθήκες 33°C και 7.5 pH, με τελική συγκέντρωση ίση με 61.8 g.L⁻¹ με συντελεστή απόδοσης 0.30 g.g⁻¹ και παραγωγικότητα 1.19 g.L⁻¹.h⁻¹.



Διάγραμμα 11: Συνθήκες ζύμωσης 33°C_7.5 pH, 38°C_7.2 pH και 28°C_7.2 pH για παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης (■), βιομάζας (■), ηλεκτρικού (■) και γαλακτικού οξέος (■) κατά τη διάρκεια ημι-συνεχούς ζύμωσης με χρήση ακατέργαστης σακχαρόζης, 1 vvm αερισμό, ρυθμό ανάδευσης 150-250 rpm.

3.2.3 Αποτελέσματα κεντρικού σύνθετου σχεδιασμού (CCD)

Τα αποτελέσματα του μοντέλου CCD που χρησιμοποιήθηκε για τη στατιστική ανάλυση των πειραματικών αποτελεσμάτων και τον καθορισμό των βέλτιστων εξεταζόμενων παραγόντων (pH και θερμοκρασία) παρουσιάζονται στο Πίνακα 4. Πιο συγκεκριμένα, παρουσιάζονται οι πειραματικές και προβλεπόμενες τιμές των δύο μεταβλητών που ελήφθησαν μαζί με τις αντίστοιχες απόλυτες διαφορές τους.

Πίνακας 4: Πειραματικές τιμές και προβλέψεις μοντέλου ως προς την βιοτεχνολογική παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης.

Αριθμός πειραμάτων	Κωδικοποιημένες Τιμές		Πραγματικές τιμές		2,3-Βουτανοδιόλη (g.L ⁻¹)		
	x ₁ pH	x ₂ T (°C)	X ₁ pH	X ₂ T (°C)	Πειραματική τιμή	Προβλέψιμη τιμή	Residual BDO (g.L ⁻¹)
1	-1	-1	5.8	28	54.6	47.2	7.39
2	1	1	7.2	38	24.0	37.3	-13.29
3	0	0	6.5	33	90.2	88.0	2.25
4	-1.414	0	5.5	33	58.6	62.9	-4.27
5	1.414	0	7.5	33	49.3	39.1	10.17
6	0	-1.414	6.5	26	45.0	49.4	-4.45
7	0	0	6.5	33	85.7	88.0	-2.25
8	0	1.414	6.5	40	69.5	59.2	10.35
9	-1	1	5.8	38	71.8	74.9	-3.08
10	1	-1	7.2	28	48.4	51.2	-2.82

Η ορθότητα του μοντέλου ελέγχθηκε με τη βοήθεια της ανάλυσης παραλλακτικότητας (ANOVA). Στον Πίνακα 6 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα με τη μορφή ανάλυσης της διακύμανσης ANOVA καθώς και οι συντελεστές που υπολογίστηκαν μέσω της Εξίσωσης 2. Αναλυτικότερα, η μεταβλητή Y είναι η συγκέντρωση της παραγόμενης 2,3-βουτανοδιόλης σε g.L⁻¹. Η σημαντικότητα του μοντέλου αξιολογήθηκε μέσω του F-test. Στην περίπτωση αυτή η τιμή F-value, F(5,4), είναι ίση με 4.8817, τιμή η οποία είναι υψηλότερη από την αντίστοιχη τιμή των πινάκων για επίπεδο εμπιστοσύνης 0.10 [F(5,4)=3.52020], το μοντέλο είναι στατιστικώς σημαντικό σε επίπεδο 10%. Επομένως, το μοντέλο θεωρείται επαρκές και ικανό να ερμηνεύσει την παραλλακτικότητα της απόκρισης. Παρ' όλα αυτά θα πρέπει να αναφερθεί ότι για μικρότερο επίπεδο εμπιστοσύνης ($\alpha=0.05$) το μοντέλο δεν θεωρείται σημαντικό καθώς η τιμή F(5,4)=4.8817 είναι μικρότερη από την αντίστοιχη τιμή F(5,4)= 5.1922 για το συγκεκριμένο επίπεδο εμπιστοσύνης. Ωστόσο, η ικανότητα πρόβλεψης του μοντέλου θεωρείται επαρκής, εφόσον επιβεβαιώνεται από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 6, όπου ο συντελεστής προσδιορισμού R² υπολογίστηκε στα 0.86 εκφράζοντας ότι το 86% της διακύμανσης της απόκρισης μπορεί να ερμηνευτεί από το προτεινόμενο μοντέλο (Πίνακας 5).

Πίνακας 5: Αποτελέσματα με τη μορφή ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA)

R ²	0.859197
R ² Adj	0.683193
Τυπική απόκλιση μέσου όρου (RMSE)	11.2608
Μέση απόκριση	59.71
Παρατηρήσεις	10

Για την περιγραφή του μοντέλου όπως έχει προαναφερθεί χρησιμοποιήθηκε πολυωνμική εξίσωση δευτέρου βαθμού για να εκφράσει το προτεινόμενο μοντέλο. Όσον αφορά τη σημαντικότητα των συντελεστών της Εξίσωσης 2, εκτιμήθηκε μέσω της κατανομής Student's t. Επομένως, οι υψηλότερες τιμές t και οι χαμηλότερες τιμές p υποδεικνύουν τους σημαντικούς συντελεστές.

$$Y = 87.95 - 8.39x_1 + 3.43x_2 - 10.4x_1x_2 - 18.48x_1^2 - 16.83x_2^2 \quad \text{Εξίσωση 3.}$$

Σύμφωνα με την Εξίσωση 3, η θετική τιμή του συντελεστή X_2 εκφράζει την τάση της ανάκτησης (R%) να αυξάνει από το χαμηλό στο υψηλό επίπεδο τιμών. Αντίθετα, οι αρνητικές τιμές των συντελεστών X_1 , X_1X_2 , X_1^2 και X_2^2 (-8.39, -10.4, -18.48 και -16.83 αντίστοιχα) έχουν αντίθετη επίδραση. Επίσης η αρνητική τιμή -10.4 του συντελεστή X_1X_2 εκφράζει την ανταγωνιστική σχέση μεταξύ των παραγόντων. Με τη δοκιμή t-test, το γραμμικό αποτέλεσμα των παραμέτρων X_1^2 και X_2^2 είναι τα πιο σημαντικά καθώς παρουσιάζουν την υψηλότερη τιμή t-Ratio, ίση με 3.51 και 3.19 αντίστοιχα.

Πίνακας 6: Αποτελέσματα με τη μορφή ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) καθώς και οι εκτιμήσεις των παραμέτρων που υπολογίστηκαν μέσω της εξίσωσης 2.

Πηγή	Βαθμοί ελευθερίας	Άθροισμα τετραγώνων	Μέσο τετράγωνο	F-value	P > F
Model	5	3095.1267	619.025	4.8817	0.0749
Error	4	507.2223	126.806		
Lack Of Fit	3	497.09731	165.699	16.3653	0.1793
Pure Error	1	10.125	10.125		
Total	9	3602.349			

Παράμετροι	Εκτίμηση	Σφάλμα	t Ratio	Prob > t
b ₁ (intercept)	87.95	7.962587	11.05	0.0004*
b ₂ (X ₁)	-8.394023	3.981293	-2.11	0.1027
b ₃ (X ₂)	3.431029	3.981293	0.86	0.4374
b ₄ (X ₁ X ₂)	-10.4	5.630399	-1.18	0.1385
b ₅ ² (X ₁) ²	-18.475	5.266756	-3.51	0.0247*
b ₆ ² (X ₂) ²	-16.825	5.266756	-3.19	0.0331*

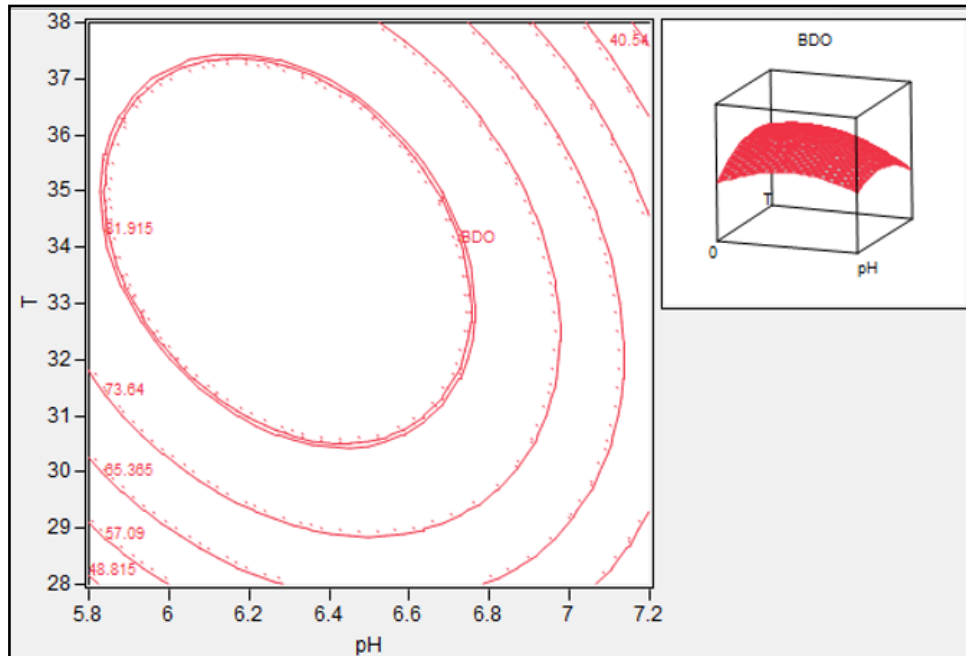
Επόμενο βήμα είναι ο προσδιορισμός των βέλτιστων τιμών για τις δύο παραμέτρους, pH και θερμοκρασία, για τις οποίες παρατηρείται μέγιστη παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης. Με βάση τους υπολογισμούς που πραγματοποιήθηκαν από το πρόγραμμα οι βέλτιστες τιμές των παραμέτρων pH και θερμοκρασίας είναι 6.3 και 33.9 °C αντίστοιχα (Πίνακας 7).

Πίνακας 7: Βέλτιστες τιμές των παραμέτρων και προβλεπόμενη παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης

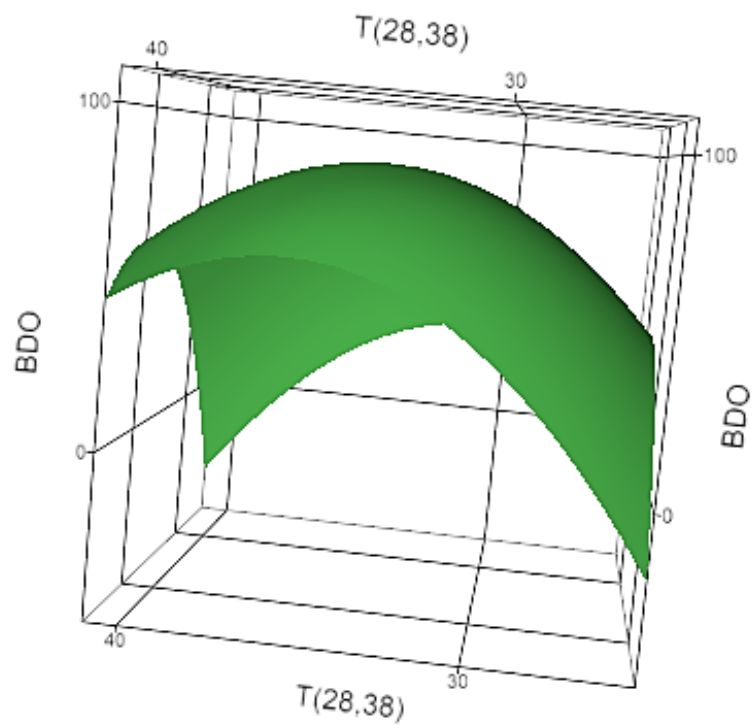
Variable	Critical value
pH (5.8, 7.2)	6.30
T (28, 38)	33.9
Predicted value at solution 89.44	

Επίσης, στο Διάγραμμα 12 παρουσιάζονται ισοϋψείς καμπύλες για την προβλεπόμενη συγκέντρωση της 2,3-βουτανοδιόλης σε διαφορετικούς συνδυασμούς pH και θερμοκρασίας. Σύμφωνα με το διάγραμμα αυτό συμπεραίνουμε ότι με συνδυασμό ακραίων τιμών στη πραγματοποίηση της ζύμωσης η προβλεπόμενη παραγωγή 2,3-

βουτανοδιόλης βρίσκεται σε χαμηλό επίπεδο, όπως για παράδειγμα στους 28 °C και 5.8 pH η προβλεπόμενη παραγωγή είναι 48.82 g.L⁻¹. Επομένως, από το Διάγραμμα 12 είναι προφανές ότι η μέγιστη συγκέντρωση της 2,3-βουτανοδιόλης επιτυγχάνεται στο μέσο επίπεδο των τιμών των δύο παραμέτρων.

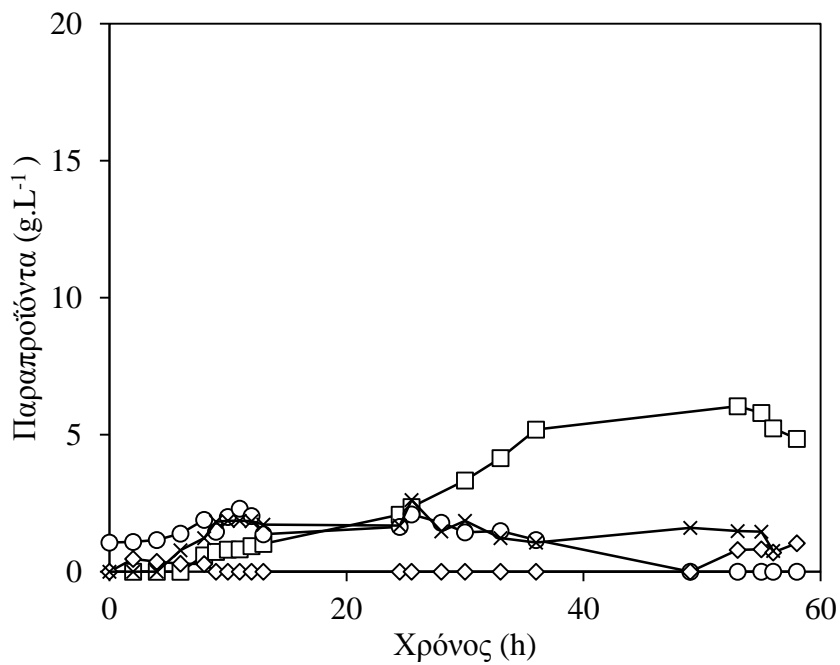
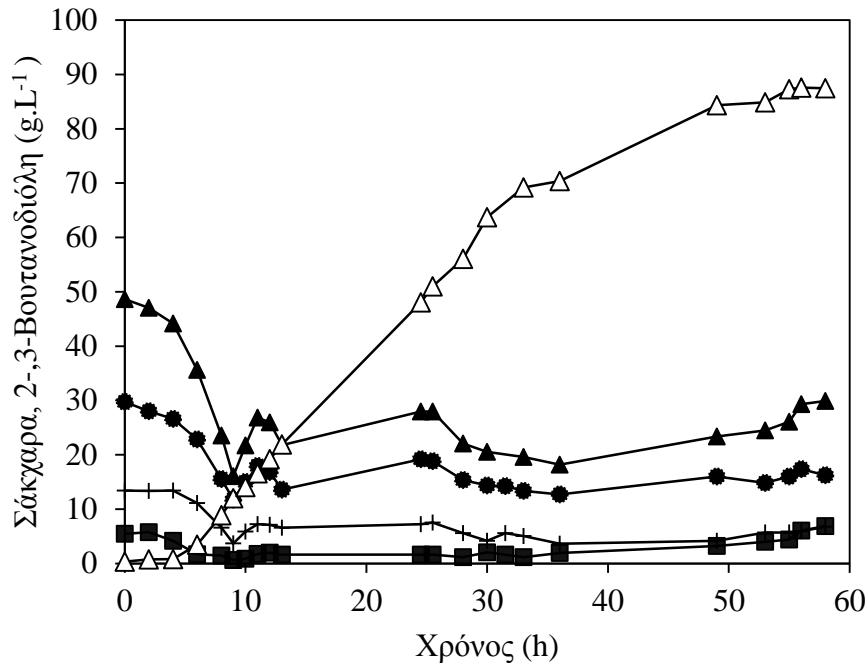


Διάγραμμα 12: Απεικόνιση isoψών καμπυλών για την προβλεπόμενη συγκέντρωση της 2,3-βουτανοδιόλης για διαφορετικούς συνδυασμούς pH και θερμοκρασίας



Διάγραμμα 13: Τρισδιάστατη απεικόνιση της απόκρισης συγκέντρωσης 2,3-βουτανοδιόλης για διαφορετικούς συνδυασμούς pH και θερμοκρασίας

Ακολούθως, για να επαλειφθούν οι παραπάνω τιμές πραγματοποιήθηκε ημι-συνεχής ζύμωση με τις βέλτιστες συνθήκες. Οι τιμή της παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης που προέκυψε ήταν αρκετά κοντά με την μέγιστη παραγωγή που υπολογίστηκε μέσω του προγράμματος. Συγκεκριμένα, η συνολική παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης με τις βελτιστοποιημένες συνθήκες ήταν 87.5 g.L^{-1} έναντι 89.44 g.L^{-1} που προέβλεψε το πρόγραμμα μέσω του μοντέλου CCD (Διάγραμμα 14).



Διάγραμμα 14: 2,3-Βουτανοδιόλη (Δ), ηλεκτρικό οξύ (□), οξικό οξύ (◇), μυρμηγκικό οξύ (ο), και αιθανόλη (×) παραγωγή καθώς επίσης και κατανάλωση σακχάρων (▲),σακχαρόζη (●), γλυκόζη (+), φρουκτόζη (■) κατά τη διάρκεια ημι-συνεχούς ζύμωσης με χρήση ακατέργαστης σακχαρόζης, 1 ννμ αερισμό, ρυθμό ανάδευσης 150-250 rpm, 33.9°C και 6.3 pH

4 Συζήτηση

Η παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης μέσω μικροβιακών ζυμώσεων αποτελεί σημαντικό πεδίο έρευνας για την επιστήμη της βιοτεχνολογίας με ισχυρές προοπτικές ανάπτυξης. Τα τελευταία χρόνια παρατηρούμε ότι έχει στραφεί σε μεγάλο βαθμό το ερευνητικό ενδιαφέρον προς τη παραγωγή της χρησιμοποιώντας διάφορους μικροοργανισμούς και αξιοποιώντας διάφορα ανανεώσιμα υποστρώματα. Η αξιοποίηση των συγκεκριμένων υποστρωμάτων οδηγεί στη μείωση του κόστους της διαδικασίας παραγωγής, σε αντίθεση με τις μεθόδους που εφαρμόζονται στη πετροχημική βιομηχανία, ενώ παράλληλα προκύπτει σημαντικό περιβαλλοντικό όφελος. Παρ' όλα αυτά, η βελτιστοποίηση της διεργασίας παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης μέσω μικροβιακών ζυμώσεων χρειάζεται περισσότερη έρευνα για να επιτευχθεί μια οικονομικά εφικτή και αποδοτική διεργασία.

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, εξετάστηκε η επίδραση του οξυγόνου στις μεταβολικές ανάγκες του μικροοργανισμού καθώς και η θερμοκρασία και το pH να αποτελεί το κύριο μέρος της μελέτης, με σκοπό τη βελτιστοποίηση της παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης. Στο Πίνακα 8 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τους διαφορετικούς συνδυασμούς pH και θερμοκρασίας που μελετήθηκαν. Φαίνεται ξεκάθαρα ότι, με τη διαφοροποίηση των συνθηκών pH και θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια της ζύμωσης επιδρά στην τελική συγκέντρωση της 2,3-βουτανοδιόλης αλλά και τη αναλογία των υπό-προϊόντων της ζύμωσης. Σε κάθε περίπτωση τα αποτελέσματα ήταν διαφορετικά, με την επίδραση αυτή να φαίνεται πιο έντονα στο σχηματισμό των υπό-προϊόντων της ζύμωσης.

Συγκρίνοντας τη μεταβολή του pH σε χαμηλή θερμοκρασία (26-28°C) δεν παρατηρείται διαφορά ως προς τη βιοτεχνολογική παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης. Παρ' όλα αυτά σημαντική είναι η διαφορά στο συντελεστή απόδοσης της 2,3-βουτανοδιόλης. Σημαντικά μειωμένος είναι στην περίπτωση που επικρατεί αλκαλικό περιβάλλον καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης (0.22 g.g⁻¹). Αυτό οφείλεται στην αυξημένη παραγωγή υπό-προϊόντων (29.4 g.L⁻¹) σε αντίθεση με ζυμώσεις σε συνθήκες όξινου και ουδέτερου pH, όπου η συνολική παραγωγή στο τέλος της ζύμωσης είναι 9-10 g.L⁻¹. Επιπρόσθετα, με αύξηση του pH παρατηρείται μείωση της παραγωγής αιθανόλης. Σε ζυμώσεις που διεξάχθηκαν σε θερμοκρασία 33°C, μεταξύ όξινου και αλκαλικού περιβάλλοντος δεν υπήρχε διαφορά στην παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης. Η μέγιστη παραγωγή παρουσιάστηκε στους 33°C και ουδέτερο pH (99.1 g.L⁻¹) με συντελεστή

απόδοσης και παραγωγικότητα 0.41 g.g^{-1} και $1.35 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ αντίστοιχα. Και σε αυτή τη περίπτωση, στο αλκαλικό περιβάλλον υπάρχει αυξημένη παραγωγή υπό-προϊόντων (44.2 g.L^{-1}), με το γαλακτικό οξύ να υπερτερεί έναντι των υπολοίπων με εμφανής διαφορά (26.3 g.L^{-1}). Με αύξηση του εύρους θερμοκρασίας ($38\text{-}40^\circ\text{C}$), διαφορά ως προς τη παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης παρατηρείται στο αλκαλικό περιβάλλον. Η παραγωγή είναι σε αρκετά χαμηλό επίπεδο (28.9 g.L^{-1}) με συντελεστή απόδοσης 0.24 g.g^{-1} και παραγωγικότητα $0.57 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Σημαντική είναι η υψηλή παραγωγή ηλεκτρικού οξέος (17.1 g.L^{-1}), σε αντίθεση με το γαλακτικό οξύ όπου σε αυτή την περίπτωση η τελική συγκέντρωση ήταν κάτω από 1 g.L^{-1} . Σύμφωνα με όσα έχουν προαναφερθεί συμπεραίνεται ότι με πραγματοποίηση της ζύμωσης σε διάφορα επίπεδα θερμοκρασίας επηρεάζεται το μεταβολικό μονοπάτι του μικροοργανισμού και διαφοροποιείται ως προς τη ποσότητα παραγωγής ηλεκτρικού και γαλακτικού οξέος σε κάθε περίπτωση (Πίνακας 8). Επίσης παρατηρείται ότι σε αλκαλικές συνθήκες ευνοείται περισσότερο η παραγωγή των οργανικών οξέων με ταυτόχρονη μείωση του συντελεστή απόδοσης της 2,3-βουτανοδιόλης. Η υψηλότερη συγκέντρωση 2,3-βουτανοδιόλης που επιτεύχθηκε ήταν 81.4 g.L^{-1} στις 53.5 h στις συνθήκες 33°C και 6.5 pH. Τελική συγκέντρωση 2,3-βουτανοδιόλης έφθασε τα 99.1 g.L^{-1} με αντίστοιχο συντελεστή απόδοσης 0.41 g.g^{-1} και παραγωγικότητα $1.35 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Γενικότερα, όσον αφορά τη παραγωγή βιομάζας, υψηλότερη παραγωγή σε κάθε περίπτωση, παρατηρήθηκε σε αλκαλικό περιβάλλον, ωστόσο η παραγωγή δεν ευνοήθηκε σε αυτό το εύρος pH.

Πίνακας 8: Σύνοψη αποτελεσμάτων για τις ημι-συνεχείς ζυμώσεις υπό διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και pH, τελικά σημεία ζύμωσης.

Temp. (°C)	pH	u _{max}	X _{max} (g.L ⁻¹)	BDO (g.L ⁻¹)	SA (g.L ⁻¹)	LA (g.L ⁻¹)	AA (g.L ⁻¹)	EtOH (g.L ⁻¹)	BDO/By- products (g.g ⁻¹)	Productivity (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Yield (g.g ⁻¹)
28	5.8	0.23	8.23	57.0	3.9	1.8	0.0	4.3	5.7	1.54	0.35
26	6.5	0.19	8.01	55.1	4.0	0.3	1.2	3.8	6.0	1.16	0.38
28	7.2	0.32	11.04	56.4	6.8	15.9	4.0	2.8	1.9	1.03	0.22
33	5.5	0.24	5.89	60.9	9.4	0.0	0.5	3.6	4.5	1.15	0.30
33	6.5	0.40	7.28	99.1	10.4	4.5	0.0	1.3	6.1	1.35	0.41
33	7.5	0.37	10.06	61.8	10.6	26.3	5.1	2.2	1.4	1.19	0.30
38	5.8	0.29	5.25	72.1	3.6	0.0	0.0	1.3	14.8	1.34	0.35
40	6.5	0.26	3.91	74.4	6.8	0.0	1.0	0.3	9.1	1.31	0.22
38	7.2	0.20	6.37	28.9	17.1	0.7	9.4	0.7	1.0	0.57	0.24

Temp.: Θερμοκρασία, u_{max}: Ειδικός ρυθμός ανάπτυξης, X_{max}: Βιομάζα, Total sugars: Συγκέντρωση σακχάρων, BDO: 2,3-Βουτανδιόλη, Y: Απόδοση, P: Παραγωγικότητα, SA: Ηλεκτρικό οξύ, LA: Γαλακτικό οξύ, FA: Μυρμηγκικό οξύ, AA: Οξικό οξύ, EtOH: Αιθανόλη, Total by-products: Συνολική συγκέντρωση υπό-προϊόντων, BDO/By-products: Λόγος 2,3-βουτανδιόλης και υπό-προϊόντων, P: Παραγωγικότητα, Y: Απόδοση

Όπως γίνεται αντιληπτό, η παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης δεν εξαρτάται μόνο από το μικροοργανισμό και τη πηγή άνθρακα που χρησιμοποιείται, αλλά σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν ο αερισμός και ανάδευση, pH και θερμοκρασία. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα πιο πάνω αποτελέσματα, ωστόσο ένας περιορισμένος αριθμός μελετών αναφέρεται στην επίδραση θερμοκρασίας και pH στη βιοτεχνολογική παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης και υπό-προϊόντων της ζύμωσης. Ωστόσο τα συμπεράσματα που προκύπτουν από την συγκεκριμένη μελέτη είναι συγκρίσιμα με αντίστοιχα της βιβλιογραφίας. Σε μελέτη των Chan et al. (2016) είχαν παρατηρήσει ότι η αύξηση του pH πάνω από το 6.5 είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης ως προς τη συγκέντρωση και απόδοση. Επιπλέον, τα υψηλότερα επίπεδα υπό-προϊόντων, κυρίως ηλεκτρικού και οξικού, συσσωρεύτηκαν σε pH 7.0 σύμφωνα με τη μελέτη που πραγματοποίησαν. Η συγκεκριμένη παρατήρηση είναι σύμφωνη με τους Lee et al. (2013), η μελέτη των οποίων ανέφερε ότι υψηλό pH οδήγησε σε υψηλότερες αναλογίες υπό-προϊόντων όπως το οξικό και αιθανόλη, οδηγώντας σε μείωση της παραγωγής στο μικροοργανισμό *K. pneumoniae* (Lee et al. 2013). Πιθανό αυτό να οφείλεται σε αδρανοποίηση της δραστηριότητας της σύνθεσης του α-ακετογαλακτικού (ALS) σε υψηλότερα επίπεδα pH από 6.0 (Chan et al. 2016). Οι Stormer et al. (1968) επίσης διαπίστωσαν ότι μία τιμή pH πάνω του 6.0 προκάλεσε απότομη μείωση της δραστηριότητας της σύνθεσης του α-ακετογαλακτικού στην μεταβολική οδό παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης στο μικροοργανισμό *K. pneumoniae* (Stormer 1968). Επιπλέον, οι Guo et al. (2017) αναφέρουν ότι ο σχηματισμός υπό-προϊόντων επηρεάστηκε από τις διάφορες τιμές pH, το ηλεκτρικό, το γαλακτικό και το οξικό οξύ αυξήθηκαν μαζί με την αύξηση του pH, αλλά ο σχηματισμός αιθανόλης μειώθηκε με την αύξηση του pH (Guo et al. 2017). Σύμφωνα με όσα έχουν προαναφερθεί, το pH μπορεί να θεωρηθεί ως ο πιο σημαντικός παράγοντας στην παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης μέσω μικροβιακών ζυμώσεων. Αυτό μπορεί να στηριχτεί στο γεγονός ότι η αλλαγή του pH μπορεί να μεταβάλει τη μεταβολική οδό, οδηγώντας σε διαφορετική σύνθεση του προϊόντος (Wong et al. 2014). Σε δοκιμές των Priya et al. 2015, σε εύρος pH (5.0-8.5) παρατηρήθηκε παρόμοιο μεταβολικό προφίλ, όμως οι συγκεντρώσεις των μεταβολικών προϊόντων διαφοροποιούνταν. Η υψηλότερη ανάπτυξη βακτηρίων προέκυψε σε pH 8.0, υποδεικνύοντας ότι το στέλεχος είναι μέτρια αλκαφιλικό. Από την άλλη όμως, η παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης δεν ευνοήθηκε σε αυτό το εύρος pH. Το pH στο αρχικό στάδιο της ζύμωσης φαίνεται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο για τη μείωση της φάσης υστέρησης του μικροοργανισμού και για την επίτευξη ικανοποιητικής βιομάζας (Priya et

al. 2016). Γενικότερα, το αλκαλικό pH οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή δευτερογενών μεταβολίτων στην ζύμωση (Petron & Petrova 2009). Κάτι ανάλογο αναφέρεται και από τους Wong et al. 2014., ότι η παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης είναι ένα φαινόμενο το οποίο σχετίζεται με την ανάπτυξη του μικροοργανισμού και αρχίζει στην εκθετική φάση της ανάπτυξης. Επομένως το αρχικό pH βοηθά στην επίτευξη της επιθυμητής βιομάζας για παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης σε μικρότερο χρονικό διάστημα (Wong et al. 2014).

Αντίστοιχα αποτελέσματα ως προς την εναλλαγή της θερμοκρασίας σε διάφορες ζυμώσεις έχουν παρατηρηθεί. Σύμφωνα με τους Häbler et al. 2012, η παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης στους 40°C ήταν δυσμενής (0.053g.g⁻¹ γλυκόζη), φαινόμενο που αποδίδεται στο γεγονός ότι η βακτηριακή ανάπτυξη και μεταβολισμός σταματά σε θερμοκρασία μεγαλύτερη των 40°C (Häbler et al. 2012). Αντίστοιχο αποτέλεσμα προέκυψε στην παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη, όταν η θερμοκρασία ζύμωσης και pH ήταν 38°C και 7.2 αντίστοιχα, με την τελική συγκέντρωση 2,3-βουτανοδιόλης να είναι 28.9 g.L⁻¹ στις 50.5 h ζύμωσης. Επιπρόσθετα, οι Priya et al. 2016, παρατήρησαν ότι πραγματοποίηση της ζύμωσης στους 25°C ευνοήθηκε η παραγωγή αιθανόλης. Πραγματοποίηση ζυμώσεων σε εύρος θερμοκρασίας (25-37°C) η παραγωγή αιθανόλης καταστέλλεται, πιθανότατα λόγω της αδράνειας της αφυδρογονάσης της αιθανόλης σε θερμοκρασία υψηλότερη των 37°C. Ο σχηματισμός αιθανόλης ήταν σημαντικά χαμηλός (0.7 g.L⁻¹) (Priya et al. 2016).

Στον Πίνακα 9 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα διαφόρων μελετών για τη παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης μέσω μικροβιακών ζυμώσεων. Όπως παρατηρείται, η βιοτεχνολογική παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης επηρεάζεται από μία πληθώρα παραγόντων. Αρχικά, ο μικροοργανισμός κατέχει σημαντικό ρόλο, με τις περιπτώσεις όπου γίνεται χρήση τροποποιημένου μικροοργανισμού να υπάρχει αποδοτικότερη μετατροπή του υποστρώματος σε 2,3-βουτανοδιόλη, όπου αυτό επιβεβαιώνεται από την απόδοση και παραγωγικότητα που επιτυγχάνεται σε κάθε περίπτωση. Επίσης, οι περισσότερες μελέτες έχουν γίνει με πηγή άνθρακα γλυκόζη στο θρεπτικό μέσο της ζύμωσης και οι συγκεντρώσεις 2,3-βουτανοδιόλης φαίνεται να είναι αρκετά ικανοποιητικές. Από τα πιο κάτω αποτελέσματα φαίνεται ότι οι συνθήκες αερισμού και ανάδευσης είναι πολύ σημαντικές στην παραγωγή της, ενώ σημαντικό είναι οι συνθήκες pH και θερμοκρασίας σε κάθε περίπτωση, οι οποίες διαφοροποιούνται ανάλογα με τον μικροοργανισμό και το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται.

Η βιοτεχνολογική παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης σε βιομηχανική κλίμακα βρίσκεται ακόμη σε πρώιμο στάδιο αλλά με ισχυρές προοπτικές ανάπτυξης. Προκειμένου να επιτευχθεί οικονομικά εφικτή και αποδοτική διεργασία πρέπει να γίνουν αρκετές μελέτες. Ωστόσο, τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μεταπτυχιακής μελέτης είναι πολύ σημαντικά για περαιτέρω έρευνα όσον αφορά τη πραγματοποίηση μίας ζύμωσης με προσαρμογή του pH σε διαφορετική τιμή για κάθε στάδιο κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Η αυξανόμενη συνειδητοποίηση της έλλειψης ορυκτών καυσίμων, τα διάφορα οφέλη που απορρέουν από τις βιολογικές διεργασίες και η εμφάνιση της «πράσινης χημείας» και κυκλικής οικονομίας μας ωθούν να καταβάλουμε περαιτέρω προσπάθειες στον τομέα αυτό. Αναγκαίο είναι να εκμεταλλευτούμε με συνείδηση το δυναμικό που βρίσκεται στη γενετική μηχανική σε συνδυασμό με τη μαθηματική μοντελοποίηση στις διαδικασίες βελτιστοποίησης ούτως ώστε να προκύψει ταχύτερη ανάπτυξη της διεργασίας.

Πίνακας 9: Βιοτεχνολογική παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης υπό διαφορετικές συνθήκες ζύμωσης.

Μικροοργανισμός	Είδος καλλιέργειας	Πηγή άνθρακα	pH	Temp (°C)	Αερισμός (vvm)	Ανάδευση (rpm)	BDO (g.L ⁻¹)	Y (g.g ⁻¹)	P (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Ref.
<i>Enterobacter ludwigii</i>	Fed-batch	Sugar cane	6.8	30	1	Cascade 150-400	117	0.29	1.18	Present study
<i>Enterobacter ludwigii</i>	Fed-batch	Sugar cane	6.3	33.9	1	Cascade 150-250	87.5	0.35	1.51	Present study
<i>Enterobacter ludwigii</i>	Fed-batch	Sugar cane	6.5	33	1	Cascade 150-250	99.1	0.41	1.35	Present study
<i>Enterobacter cloacae</i> <i>TERI BD 18</i>	Fed-batch	Commercial glucose	7.5 (0-10h) 6.5 (10-80h)	37	-	200 (10h) 150(10-80h)	85	0.48	-	(Priya et al. 2016)
<i>K. oxytoca</i> <i>KMS005</i>	Fed-batch	Maltodextrin	6.0	38	0.8	400	88.1	0.412	1.13	(Chan et al. 2016)
<i>K. oxytoca</i> <i>M1/pUC18CM-budC</i>	Fed-batch	Glucose	6.0	30	1	400	142.5	0.42	1.47	(Cho et al. 2015)
<i>K. oxytoca</i> <i>ME-UD-3</i> <i>(ΔaldA)</i>	Fed-batch	Glucose	6.5	37	1	200	130	0.48	1.63	(Ji et al. 2010)
<i>K. oxytoca</i> <i>CICC 10781</i>	Batch	Lactose	6.5 (0-8h) 6 (9-35h)	35	1	300	30.75	0.41	-	(Guo et al. 2017)

Temp: Θερμοκρασία, BDO:2,3-βουτανοδιόλη, Y:Απόδοση, P: Παραγωγικότητα, Ref: Βιβλιογραφία

BIBΛIOΓΡΑΦΙΑ

- Alam, S. et al., 1990. Kinetics of 2,3-Butanediol Fermentation by *Bacillus amyloliquejizciens* : Effect of Initial Substrate Concentration and Aeration. , pp.71–84.
- Barret EL, Collins EB, Hall BJ, M.S., 1983. Production of 2,3-butylene glycol from whey by *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter aerogenes*. *J Dairy Sci*, p.66:2507–14.
- Bartowsky, E.J. & Henschke, P.A., 2004. The “buttery” attribute of wine - Diacetyl - Desirability, spoilage and beyond. *International Journal of Food Microbiology*, 96(3), pp.235–252.
- Beronio, P.B. & Tsao, G.T., 1993. Optimization of 2,3-butanediol production by *Klebsiella oxytoca* through oxygen transfer rate control. *Biotechnology and Bioengineering*, 42(11), pp.1263–1269.
- Biebl, H.; Zeng, A. P.; Menzel, K.; Deckwer, W.D., 1998. Fermentation of glycerol to 1, 3-propanediol and 2, 3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50(1), pp.24–29.
- Bryn, K., Ulstrup, J.C. & Stormer, F.C., 1973. Effect of acetate upon the formation of acetoin in *Klebsiella* and *Enterobacter* and it possible practical application in a rapid voges-proskauer test. *Applied microbiology*, 25(3), pp.511–512.
- Caspi R., 2008. Acetoin biosynthesis I; Acetoin biosynthesis II; Butanediol biosynthesis. *Pathways, MetaCyc encyclopedia of metabolic*.
- Celińska, E. & Grajek, W., 2009. Biotechnological production of 2,3-butanediol-Current state and prospects. *Biotechnology Advances*, 27(6), pp.715–725.
- Chan, S., Jantama, S.S. & Kanchanatawee, S., 2016. Process Optimization on Micro-Aeration Supply for High Production Yield of 2, 3- Butanediol from Maltodextrin by Metabolically-Engineered *Klebsiella oxytoca*. , pp.1–20.
- Cho, S. et al., 2015. Enhanced 2,3-butanediol production by optimizing fermentation conditions and engineering *Klebsiella oxytoca* M1 through overexpression of acetoin reductase. *PLoS ONE*, 10(9), pp.1–16.
- Converti, A., Perego, P. & Del Borghi, M., 2003. Effect of specific oxygen uptake rate on *Enterobacter aerogenes* energetics: Carbon and reduction degree balances in

- batch cultivations. *Biotechnology and Bioengineering*, 82(3), pp.370–377.
- Fages, J. et al., 1986. 2,3-Butanediol production from Jerusalem artichoke, *Helianthus tuberosus*, by *Bacillus polymyxa* ATCC 12 321. Optimization of kLa profile. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 25(3), pp.197–202.
- Garg, S.K.K. & Jain, a., 1995. Fermentative production of 2, 3-butanediol: a review. *Bioresource Technology*, 51(2), pp.103–109.
- Grover, B., Garg, S. & Verma, J., 1990. Production of 2, 3-butanediol from wood hydrolysate by *Klebsiella pneumoniae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 6, pp.328–332.
- Guo, X. et al., 2017. Efficient production of 2, 3-butanediol from cheese whey powder (CWP) solution by *Klebsiella pneumoniae* through integrating pulsed fed-batch fermentation with a two-stage pH control strategy. *Fuel*, 203, pp.469–477.
- Häßler, T. et al., 2012. Enhanced fed-batch fermentation of 2,3-butanediol by *Paenibacillus polymyxa* DSM 365. *Bioresource Technology*, 124, pp.237–244.
- Hespell, R.B., 1996. Fermentation of xylan, corn fiber, or sugars to acetoin and butanediol by *Bacillus polymyxa* strains. *Current Microbiology*, 32(5), pp.291–296.
- Hon-Nami, K., 2006. A unique feature of hydrogen recovery in endogenous starch-to-alcohol fermentation of the marine microalga, *Chlamydomonas perigranulata*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 131(1–3), pp.808–28.
- Van Houdt, R., Aertsen, A. & Michiels, C.W., 2007. Quorum-sensing-dependent switch to butanediol fermentation prevents lethal medium acidification in *Aeromonas hydrophila* AH-1N. *Research in Microbiology*, 158(4), pp.379–385.
- Jansen, N., Flickinger, M.C. & Tsao, G.T., 1984. Production of 2,3-Butanediol from D-Xylose by. , XXVI, pp.362–369.
- Ji, X.J. et al., 2010. Engineering *Klebsiella oxytoca* for efficient 2, 3-butanediol production through insertional inactivation of acetaldehyde dehydrogenase gene. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(6), pp.1751–1758.
- Ji, X.J., Huang, H. & Ouyang, P.K., 2011. Microbial 2,3-butanediol production: A state-of-the-art review. *Biotechnology Advances*, 29(3), pp.351–364.
- Johnson, M.J., 1944. Determination of 2,3-butylene glycol in fermentation. *Ind. Engng*

Chem., pp.626–7.

Kamm, B. & Kamm, M., 2006. Biorefineries - Multi product processes. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 105(January), pp.175–204.

Kamm, B. & Kamm, M., 2004. Principles of biorefineries. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(2), pp.137–145.

Lee, S. et al., 2013. Optimized Production of 2,3-Butanediol by a Lactate Dehydrogenase-deficient Mutant of *Klebsiella pneumoniae*. , 1215, pp.1210–1215.

Limayem, A. & Ricke, S.C., 2012. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in Energy and Combustion Science*, 38(4), pp.449–467.

Magee, R. & Kosaric, N., 1987. The microbial production of 2, 3-butanediol. *Advances in Applied Microbiology*, 32, pp.89–161.

Mayer, D., Schlensog, V. & Bock, A., 1995. Identification of the transcriptional activator controlling the butanediol fermentation pathway in *Klebsiella terrigena*. *Journal of Bacteriology*, 177(18), pp.5261–5269.

Mielenz, J.R., 2001. Ethanol production from biomass: technology and commercialization status. *Current opinion in microbiology*, 4(3), pp.324–329.

Nilegaonkar, S., Bhosale, S. & Kshirsagar, D., 1992. Production of 2, 3-butanediol from glucose by *Bacillus licheniformis*. *World Journal of*, 8, pp.378–381.

Papanikolaou, S. et al., 2008. Biotechnological valorisation of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: Production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil. *Biomass and Bioenergy*, 32(1), pp.60–71.

Pearce, D.W. and R.K.T., 1990. Economics of Natural Resources and the Environment. , pp.227–228.

Perego, P. et al., 2000. 2,3-Butanediol production by *Enterobacter aerogenes*: Selection of the optimal conditions and application to food industry residues. *Bioprocess Engineering*, 23(6), pp.613–620.

Peters, D., 2007. Raw Materials. *Advances in Biochemical Engineering biotechnology*. In R. Ulber & D. Sell, eds. *White Biotechnology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 1–30.

- Petrov, K. & Petrova, P., 2009. High production of 2,3-butanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* G31. , pp.659–665.
- Pirt, S.J., 1985. Principles of microbe and cell cultivation. Wiley, p.274.
- Priya, A. et al., 2016. Microbial production of 2,3-butanediol through a two-stage pH and agitation strategy in 150 l bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 105, pp.159–167.
- Ragauskas, A.J. et al., 2006. The Path Forward for Biofuels and Biomaterials. *Science*, 311(5760), pp.484–489.
- Sablayrolles, J.M. & Goma, G., 1984. Butanediol production by *Aerobacter aerogenes* NRRL B199: Effects of initial substrate concentration and aeration agitation. *Biotechnology and Bioengineering*, 26(2), pp.148–155.
- Saha, B.C., 2003. Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30(5), pp.279–291.
- Sivakumar A, Swaminathan T, B.A., 1995. Effect of urea on the production of 2,3-butanediol by *Klebsiella oxytoca*. *Bioprocess Eng* 13:, pp.49–50.
- Soltys, K. a, Batta, a K. & Koneru, B., 2001. Successful nonfreezing, subzero preservation of rat liver with 2,3-butanediol and type I antifreeze protein. *The Journal of surgical research*, 96, pp.30–34.
- Sridhar S., 1989. Zur Abtrennung von Butandiol-2,3 aus Fermenter- Brühenmit Hilfe der Umkehrosiose. *ChemIng Tech* 61(3), pp.252–253.
- Stormer, F.C., 1968. Evidence for induction of the 2,3-butanediol-forming enzymes in *Aerobacter aerogenes*. *Federation of European Biochemical Societies*, 2.
- Syu, M.J., 2001. Biological production of 2,3-butanediol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55(1), pp.10–18.
- Underkofler, L. A. & Hickey, R.J., 1954. Industrial Fermentations. *Chemical Publishing Company, New York*, Vol. 2, pp.27–94.
- Villet, R., 1981. Biotechnology for producing chemicals from biomass. Fermentation Chemicals from Biomass. Solar Energy Research Institute, Golden, Colorado, SERI/TR, Vol. 2, pp.621–754.
- Voloch M, Jansen NB, Ladisch MR, Tsao GT, Narayan R, R.V., 1985. 2,3-Butanediol.

- In: Moo-Young M, Cooney CL , Humphrey AE, editors, Comprehensive biotechnology. Oxford: Pergamon/Elsevier., pp.933–47.*
- Wang, A. et al., 2010. Production of 2,3-butanediol from corncob molasses, a waste by-product in xylitol production. , pp.965–970.
- Willke, T. & Vorlop, K.D., 2004. Industrial bioconversion of renewable resources as an alternative to conventional chemistry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66(2), pp.131–142.
- Wong, C. et al., 2014. Bioresource Technology Effects of pH and fermentation strategies on 2,3-butanediol production with an isolated *Klebsiella sp.* Zmd30 strain. , 152, pp.169–176.
- Wu, K.J. et al., 2008. Simultaneous production of 2,3-butanediol, ethanol and hydrogen with a *Klebsiella sp.* strain isolated from sewage sludge. *Bioresource Technology*, 99(17), pp.7966–7970.
- Xiu, Z.L. & Zeng, A.P., 2008. Present state and perspective of downstream processing of biologically produced 1,3-propanediol and 2,3-butanediol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78(6), pp.917–926.
- Yu, E.K.C. & Saddler, J.N., 1982. Enhanced Production of pneumoniae Grown on High Sugar Concentrations in the Presence of Acetic Acid Enhanced Production of 2,3-Butanediol by *Klebsiella pneumoniae* Grown on High Sugar Concentrations in the Presence of Acetic Acid. , pp.777–784.
- Zeng, A. et al., 1994. Use of respiratory quotient as a control parameter for optimum oxygen supply and scale-up of 2,3-butanediol production under microaerobic conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 44(9), pp.1107–1114.
- Zhang, L. et al., 2010. Microbial production of 2,3-butanediol by a surfactant (serrawettin)- deficient mutant of *Serratia marcescens* H30. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37(8), pp.857–862.