

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου

Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

*«Βελτιστοποίηση του θρεπτικού μέσου για την βιοτεχνολογική παραγωγή της
2,3-βουτανودیολης με βάση την αξιοποίηση της μελάσας»*

Επιβλέπων :

Κουτίνας Απόστολος, Επίκουρος καθηγητής

Όλγα Μ. Ψάκη

ΑΘΗΝΑ 2017

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου

Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

*«Βελτιστοποίηση του θρεπτικού μέσου για την βιοτεχνολογική παραγωγή της
2,3-βουτανودیολης με βάση την αξιοποίηση της μελάσας»*

Εξεταστική επιτροπή:

Κουτίνας Απόστολος, Επίκουρος καθηγητής

Παπανικολάου Σεραφείμ, Αναπληρωτής καθηγητής

Κούκος Ιωάννης, Αναπληρωτής καθηγητής

Επιβλέπων :

Κουτίνας Απόστολος, Επίκουρος καθηγητής

Όλγα Μ. Ψάκη

ΑΘΗΝΑ 2017

Ευχαριστίες

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

Πρωτίστως ευχαριστώ τον Επίκουρο καθηγητή κ. Κουτίνα Απόστολο, για την ανάθεση και την επίβλεψη της παρούσας μελέτης, καθώς και την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας.

Επίσης, θα ήθελα εκφράσω τις ευχαριστίες μου στους Αναπληρωτές καθηγητές κ. Παπανικολάου Σεραφείμ και κ. Κούκο Ιωάννη, μέλη της τριμελούς επιτροπή για την βοήθειά τους κατά την διάρκεια του μεταπτυχιακού μου.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτωρ Μάινα Σοφία, για τη συνεχή καθοδήγηση και βοήθεια που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Κυρίως θα ήθελα να την ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και για όλα όσα με δίδαξε.

Επιπλέον, ευχαριστώ τον μεταδιδακτορικό ερευνητή Βλυσίδα Ανέστη, για την ενασχόληση του με το στατιστικό κομμάτι της παρούσας μελέτης καθώς και την καθοδήγησή του στο κομμάτι αυτό. Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα που υπήρχε στο χώρο του εργαστηρίου.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου και στους φίλους μου για την στήριξη και κατανόηση που μου πρόσφεραν όλο αυτό τον καιρό.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η βιοτεχνολογική παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης από απόβλητα βιομηχανίας τροφίμων όπως η μελάσα έχει αποκτήσει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια λόγω των πολλαπλών εφαρμογών της. Στην παρούσα μελέτη, μελετήθηκε η βιοτεχνολογική παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης με τη χρήση του βακτηριακού στελέχους *Enterobacter ludwigii*. Στόχος της μελέτης ήταν η βελτιστοποίηση του θρεπτικού μέσου αξιοποιώντας τη μελάσα ως υπόστρωμα και εμπορικά σκευάσματα αζώτου και αλάτων. Αρχικά πραγματοποιήθηκαν ημι-συνεχείς καλλιέργειες με τη χρήση μελάσας και ανόργανης πηγής αζώτου αξιοποιώντας ακατέργαστη σακχαρόζη και μελάσα ως τροφοδοσία. Στη συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση της αρχικής συγκεντρώσεως μελάσας και η επίδραση διαφορετικών πηγών αζώτου με σκοπό την βελτιστοποίηση της παραγωγής της 2,3-βουτανοδιόλης. Η αρχική συγκέντρωση μελάσας 80 g.L^{-1} είχε τα καλύτερα αποτελέσματα ως προς την απόδοση της 2,3-βουτανοδιόλης, τη παραγωγικότητα και τη μικροβιακή αύξηση (0.38 g.g^{-1} , $1.23 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ και 0.28 h^{-1} , αντίστοιχα). Μείγμα εκχυλίσματος ζύμης, θειικού αμμωνίου και υγρό εκχύλισμα από την επεξεργασία σπόρων καλαμποκιού επιλέχθηκαν για περαιτέρω μελέτη. Η επίδραση της πηγής αζώτου και διαφόρων ιχνοστοιχείων μελετήθηκαν μέσω στατιστικού σχεδιασμού. Το εκχύλισμα ζύμης, το θειικό αμμώνιο και το KOH προσδιορίστηκαν ως πιο σημαντικοί παράγοντες για την παραγωγικότητα της 2,3-βουτανοδιόλης, μέσα από τον πειραματικό σχεδιασμό Plackett–Burman. Με τον κεντρικό σύνθετο σχεδιασμό (CCD) προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες συγκεντρώσεις. Οι βέλτιστες συγκεντρώσεις εκχυλίσματος ζύμης, θειικού αμμωνίου και το KOH ήταν 10 g.L^{-1} , 6.2 g.L^{-1} and 0.7 g.L^{-1} αντίστοιχα. Ημι-συνεχείς καλλιέργειες με το βελτιστοποιημένο θρεπτικό μέσο χρησιμοποιώντας ακατέργαστη σακχαρόζη και μελάσα ως τροφοδοσία πραγματοποιήθηκαν. Η τελική συγκέντρωση 2,3-βουτανοδιόλης ήταν 73.33 g.L^{-1} με απόδοση 0.28 g.g^{-1} και ρυθμό παραγωγής $1.52 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ στην περίπτωση που μελάσα χρησιμοποιήθηκε ως τροφοδοσία. Ενώ, όταν ακατέργαστη σακχαρόζη χρησιμοποιήθηκε ως τροφοδοσία η τελική συγκέντρωση 2,3-βουτανοδιόλης έφτασε τα 97.5 g.L^{-1} , με απόδοση 0.38 g.g^{-1} και παραγωγικότητα $1.77 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

Λέξεις κλειδιά: 2,3-βουτανοδιόλη, μελάσα ζαχαροκάλαμου, βελτιστοποίηση θρεπτικού μέσου, ημι-συνεχής ζύμωση

ABSTRACT

Recently, the biotechnological production of 2,3-butanediol has gained much interest due to the wide variety of industrial applications. Various by-products streams and food wastes have been valorized for microbial 2,3-butanediol production. In this study, the optimization of the biotechnological production of 2,3-butanediol was studied using the bacterial strain *Enterobacter ludwigii*, molasses as a carbon source, commercial nitrogen compounds and salts. At first, the utilization of molasses was investigated in fed-batch fermentations using inorganic nitrogen source and feeding solution of raw sugarcane and molasses. The effect of the initial molasses concentration and different nitrogen sources was studied in order to optimize the production of 2,3-butanediol. The higher conversion yield, productivity and μ_{\max} (0.38 g.g⁻¹, 1.23 g.L⁻¹.h⁻¹ and 0.28 h⁻¹, respectively) were obtained when the initial molasses concentration was 80 g.L⁻¹. A combination of yeast extract, pre-treated CSL and ammonium sulphate were the nitrogen sources that selected for further study. The effect of media composition on 2,3-butanediol production was study by two step statistically designed experiments. Yeast extract, ammonium sulfate and KOH were identified as the most significant factors for the production of 2,3-butanediol by the Plackett-Burman design. A central composite design was employed to determine their optimal levels. The optimal concentration of yeast extract, ammonium sulfate and KOH were 10 g.L⁻¹, 6.2 g.L⁻¹ and 0.7 g.L⁻¹ respectively. Fed-batch cultures were performed under the optimal conditions using raw sugarcane and sugarcane molasses as feeding. Up to 73.3 g.L⁻¹ of 2,3-butanediol with conversion yield of 0.28 g.g⁻¹ and productivity of 1.52 g.L⁻¹.h⁻¹ was obtained in the case with sugarcane molasses as feeding. Though when sugarcane solution used as feeding, 2,3-butanediol production reached 97.5 g.L⁻¹, with conversion yield of 0.38 gg⁻¹ and productivity of 1.77 gL⁻¹.h⁻¹.

Keywords: 2,3-butanediol, sugarcane molasses, medium optimization, fed batch.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	iv
ABSTRACT.....	v
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	vi
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	ix
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	x
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	xii
1 Εισαγωγή	13
1.1 2-3 Βουτανοδιόλη	13
1.1.1 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά	13
1.1.2 Βιομηχανικές εφαρμογές	14
1.2 Βιοτεχνολογική παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης.....	15
1.3 Μικροοργανισμοί.....	17
1.4 Ανανεώσιμες πρώτες ύλες ως υποστρώματα.....	18
1.4.1 Λιγνοκυτταρινούχα Υποστρώματα.....	18
1.4.2 Μη κυτταρινούχα υποστρώματα	19
1.4.3 Μελάσα.....	19
1.4.3.1 Σύσταση μελάσας και χαρακτηριστικά	20
1.4.3.2 Απόβλητα μελάσας.....	20
1.5 Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης.....	21
1.5.1 Σύσταση θρεπτικού υποστρώματος.....	21
1.5.2 Αρχική συγκέντρωση σακχάρων	23
1.5.3 Αερισμός.....	24
1.5.4 Ανάδευση.....	25
1.5.5 Θερμοκρασία	26

1.5.6	pH.....	26
1.6	Σκοπός της μελέτης.....	27
2	Υλικά και μέθοδοι.....	28
2.1	Βιολογικό υλικό	28
2.2	Σύσταση μελάσας.....	28
2.3	Παρασκευή εμβολίου	28
2.4	Θρεπτικό μέσο και συνθήκες ζυμώσεων	29
2.4.1	Ημι-συνεχείς καλλιέργειες με μελάσα ως πηγή άνθρακα.....	29
2.4.2	Επίδραση αρχικής συγκέντρωσης μελάσας.....	30
2.4.3	Επίδραση της πηγής αζώτου.....	30
2.5	Βελτιστοποίηση θρεπτικού μέσου ζύμωσης	32
2.5.1	Plackett–Burman design	32
2.5.2	Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός (Central Composite Design, CCD) και Επιφάνειας Απόκρισης (Response Surface Methodology-RSM).....	33
2.5.3	Ημι-συνεχείς καλλιέργειες με το βελτιστοποιημένο θρεπτικό μέσο	34
2.6	Αναλυτικές μέθοδοι	35
2.6.1	Προσδιορισμός pH.....	35
2.6.2	Προσδιορισμός βιομάζας.....	35
2.6.3	Προσδιορισμός σακχάρων και μεταβολικών προϊόντων.....	36
3	Αποτελέσματα.....	37
3.1	Ημι-συνεχείς καλλιέργειες με μελάσα ως πηγή άνθρακα σε βιοαντιδραστήρα 37	
3.2	Πειράματα σε κωνικές φιάλες με πηγή άνθρακα μελάσα.....	40
3.2.1	Επίδραση αρχικής συγκέντρωσης μελάσας.....	40
3.2.2	Επίδραση της πηγής αζώτου.....	41
3.3	Βελτιστοποίηση θρεπτικού μέσου ζύμωσης.....	44

3.3.1	Αποτελέσματα του πειραματικού Plackett–Burman	44
3.3.2	Αποτελέσματα του πειραματικού Κεντρικού Σύνθετου Σχεδιασμού (Central Composite Design, CCD) και της Επιφάνειας Απόκρισης (Response Surface Methodology-RSM).....	46
3.3.3	Βελτιστοποίηση μέσω του προγράμματος Matlab	50
3.4	Ημι-συνεχείς καλλιέργειες με το βελτιστοποιημένο θρεπτικό μέσο σε βιοαντιδραστήρα.....	51
4	Συζήτηση	55
5	Βιβλιογραφία	63

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Σύσταση μελάσας ανάμεσα του ζαχαρότευτλου και ζαχαροκάλαμου.....	20
Πίνακας 2: Κυριότερα ιχνοστοιχεία της μελάσας.	28
Πίνακας 3: Σύσταση θρεπτικού μέσου με διαφορετικές συγκεντρώσεις πηγής αζώτου	31
Πίνακας 4: Έλεγχος σημαντικών παραγόντων για την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης..	33
Πίνακας 5: Επίδραση αρχικής συγκέντρωσης μελάσας στην παραγωγή της 2,3 βουτανοδιόλης	41
Πίνακας 6: Αποτελέσματα ζυμώσεων με διαφορετικές πηγές αζώτου.	43
Πίνακας 7: Κωδικοποιημένη τιμή κάθε μεταβλητής στο σχεδιασμό Plackett-Burman και η αντίστοιχη απόκριση παραγωγής του BDO, η απόδοση και η παραγωγικότητα.	45
Πίνακας 8: Επίδραση και στατιστική ανάλυση των μεταβλητών στην απόδοση και παραγωγικότητα της 2,3-βουτανοδιόλης.	46
Πίνακας 9: Πειραματικές τιμές και προβλέψεις του μοντέλου όσον αφορά την απόκριση της παραγωγικότητας.....	47
Πίνακας 10: Εκτίμηση των τιμών παραμέτρων για την παραγωγικότητα της 2,3-βουτανοδιόλης.	48
Πίνακας 11: Πειραματικές τιμές και προβλέψεις του μοντέλου όσον αφορά την απόκριση της 2,3 βουτανοδιόλης.....	51
Πίνακας 12: Ζυμώσεις με διαφορετικούς μικροοργανισμούς με πηγή μελάσα για παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης.....	61

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

- Διάγραμμα 1: Επίδραση της σχετικής διαθεσιμότητας οξυγόνου στις αποδόσεις του προϊόντος στο *B. polymyxa* σύμφωνα με το άρθρο του De Mas et al, 1988. 25
- Διάγραμμα 2: Κατανάλωσης σακχαρόζης (Δ), γλυκόζη (\times), φρουκτόζη (\circ) καθώς και παραγωγή 2,3-Βουτανοδιόλη (\blacktriangle), ηλεκτρικό οξύ (\square), γαλακτικό οξύ (\diamond), μυρμηγκικό οξύ (\circ), οξικό οξύ (\blacksquare) και αιθανόλη (\times) κατά τη διάρκεια ημι-συνεχούς ζύμωσης με χρήση ακατέργαστης σακχαρόζης ως τροφοδοσία..... 38
- Διάγραμμα 3: Κατανάλωσης σακχαρόζης (Δ), γλυκόζη (\times), φρουκτόζη (\circ) καθώς και παραγωγή 2,3-Βουτανοδιόλη (\blacktriangle), ηλεκτρικό οξύ (\square), γαλακτικό οξύ (\diamond), μυρμηγκικό οξύ (\circ), οξικό οξύ (\blacksquare) και αιθανόλη (\times) κατά τη διάρκεια ημι-συνεχούς ζύμωσης με χρήση μελάσας ως τροφοδοσία. 39
- Διάγραμμα 4: Συντελεστής απόδοσης g.g^{-1} (\blacksquare) και παραγωγικότητα $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (\blacksquare) με τη χρήση διαφορετικών πηγών αζώτου..... 43
- Διάγραμμα 5: Counter plot του ρυθμού παραγωγής της 2,3 βουτανοδιόλης για τις εξεταζόμενες μεταβλητές εκχύλισμα ζύμης και θειικό αμμώνιο και ΚΟΗ όπως προέκυψε από την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων..... 50
- Διάγραμμα 6: Κατανάλωσης σακχαρόζης (Δ), γλυκόζη (\times), φρουκτόζη (\circ) καθώς και παραγωγή 2,3-Βουτανοδιόλη (\blacktriangle), ηλεκτρικό οξύ (\square), γαλακτικό οξύ (\diamond), μυρμηγκικό οξύ (\circ), οξικό οξύ (\blacksquare) και αιθανόλη (\times) κατά τη διάρκεια ημι-συνεχούς ζύμωσης με χρήση μελάσας ως τροφοδοσία. 53
- Διάγραμμα 7: Κατανάλωσης σακχαρόζης (Δ), γλυκόζη (\times), φρουκτόζη (\circ) καθώς και παραγωγή 2,3-Βουτανοδιόλη (\blacktriangle), ηλεκτρικό οξύ (\square), γαλακτικό οξύ (\diamond), μυρμηγκικό οξύ (\circ), οξικό οξύ (\blacksquare) και αιθανόλη (\times) κατά τη διάρκεια ημι-συνεχούς ζύμωσης βελτιστοποιημένου θρεπτικού με τροφοδοσία ακατέργαστη σακχαρόζης..... 54
- Διάγραμμα 8: Παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης, γαλακτικού οξέος και ηλεκτρικού οξέος σε ημι-συνεχείς ζυμώσεις με τη χρήση βελτιστοποιημένου θρεπτικού με τροφοδοσία μελάσας (\bullet) και ακατέργαστης σακχαρόζης (\blacktriangle) και με τη χρήση ανόργανου θρεπτικού μέσου με τροφοδοσία μελάσας (\circ) και ακατέργαστης σακχαρόζης (Δ)...... 58
- Διάγραμμα 9: Ρυθμός παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης οξέος σε ημι-συνεχείς ζυμώσεις με τη χρήση βελτιστοποιημένου θρεπτικού με τροφοδοσία μελάσας (\bullet) και ακατέργαστης

σακχαρόζης(▲) και με τη χρήση ανόργανου θρεπτικού μέσου με τροφοδοσία μελάσας (○) και ακατέργαστης σακχαρόζης (Δ). 58

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Στερεοϊσομερές μορφές της 2,3-βουτανοδιόλης (Ji 2011).	14
Εικόνα 2: Μεταβολικά μονοπάτια του <i>Lactococcus lactis</i> προς παραγωγή αιθανόλης, οξικού, μυρμηκικού, γαλακτικού οξέος και 2,3-βουτανοδιόλης (Celińska & Grajek 2009)	16
Εικόνα 3: Κατάταξη των κύριων βακτηρίων για παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης (Magee & Kosaric 1987)	17
Εικόνα 4: Παρασκευή υγρού εμβολίου για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού	29
Εικόνα 5: Καλλιέργεια του μικροοργανισμού <i>E. ludgwi</i> με πηγή άνθρακα την μελάσα	31
Εικόνα 6: Ημι-συνεχής ζύμωση του <i>E. ludgwii</i> σε βιοαντιδραστήρα με ενεργό όγκο 2L.	35

1 Εισαγωγή

Η συνεχόμενη κατανάλωση των ορυκτών καυσίμων έχει οδηγήσει στην σταδιακή μείωσή τους, και συνεπώς στην αύξηση της τιμής τους (Cho *et al.*, 2013). Μέχρι και σήμερα, η παραγωγή πολλών χημικών ενώσεων γίνεται αποκλειστικά μέσω των κλασσικών χημικών μεθόδων από μη ανανεώσιμες πηγές, κυρίως το πετρέλαιο (Biashkowska, 2016). Οι οικονομικές και περιβαλλοντικές ανησυχίες ώθησε τον άνθρωπο σε εναλλακτικές λύσεις όπως η ανάπτυξη βιοδιυλιστηρίων που ενσωματώνουν διαδικασίες μετατροπής βιομάζας και παραγωγής καυσίμων, ενέργειας και βιοτεχνολογικών χημικών από ανανεώσιμες πηγές. Η αντικατάσταση των κλασσικών χημικών μεθόδων με βιοτεχνολογικές μεθόδους που βασίζονται αποκλειστικά στην αξιοποίηση της περίσσεια βιομάζας και αποβλήτων, θεωρείται μια καλή εναλλακτική λόγω του περιβαλλοντικού οφέλους (Willke and Vorlop, 2004; Ragauskas *et al.*, 2006).

Η βιοτεχνολογική παραγωγή της 2-3 βουτανοδιόλη τα τελευταία χρόνια έχει αποκτήσει μεγάλο ενδιαφέρον λόγω των πολλαπλών βιομηχανικών εφαρμογών της. Η παραγωγή της με ζύμωση από ανανεώσιμες πηγές άνθρακα (περίσσεια βιομάζας και απόβλητα) αποτελεί μια οικονομική μέθοδος (Garg and Jain, 1995; Perego *et al.*, 2000; Kumar, Singh and Singh, 2008).

1.1 2-3 Βουτανοδιόλη

Η πρώτη αναφορά για την μικροβιακή παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης ήταν το 1906 από τους ερευνητές Harden και Wallpole με τη χρήση του μικροοργανισμού *Klebsiella pneumoniae*. Αργότερα το 1926, ο Donker μελέτησε τη συσσώρευση της βουτανοδιόλης σε καλλιέργειες του μικροοργανισμού *Bacillus polymyxa*. Το 1933, ο Fulmer έθεσε πρόταση για την μικροβιακή παραγωγή της βουτανοδιόλης σε βιομηχανικό επίπεδο (Garg and Jain, 1995; Celińska and Grajek, 2009).

1.1.1 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά

Η 2,3-βουτανοδιόλη είναι επίσης γνωστή ως 2,3-βουτυλενογλυκόλη ή διμεθυλενο-γλυκόλη και εμφανίζεται σε υγρή ή σε κρυσταλλική μορφή. Επιπλέον χαρακτηρίζεται ως άοσμη και άχρωμη. Ο μοριακός της τύπος είναι $C_4H_{10}O_2$ και έχει μοριακό βάρος 90.121 ($g \cdot mol^{-1}$).

Η 2,3-βουτανοδιόλη έχει υψηλό σημείο βρασμού το οποίο κυμαίνεται από 177 °C έως 182 °C ανάλογα με την μορφή που βρίσκεται, και χαμηλό σημείο τήξεως περίπου στους -60 °C. Η 2,3-βουτανοδιόλη απαντάται σε 3 ισομερή: D-(-), L-(+) και μεσο-μορφή (Celińska and Grajek, 2009) (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Στερεοϊσομερές μορφές της 2,3-βουτανοδιόλης (Ji 2011).

1.1.2 Βιομηχανικές εφαρμογές

Η 2,3-βουτανοδιόλη χαρακτηρίζεται από τις ποικίλες εφαρμογές και χρήσεις της και γι' αυτό το λόγο η βιομηχανία έχει δείξει σημαντικό ενδιαφέρον για την παραγωγή της. Μία από τις πολλές εφαρμογές της, είναι η λειτουργία της ως αντιψυκτικός παράγοντα, η οποία οφείλεται στο χαμηλό σημείο πήξεως -60°C. Επιπλέον, χαρακτηρίζεται ως προϊόν υψηλής προστιθέμενης αξίας, δεδομένου ότι χρησιμοποιείται ως πρόσθετο στα τρόφιμα. Το διακετύλιο παράγεται μέσω της αφυδρογόνωση της 2,3-βουτανοδιόλης, χρησιμοποιείται από τις βιομηχανίες τροφίμων ως συντηρητικό, εξαιτίας της βακτηριοστατική του δράση (Celińska and Grajek, 2009). Παράλληλα, θεωρείται μία σημαντική ένωση η οποία είναι υπεύθυνη για την χαρακτηριστική γεύση και οσμή του βουτύρου στα τρόφιμα (Bartowsky and Henschke, 2004). Ωστόσο η εφαρμογή της 2,3-βουτανοδιόλης δεν περιορίζεται μόνο ως πρόσθετο στα τρόφιμα. Μια από τις πιο σημαντικές εφαρμογές της, είναι ότι από την αφυδάτωσης της 2,3 BDO παράγεται η μεθυλο-αιθυλο-κετόνη (MEK), η οποία αξιοποιείται ως υγρό πρόσθετο καυσίμων καθώς επίσης και ως διαλύτης για τη σύνθεση ρητίνων (Garg and Jain, 1995). Ταυτόχρονα η εστεροποίηση της 2,3-βουτανοδιόλης σχηματίζει πρόδρομες ουσίες πολουρεθάνης, οι οποίες αποτελούν συστατικά σε φάρμακα και σε καλλυντικά προϊόντα. Επιπλέον, άλλη μία εφαρμογή της 2,3-βουτανοδιόλης είναι στην κατασκευή παραγωγή μελανιών εκτύπωσης, καπνογόνων, πλαστικών καθώς και σε αρώματα (Garg

and Jain, 1995). Εξίσου σημαντική, είναι η μετατροπή της 2,3 BDO σε 1,3 βουταδιένιο το οποίο συμβάλλει στην παραγωγή του συνθετικού καουτσούκ (Syu, 2001). Ιδιαίτερη σημασία έχει η θερμαντική αξία της, του 27198 J.g⁻¹ η οποία είναι συγκρίσιμη με άλλα υγρά καύσιμα όπως η αιθανόλη 29055 J.g⁻¹ και η μεθανόλη 22081 J.g⁻¹ (Flickinger, 1980). Συνεπώς, η χρήση της 2,3-βουτανοδιόλης δεν επηρεάζεται από την παρουσία της αιθανόλης αφού ισομοριακά μίγματα αιθανόλης και βουτανοδιόλης προσφέρει μια συνδυασμένη αξία των 27660 J.g⁻¹ (Yu and Saddler, 1982).

1.2 Βιοτεχνολογική παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης

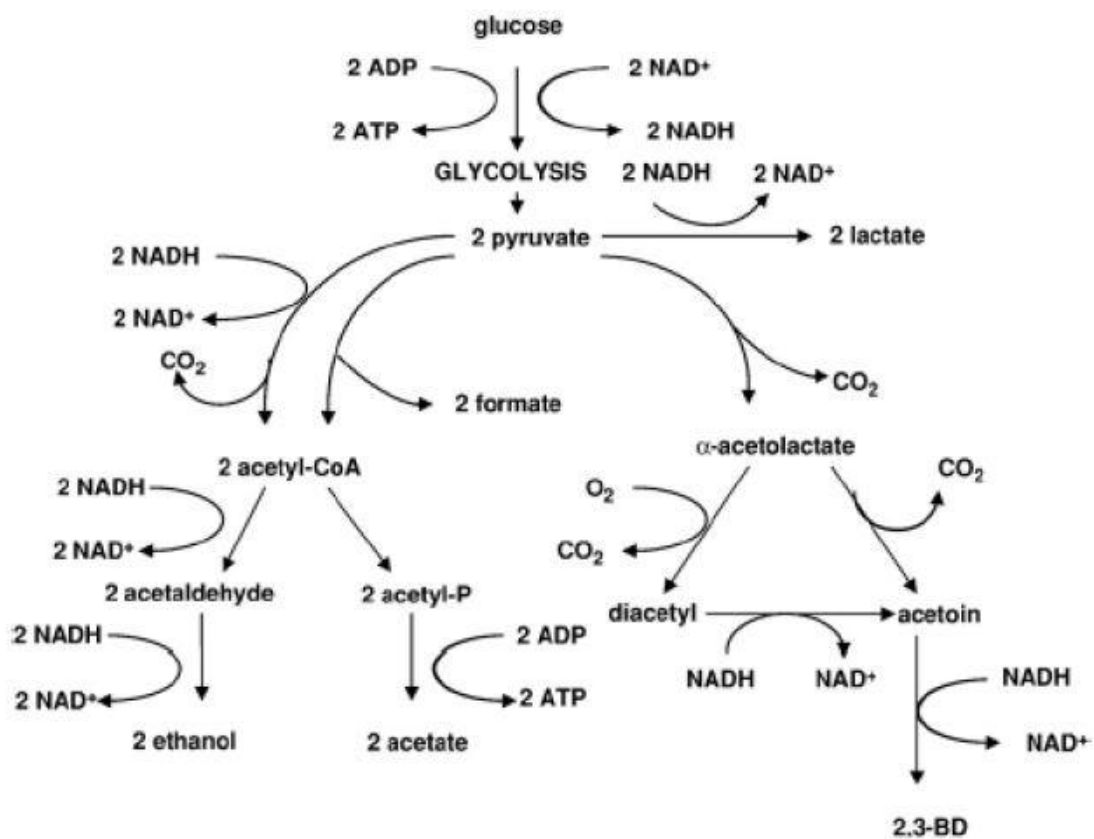
Η παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης μέσω μικροβιακών ζυμώσεων πραγματοποιείται κυρίως από βακτήρια σε διάφορα υποστρώματα. Μία ποικιλία από μονοσακχαρίτες (εξόζες και πεντόζες) μπορούν να αξιοποιηθούν για την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης. Το κύριο μέσο καλλιέργεια που έχει μελετηθεί εντατικά είναι η γλυκόζη (Syu, 2001).

Σε πρώτο στάδιο, οι μονοσακχαρίτες μετατρέπονται σε πυροσταφυλικό. Η γλυκόζη μέσω της γλυκολυτικής οδού Embden- Meyerhof μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό, εν αντίθεση με τις πεντόζες, όπου ο σχηματισμός του πυροσταφυλικού γίνεται μέσω συνδυασμού των μονοπατιών φωσφοροπεντοζών και Embden- Meyerhof (Magee and Kosaric, 1987). Έπειτα, το πυροσταφυλικό εισέρχεται στο μονοπάτι μικτού οξύ-2,3-βουτανοδιόλη, στο οποίο εκτός από βουτανοδιόλη παράγεται και ηλεκτρικό, αιθανόλη, γαλακτικό, ακετόνη κ.α. Η τελική συγκέντρωση βουτανοδιόλης και των υπόλοιπων προϊόντων που παράγονται εξαρτώνται από τις συνθήκες που επικρατούν, καθώς και το είδος του μικροοργανισμού που χρησιμοποιείται στην ζύμωση (Ji, Huang and Ouyang, 2011). Η Εικόνα 2 εξηγεί σχηματικά την γλυκόλυση προς παραγωγή βουτανοδιόλης από τον μικροοργανισμό *Lactococcus lactis*.

Για την βιοσύνθεση της 2,3-βουτανοδιόλης από το πυροσταφυλικό είναι απαραίτητη η εμπλοκή τριών βασικών ενζύμων, η συνθάση ακετολογαλακτικού οξέος, η αποκαρβοξυλάση ακετογαλακτικού οξέος και η αφυδρογονάση της 2,3-βουτανοδιόλης (Ji, Huang and Ouyang, 2011). Αρχικά το πυροσταφυλικό μετά από την γλυκόλυση με παρουσία NADH μετατρέπεται σε γαλακτικό οξύ ή σε χαμηλή περιεκτικότητα σε NADH το πυροσταφυλικό αποκαρβοξυλιώνεται σε α-ακετολογαλακτικό με την δράση της συνθάση ακετολογαλακτικού οξέος. Στην συνέχεια, σε αναερόβιες συνθήκες, το α-ακετολογαλακτικό μετατρέπεται σε ακετοΐνη.

Αντίθετα σε παρουσία οξυγόνου το α-ακετογαλακτικό παράγει διακετύλιο όταν αποκαρβοξυλιώνεται. Το διακετύλιο με την βοήθεια της αφυδρογονάση της ακετοΐνης, σχηματίζεται σε ακετοΐνη. Τέλος, η αφυδρογονάση της 2,3-βουτανοδιόλης δρα στη ακετοΐνη και παράγεται η 2,3-βουτανοδιόλη (Celińska and Grajek, 2009).

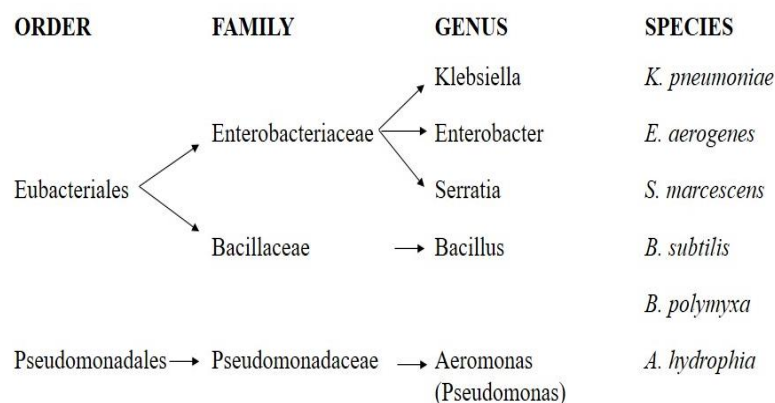
Ο μέγιστος θεωρητικός συντελεστής απόδοσης βουτανοδιόλης από την γλυκόζη που καταναλώνεται είναι 0.50 g.g^{-1} . Η ίδια απόδοση είναι και με τις πεντόζες, οι οποίες μέσω του μονοπατιού των φωσφοροπεντοζών μετατρέπονται σε 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη (Jansen, Flickinger and Tsao, 1984; Voloch, 1985). Σύμφωνα με τους Pirt και Callow οι πραγματικές αποδόσεις βουτανοδιόλης που λαμβάνονται χρησιμοποιώντας τον μικροοργανισμό *K. oxytoca* μπορεί να φτάσει το 80-90% της θεωρητικής απόδοσης.



Εικόνα 2: Μεταβολικά μονοπάτια του *Lactococcus lactis* προς παραγωγή αιθανόλης, οξικού, μυρμηκικού, γαλακτικού οξέος και 2,3-βουτανοδιόλης (Celińska & Grajek 2009)

1.3 Μικροοργανισμοί

Ένας μεγάλος αριθμός από είδη μικροοργανισμών μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ζύμωση για παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης σε διάφορα υποστρώματα όπως γλυκερόλη, εξόζες, πεντόζες καθώς και σε λιγνοκυτταρινούχα υλικά. Σε αυτούς, περιλαμβάνονται οι μικροοργανισμοί του γένους *Klebsiella* (*Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella terrigena*), *Enterobacter* (*Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*), *Bacillus* (*Bacillus polymyxa*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*), *Lactobacillus* (*Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*), *Serratia* (*Serratia marcescens*) καθώς και άλλοι πολλοί (Garg and Jain, 1995; Syu, 2001; Celińska and Grajek, 2009; Ji, Huang and Ouyang, 2011).



Εικόνα 3: Κατάταξη των κύριων βακτηρίων για παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης (Magee & Kosaric 1987)

Τα βακτήρια είναι επί του παρόντος οι μόνοι μικροοργανισμοί που έχουν βιομηχανική σημασία για την παραγωγή βουτανοδιόλης, εν αντίθεση με τις ζύμες αρκετές από τις οποίες είναι ικανές να παράγουν βουτανοδιόλη αλλά σε πολύ χαμηλές αποδόσεις (Magee and Kosaric, 1987; Garg and Jain, 1995). Μερικά βακτήρια που είναι σε θέση να παράγουν μεγάλες συγκεντρώσεις βουτανοδιόλης σε υψηλές αποδόσεις είναι τα στελέχη *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae* και ο *Bacillus polymyxa*. Ο *Enterobacter aerogenes* και ο *Serratia marcescens* θεωρούνται πολύ υποσχόμενοι μικροοργανισμοί (Magee and Kosaric, 1987; Ji, Huang and Ouyang, 2011; Yang, El-Enshay and Nuttha, 2013).

Οι μικροοργανισμοί *Klebsiella sp.*, *E. Aerogenes* ανήκουν στη κλάση 2, οι οποίοι λόγω της παθογένειας τους είναι ανεπιθύμητη η εφαρμογή τους σε ζυμώσεις βιομηχανικής κλίμακας. Γι αυτό το λόγο, στις βιομηχανίες χρησιμοποιούνται μικροοργανισμοί της κλάσης 1 οι οποίοι είναι ασφαλή. Ωστόσο οι μικροοργανισμοί αυτοί έχουν χαμηλές αποδόσεις για μια οικονομική διεργασία (Celińska and Grajek, 2009).

1.4 Ανανεώσιμες πρώτες ύλες ως υποστρώματα

Η πιο σύνηθης πηγή άνθρακα για τη βιοτεχνολογική παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης είναι οι υδατάνθρακες (Ji, Huang and Ouyang, 2011). Η πηγή άνθρακα αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα που επιδρά στο κόστος της διεργασία, με αποτέλεσμα να επηρεάζεται και η τελική τιμή του προϊόντος (Celińska and Grajek, 2009). Ως εκ τούτου, η αξιοποίηση φθηνών υποστρωμάτων, όπως περίσσεια βιομάζας και απόβλητα καθιστά την διεργασία πιο αποδοτική (Kallbach *et al.*, 2016). Όλα τα υποστρώματα που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης ταξινομούνται σε 2 κατηγορίες, τα λιγνοκυτταρινούχα και τα μη κυτταρινούχα (Ji, Huang and Ouyang, 2011).

1.4.1 Λιγνοκυτταρινούχα Υποστρώματα

Η λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα έχει αποτελέσει μεγάλο ενδιαφέρον λόγω της μεγάλης αφθονία της στο περιβάλλον. Αναφέρονται κυρίως στα υπολείμματα γεωργικών καλλιεργειών (φύλλα, κλαδιά, άχυρο κλπ), υπολείμματα επεξεργασίας γεωργικών προϊόντων (επεξεργασία καλαμποκιού, πυρηνόξυλο, φλούδες φρούτων κλπ) και υπολείμματα δασικής προέλευσης (επεξεργασία ξύλου). Η χρήση της αποτελεί μια εναλλακτική λύση για την παραγωγή ενέργειας και βιοδιεργασιών (Kumar, Singh and Singh, 2008; Hendriks and Zeeman, 2009). Η σύσταση των λιγνοκυτταρινούχων εξαρτάται ανάλογα από την προέλευσή τους. Τα κύρια συστατικά, ανεξάρτητα από τον τύπο της βιομάζας είναι η κυτταρίνη (30-50%), η ημικυτταρίνη (15-35%) και η λιγνίνη (10-20%) και σε μικρές ποσότητες περιέχει τέφρα καθώς και άλλα μη δομικά συστατικά (Wan and Li, 1994). Οι περισσότεροι μικροοργανισμοί δεν μπορούν να αφομοιώσουν την κυτταρίνη, λιγνίνη και κυτταρίνη λόγω των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών τους. Συνεπώς, είναι απαραίτητη η προεπεξεργασία των

λιγνοκυτταρινούχων υποστρώματων πριν την χρήση τους σε μια μικροβιακή διεργασία (Wan and Li, 1994; Mosier *et al.*, 2005).

1.4.2 Μη κυτταρινούχα υποστρώματα

Τα μη κυτταρινούχα υποστρώματα αποτελούνται κυρίως από τα υγρά απόβλητα της βιομηχανίας τροφίμων, τα οποία η περιεκτικότητά τους σε σάκχαρα είναι υψηλή όπως το υδρολυμένο άμυλο που προέρχεται από την επεξεργασία καλαμποκιού, η μελάσα από την επεξεργασία ζαχαροκάλαμου και ο ορός γάλακτος από την παραγωγή τυριών (Ji, Huang and Ouyang, 2011). Έκτος από τα απόβλητα της βιομηχανίας τροφίμων μη κυτταρινούχα υποστρώματα είναι και τα φυτά πλούσια σε εξόζες (ινουλίνη και σακχαρόζη). Συγκεκριμένα, η αγκινάρα της Ιερουσαλήμ (*Helianthus tuberosus*) είναι ένα ποώδες φυτό το οποίο είναι πλούσια σε υδατάνθρακες και είναι ιδανική πηγή άνθρακα στις ζυμώσεις (Sun *et al.*, 2009).

Τέλος, η γλυκερόλη θεωρείται ένα χαμηλού κόστους μη κυτταρινούχο υπόστρωμα. Αποτελεί το πιο σημαντικό παραπροϊόν από την βιομηχανία παραγωγής βιοντίζελ. Έχει δείξει ενδιαφέρον λόγω της μεγάλης ποσότητας που παράγεται ετησίως και χρησιμοποιείται για την βιοτεχνολογική παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης (Petrova and Petrova, 2010).

1.4.3 Μελάσα

Η μελάσα αποτελεί το κύριο παραπροϊόν από την βιομηχανία παραγωγής ζάχαρης. Ειδικότερα παράγεται κατά την διαδικασία βρασμού του χυμού των ζαχαρότευτλων ή ζαχαροκάλαμων που έχει ως αποτέλεσμα την κρυστάλλωση της ζάχαρης και έπειτα την απομάκρυνσή της (Hulbert Olbrich, 1963). Η μελάσα αξιοποιείται κυρίως στις βιομηχανίες τροφίμων, για ζωοτροφή, για παραγωγή χαρτιού και καυσίμων κ.α.. Επιπλέον λόγω της πλούσιας περιεκτικότητας σε σάκχαρα που περιέχει, η μελάσα χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα στη βιοτεχνολογική παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης καθώς και άλλων βιοτεχνολογικών προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας όπως το κιτρικό οξύ, αιθανόλη, ηλεκτρικό οξύ, ενδοκυτταρικό λίπος κ.α. Επιπλέον, το χαμηλό κόστος της και η μεγάλη διαθεσιμότητά της είναι δυο κύριοι παράγοντες, η οποία η μελάσα θεωρείται μία από τις σημαντικότερες πηγές

άνθρακα που χρησιμοποιούνται στις μικροβιακές ζυμώσεις (Afschar *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 2010; Chan, Kanchanatawee and Jantama, 2012).

1.4.3.1 Σύσταση μελάσας και χαρακτηριστικά

Η μελάσα λόγω του υψηλού ιξώδους και πυκνότητας που έχει παρουσιάζεται ως ένα παχύρευστο υγρό, με pH χαμηλό (Baikow, 2013). Διακρίνεται σε 2 διαφορετικά είδη ανάλογα από την ποικιλία, σε μελάσα από ζαχαροκάλαμο (sugar cane molasses) και μελάσα από ζαχαρότευτλο (beet molasses). Η ποικιλία είναι ένας από τους πολλούς παράγοντες που επηρεάζεται η σύσταση της μελάσας. Άλλοι παράγοντες είναι οι αγροκλιματικές συνθήκες που επικρατούν, η επεξεργασία της μελάσας καθ' όλη τη διάρκεια από την συλλογή μέχρι και την αποθήκευση (Hulbert Olbrich, 1963). Τα κύρια συστατικά όπως αναφέρεται και στον πίνακα 1 είναι το νερό, υδατάνθρακες κυρίως σακχαρόζη ενώ σε σημαντικές ποσότητες βρίσκονται η γλυκόζη και η φρουκτόζη. Επίσης περιέχει πρωτεΐνες και διάφορα ιχνοστοιχεία (Jung *et al.*, 2013).

Πίνακας 1: Σύσταση μελάσας ανάμεσα του ζαχαρότευτλου και ζαχαροκάλαμου

Συστατικά	Ζαχαρότευτλου (%)	Ζαχαροκάλαμου(%)
Νερό	16.5	20.0
<i>Οργανικά συστατικά</i>		
Σακχαρόζη	51.0	32.0
Γλυκόζη	-	16.0
Φρουκτόζη	-	14.0
Ιμβερτοποιήμενα σάκχαρα	1.0	-
Ραφινόζη	1.0	-
Αζωτούχες ενώσεις	19.0	10.0
<i>Ανόργανα συστατικά</i>	11.5	8.0

1.4.3.2 Απόβλητα μελάσας

Η απόρριψη των υδρολυμάτων μελάσας στο περιβάλλον, την καθιστούν ένα δυνητικό παράγοντα στο περιβάλλον εξαιτίας του χαμηλού pH και του σκούρου

χρώματος της. Το σκούρο χρώμα της μελάσας οφείλεται στη αντίδραση μη ενζυματική αμαύρωσης μεταξύ των αναγόντων σακχάρων και σακχάρων με αποτέλεσμα την παραγωγή μελανοϊδίνες οι οποίες είναι περιβαλλοντικοί ρύποι. Επιπλέον εξαιτίας του σκούρου χρώματος, η διείσδυση των ακτινών του ήλιου παρεμποδίζεται με αποτέλεσμα να υπάρχει μείωση την φωτοσυνθετική δραστηριότητα και του οξυγόνου στους υδρόβιους οργανισμούς (FitzGibbon *et al.*, 1998).

Επίσης, η διάθεση της σε έδαφος είναι εξίσου ζημιογόνο αφού μπορεί να προκαλέσει μείωση της αλκαλικότητας του εδάφους και του μαγγανίου με αποτέλεσμα να οδηγήσει στην παρεμπόδιση εκβλάστησης βλαστών (Jagroop, Dalel and Pooman, 2001; Chandra, Bharagava and Rai, 2008). Εκτός των άλλων, η ρήξη της μελάσας μπορεί να προκαλέσει προβλήματα ευτροφισμού λόγω της περιεκτικότητας της σε άζωτο ($1600-4200 \text{ mg.L}^{-1}$), φώσφορο ($225-3.038 \text{ mg.L}^{-1}$) και κάλιο ($9600-17475 \text{ mg.L}^{-1}$) (FitzGibbon *et al.*, 1998). Επομένως, δεν είναι εφικτή η απευθείας απόρριψη της στο περιβάλλον με αποτέλεσμα να είναι απαραίτητο η επεξεργασία της για τον αποχρωματισμό της. Η επεξεργασία της μελάσας μπορεί να γίνει με βιολογικούς (ζυμώσεις με μύκητες και βακτήρια), φυσικές και χημικές μεθόδους (κροκίδωση, οζονόλυση) (Jagroop, Dalel and Pooman, 2001; Chandra, Bharagava and Rai, 2008; Kumar, Singh and Singh, 2008).

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

Η παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες όπως ο αερισμός, η θερμοκρασία, το pH, η σύσταση θρεπτικού υποστρώματος και η συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος οι οποίοι θα αναλυθούν λεπτομερώς στις επόμενες ενότητες.

1.5.1 Σύσταση θρεπτικού υποστρώματος

Η σύσταση του θρεπτικού μέσου είναι ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει, όχι μόνο την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης αλλά και τον ίδιο τον μικροοργανισμό (Ji, *et al* 2011). Το θρεπτικό υπόστρωμα πρέπει να έχει όλα τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά που απαιτούνται για την ανάπτυξη και διατήρηση του μικροοργανισμού. Η ενίσχυση του μέσου με πρόσθετα συστατικά όπως βιταμίνες και ιχνοστοιχεία είναι αναγκαία για μια αποδοτική παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης. Η

συγκέντρωση των συστατικών στο θρεπτικό μέσο επηρεάζει άμεσα την παραγωγή των προϊόντων (Garg and Jain, 1995).

Η πηγή αζώτου αποτελεί μια ένας σημαντικός παράγοντας για την σύνθεση της πρωτεΐνης η οποία είναι απαραίτητη για τον κυτταρικό μεταβολισμό, κυρίως στην παραγωγή βιομάζας και ενζύμων. Γι αυτό το λόγο το άζωτο πρέπει να παρέχεται σε μεγάλες ποσότητες μέσα στο μέσο (Magee and Kosaric, 1987). Μερικές πηγές αζώτου που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης είναι το εκχύλισμα ζύμης, η ουρία, τα ανόργανα άλατα κ.α (Ji, Huang and Ouyang, 2011). Ο Laube et al. (1984) μελέτησε την επίδραση του εκχυλίσματος ζύμης σε ζύμωση με τον μικροοργανισμό *B. Polymyxa*, για παραγωγή βουτανοδιόλης. Τα αποτελέσματα ήταν ότι η βέλτιστη συγκέντρωση εκχυλίσματος ζύμης 1.5% έδινε παρόμοια αποτελέσματα, με συγκέντρωση 0.5% εκχύλισμα ζύμης όπου υπήρχε αύξηση της συγκέντρωσης των φωσφορικών αλάτων καθώς και με την προσθήκη σιδήρου και μαγγανίου στο μέσο (Laube, et al 1984). Το εκχύλισμα ζύμης αν και είναι μια πλούσια πηγή αζώτου λόγω της υψηλού κόστους του, η βιομηχανία έχει στρέψει το ενδιαφέρον της σε άλλες πιο οικονομικές αζωτούχες πηγές όπως είναι η ουρία και το θειικό αμμώνιο (Sivakumar et al 1995).

Γενικά για μια ικανοποιητική παραγωγή προϊόντων και συγκεκριμένα 2,3-βουτανοδιόλη, το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιείται πρέπει να πληροί τις ανάγκες του μικροοργανισμού που θα τελέσει την ζύμωση. Για παράδειγμα, το γένος *Klebsiella* είναι ικανό να παράγει βουτανοδιόλη σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιλαμβάνει μόνο ανόργανα άλατα και ζάχαρη (Long, S. K. & Patrick, 1945).

Επιπλέον, σύμφωνα με μελέτες έχουν δείξει ότι συγκεκριμένα ιχνοστοιχεία μπορούν να ενισχύσουν την απόδοση της 2,3-βουτανοδιόλη όπως είναι τα κατιόντα Fe^{2+} και Mn^{2+} . Συγκεκριμένα σύμφωνα με το άρθρο Laube et al. (1984a) η προσθήκη Fe^{2+} και Mn^{2+} σε συνδυασμό 0.5% εκχυλίσματος ζύμης έδωσε μεγαλύτερη απόδοση βουτανοδιόλης. Επίσης και το φωσφορικό οξύ υπό την μορφή φωσφορικού καλίου ή φωσφορικού νατρίου σε θρεπτικό μέσο που περιλαμβάνει εκχύλισμα ζύμης, διεγείρει την απόδοση της βουτανοδιόλης (Garg and Jain, 1995). Συνεπώς, η μείωση του εκχυλίσματος ζύμης με προσθήκη των παραπάνω ιχνοστοιχείων στο θρεπτικό μέσο, μπορεί να αυξήσει την απόδοση σε 2,3-βουτανοδιόλη (Laube, et al 1984).

1.5.2 Αρχική συγκέντρωση σακχάρων

Σύμφωνα με μελέτες, η αρχική συγκέντρωση και το είδος των σακχάρων στο θρεπτικό μέσο και ανάλογα και ο μικροοργανισμός που χρησιμοποιείται στην ζύμωση επηρεάζει σημαντικά στην απόδοση παραγωγής της 2,3-βουτανοδιόλης.

Σε ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν με τον μικροοργανισμό *B. Polymyxa* με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης μεγαλύτερη από 150 g.L^{-1} παρατηρήθηκε αναστολή στην αύξηση (De Mas, Jansen and Tsao, 1988). Σε καλλιέργειες με τον μικροοργανισμό *E. aerogenes* σε αρχικές συγκεντρώσεις γλυκόζης να είναι από 9-72 g.L^{-1} παρατηρήθηκε ότι δεν επηρέασε την παραγωγικότητα της 2,3-βουτανοδιόλης (Converti, Perego and Del Borghi, 2003).

Επιπλέον έρευνες αναφέρουν ότι σε συγκεντρώσεις σακχάρων 80 g.L^{-1} , ο ρυθμός παραγωγής και η απόδοση σε βουτανοδιόλη ήταν υψηλά, ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις σακχάρων ο ρυθμός παραγωγής και η απόδοση σε βουτανοδιόλης ήταν μειωμένος. Ωστόσο, η βέλτιστη συγκέντρωση σακχάρων συχνά εξαρτάται από τη συγκεκριμένη πρώτη ύλη που χρησιμοποιείται ως πηγή άνθρακα και τον μικροοργανισμό (Jansen and Tsao, 1983).

Η χρήση ανανεώσιμων πηγών άνθρακα για την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης, είχαν ως αρχική συγκέντρωση σακχάρων γύρω στο 5%-10%. Οι χαμηλές συγκεντρώσεις οφείλονται εν μέρει στο γεγονός ότι, καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση σακχάρων στις πρώτες ύλες, παράλληλα αυξάνονται επίσης οι ανασταλτικές ουσίες που υπάρχουν στις πρώτες ύλες (Long, S. K. & Patrick, 1945). Μεγάλες συγκεντρώσεις ανασταλτικών ουσιών είναι ιδιαίτερα εμφανείς στα προϊόντα υδρόλυσης ξύλου και σε διάφορους τύπους μελάσας, γι αυτό το λόγω οι ζυμώσεις τους τελούνται με χαμηλές συγκεντρώσεις άνθρακα (4%- 6%) (Mccall and Georgi, 1954). Εν αντίθεση με συνθετικά υποστρώματα που έχουν αυξημένη αρχική συγκέντρωση (έως και 200 g.L^{-1}) από καθαρά σάκχαρα όπως η γλυκόζη τότε δεν παρεμποδίζεται ο σχηματισμός της διόλης. Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί ότι υπάρχει μείωση του ειδικού ρυθμού αύξησης σε αρχικές συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 20 g.L^{-1} (Celińska and Grajek, 2009).

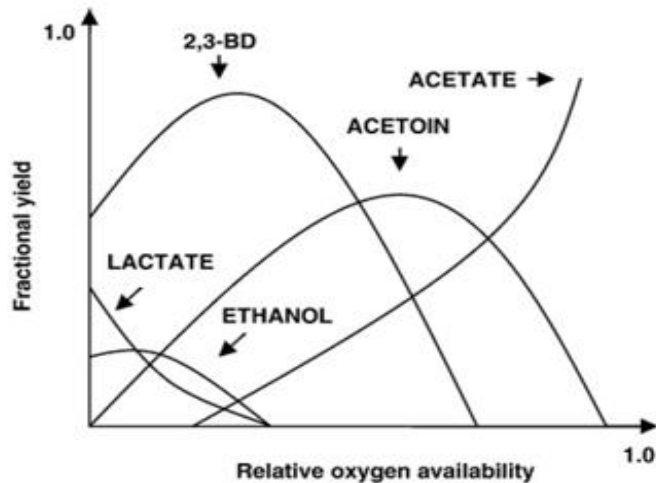
1.5.3 Αερισμός

Η παροχή οξυγόνου είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας για την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης. Η 2,3-βουτανοδιόλη είναι προϊόν που παράγεται κάτω υπό αναερόβιες συνθήκες. Μελέτες έχουν δείξει ότι εισαγωγή αερισμού ενισχύουν την παραγωγή της. Σε υψηλές συγκεντρώσεις παροχής οξυγόνου, οι Kosaric et al. (1992) αναφέρει ότι η παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης εμποδίζεται εξαιτίας της γρήγορης και μη ανατρέψιμη απενεργοποίησης του ενζύμου συνθάση του α-ακετογαλακτικού. Ωστόσο, σε μικροαερόφιλες συνθήκες, η παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης αυξάνεται (Converti, Perego and Del Borghi, 2003).

Οι περισσότερες έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί με τους μικροοργανισμούς *Bacillus polymyxa* και *Klebsiella sp.* Οι μικροοργανισμοί αυτοί, είναι προαιρετικά αναερόβιοι μικροοργανισμοί οι οποίοι μπορούν από μέσω 2 διαφορετικούς οδούς (ζύμωσης και αναπνοής) να αποκτήσουν ενέργεια. Σε περιορισμένη παροχή οξυγόνου είναι ταυτόχρονα ενεργές. Μείωση της διαθεσιμότητας του οξυγόνου οδηγεί στην αύξηση στην απόδοση της βουτανοδιόλης εν αντίθεση με την συγκέντρωση της κυτταρικής βιομάζας η οποίας μειώνεται (Celińska and Grajek, 2009).

Οι Voloch et al. (1985) παρατηρεί ότι ο σχηματισμός της κυτταρικής βιομάζας και του διοξειδίου του άνθρακα ευνοούνται σε υψηλή παροχή οξυγόνου, ενώ υπό αναερόβιες συνθήκες ευνοείται η παραγωγή της αιθανόλης σε ισομοριακές ποσότητες με της 2,3-βουτανοδιόλης.

Γενικά σε ελεγχόμενες συνθήκες αερισμού η παραγωγή παραπροϊόντων μπορεί να είναι μειωμένη και να υπάρξει μεγάλη παραγωγή βουτανοδιόλης (Zeng and Sabra, 2011).



Διάγραμμα 1: Επίδραση της σχετικής διαθεσιμότητας οξυγόνου στις αποδόσεις του προϊόντος στο *B. polymyxa* σύμφωνα με το άρθρο του De Mas et al, (1988).

1.5.4 Ανάδευση

Η ανάδευση είναι σημαντική στις διεργασίες ζυμώσεων επειδή εξασφαλίζει μια αποτελεσματική ζύμωση, με τη συνεχή έκθεση νέων υπόστρωμα στους μικροοργανισμούς και τη διανομή των προϊόντων ζύμωσης στον ζωμό της καλλιέργειας (Celińska and Grajek, 2009).

Οι Barrett et al. (1983) έχουν σχετίσει την αύξηση της απόδοσης της 2,3-βουτανοδιόλης με διαφορετικούς ρυθμούς ανάδευσης. Σε καλλιέργειες των μικροοργανισμών *E. aerogenes* και *K. pneumoniae* σε διαφορετικά υποστρώματα γλυκόζης και λακτόζης, υπό ανάδευση 220 rpm, η παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης αυξήθηκε έως και 5 φορές σε ζύμωση γλυκόζη, και έως 15-φορές σε ζύμωση λακτόζης. Ωστόσο, πολύ υψηλές τιμές ανάδευσης οδηγούν σε μείωση της παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης. Σε πειράματα με τον μικροοργανισμό *B. polymyxa*, όταν η ανάδευση ήταν στους 300 rpm η παραγωγή βουτανοδιόλης ήταν λιγότερη σε σύγκριση με την παραγωγή στους 125 rpm (Laube, et al 1984).

1.5.5 Θερμοκρασία

Η παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης είναι συνδεδεμένη με την αύξηση. Συνεπώς, η μέγιστη απόδοση σε προϊόν πρέπει να είναι σχετικά το ίδιο με την μέγιστη απόδοση σε βιομάζα (Celińska and Grajek, 2009).

Σε μια βακτηριακή ζύμωση για την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης, η βέλτιστη θερμοκρασία κυμαίνεται στους 30-35 °C, καθώς σε αυτό το εύρος είναι αυξημένη η ενζυμική δραστηριότητα (Garg and Jain, 1995). Ωστόσο, η βέλτιστη θερμοκρασία εξαρτάται από το στέλεχος και το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται στην εκάστοτε ζύμωση. Ως εκ τούτου, η βέλτιστη τιμή πρέπει να προσδιορίζεται μεμονωμένα για κάθε περίπτωση (Celińska and Grajek, 2009).

Σύμφωνα με τους Biebl et al. (1998), η μείωση της θερμοκρασία από 35 °C στους 30 °C σε ζυμώσεις με τον μικροοργανισμό *K. Pneumoniae* είχε ως αποτέλεσμα την μείωση της παραγωγής της αιθανόλης και την εύνοια της παραγωγής την 2,3 - βουτανοδιόλης. Παράλληλα, και στον μικροοργανισμό *B. polymyxa* η βέλτιστη θερμοκρασία ήταν 30 °C (Celińska and Grajek, 2009). Εν αντίθεση με τον μικροοργανισμό *E. aerogenes*, όπου η βέλτιστη θερμοκρασία είναι 39 °C (Perego et al., 2000; Converti, Perego and Del Borghi, 2003).

1.5.6 pH

Το pH του μέσου ζύμωσης θεωρείται μία εξίσου σημαντική παράμετρος για την ζύμωση. Εκτός από την σύνθεση βιομάζας, επηρεάζει και τον βακτηριακό μεταβολισμό (Garg and Jain, 1995).

Σε χαμηλές τιμές pH, η παραγωγή των οργανικών οξέων αυξάνεται και η παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης αναστέλλεται. Σε ψηλές τιμές pH, παρουσιάζεται αύξηση της παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης και μείωση της παραγωγή των οργανικών οξέων. Ωστόσο η βέλτιστη τιμή pH για παραγωγή βουτανοδιόλης επηρεάζεται από το υπόστρωμα και τον μικροοργανισμό (Celińska and Grajek, 2009). Στα περισσότερα υποστρώματα, συμπεριλαμβανομένου και τα υδρολύματα ξύλου, η βέλτιστη τιμή pH κυμαίνεται στην περιοχή 6- 6.2 (Grover, et al 1990).

Ο μικροοργανισμός *K. oxytoca* έχει βέλτιστη τιμή pH γύρω στο 5-6 (Voloach, 1985). Για τον μικροοργανισμό *E. aerogenes*, βέλτιστη τιμή για παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης θεωρείται η τιμή 6 (Perego et al., 2000).

1.6 Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης είναι η βελτιστοποίηση της βιοτεχνολογικής παραγωγής της 2,3-βουτανοδιόλης με τη χρήση αποβλήτων της βιομηχανίας ζάχαρης ως υποστρώμα.

Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης από το βακτηριακό στέλεχος *Enterobacter ludwigii* σε ασυνεχείς και ημι-συνεχείς καλλιέργειες με τη χρήση μελάσας ως πηγή άνθρακα και εμπορικά σκευάσματα αζώτου και αλάτων.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ημι-συνεχής καλλιέργεια με τη χρήση μελάσας και ανόργανης πηγής αζώτου με τη χρήση σακχαρόζης και μελάσας ως τροφοδοσία. Στη συνέχεια της πειραματικής διαδικασίας και με στόχο τη βελτιστοποίηση της παραγωγής της 2,3-βουτανοδιόλης μελετήθηκε η επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης μελάσας και η επίδραση διαφορετικών πηγών αζώτου. Η επίδραση διαφόρων συστατικών του υποστρώματος βελτιστοποιήθηκαν με τη χρήση στατιστικών μεθόδων ανάλυσης. Τέλος, οι βελτιστοποιημένες συνθήκες υποστρώματος για την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης χρησιμοποιήθηκαν σε ημι-συνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα με τη χρήση σακχαρόζης και μελάσας ως τροφοδοσία.

2 Υλικά και μέθοδοι

2.1 Βιολογικό υλικό

Στην παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη, το βακτηριακό στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε ανήκει στην τράπεζα του εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Συγκεκριμένα, το βακτήριο που χρησιμοποιήθηκε είναι το στέλεχος *Enterobacter ludwigii* και ανήκει στην οικογένεια *Enterobacteriaceae*. Για μακροπρόθεσμη διατήρηση, ο μικροοργανισμός αποθηκεύεται στους -80 °C. Για την βραχυπρόθεσμη συντήρηση, ο μικροοργανισμός αποθηκεύεται σε φιαλίδιο που εμπεριέχεται από τα κύτταρα του βακτηρίου σε υγρό ζύμωσης και γλυκερόλης (50% v/v).

2.2 Σύσταση μελάσας

Η μελάσα ζαχαροκάλαμου περιεκτικότητας σακχάρων 55% που χρησιμοποιήθηκε ως πηγή άνθρακα προμηθεύτηκε από την πολυεθνική εταιρεία Petrobras (Ρίο ντε Τζανέιρο, Βραζιλία). Τα κυριότερα ιχνοστοιχεία που περιλαμβάνονται στην μελάσα απεικονίζονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2: Κυριότερα ιχνοστοιχεία της μελάσας.

Ιχνοστοιχεία	Ποσότητα (mg/g)
Mg ²⁺	0.66 ± 0.07
Ca ²⁺	0.45 ± 0.05
Fe ⁺	0.05 ± 0.01

2.3 Παρασκευή εμβολίου

Για την ανάπτυξη και καλλιέργεια του εμβολίου, αρχικά παρασκευάστηκε ένα υγρό θρεπτικό μέσο με την ακόλουθη σύσταση (σε g.L⁻¹): 2 K₂HPO₄, 5 CH₃COONa, 0.8 MgSO₄·7H₂O, 0.06 MgSO₄·H₂O, 5 πεπτόνη, 5 εκχυλίσματος κρέατος, 2.5 εκχύλισμα ζύμης καθώς και 10 σακχαρόζη ως πηγή άνθρακα. 200 mL θρεπτικού μέσου

μεταφέρθηκαν σε κωνικές φιάλες 500 mL και έπειτα αποστειρώθηκαν στους 121 °C για 20 λεπτά. Στην συνέχεια ο εμβολιασμός (10% v/v) έγινε υπό ασηπτικές συνθήκες και επώαστηκαν για 12-14 ώρες όπου ο μικροοργανισμός βρίσκεται στην εκθετική του φάση, υπό ανάδευση στροφών 180 rpm σε θερμοκρασία 30 °C.



Εικόνα 4: Παρασκευή υγρού εμβολίου για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού

2.4 Θρεπτικό μέσο και συνθήκες ζυμώσεων

2.4.1 Ημι-συνεχείς καλλιέργειες με μελάσα ως πηγή άνθρακα

Αρχικά, διεξήχθησαν ζυμώσεις ημι-συνεχούς καλλιέργειας χρησιμοποιώντας θρεπτικό μέσο με σύσταση (σε g.L^{-1}): 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 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.09 $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.0225 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0075 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ και 0.0038 $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ με τροφοδοσία σακχαρόζης και μελάσας. Οι ζυμώσεις έλαβαν χώρα σε βιοαντιδραστήρα ημι-διαλείποντος έργου συνολικού όγκου 6.7L (Ralf, Bioengineering). Τα εν λόγω πειράματα, καθ'όλη την διάρκεια της ζύμωσης υπήρχαν σταθερές συνθήκες pH στο 6.6 και θερμοκρασίας 30 °C. Η ρύθμιση του pH γινόταν με αυτόματη προσθήκη 10M NaOH ή 10% H_2SO_4 ανάλογα με την ένδειξη που έδινε ο αισθητήρας pH. Για να διατηρηθεί το επίπεδο του διαλυτού οξυγόνου στο 5%, ο ρυθμός αερισμού καθώς και της ανάδευσης ήταν 1 vvm και 150-400 rpm αντίστοιχα. Όταν η συγκέντρωση των σακχάρων ήταν περίπου 15 g.L^{-1} γινόταν προσθήκη πυκνού

διαλύματος σακχαρόζης ή μελάσας σε σταθερή τροφοδοσία προκειμένου να διατηρηθεί η συγκέντρωση των σακχάρων πάνω από 15 g.L^{-1} .

2.4.2 Επίδραση αρχικής συγκέντρωσης μελάσας

Κατά την πρώτη φάση της πειραματικής διαδικασίας, πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις με διαφορετικές συγκεντρώσεις μελάσας προκειμένου να εξεταστεί η ικανότητα του μικροοργανισμού να αφομοιώσει την πηγή άνθρακα και να παράγει βουτανοδιόλη. Η σύσταση του θρεπτικού μέσου που επιλέχθηκε για να αναπτυχθεί ο μικροοργανισμός ήταν η εξής (σε g.L^{-1}): $7.2 (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $6 (\text{NH}_4)\text{HPO}_4$, 0.4 KOH , 0.5 EDTA , $0.3 \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0.09 \text{ CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $0.02 \text{ FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$, $0.007 \text{ ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0.003 \text{ MnSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$. Στο μέσο αυτό προστέθηκε μελάσα με συνεχώς αυξανόμενη αρχική συγκέντρωση (40, 80, 120, 200, 260 g.L^{-1}). Τα υλικά και το θρεπτικό μέσο αποστειρώθηκαν στους 121°C για 20 λεπτά. Για αποφυγή του φαινομένου της αντίδρασης Maillard η οποία λαμβάνει χώρα στα αμινοξέα και στα ανάγοντα σάκχαρα η πηγή αζώτου καθώς και η πηγή αλάτων αποστειρώθηκαν ξεχωριστά και με ασηπτικές συνθήκες μεταφέρθηκαν στο θρεπτικό μέσο. Η συγκέντρωση μελάσας που επιλέχθηκε για τα μετέπειτα πειράματα ήταν η συγκέντρωση όπου η απόδοση και η παραγωγικότητα είναι βέλτιστη, ενώ η παραγωγή παραπροϊόντων είναι χαμηλή.

2.4.3 Επίδραση της πηγής αζώτου

Η σύσταση του θρεπτικού μέσου που χρησιμοποιήθηκε για την επίδραση της πηγής αζώτου ήταν η προαναφερόμενη, με πηγή άνθρακα 80 g.L^{-1} μελάσα. Η ουρία, το εκχύλισμα ζύμης YE, επεξεργασμένο και μη υγρό εκχύλισμα από την επεξεργασία σπόρων καλαμποκιού (Corn steep liquor, CSL) καθώς και ο συνδυασμός του εκχυλίσματος ζύμης και επεξεργασμένου CSL ήταν οι οργανικές και ανόργανες πηγές αζώτου που αντικατάστησαν την ανόργανη πηγή αζώτου του θρεπτικού μέσου, το θειικό αμμώνιο. Η επεξεργασία του CSL έγινε με την μέθοδο των Bradfield et al. (2014) με κάποιες τροποποιήσεις. Συγκεκριμένα έγινε βρασμός 500 g.L^{-1} CSL στους 100°C για 15 min. Έπειτα ακολουθεί φυγοκέντρηση για απομάκρυνση των στερεών και τέλος διήθηση. Οι συγκεντρώσεις των εναλλακτικών πηγών αζώτου που χρησιμοποιήθηκαν υπολογίστηκαν με βάση το ποσοστό αζώτου που είχε η αρχική πηγή αζώτου $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Πίνακας 3).

Πίνακας 3: Σύσταση θρεπτικού μέσου με διαφορετικές συγκεντρώσεις πηγής αζώτου.

Πηγή αζώτου	A	B	Γ	Δ	E	Z	H	Θ
(NH ₄) ₂ SO ₄	7.2	-	-	-	-	-	-	-
Ουρία	-	3.32	-	-	-	-	-	-
Εκχύλισμα ζύμης	-	-	15.3	7.632	5	2.5	-	-
Επεξεργασμένο CSL	-	-	-	-	10	5	-	30
CSL	-	-	-	-	-	-	30	-

Τα πειράματα των ζυμώσεων που πραγματοποιήθηκαν με σκοπό την βελτιστοποίηση του θρεπτικού μέσου (επίδραση αρχικής συγκέντρωσης μελάσας και επίδραση πηγής αζώτου) πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 30 °C υπό ρυθμό ανάδευσης 180 rpm και ελεγχόμενο pH 6.3. Ο τελικός όγκος του θρεπτικού μέσου ήταν όγκο 100 mL σε κωνικές φιάλες των 500 mL. Τα πειράματα διεξήχθησαν εις διπλούν και τα αποτελέσματα παριστούν τη μέση τιμή.



Εικόνα 5: Καλλιέργεια του μικροοργανισμού *E. luidgwi* με πηγή άνθρακα την μελάσα.

2.5 Βελτιστοποίηση θρεπτικού μέσου ζύμωσης

Για την βελτιστοποίηση του θρεπτικού μέσου, εφαρμόστηκε ένας πειραματικός σχεδιασμός 2 σταδίων, με σκοπό να καθοριστούν και να βελτιστοποιηθούν οι σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την ζύμωση της 2,3-βουτανοδιόλης. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε ο πειραματικός σχεδιασμός Plackett–Burman για τον καθορισμό των σημαντικών παραγόντων και έπειτα εφαρμόστηκε ο σχεδιασμός βελτιστοποίησης (Central Composite Design, CCD) σε συνδυασμό με τον σχεδιασμό της επιφάνειας απόκρισης (Response Surface Methodology, RSM) για την βελτιστοποίηση των εξεταζόμενων παραγόντων. Οι πειραματικοί σχεδιασμοί και η εξαγωγή των αποτελεσμάτων έγιναν με τη χρήση του προγράμματος JMP8. Τέλος, οι βέλτιστες τιμές των σημαντικών παραμέτρων υπολογίστηκαν με τη χρήση του προγράμματος Matlab.

2.5.1 Plackett–Burman design

Ο σχεδιασμός Plackett–Burman, αρχικά εφαρμόστηκε για να προσδιοριστούν οι παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή, την απόδοση καθώς και τον ρυθμό παραγωγής της 2,3-βουτανοδιόλης μεμονωμένα, χωρίς καμία αλληλεπίδραση μεταξύ τους. Συνολικά 11 παράγοντες μελετήθηκαν στο σχεδιασμό Plackett–Burman οι οποίοι είναι: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, εκχύλισμα ζύμης, CSL, $(\text{NH}_4)\text{HPO}_4$, KOH, EDTA, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ και $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Κάθε παράγοντας εξετάστηκε σε δύο επίπεδα: (+1) το υψηλότερο και (-1) το χαμηλότερο. Στον πίνακα 4 παρουσιάζονται οι παράγοντες, οι κωδικοποιημένες τιμές και τα επίπεδα τιμών τους. Πραγματοποιήθηκαν 12 πειράματα εις διπλούν και με τυχαία σειρά ώστε να εκτιμηθεί το πειραματικό σφάλμα και να ελεγχθεί η ορθότητα του μοντέλου.

Τα μειονεκτήματα του πειραματικού σχεδιασμού Plackett–Burman είναι ότι δεν μπορεί να συμπεριλάβει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παραγόντων που εξετάζονται με αποτέλεσμα να μην απεικονίζει τις πλήρεις επιδράσεις της παραμέτρου στην απόκριση του συστήματος και να αυξάνονται ο αριθμός των πειραμάτων που πρέπει να πραγματοποιηθούν. Προκειμένου να αντιμετωπιστούν αυτά τα προβλήματα, η βελτιστοποίηση των επιμέρους σημαντικών παραγόντων έγινε με τη χρήση τεχνικών πολυπαραμετρικής στατιστικής Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός (Central Composite Design, CCD).

Πίνακας 4: Έλεγχος σημαντικών παραγόντων για την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης.

Παράγοντες	Κωδικοποιημένες τιμές	Χαμηλό επίπεδο (-1)	Υψηλό επίπεδο (+1)
(NH ₄) ₂ SO ₄	X1	4	7.2
Εκχύλισμα ζύμης	X2	1	5
CSL	X3	2	6
(NH ₄) ₂ HPO ₄	X4	2	6
KOH	X5	0	0.45
EDTA	X6	0	0.51
MgSO ₄ ·7H ₂ O	X7	0	0.3
CaCl ₂ ·6H ₂ O	X8	0	0.09
FeSO ₄ ·7H ₂ O	X9	0.0225	0.045
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	X10	0	0.0075
MnSO ₄ ·7H ₂ O	X11	0.0038	0.0076

2.5.2 Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός (Central Composite Design, CCD) και Επιφάνειας Απόκρισης (Response Surface Methodology-RSM)

Στο επόμενο στάδιο για την βελτιστοποίηση του θρεπτικού μέσου, ακολούθησε ο προσδιορισμός των βέλτιστων επιπέδων των σημαντικών μεταβλητών που αναδείχθηκαν μέσα από το πειραματικό σχεδιασμό Plackett–Burman. Για το σκοπό αυτό, εφαρμόστηκε η μέθοδος επιφανειακής απόκρισης (RSM), σε συνδυασμό με το κεντρικό σύνθετο σχεδιασμό (CCD), για την βελτίωση του ρυθμού παραγωγής της 2,3-βουτανοδιόλης.

Η μέθοδος επιφανειακής απόκρισης (RSM), εν αντίθεση με το σχεδιασμό Plackett–Burman, εκτιμά την αλληλεπίδραση των εξεταζόμενων παραγόντων σε μια πολυωνυμική εξίσωση 2^{ου} βαθμού, με αποτέλεσμα να βελτιστοποιήσει τους παραμέτρους που επηρεάζουν σημαντικά την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης. Η εξίσωση που χρησιμοποιήθηκε είναι η ακόλουθη:

$$Y = b_0 + \sum b_i x_i + \sum b_j x_i^2 + \sum b_{ii} x_{ij} \quad \text{εξίσωση 1}$$

Όπου: το Y είναι η απόκριση του μοντέλου η οποία στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι ο ρυθμός παραγωγής βουτανοδιόλης σε $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, b_0 είναι το σημείο τομής, b_i είναι η γραμμική επίδραση των παραμέτρων, b_{ii} είναι η παράμετρος αλληλεπίδρασης και b_j είναι οι τετραγωνικές παράμετροι των παραγόντων. Οι παράμετροι υπολογίστηκαν με την μέθοδο της γραμμικής παλινδρόμησης ελαχιστοποιώντας τις προβλεπόμενες με τις πειραματικές τιμές.

Συγκεκριμένα, οι σημαντικοί παράμετροι που υποδεικνύονται από το Plackett–Burman υποβλήθηκαν σε στατιστική βελτιστοποίηση σύμφωνα με το CCD. Για τις ανάγκες του μοντέλου πραγματοποιήθηκαν δεκαεφτά πειράματα τα οποία αντιπροσωπεύουν όλους τους πιθανούς συνδυασμούς των εξεταζόμενων παραμέτρων σύμφωνα με το CCD. Για στατιστικούς υπολογισμούς, οι σχέσεις μεταξύ των κωδικοποιημένων τιμών και των πραγματικών τιμών περιγράφονται από την ακόλουθη εξίσωση:

$$x_i = \frac{X_i - X_i^{CP}}{\Delta X_i} \quad \text{εξίσωση 2}$$

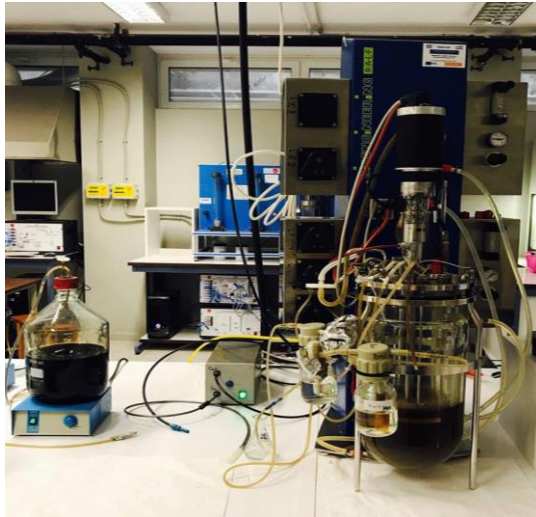
Όπου το i συμβολίζει τις ανεξάρτητες μεταβλητές, το x_i είναι η κωδικοποιημένη τιμή, X_i είναι η πραγματική τιμή, X_i^{CP} είναι η πραγματική τιμή της εξεταζόμενης μεταβλητής στο βασικό επίπεδο και ΔX_i είναι η τιμή του βήματος αλλαγής.

Όλα τα πειράματα για τη στατιστική βελτιστοποίηση του μέσου διεξήχθησαν σε κωνικές φιάλες 500 mL που ήταν πληρωμένες με 100 mL του εκάστου μέσου συμπληρωμένου με 80 g.L^{-1} μελάσας και 10% v/v εμβολίου. Οι συνθήκες που επωάστηκαν ήταν οι ακόλουθες: ρυθμός ανάδευσης 180 rpm, θερμοκρασία $30 \text{ }^\circ\text{C}$, και pH 6.3.

2.5.3 Ημι-συνεχείς καλλιέργειες με το βελτιστοποιημένο θρεπτικό μέσο

Τέλος, ζυμώσεις με το βελτιστοποιημένο θρεπτικό υπόστρωμα έλαβαν χώρα σε βιοαντιδραστήρα ημι-διαλείποντος έργου συνολικού όγκου 6.7L (Ralf, Bioengineering), με ενεργό όγκο 2 L. Τα εν λόγω πειράματα, καθ'όλη την διάρκεια της ζύμωσης υπήρχαν σταθερές συνθήκες pH στο 6.6 και θερμοκρασίας $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Η ρύθμιση

του pH γινόταν με αυτόματη προσθήκη 10M NaOH ή 10% H₂SO₄ ανάλογα με την ένδειξη που έδινε ο αισθητήρας pH. Για να διατηρηθεί το επίπεδο του διαλυτού οξυγόνου στο 5%, ο ρυθμός αερισμού καθώς και της ανάδευσης ήταν στο 1 vvm και 150-400 rpm αντίστοιχα.. Όταν η συγκέντρωση των σακχάρων ήταν περίπου 15 g.L⁻¹ γινόταν προσθήκη πυκνού διαλύματος σακχαρόζης ή μελάσας σε σταθερή τροφοδοσία προκειμένου να διατηρηθεί η συγκέντρωση των σακχάρων πάνω από 15 g.L⁻¹.



Εικόνα 6: Ημι-συνεχής ζύμωση του *E. ludgwii* σε βιοαντιδραστήρα με ενεργό όγκο 2L.

2.6 Αναλυτικές μέθοδοι

2.6.1 Προσδιορισμός pH

Το pH της καλλιέργειας προσδιορίστηκε με pH-μέτρο τύπου Checker by Hanna Instruments. Για την παρακολούθηση της πορείας του pH κατά την ζύμωση ήταν αναγκαίο σε κάθε σημείο της κινητικής να λαμβάνετε μέτρηση του. Η διόρθωση του γινόταν με την προσθήκη διαλύματος NaOH 5M ή H₂SO₄ 10% ανάλογα με τις ανάγκες, έτσι ώστε η διατήρηση του pH της καλλιέργειας να κυμαίνεται στους 6.3 ± 0.2 .

2.6.2 Προσδιορισμός βιομάζας

Η κυτταρική ανάπτυξη κατά την διάρκεια της ζύμωσης προσδιορίστηκε μέσω της μέτρησης της οπτικής πυκνότητας (Optical Density, OD) σε κάθε σημείο της κινητικής. Συγκεκριμένα, τα δείγματα αραιώθηκαν κατάλληλα με απιονισμένο νερό, έτσι ώστε η

απορρόφησή τους να ήταν από 0.1-0.9, και με την χρήση του φωτόμετρου τύπου Hitachi, έγινε μέτρηση της οπτικής πυκνότητας σε μήκος κύματος 650 nm.

2.6.3 Προσδιορισμός σακχάρων και μεταβολικών προϊόντων

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των σακχάρων και των μεταβολικών προϊόντων έγινε με την εφαρμογή της μεθόδου Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (High performance liquid chromatography, HPLC) και χρήση του συστήματος HPLC SHIMADZU UFLC XR. Η ταυτοποίηση των ενώσεων γίνεται με σύγκριση των χρόνων κατακράτησης των πρότυπων ουσιών. Οι ενώσεις διαχωρίζονται με την στατική φάση της στήλης ανάλογα με την ισχύ αλληλεπίδρασης τους γι' αυτό τον λόγο οι χρόνοι έκλουσής τους είναι διαφορετικοί. Ο διαχωρισμός των ενώσεων έγινε με την στήλη Phenomenx Rezex ROA (300x7.8mm). Χρησιμοποιήθηκε αραιό διάλυμα H₂SO₄ 10 mM για την κινητική φάση και ρυθμό ροής 0.6 mL/min σε θερμοκρασία στήλης 65 °C. Πριν από τη μέτρηση HPLC, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στις 9.000 rpm. Το υπερκείμενο αραιώθηκε κατάλληλα με διάλυμα 10mM H₂SO₄ και φιλτραρίστηκε σε φιαλίδια δείγματος HPLC.

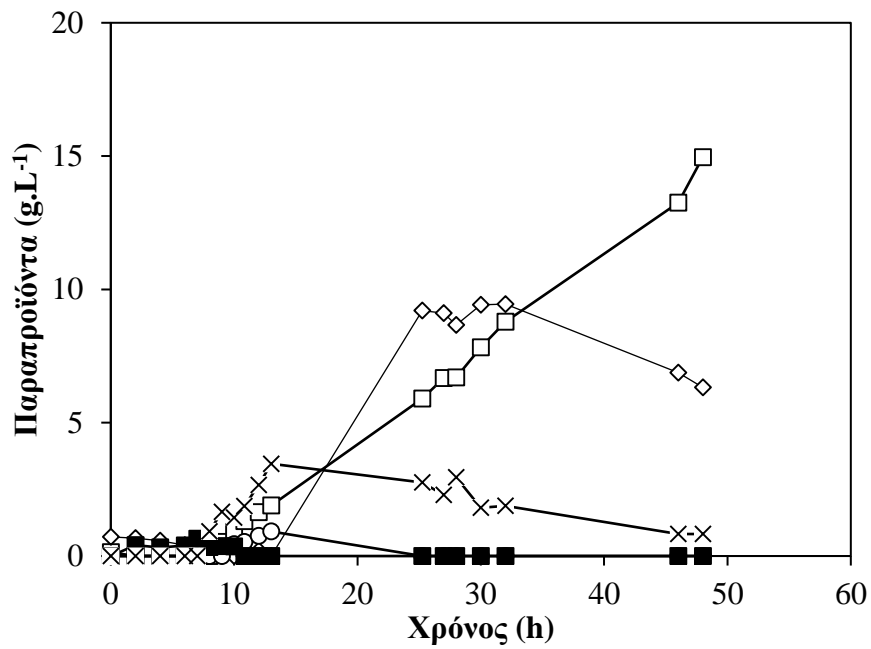
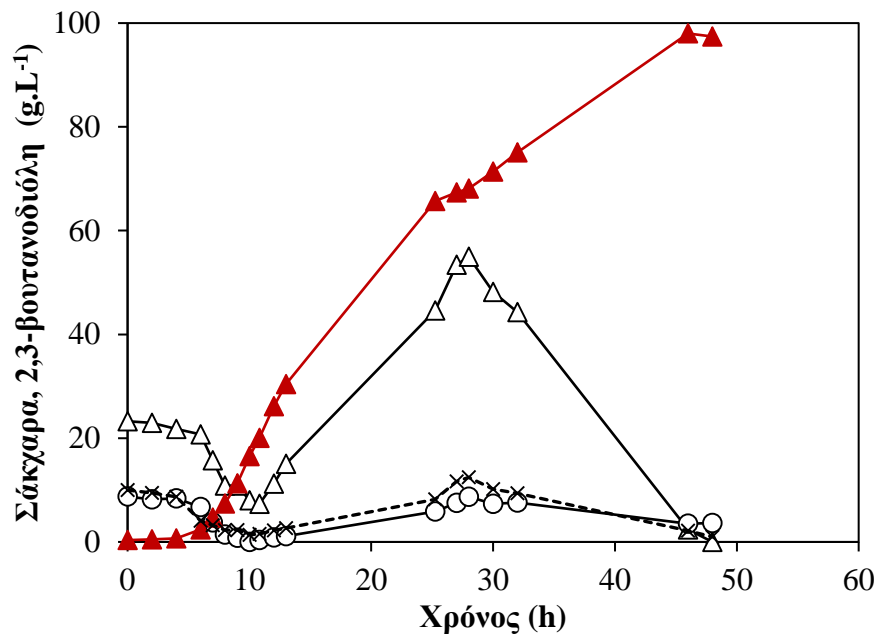
3 Αποτελέσματα

3.1 Ημι-συνεχείς καλλιέργειες με μελάσα ως πηγή άνθρακα σε βιοαντιδραστήρα

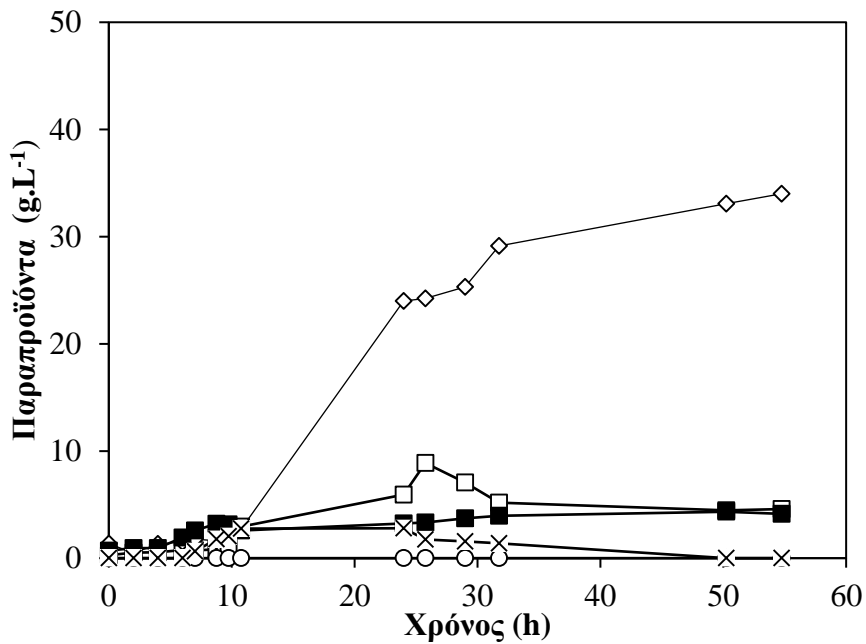
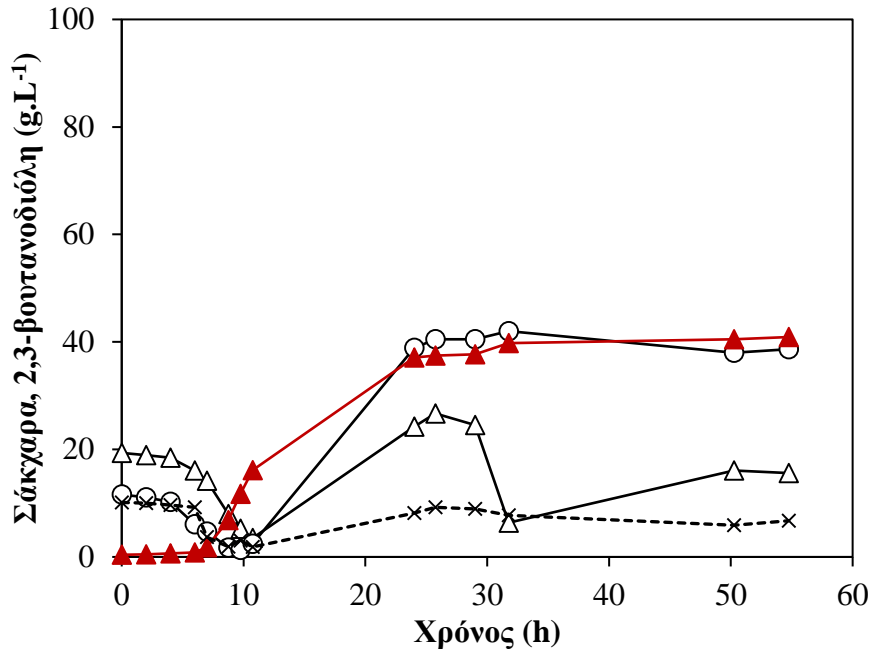
Το βακτηριακό στέλεχος *Enterobacter ludwigii* έχει αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών για την ικανότητα παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης με τη χρήση σακχαρόζης ως πηγή άνθρακα, ωστόσο δεν έχει μελετηθεί με τη χρήση μελάσας. Στην παρούσα μελέτη αρχικά, μελετήθηκε η παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης από το βακτηριακό στέλεχος *E. ludwigii* πραγματοποιώντας ημι-συνεχής καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα. Συγκεκριμένα, διεξήχθησαν 2 ζυμώσεις σε ίδιες συνθήκες ρυθμού αερισμού και ανάδευσης (1 nvm και 150-400 rpm αντίστοιχα), με το ίδιο θρεπτικό μέσο και ανόργανη πηγή αζώτου αλλά με τη χρήση σακχαρόζης και μελάσας ως τροφοδοσία. Τα πειράματα αυτά καθώς και οι συνθήκες καλλιέργειας, επιλέχθηκαν σύμφωνα με δεδομένα προηγούμενων μελετών.

Για την ζύμωση με την χρήση σακχαρόζης για τροφοδοσία η τελική συγκέντρωση βουτανοδιόλης έφθασε τα 97.4 g.L^{-1} με συντελεστής απόδοσης 0.35 g.g^{-1} και παραγωγικότητα $2.03 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Τα κύρια παραπροϊόντα που παρήχθησαν ήταν το ηλεκτρικό οξύ (15 g.L^{-1}) και το γαλακτικό οξύ (6.3 g.L^{-1}) (Διάγραμμα 2). Στις 25.25h ο ρυθμός παραγωγής έφτασε τη μέγιστη τιμή $2.60 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ενώ μετέπειτα ώρες παρουσίασε μείωση.

Στην χρήση μελάσας για τροφοδοσία (Διάγραμμα 3) παρατηρείται ότι υπάρχει μεγάλη παραγωγή γαλακτικού οξέος με τελική συγκέντρωση να φθάνει 34 g.L^{-1} . Η τελική συγκέντρωση βουτανοδιόλης έφθασε τα 40.9 g.L^{-1} με συντελεστής απόδοσης 0.31 g.g^{-1} και παραγωγικότητα $0.75 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Επίσης, από τις 24 ώρες παρουσιάζει συσσώρευση φρουκτόζης με την συγκέντρωσή της να είναι μεγαλύτερη από την σακχαρόζη και γλυκόζη.



Διάγραμμα 2: Κατανάλωσης σακχαρόζης (Δ), γλυκόζη (×), φρουκτόζη (ο) καθώς και παραγωγή 2,3-Βουτανιοδιόλη (▲), ηλεκτρικό οξύ (□), γαλακτικό οξύ (◇), μυρμηγκικό οξύ (ο), οξικό οξύ (■) και αιθανόλη (×) κατά τη διάρκεια ημι-συνεχούς ζύμωσης με χρήση ακατέργαστης σακχαρόζης ως τροφοδοσία.



Διάγραμμα 3: Κατανάλωσης σακχαρόζης (Δ), γλυκόζη (×), φρουκτόζη (ο) καθώς και παραγωγή 2,3-Βουτανодиόλη (▲), ηλεκτρικό οξύ (□), γαλακτικό οξύ (◊), μυρμηγκικό οξύ (ο), οξικό οξύ (■) και αιθανόλη (×) κατά τη διάρκεια ημι-συνεχούς ζύμωσης με χρήση μελάσας ως τροφοδοσία.

3.2 Πειράματα σε κωνικές φιάλες με πηγή άνθρακα μελάσα

3.2.1 Επίδραση αρχικής συγκέντρωσης μελάσας

Για τη βελτιστοποίηση της ζύμωσης αρχικά μελετήθηκε η επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης μελάσας. Τα πειράματα διεξήχθησαν σε κωνικές φιάλες και η σύσταση του θρεπτικού μέσου ήταν η ίδια για όλες τις συγκεντρώσεις πειραμάτων. Στον Πίνακα 5 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα για τα πειράματα με διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις μελάσας. Όπως παρατηρείται, η παραγωγικότητα και η απόδοση 2,3-βουτανοδιόλης επηρεάζεται από την αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα. Παρατηρήθηκε σημαντική παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης με την αύξηση της συγκέντρωσης της μελάσας από 40 σε 200 g.L⁻¹, περαιτέρω αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης μελάσας είχε αρνητική επίδραση στην παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης. Σύμφωνα με μελέτες αυτό συμβαίνει λόγω των μεγάλων συγκεντρώσεων ανασταλτικών συστατικών που υπάρχουν σε μεγάλες συγκεντρώσεις μελάσας και επηρεάζει την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης. Η μέγιστη συγκέντρωση 2,3-βουτανοδιόλης (35.9 g.L⁻¹) πραγματοποιήθηκε στην καλλιέργεια με αρχική συγκέντρωση μελάσας 200 g.L⁻¹. Ωστόσο, ο σχηματισμός παραπροϊόντων αυξήθηκε με την αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης. Τα κύρια παραπροϊόντα που παρήχθησαν είναι το ηλεκτρικό και το γαλακτικό οξύ. Υψηλότερος συντελεστής απόδοσης έδωσε η αρχική συγκέντρωση 260 g.L⁻¹, ωστόσο το 52.5% των σακχάρων έμειναν ακατανάλωτα στο τέλος της ζύμωσης. Υψηλές συγκεντρώσεις μελάσας φαίνεται να παρουσιάζει παρεμπόδιση του μικροοργανισμού να παράγει 2,3-βουτανοδιόλη γι' αυτό τον λόγο οφείλεται η χαμηλή παραγωγικότητα στην αντίστοιχη ζύμωση. Τα πιο ικανοποιητικά αποτελέσματα όσο αφορά την απόδοση και την παραγωγικότητα παρουσιάστηκαν στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με αρχική συγκέντρωση μελάσας 80 g.L⁻¹, με τελική συγκέντρωση 2,3-βουτανοδιόλης 13.5 g.L⁻¹ και υψηλή απόδοση και παραγωγικότητα (0.38 g.g⁻¹ και 1.23 g.L⁻¹.h⁻¹ αντίστοιχα). Επίσης η συνολική παραγωγή παραπροϊόντων παρουσιάζεται να είναι χαμηλή (3.5 g.L⁻¹) σε σύγκριση με τα πειράματα που χρησιμοποιήθηκαν υψηλότερες συγκεντρώσεις μελάσας. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω αποτελέσματα η αρχική συγκέντρωση μελάσας 80 g.L⁻¹ χρησιμοποιήθηκε στα επόμενα πειράματα.

Πίνακας 5: Επίδραση αρχικής συγκέντρωσης μελάσας στην παραγωγή της 2,3 βουτανοδιόλης

Αρχική συγκέντρωση μελάσας (g.L ⁻¹)	2,3-βουτανοδιόλη (g.L ⁻¹)	Απόδοση (g.g ⁻¹)	Παραγωγικότητα (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	SA (g.L ⁻¹)	LA (g.L ⁻¹)	AA (g.L ⁻¹)	EtOH (g.L ⁻¹)
40	5.8	0.33	0.73	0.5	0.0	0.0	0.8
80	13.5	0.38	1.23	0.8	0.3	0.1	2.3
120	21.6	0.33	1.20	1.3	0.4	0.1	4.7
160	30.4	0.39	1.27	2.4	0.2	1.7	6.2
200	35.9	0.37	1.16	1.3	0.6	0.2	6.6
260	24.85	0.41	0.53	1.2	1.1	1.1	1.6

Όπου SA:ηλεκτρικό οξύ, LA:γαλακτικό οξύ, AA: οξικό οξύ, EtOH:αιθανόλη.

3.2.2 Επίδραση της πηγής αζώτου

Όπως προαναφέρθηκε και πιο πάνω, η πηγή αζώτου είναι ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει το μεταβολισμό του μικροοργανισμού καθώς και την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης. Διαφορετικές πηγές αζώτου έχουν χρησιμοποιηθεί από διάφορους ερευνητές για τη βέλτιστη ανάπτυξη και παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης. Στην παρούσα μελέτη η ουρία, το θειικό αμμώνιο, το εκχύλισμα ζύμης (YE), corn steep liquor CSL (επεξεργασμένο και μη) καθώς και ο συνδυασμός του εκχυλίσματος ζύμης και επεξεργασμένου CSL ήταν οι οργανικές και ανόργανες πηγές αζώτου που μελετήθηκαν. Η καταλληλότητα της πηγής αζώτου εξετάστηκε με πειράματα σε κωνικές φιάλες με αρχικής συγκέντρωσης μελάσας 80 g.L⁻¹. Οι συγκεντρώσεις των εναλλακτικών πηγών αζώτου αναφέρεται στο πίνακα 3.

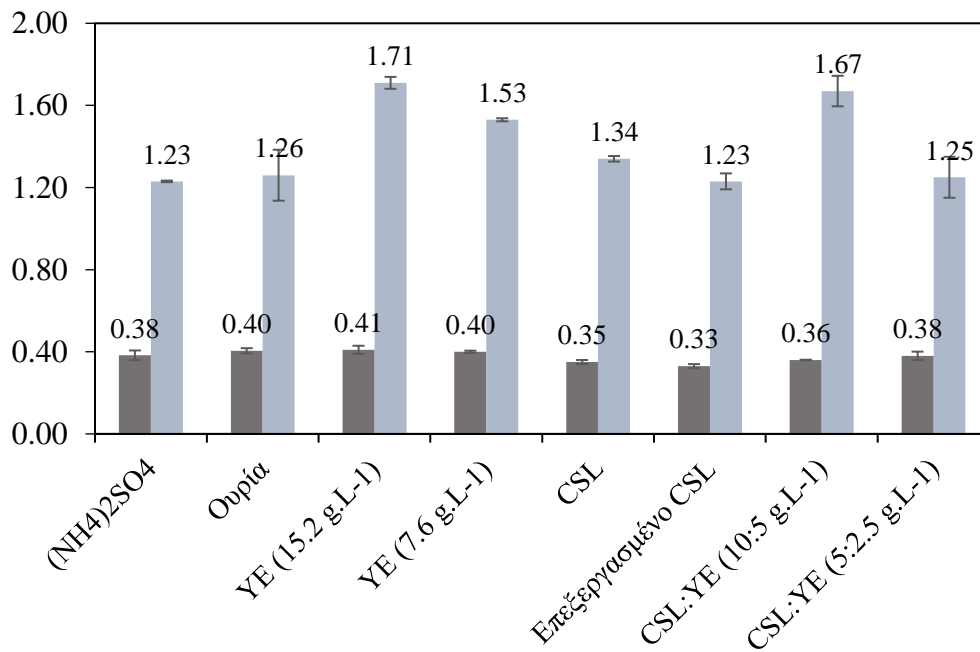
Στον Πίνακα 6 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα μεταξύ των ζυμώνσεων που διεξάχθηκαν με τον μικροοργανισμό *E. ludgwii* με διαφορετικές πηγές αζώτου. Όπως φαίνεται η χρήση διαφορετικών πηγών αζώτου επιδρά τόσο στην παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης και την παραγωγικότητα όσο και στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού και το σχηματισμό των παραπροϊόντων. Η χρήση οργανικής πηγής αζώτου και θειικού

αμμωνίου είχε θετική επίδραση στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού σημειώνοντας υψηλές τιμές μ_{\max} . Συγκεκριμένα, η χρήση της ανόργανης πηγής $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ έχει τη μεγαλύτερη τιμή μ_{\max} (0.43 h^{-1}) με τελική παραγωγή βιομάζας 8.7 g.L^{-1} , στην συνέχεια ακολουθεί το εκχύλισμα ζύμης (15.2 g.L^{-1}), με μ_{\max} 0.41 h^{-1} και τελική παραγωγή βιομάζας 10.4 g.L^{-1} . Μεταξύ των διαφορετικών πηγών αζώτου, το YE και το CSL είχαν θετική επίδραση στη παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης. Η χρήση CSL (επεξεργασμένου ή μη) ως μοναδική πηγή αζώτου παρουσίασε παρόμοια αποτελέσματα σχετικά με τη παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης, την απόδοση και την παραγωγικότητα. Αντίθετα, μείγμα επεξεργασμένου CSL με YE βελτίωσε την παραγωγικότητα. Ωστόσο διαφορετική αναλογία επεξεργασμένου CSL με YE είχε διαφορετική επίδραση. Συγκεκριμένα, η χρήση επεξεργασμένου CSL με YE με 10 g.L^{-1} και 5 g.L^{-1} αντίστοιχα βελτίωσε κατά 33.6% την παραγωγικότητα συγκριτικά με τη χρήση χαμηλότερης συγκέντρωσης μείγματος επεξεργασμένου CSL και YE. Επίσης, υψηλή συγκέντρωση YE (15.2 g.L^{-1}) παρουσίασε αύξηση της παραγωγικότητας κατά 11.8% συγκριτικά με τη χρήση YE με συγκέντρωση 7.6 g.L^{-1} . Από το Πίνακα 8 καθώς και το Διάγραμμα 5 παρατηρείται ότι μέγιστη τελική συγκέντρωση βουτανοδιόλης 16.2 g.L^{-1} , παραγωγικότητα $1.71 \text{ g.L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ και απόδοση 0.41 g.g^{-1} σημειώθηκε στις ζυμώσεις με τη χρήση YE (15.2 g.L^{-1}) ως πηγή αζώτου.

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω αποτελέσματα, η χρήση οργανικής πηγής αζώτου βελτιώνει την παραγωγικότητα, ενώ αντίστοιχα αποτελέσματα παρατηρούνται ως προς το βαθμό απόδοσης με τη χρήση YE, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ και μείγμα YE και επεξεργασμένου CSL. Συνεπώς, οι πηγές αζώτου που επιλέχθηκαν για τη βελτιστοποίηση του θρεπτικού μέσου ήταν ο συνδυασμός εκχυλίσματος ζύμης και επεξεργασμένου CSL και το θειικό αμμώνιο.

Πίνακας 6: Αποτελέσματα ζυμώσεων με διαφορετικές πηγές αζώτου.

Πηγή αζώτου (g.L ⁻¹)	μ_{max} (h ⁻¹)	X (g.L ⁻¹)	BDO (g.L ⁻¹)	SA (g.L ⁻¹)	LA (g.L ⁻¹)	AA (g.L ⁻¹)	EtOH (g.L ⁻¹)
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.43	8.7	13.5	0.8	0.3	0.1	2.3
Ουρία	0.26	6.4	13.8	1.0	0.4	0.1	2.7
YE (15.2 g.L ⁻¹)	0.40	10.4	16.2	0.9	0.8	0.7	2.8
YE (7.6 g.L ⁻¹)	0.41	13.1	14.5	0.9	0.4	0.0	2.8
CSL	0.22	6.7	14.1	1.0	0.8	0.2	3.5
Επεξεργασμένο CSL	0.26	9.4	12.3	0.7	0.3	0.0	2.5
CSL:YE (10:5 g.L ⁻¹)	0.29	11.2	13.7	0.9	0.4	0.3	2.26
CSL:YE (5:2.5 g.L ⁻¹)	0.35	11.2	11.9	0.84	0.3	0.0	2.3



Διάγραμμα 4: Συντελεστής απόδοσης g.g⁻¹ (■) και παραγωγικότητα g.L⁻¹.h⁻¹ (■) με τη χρήση διαφορετικών πηγών αζώτου.

3.3 Βελτιστοποίηση θρεπτικού μέσου ζύμωσης

3.3.1 Αποτελέσματα του πειραματικού Plackett–Burman

Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, τα ιχνοστοιχεία καθώς και η πηγή αζώτου επηρεάζουν σημαντικά στην παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης. Στην παρούσα μελέτη αρχικά χρησιμοποιήθηκε ο πειραματικός σχεδιασμός Plackett-Burman για να εκτιμηθούν τα ιχνοστοιχεία και η πηγή αζώτου που επιδρούν στην παραγωγή, την απόδοση και την παραγωγικότητα της 2,3-βουτανοδιόλης. Ο πειραματικός σχεδιασμός Plackett-Burman αποτελεί μια αποτελεσματική τεχνική βελτιστοποίησης, η οποία χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη για να προσδιοριστούν οι παράγοντες που επηρέασαν σημαντικά μια μεταβλητή και να προσδιοριστούν οι μη σημαντικοί παράγοντες που πρέπει να εξαιρεθούν για να δημιουργήσει ένα μικρότερο σύνολο παραγόντων.

Ο Πίνακας 7 παρουσιάζει τον πειραματικό σχεδιασμό Plackett-Burman για 12 δοκιμές με δύο επίπεδα της κάθε μεταβλητής και την αντίστοιχη παραγωγή BDO, απόδοση και παραγωγικότητα. Καμία παράμετρος δεν επιδρούσε σημαντικά για την τελική συγκέντρωση 2,3-βουτανοδιόλης. Οι επιδράσεις καθώς και η στατιστική ανάλυση των μεταβλητών ως προς την απόδοση σε παραγόμενη 2,3-βουτανοδιόλης καθώς και στον ρυθμό παραγωγής παρουσιάζεται στον Πίνακα 8. Με βάση την στατιστική ανάλυση, οι παράγοντες που επηρεάζουν θετικά στην απόδοση της παραγόμενης 2,3-βουτανοδιόλης είναι το YE-X₂ ($p=0.067$ και $t=2.00$) και το KOH-X₅ ($p=0.067$ $t=2.00$). Οι τιμές t υποδηλώνουν ότι ενδεχόμενη αύξηση της συγκέντρωσης των 2 αυτών παραγόντων, θα έχει θετική επίδραση στην απόδοση της παραγόμενης 2,3-βουτανοδιόλης. Όσο αφορά τη παραγωγικότητα, οι παράγοντες που επηρεάζουν θετικά στην απόδοση της παραγόμενης 2,3-βουτανοδιόλης είναι (NH₄)₂SO₄-X₁ ($p=0.0991$ $t=-1.74$) και το YE-X₂ ($p=2.27$ $t=0.0463$). Το γεγονός ότι οι τιμές t για το (NH₄)₂SO₄-X₁ είναι αρνητικό υποδηλώνει ότι ενδεχομένη μείωση της συγκέντρωσης του (NH₄)₂SO₄ επηρεάζει θετικά την παραγωγικότητα. Αντίθετα αυξάνοντας τη συγκέντρωση του YE επιφέρει θετική επίδραση στην παραγωγικότητα.

Πίνακας 7: Κωδικοποιημένη τιμή κάθε μεταβλητής στο σχεδιασμό Plackett-Burman και η αντίστοιχη απόκριση παραγωγής του BDO, η απόδοση και η παραγωγικότητα.

Πείραμα	Κωδικοποιημένες τιμές											BDO (g.L ⁻¹)	Απόδοση (g.g ⁻¹)	Παραγωγικότητα (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)			
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11	Τυπικό σφάλμα	Τυπικό σφάλμα	Τυπικό σφάλμα			
1	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	13.1	1.6	0.33	0.04	1.31	0.16
2	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	14.7	0.0	0.35	0.01	1.05	0.00
3	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	14.3	0.2	0.35	0.00	1.19	0.02
4	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	16.1	0.2	0.38	0.01	1.61	0.02
5	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	15.2	0.1	0.40	0.00	1.52	0.01
6	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	15.0	0.4	0.37	0.01	1.50	0.04
7	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	15.0	0.3	0.37	0.01	1.07	0.02
8	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	14.5	0.1	0.36	0.01	1.21	0.01
9	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	14.8	1.0	0.38	0.01	1.23	0.09
10	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	13.7	1.1	0.35	0.02	1.14	0.09
11	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	15.9	0.0	0.38	0.00	1.32	0.00
12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	14.9	0.4	0.38	0.01	1.24	0.03

Πίνακας 8: Επίδραση και στατιστική ανάλυση των μεταβλητών στην απόδοση και παραγωγικότητα της 2,3-βουτανοδιόλης.

Μεταβλητή	Απόδοση (g·g ⁻¹)			Παραγωγικότητα (g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)		
	Συντελεστής	t- τιμές	P- τιμές	Συντελεστής	t- τιμές	P- τιμές
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.003333	0.67	0.5315	-0.080917	-1.74	0.0991
YE	0.01	2.00	0.0673	0.10575	2.27	0.0463
CSL	0.001667	0.33	0.7681	-0.025417	0.55	0.6382
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.003333	0.67	0.5544	0.051583	1.11	0.2438
KOH	0.01	2.00	0.0673	0.027417	0.59	0.6115
EDTA	-0.001667	-0.33	0.7681	-0.057083	-1.22	0.2064
MgSO ₄ ·7H ₂ O	-0.003333	-0.67	0.4797	0.03025	0.65	0.5733
CaCl ₂ ·xH ₂ O	0.001667	0.33	0.7681	-0.00325	-0.07	0.9481
FeSO ₄ ·7H ₂ O	-0.005	-1.00	0.2919	-0.019083	-0.41	0.7183
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.001667	0.33	0.7681	-0.031083	-0.67	0.5002
MnSO ₄ ·7H ₂ O	-0.008333	-1.67	0.1062	-0.040583	-0.87	0.3484

3.3.2 Αποτελέσματα του πειραματικού Κεντρικού Σύνθετου Σχεδιασμού (Central Composite Design, CCD) και της Επιφάνειας Απόκρισης (Response Surface Methodology-RSM)

Στην συνέχεια, ο προσδιορισμός των σημαντικών παραγόντων που αναδείχθηκαν μέσα από το πειραματικό σχεδιασμό Plackett–Burman ((NH₄)₂SO₄-(X₁), YE(X₂), και KOH(X₅),) έγινε με την μέθοδο επιφανειακής απόκρισης (RSM), σε συνδυασμό με το κεντρικό σύνθετο σχεδιασμό (CCD), για την βελτιστοποίηση της απόδοσης και του

ρυθμού παραγωγής της 2,3-βουτανοδιόλης. Ο πειραματικός σχεδιασμός για τις σημαντικές μεταβλητές X_1 , X_2 και X_5 καθώς και οι προβλεπόμενες και πειραματικές τιμές για το ρυθμό παραγωγής της 2,3-βουτανοδιόλης, αναφέρονται στον Πίνακα 9. Οι συγκεντρώσεις των άλλων παραγόντων σταθεροποιήθηκαν σε όλα τα πειράματα στα χαμηλά επίπεδα τους όπως φαίνεται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 9: Πειραματικές τιμές και προβλέψεις του μοντέλου όσον αφορά την απόκριση της παραγωγικότητας.

Πείραμα	ΥΕ (g.L ⁻¹)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g.L ⁻¹)	ΚΟΗ (g.L ⁻¹)	Παραγωγικότητα (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)		
				Πειραματική τιμή	Προβλεπόμενη τιμή	Τυπικό σφάλμα
1	8.0	8.8	0.6	1.50	1.55	-0.05
2	8.0	8.8	0.1	1.52	1.49	0.03
3	8.0	5.2	0.6	1.70	1.59	0.11
4	8.0	5.2	0.1	1.26	1.38	-0.12
5	2.0	8.8	0.6	1.27	1.16	0.11
6	2.0	8.8	0.1	1.17	1.29	-0.12
7	2.0	5.2	0.6	1.18	1.21	-0.03
8	2.0	5.2	0.1	1.23	1.19	0.04
9	10.0	7.0	0.4	1.57	1.56	0.01
10	0	7.0	0.4	1.07	1.07	0
11	5.0	10.0	0.4	1.43	1.41	0.02
12	5.0	4.0	0.4	1.36	1.36	0
13	5.0	7.0	0.7	1.34	1.43	-0.08
14	5.0	7.0	0	1.46	1.36	0.10
15	5.0	7.0	0.4	1.49	1.49	0
16	5.0	7.0	0.4	1.46	1.49	-0.03
17	5.0	7.0	0.4	1.52	1.49	0.03

Η υψηλότερη παραγωγικότητα ($1.70 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) παρουσιάζεται στην περίπτωση που οι συγκεντρώσεις του θειικού αμμωνίου, εκχυλίσματος ζύμης και KOH ήταν 5.2, 8.8 και $0.6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ αντίστοιχα. Αντίθετα, το πείραμα 10 όπου η συγκέντρωση του εκχυλίσματος ζύμης ήταν μηδενική παρατηρείται η μικρότερη παραγωγικότητα $1.07 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$.

Ο Πίνακας 10 δείχνει μια σύνοψη των αποτελεσμάτων με τη μορφή ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) και τις μετρήσεις των συντελεστών από την εξίσωση 1 όπως αυτοί υπολογίστηκαν. Σύμφωνα τις πειραματικές τιμές πραγματοποιήθηκε μια στατιστική δοκιμή μέσω του F-test το οποίο δείχνει την σημαντικότητα του μοντέλου.

Πίνακας 10: Εκτίμηση των τιμών παραμέτρων για την παραγωγικότητα της 2,3-βουτανοδιόλης.

Πηγή προέλευσης	Βαθμοί ελευθερίας	Άθροισμα τετραγώνων	Μέσο τετράγωνο	F-τιμή	P > F
Model	9	0.37170122	0.0413	3.673	0.0501
Error	7	0.07871055	0.011244		
Lack Of Fit	5	0.07691055	0.015382	17.0912	0.0562
Pure Error	2	0.0018	0.0009		
Σύνολο	16	0.45041176			
Μεταβλητή	Εκτίμηση	Σφάλμα	t Ratio	Prob > t	
Μοντέλο	1.4906921	0.061102	24.4	0.001	
X ₁	0.0152103	0.028694	0.53	0.6124	
X ₂	0.1443155	0.028694	5.03	0.0015	
X ₅	0.0196374	0.028694	0.68	0.5158	
X ₁ ²	-0.035972	0.031582	-1.14	0.2922	
X ₂ ²	-0.062488	0.031582	-1.98	0.0884	
X ₅ ²	-0.034204	0.031582	-1.08	0.3147	
X ₁ X ₂	0.00375	0.037491	0.1	0.9231	
X ₁ X ₅	-0.03875	0.037491	-1.03	0.3357	
X ₂ X ₅	0.04625	0.037491	1.23	0.2571	

$$R^2 = 0.825, R^2 \text{ adjusted} = 0.600, \text{RMSE} = 0.106$$

Στην περίπτωση αυτή, η τιμή F είναι ίση με 3.6730, η οποία είναι υψηλότερη από την αντίστοιχη τιμή των πινάκων για επίπεδο εμπιστοσύνης 0.05 ($F(9,7)= 3.29$), επομένως η ικανότητα πρόβλεψης του μοντέλου μπορεί να θεωρείται επαρκής. Επίσης η σημαντικότητα του μοντέλου μπορεί να προσδιοριστεί και από τους συντελεστές προσδιορισμού R^2 (0.825 και $\text{adj } R^2$ (0.600)).

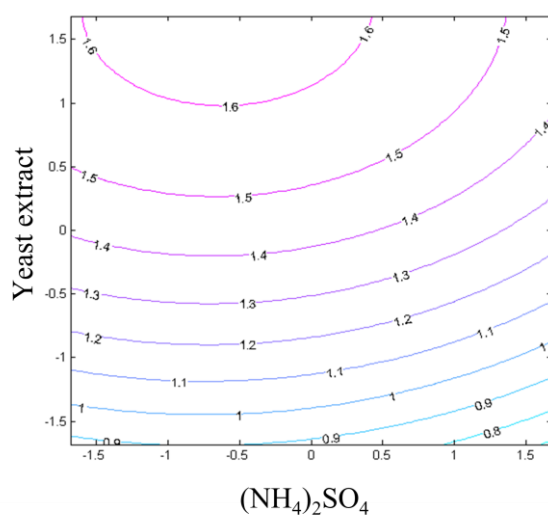
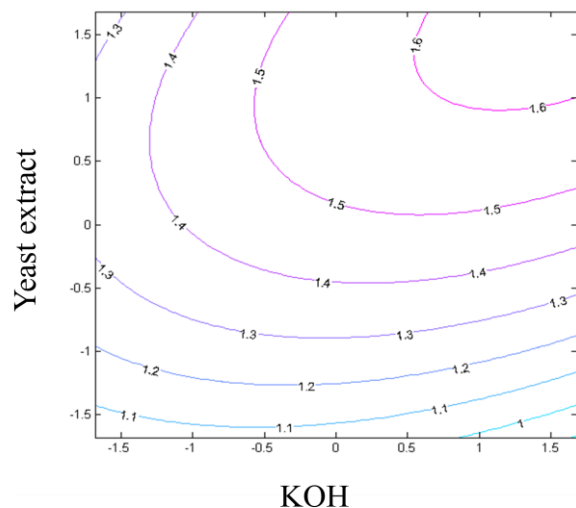
Ο έλεγχος για την σημαντικότητα των συντελεστών της Εξίσωσης 2 εκτιμήθηκε μέσω της κατανομής Student's *t*. Υψηλότερες τιμές *t* σε συνδυασμό με χαμηλότερες τιμές *p* υποδεικνύουν την σημαντικότητα των συντελεστών. Σύμφωνα με το *t*-test, η παράμετρος X_1 (YE), παρουσιάζει τη σημαντικότερη επίδραση, καθώς σημειώνεται να έχει την υψηλότερη τιμή *t*-Ratio (5.03) με χαμηλή τιμή *p* (0.0015). Αυτό υποδηλώνει ότι η συγκέντρωση του YE έχει άμεση σχέση με το ρυθμό παραγωγής της 2,3-βουτανοδιόλης. Η επίδραση των υπόλοιπων συντελεστών ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KOH) θεωρείται αμελητέα δεδομένου ότι και οι 2 παρουσιάζουν χαμηλές τιμές *t*-Ratio ίσες με 0.53 και 0.68 αντίστοιχα. Επίσης η αλληλεπίδραση μεταξύ YE έχει σημαντική επίδραση στο ρυθμό παραγωγής της 2,3-βουτανοδιόλης με τιμή $t = -1.98$.

Σύμφωνα λοιπόν με τις εκτιμήσεις των παραμέτρων, η πολυωνυμική εξίσωση γίνεται:

$$Y = 1.49 + 0.015X_1 + 0.14X_2 + 0.0196X_5 - 0.036X_1^2 - 0.06X_2^2 - 0.034X_5^2 + 0.0375X_1X_2 - 0.0039X_1X_5 + 0.046X_2X_5$$

Όπου *Y* είναι ο προβλεπόμενος ρυθμός της 2,3-βουτανοδιόλης, το X_1 είναι το YE, X_2 το $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, και το X_5 είναι το KOH.

Στο Διάγραμμα 5 παρουσιάζει το σύνολο του εύρους των 3 εξεταζόμενων παραμέτρων (Εκχύλισμα ζύμης, Θεϊκό αμμώνιο και KOH) σε σχέση με τον ρυθμό παραγωγής της 2,3-βουτανοδιόλης χρησιμοποιώντας τις παραμέτρους της Εξίσωσης 1. Παρατηρείται ότι για συγκεντρώσεις εκχυλίσματος ζύμης 8.8–10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ σε συνδυασμό με συγκεντρώση θεϊκού αμμωνίου μεταξύ 0–6.2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ και συγκεντρώσεων KOH 0.4–0.7 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ο ρυθμός παραγωγικότητας είναι μέγιστος.



Διάγραμμα 5: Counter plot του ρυθμού παραγωγής της 2,3 βουτανοδιόλης για τις εξεταζόμενες μεταβλητές εκχύλισμα ζύμης και θειικό αμμώνιο και KOH όπως προέκυψε από την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

3.3.3 Βελτιστοποίηση μέσω του προγράμματος Matlab

Η βελτιστοποίηση της παραγωγικότητας έγινε με χρήση της Εξίσωσης 1 χρησιμοποιώντας τις εκτιμήσεις των παραμέτρων του CCD. Το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Matlab. Πέρα από την βελτιστοποίηση του ρυθμού παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης εφαρμόστηκαν περιορισμοί σχετικά με την απόδοση

(>0.372), τελική συγκέντρωση 2,3-βουτανοδιόλης (>14.9) και το λόγο 2,3-βουτανοδιόλης με παραπροϊόντα (>2.5).

Σύμφωνα με τις προβλέψεις του μοντέλου, η βέλτιστη τιμή για συγκέντρωση εκχυλίσματος ζύμης είναι 10 g.L^{-1} , ενώ για το θεϊκό αμμώνιο και KOH είναι 6.2 και 0.7 g.L^{-1} αντίστοιχα, οι οποίες δίνουν την βέλτιστη παραγωγικότητα σε τιμή $1.64 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

Τα αποτελέσματα με τις προβλεπόμενες και οι πειραματικές τιμές αναφέρονται στον Πίνακα 11. Από τα αποτελέσματα, παρατηρείται ότι ο ρυθμός παραγωγής ήταν $1.64 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ όπως προέβλεψε το μοντέλο. Επίσης ο λόγος παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης ήταν μεγαλύτερος από το προβλεπόμενο καθώς και η απόδοση σε παραγόμενη 2,3-βουτανοδιόλη. Συνεπώς, το μοντέλο ήταν επαρκές, με τις πειραματικά τιμές να είναι ακριβή σε σύγκριση με τις προβλεπόμενες τιμές.

Πίνακας 11: Πειραματικές τιμές και προβλέψεις του μοντέλου όσον αφορά την απόκριση της 2,3 βουτανοδιόλης.

	Προβλεπόμενες τιμές	Πειραματικές τιμές	Τυπικό σφάλμα
BDO (g.L^{-1})	14.9	13.12 ± 0.13	-1.80
Απόδοση (g.g^{-1})	0.39	0.42 ± 0.00	0.03
Παραγωγικότητα ($\text{g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	1.64	1.64 ± 0.02	0
BDO/By-PRD (g.g^{-1})	2.54	2.87	0.33

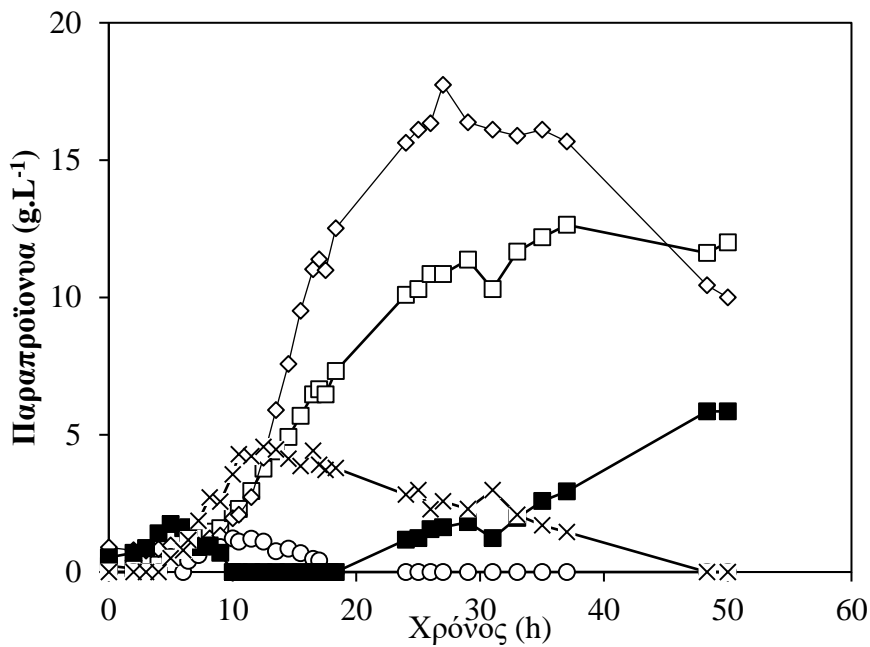
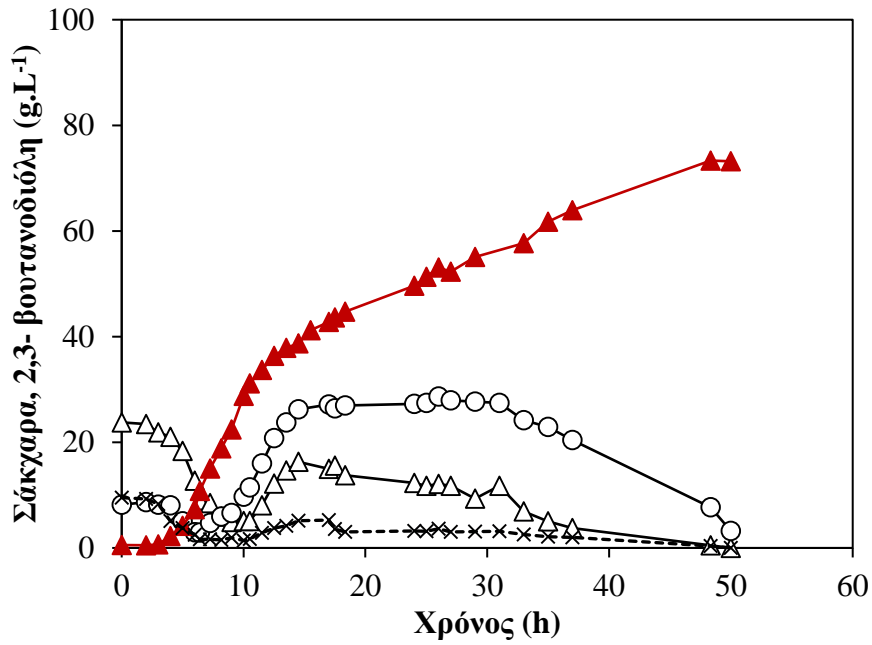
3.4 Ημι-συνεχείς καλλιέργειες με το βελτιστοποιημένο θρεπτικό μέσο σε βιοαντιδραστήρα

Τέλος, για την αύξηση της συγκέντρωσης της 2,3-βουτανοδιόλης και την επίδραση του βελτιστοποιημένου θρεπτικού στην παραγωγικότητα, διεξάχθηκαν 2 πειράματα με τη βελτιστοποιημένη σύνθεση θρεπτικού μέσου που δόθηκε από τον κώδικα Matlab, με τροφοδοσία μελάσας και ακατέργαστης σακχαρόζης. Συγκεκριμένα, οι 2 ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε θρεπτικό μέσο όπως προέκυψε από τον

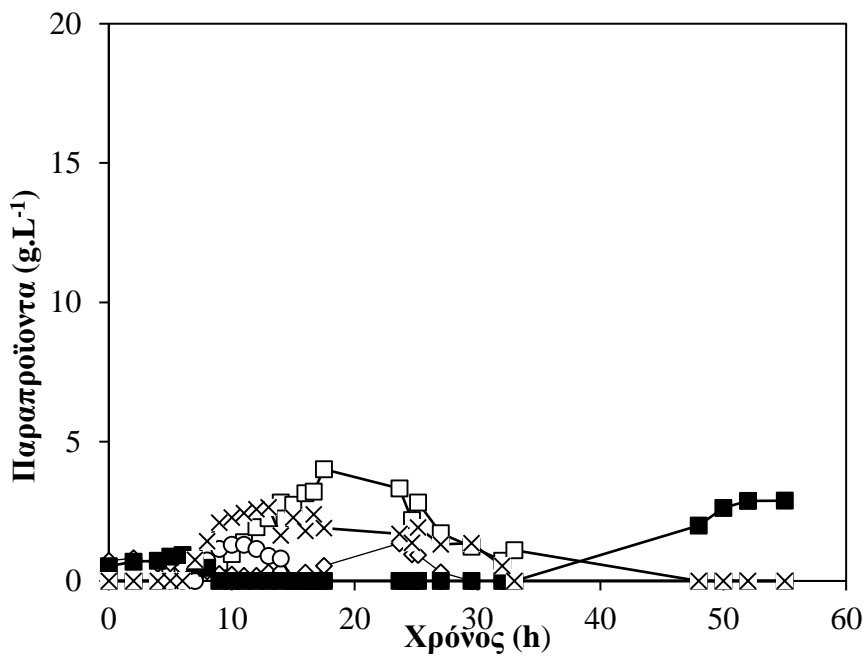
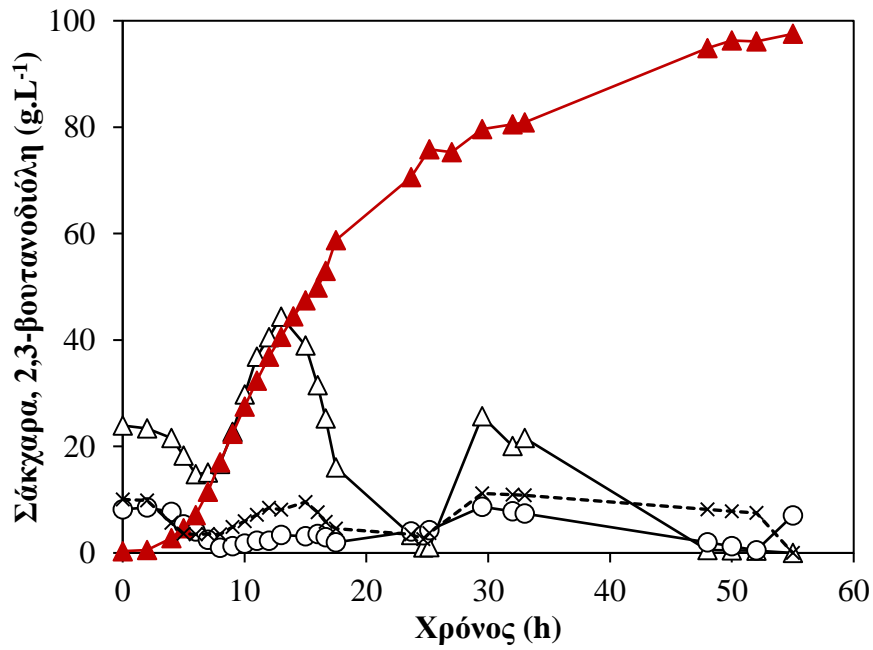
πειραματικό σχεδιασμό (σε g.L^{-1}): 6.2 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 YE, 2 CSL, 2 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0.7 KOH, 0.0025 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ και 0.0038 $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

Τα αποτελέσματα των 2 ζυμώσεων με το βελτιστοποιημένο θρεπτικό φαίνονται στα Διαγράμματα 6 και 7. Από το Διάγραμμα 6, παρατηρείται ότι η ζύμωση με τροφοδοσία μελάσας η συσσώρευση φρουκτόζης ξεκινά από τις πρώτες ώρες της ζύμωσης. Συγκεκριμένα, το φαινόμενο ξεκινά να είναι εμφανές από τις 10h όπου συγκέντρωση φρουκτόζης είναι 9.7 g.L^{-1} και συγκέντρωση σακχαρόζης να βρίσκεται στο 5.1 g.L^{-1} . Η συγκέντρωση της 2,3-βουτανοδιόλης στις 18.33h βρίσκεται στα 44.7 g.L^{-1} με συντελεστή απόδοσης 0.38 g.g^{-1} και παραγωγικότητα $2.44 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Μετά τις 24h, παρατηρείται μείωση του ρυθμού παραγωγής της 2,3-βουτανοδιόλης και σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης του ηλεκτρικού οξέος και του γαλακτικού οξέος. Η τελική συγκέντρωση 2,3-βουτανοδιόλης ήταν 73.33 g.L^{-1} , με απόδοση να φτάνει στο 0.28 g.g^{-1} και παραγωγικότητα $1.52 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

Η ζύμωση με τροφοδοσία ακατέργαστης σακχαρόζης σημειώνεται να έχει τελική συγκέντρωση βουτανοδιόλης 97.5 g.L^{-1} , με απόδοση παραγόμενης 2,3-βουτανοδιόλης 0.38 g.g^{-1} και παραγωγικότητα $1.77 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Στις 25.26h ο ρυθμός παραγωγής καθώς και η απόδοση 2,3-βουτανοδιόλης σημειώνουν τις μέγιστες τιμές $3.01 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ και 0.41 g.g^{-1} αντίστοιχα. Επίσης υπάρχει μείωση της παραγωγής των παραπροϊόντων με αποτέλεσμα στο τέλος της ζύμωσης να μην υπάρχουν παραπροϊόντα παρά μόνο οξικό οξύ με συγκεντρώση 2.9 g.L^{-1} (Διάγραμμα 7).



Διάγραμμα 6: Κατανάλωσης σακχαρόζης (Δ), γλυκόζη (\times), φρουκτόζη (\circ) καθώς και παραγωγή 2,3-Βουτανοδιόλη (\blacktriangle), ηλεκτρικό οξύ (\square), γαλακτικό οξύ (\diamond), μυρμηγκικό οξύ (\circ), οξικό οξύ (\blacksquare) και αιθανόλη (\times) κατά τη διάρκεια ημι-συνεχούς ζύμωσης με χρήση μελάσας ως τροφοδοσία.



Διάγραμμα 7: Κατανάλωσης σακχαρόζης (Δ), γλυκόζη (×), φρουκτόζη (ο) καθώς και παραγωγή 2,3-Βουτανιοδιόλη (▲), ηλεκτρικό οξύ (□), γαλακτικό οξύ (ϐ), μυρμηγκικό οξύ (ο), οξικό οξύ (■) και αιθανόλη (×) κατά τη διάρκεια ημι-συνεχούς ζύμωσης βελτιστοποιημένου θρεπτικού με τροφοδοσία ακατέργαστη σακχαρόζης.

4 Συζήτηση

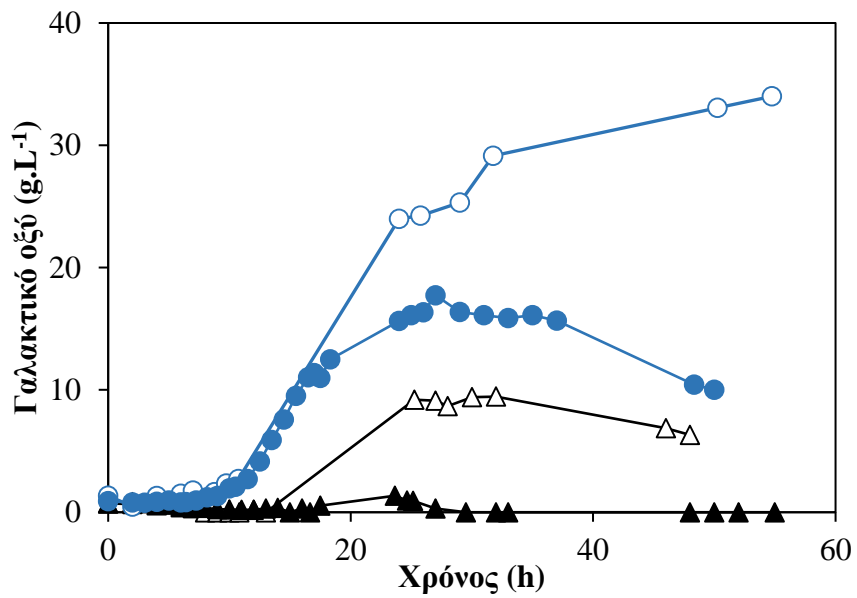
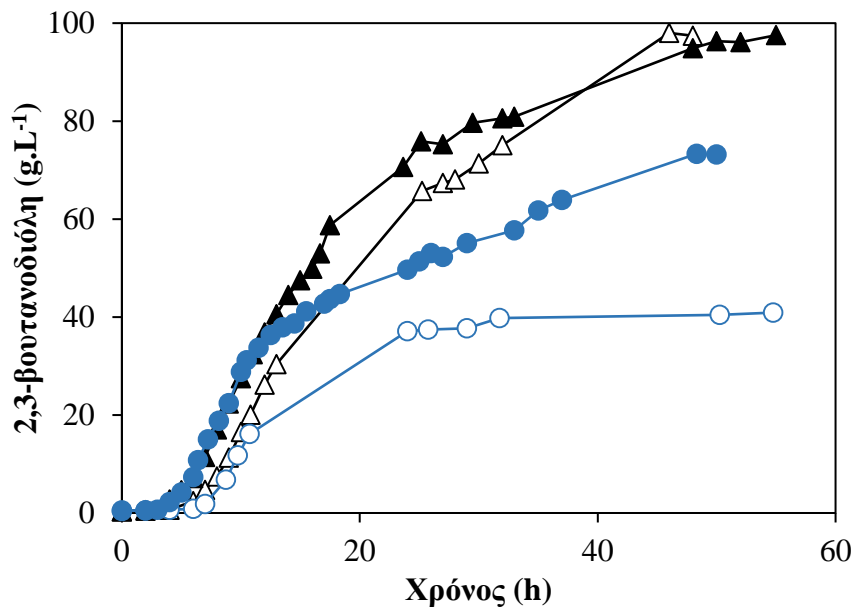
Τα τελευταία χρόνια, η βιοτεχνολογική παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης με αξιοποίηση ανανεώσιμων υποστρωμάτων, έχει αποκτήσει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον λόγω των πολλαπλών βιομηχανικών εφαρμογών της (Celińska and Grajek, 2009; Ji, Huang and Ouyang, 2011). Η χρήση ανανεώσιμων υποστρωμάτων όπως απόβλητα βιομηχανίας τροφίμων, θεωρείται μια καλή εναλλακτική αντικατάστασης των μη ανανεώσιμων πηγών (κυρίως πετροχημικής φύσεως), λόγω του οικονομικού και περιβαλλοντικού οφέλους που υπάρχει (Willke and Vorlop, 2004). Η πρώτη αναφορά για την μικροβιακή παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης ήταν το 1906 από τους ερευνητές Harden και Wallpole. Από τότε πολλές έρευνες έχουν διεξαχθεί για την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης με χρήση διάφορων, κυρίως, βακτηρίων σε λιγνοκυτταρινούχα και μη κυτταρινούχα, υποστρώματα. Οι περισσότερες μελέτες για την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης, έχουν γίνει με την χρήση γλυκόζης ως μέσο καλλιέργειας. (Syu, 2001).

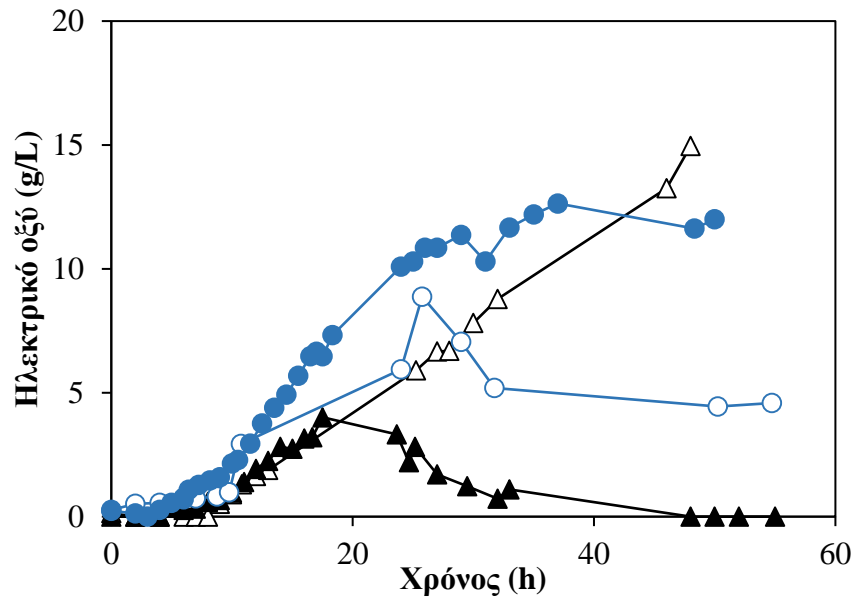
Στην παρούσα μελέτη, στόχος ήταν η βελτιστοποίηση παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης με πηγή άνθρακα μελάσα με το βακτηριακό στέλεχος *Enterobacter ludwigii*. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ημι-συνεχής καλλιέργεια με τη χρήση μελάσας και ανόργανης πηγής αζώτου με χρήση ακατέργαστης σακχαρόζης και μελάσας ως τροφοδοσία. Συγκρίνοντας τις ημι-συνεχείς καλλιέργειες, η ζύμωση με τροφοδοσίας μελάσας παρουσιάζει μείωση της τελικής συγκέντρωσης 2,3-βουτανοδιόλης κατά 58 % (Πίνακας 12). Η απόδοση σε παραγόμενη 2,3-βουτανοδιόλη και η παραγωγικότητα επίσης μειώνονται ($0.31 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ και $0.75 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ αντίστοιχα). Επιπλέον, στην περίπτωση που η μελάσα χρησιμοποιήθηκε ως τροφοδοσία παρατηρείται μεγάλη συγκέντρωση παραπροϊόντων με κύριο παραπροϊόν να είναι το γαλακτικό οξύ ($34 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Δεδομένων των αποτελεσμάτων κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί η επίδραση της πηγής αζώτου και των ιχνοστοιχείων. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες η πηγή αζώτου καθώς και τα ιχνοστοιχεία επηρεάζουν τόσο την αύξηση του μικροοργανισμού όσο και την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης. Η βελτιστοποίηση του θρεπτικού μέσου έγινε με τη χρήση στατιστικών μεθόδων με χρήση μελάσας ως πηγή άνθρακα. Το YE , το $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ και το KOH ήταν οι σημαντικότεροι παράγοντες που επιδρούν στην παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης.

Στην συνέχεια, οι βελτιστοποιημένες συνθήκες υποστρώματος για την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης χρησιμοποιήθηκαν σε ημι-συνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα με τη χρήση ακατέργαστης σακχαρόζης και μελάσας ως τροφοδοσία. Στο Διάγραμμα 8 παρουσιάζεται η συγκριτική παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης, γαλακτικού οξύ και ηλεκτρικού οξύ ανάμεσα στις ζυμώσεις με τη χρήση του ανόργανου θρεπτικού μέσου και του βελτιστοποιημένου θρεπτικού μέσου με τροφοδοσία μελάσας και ακατέργαστης σακχαρόζης. Κατά τις ζυμώσεις με τροφοδοσία ακατέργαστης σακχαρόζης τόσο με τη χρήση του ανόργανου θρεπτικού μέσου όσο και με τη χρήση του βελτιστοποιημένου, η τελική συγκέντρωση της 2,3-βουτανοδιόλης είχε ίδια τιμή (97 g.L^{-1}). Ωστόσο, σημειώθηκε αισθητή μείωση της παραγωγή των οργανικών οξέων κυρίως του γαλακτικού και ηλεκτρικού οξύ στην περίπτωση όπου το βελτιστοποιημένο θρεπτικό μέσο χρησιμοποιήθηκε. Επιπλέον, μείωση παρατηρείται στον συντελεστή απόδοσης κατά 7.9% και στην παραγωγικότητα κατά 14.7%. Στην περίπτωση όπου το βελτιστοποιημένο θρεπτικό μέσο χρησιμοποιήθηκε με τροφοδοσία μελάσας, η τελική συγκέντρωση 2,3-βουτανοδιόλης παρουσιάζει αύξηση κατά 44.2% συγκριτικά με το ανόργανο θρεπτικό μέσο με χρήση μελάσας ως τροφοδοσία. Επίσης, παρατηρήθηκε αύξηση της απόδοσης και της παραγωγικότητας με τιμές 0.28 g.g^{-1} και $1.52 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ αντίστοιχα. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι στην ζύμωση με το βελτιστοποιημένο θρεπτικό η συνολική παραγωγή παραπροϊόντων μειώθηκε σημαντικά (34.7%), με χαμηλή παραγωγή γαλακτικού οξέος (10.4 g.L^{-1}). Επιπλέον στις ζυμώσεις με τις βελτιστοποιημένες συνθήκες, κατά τις πρώτες ώρες παρατηρείται υψηλός ρυθμός παραγωγής (Διάγραμμα 9).

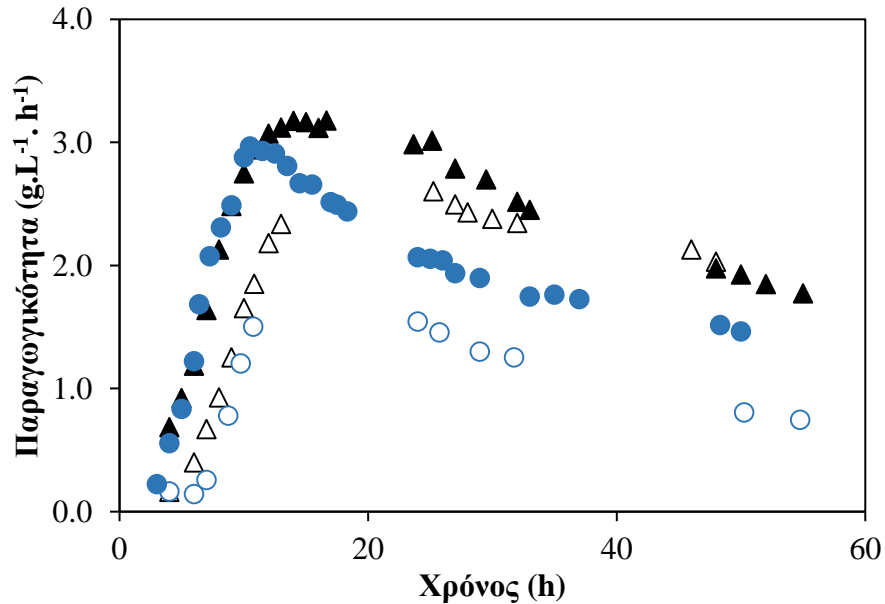
Από τα αποτελέσματα συμπεραίνουμε ότι η σύσταση του θρεπτικού υποστρώματος και το είδος της τροφοδοσίας που παρέχεται, επηρεάζει σημαντικά την βιοτεχνολογική παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης. Ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης είναι και η πηγή αζώτου. Σύμφωνα με μελέτες, η χρήση οργανικής σημειώνεται να έχει θετική επίδραση στην παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης. Συγκεκριμένα, οι Laube et al (1984) αναφέρει ότι αύξηση της συγκέντρωσης του YE στο θρεπτικό μέσο επηρεάζει θετικά στην απόδοση της παραγόμενης διόλης. Οι Yu και Saddler et al.(1984) επίσης αναφέρουν ότι παρουσιάζεται αυξημένη παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης με αύξηση της συγκέντρωσης του YE. Η παραγωγή της βιομάζας είναι άμεσα συνδεδεμένη με την

παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης. Με την χρήση ανόργανης πηγής παρατηρείται μειωμένη παραγωγή βιομάζας καθώς της 2,3-βουτανοδιόλης (Jiayang *et al.*, 2006).





Διάγραμμα 8: Παραγωγή 2,3-βουτανδιόλης, γαλακτικού οξύ και ηλεκτρικού οξύ σε ημι-συνεχείς ζυμώσεις με τη χρήση βελτιστοποιημένου θρεπτικού με τροφοδοσία μελάσας (●) και ακατέργαστης σακχαρόζης (▲) και με τη χρήση ανόργανου θρεπτικού μέσου με τροφοδοσία μελάσας (○) και ακατέργαστης σακχαρόζης (Δ).



Διάγραμμα 9: Ρυθμός παραγωγής 2,3-βουτανδιόλης οξύ σε ημι-συνεχείς ζυμώσεις με τη χρήση βελτιστοποιημένου θρεπτικού με τροφοδοσία μελάσας (●) και ακατέργαστης σακχαρόζης (▲) και με τη χρήση ανόργανου θρεπτικού μέσου με τροφοδοσία μελάσας (○) και ακατέργαστης σακχαρόζης (Δ).

Η μελάσα ως πηγή άνθρακα έχει χρησιμοποιηθεί σε αρκετές ερευνητικές μελέτες σε ζυμώσεις από διάφορους μικροοργανισμούς. Τα αποτελέσματα της βιβλιογραφίας σε σύγκριση με της παρούσας μελέτης παρουσιάζονται στον Πίνακα 12. Σύμφωνα με τους Afschar et al. (1991), με σύστημα ανάκυκλωση κυττάρων με τον μικροοργανισμό *K. oxytoca* σε υπόστρωμα ιμβερτοποιημένης μελάσας με αρχική συγκέντρωση 280 g.L⁻¹, παρήγε 118 g.L⁻¹ 2,3-βουτανοδιόλης με απόδοση 0.42 g.g⁻¹ και παραγωγικότητα 1.52 g.L⁻¹.h⁻¹. Οι Jung et al. (2013) αρχικά μελέτησαν την παραγωγή της 2,3 βουτανοδιόλης σε φιάλες με αρχική συγκέντρωσης μελάσας ζαχαροκάλαμου 60 g.L⁻¹ με το στέλεχος *E. Aerogenes* το οποίο έδωσε χαμηλή παραγωγικότητα 0.84 g.L⁻¹.h⁻¹. Στην ίδια μελέτη τροποποιώντας τον μικροοργανισμό, σε ημι-συνεχής καλλιέργειας με τροφοδοσία μελάσα ζαχαροκάλαμου έδωσε καλύτερα αποτελέσματα με τελική συγκέντρωση 2,3-βουτανοδιόλης 98.7 g.L⁻¹ και παραγωγικότητα 2.74 g.L⁻¹.h⁻¹. Επίσης ημι-συνεχής ζύμωση με πηγή άνθρακα και τροφοδοσία μελάσα ζαχαροκάλαμου πραγματοποιήθηκε με τροποποιημένο στέλεχος *K. pneumoniae ATCC 200721 AldhA*. Η τελική παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης ήταν 76.24 g.L⁻¹ με ρυθμό παραγωγή 2.31 g.L⁻¹ h⁻¹ (Lee et al., 2013).

Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συμπεραίνεται ότι ο μικροοργανισμός με το βελτιστοποιημένο υπόστρωμα παράγει ικανοποιητική τελική συγκέντρωση 2,3-βουτανοδιόλης συγκριτικά με την βιβλιογραφία. Ωστόσο παρουσιάζει πιο χαμηλή παραγωγικότητα και απόδοση παραγόμενης 2,3-βουτανοδιόλης. Αυτό μπορεί να συμβαίνει λόγω της διαφορετικής σύστασης μελάσας καθώς και στις συνθήκες της ζύμωσης. Σύμφωνα με μελέτες, η σύσταση της μελάσας ζαχαροκάλαμου περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις ιχνοστοιχείων, τα οποία λειτουργούν παρεμποδιστικά στο μεταβολισμό του μικροοργανισμού και την κυτταρική αύξηση (Afschar, 1993; Celińska and Grajek, 2009; Ji, Huang and Ouyang, 2011). Επίσης, η παραγωγή παραπροϊόντων είναι ένας επιπλέον λόγος που συμβάλει στην μείωση του ρυθμού παραγωγής της 2,3-βουτανοδιόλης καθώς για την παραγωγή τους απαιτούν συγκριτικά ισοδύναμες ενεργειακές ανάγκες με την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης (Jung et al., 2012, 2013).

Συμπερασματικά η βελτιστοποίηση της διεργασίας απαιτεί περαιτέρω μελέτη προκειμένου να βελτιωθεί η παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης χρησιμοποιώντας τροποποιημένους μικροοργανισμούς για την επίτευξη υψηλής απόδοσης και

παραγωγικότητας. Επίσης η μελάσα ως πηγή άνθρακα αποτελεί ένα χαμηλού κόστους θρεπτικό μέσο που μπορεί να αντικαταστήσει την γλυκόζη όμως περιέχει ιχνοστοιχεία, τα οποία δρουν στον ρυθμό παραγωγής της 2,3-βουτανοδιόλης και μπορεί να επιδρούν στην αύξηση των παραπροϊόντων. Συνεπώς, επεξεργασία της μελάσας πριν την χρήση της σε ζυμώσεις θα μπορούσε να έχει θετικά αποτελέσματα στην παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης

Πίνακας 12: Ζυμώσεις με διαφορετικούς μικροοργανισμούς με πηγή μελάσα για παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης.

Μικροοργανισμός	Σύστημα καλλιέργειας	Υπόστρωμα	Πηγή αζώτου	Τροφοδοσία	Χρόνος (h)	2,3-βουτανοδιόλη (g.L ⁻¹)	Απόδοση (g.g ⁻¹)	Παραγωγικότητα (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Αναφορά
<i>E.ludwigii</i>	Ημι-συνεχής καλλιέργεια	Μελάσα ζαχαροκάλαμο	10 YE , 6.2 (NH ₄) ₂ SO ₄ 2 CSL	Ακατέργαστη Σακχαρόζη	25.16	75.84	0.41	3.01	Παρούσα μελέτη
					55	97.53	0.38	1.77	
				Μελάσα ζαχαροκάλαμο	18.33	44.69	0.38	2.44	
					48.33	73.33	0.28	1.52	
				Ακατέργαστη Σακχαρόζη	25.25	65.73	0.37	2.60	
					48	97.43	0.35	2.03	
				Μελάσα ζαχαροκάλαμο	24	37.09	0.38	1.55	
					54.75	40.91	0.31	0.75	
<i>K.oxytoca DSM3539</i>	Ανακύκλωση κυττάρων	Ιμβερτοποιημένη μελάσα	5 YE 5 Τρυπτόνη	/	55	118.0	0.42	2.40	Afschar et al. (1991)
<i>E. aerogene KCTC2190</i>	Ασυνεχής σε φιάλες	Μελάσα ζαχαροκάλαμο	5 YE	/	12	10.02	0.29	0.84	Jung et al. (2013)
<i>E. aerogenes EMY68</i>	Ημι-συνεχής καλλιέργεια		5.35 (NH ₄) ₂ SO ₄ 10 Καζαμινικό οξύ	Μελάσα ζαχαροκάλαμο	36	98.69	0.36	2.74	
<i>K.pneumoniae ATCC 200721</i>	Ημι-συνεχής καλλιέργεια	Μελάσα	45 CSL	Μελάσα ζαχαροκάλαμο	34	76.24	0.39	2.31	Lee et al. (2013)

<i>AldhA</i>		ζαχαροκάλαμο							
<i>B. amyloliquefaciens</i> <i>TUL 308</i>	Ημι-συνεχής καλλιέργεια σε φιάλες	Μελάσα ζαχαρότευτλο	2 YE, 2.5 NH ₄ Cl	Γλυκόζη	138	60.83	0.47	0.44	Sikora et al. (2015)
<i>E. cloacae</i>	Ημι-συνεχής καλλιέργεια	Μελάσα ζαχαροκάλαμο	8.8 ουρία	Μελάσα ζαχαροκάλαμο	60	90.8	0.39	1.66	Dai et al (2015)
<i>B. subtilis</i>	Ημι-συνεχής καλλιέργεια	Μελάσα ζαχαρότευτλο	20.πεπτόνη 10 YE 6.8 Na ₂ HPO ₄	Γλυκόζη	114	75.73	0.31	0.66	Białkowska et al (2016)

5 Βιβλιογραφία

- Afschar, A.S., Bellgard, K.H, Rossel, C.E.V., Czok, A, Schaller, K, 1991a The production of 2,3-butanediol by fermentation of high test molasses, *Appl. Microbiol. and Biotechnol.* 582–585.
- Afschar, AS, CE Vaz Rosscli, R. Jonas, A.Q.C and K.S, 1993 Microbial production and downstream processing Methyl-Ethyl I Polyurethane solvent I Isomers of I octane, *J. Biotechnol* 27,317–329.
- Baikow, V. E. (2013) *Manufacture and Refining of Raw Cane Sugar, Manufacture and Refining of Raw Cane Sugar.*
- Bartowsky, E.J. and Henschke, P. A, 2004. The “buttery” attribute of wine diacetyl - desirability, spoilage and beyond, *International Journal of Food Microbiology*, 96, 235–252.
- Biebl H., Menzel K., Zeng A-P., Deckwer W-D., 1999, Microbial production of 1,3-propanediol. *Applied Microbiology Biotechnology*, 52, 715-725
- Biashkowska, A.M. 2016 ‘Strategies for efficient and economical 2,3-butanediol production: new trends in this field’, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1–14.
- Bradfield, M.F.A, Mohagheghi A, Salvachua D, Smith H, Black B.A, Dowe N, Beckham G.T and Nicol W, 2015, Continuous succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* on xylose-enriched hydrolysate’, *Biotechnology for Biofuels*. BioMed Central, 8, 181.
- Bradfield, M.F.A., and Nicol, W, 2014, Continuous succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* in a biofilm reactor: Steady-state metabolic flux variation’, *Biochemical Engineering Journal*. Elsevier B.V., 85, 1–7.
- Celińska, E. and Grajek, W, 2009, Biotechnological production of 2,3-butanediol- Current state and prospects, *Biotechnology Advances*, 27, 715–725.
- Chan, S., Kanchanatawee, S. and Jantama, K., 2012, Production of succinic acid from sucrose and sugarcane molasses by metabolically engineered *Escherichia coli*,

Bioresource Technology. 103, 329–336.

Chandra, R., Bharagava, R. N. and Rai, V, 2008, Melanoidins as major colourant in sugarcane molasses based distillery effluent and its degradation', *Bioresource Technology* 99, 4648–4660.

Cho, S., Kyung D.K., Ahn J.H, Lee J., Kim. S.W., Um Y., 2013, Selective production of 2,3-butanediol and acetoin by a newly isolated bacterium *klebsiella oxytoca MI*, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 170, 1922–1933.

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

FitzGibbon F., Singh D., McMullan G., Marchanta R., 1998, The effect of phenolic acids and molasses spent wash concentration on distillery wastewater remediation by fungi, *Process Biochemistry*, 33, 799–803.

Flickinger, M. C., 1980, Current biological research in conversion of cellulosic carbohydrates into liquid fuels: how far have we come?, *Biotechnology and Bioengineering*, 22, 27–48.

Garg, S. K. and Jain, A. 1995, Fermentative production of 2,3-butanediol: A review, *Bioresource Technology*, 51, 103–109.

Grover, B., Garg, S. and Verma, J. (1990) 'Production of 2, 3-butanediol from wood hydrolysate by *Klebsiella pneumoniae*', *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 6, 328–332.

Hendriks, A. T. W. M. and Zeeman, G. (2009) 'Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass', *Bioresource Technology*, 100(1), pp. 10–18.

Hulbert Olbrich, 1963, 'The molasses. Principles of sugars Technology 3, Fermentation Technologies.

Jagroop, D., Dalel, S. and Pooman, N., 2001, Decolorisation of molasse wastewater by cells of *Pseudomonas fluorescens* immobilized on porous cellulose carrier, *Bioresource Technology*, 78, 111–114.

Jansen, N., Flickinger, M. C, Tsao, G. T., 1984, Production of 2,3-Butanediol from D-Xylose by XXVI, 362–369.

- Jansen, N., Tsao, G.,1983, Bioconversion of Pentoses to 2,3-Butanediol by *Klebsiella pneumoniae*, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*,27,. 85–99.
- Ji, X. J., Huang, H, Ouyang, P-K., 2011, Microbial 2,3-butanediol production: A state-of-the-art review, *Biotechnology Adv.* 29,351–364.
- Jiayang, Q. I. N. *et al.*, 2006, Production of 2,3-Butanediol by, 14,132–136.
- Jung, M.Y.,Ng C.Y, Song H., Lee J., Oh. M.K., 2012, Deletion of lactate dehydrogenase in *Enterobacter aerogenes* to enhance 2,3-butanediol production, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95,461–469.
- Jung M.Y,Park B.S, Lee J.Oh M.K., 2013 Engineered *Enterobacter aerogenes* for efficient utilization of sugarcane molasses in 2,3-butanediol production, *Bioresource Technology.*, 139,21–27.
- Kallbach, M., Horn S., Kuenz A., 2016, Screening of novel bacteria for the 2,3-butanediol production, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1, 1–9.
- Kumar, R., Singh, S. and Singh, O. V.,2008, Bioconversion of lignocellulosic biomass: Biochemical and molecular perspectives, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35,377–391.
- Laube, V. M., Groleau, D. and Martin, S. M.,1984, 2,3-Butanediol production from xylose and other hemicellulosic components by *Bacillus polymyxa*, *Biotechnology Letters*, 6,257–262.
- Lee, S.M., Oh B.R., Jang M.P, Yu A., Heo SY., Hong WK, Seo J W, Kim C.H.,2013, Optimized production of 2,3-butanediol by a lactate dehydrogenase-deficient mutant of *Klebsiella pneumoniae*, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 18,1210–1215.
- Long, S. K. & Patrick, R., 1945, The present status of the 2,3-butylene glycol fermentation, *Advances in Applied Microbiology*, 5 ,135–55.
- Magee, R. and Kosaric, N.,1987, The microbial production of 2, 3-butanediol , *Advances in Applied Microbiology*, 32,89–161.
- De Mas, C., Jansen, N. B. and Tsao, G. T.,1988, Production of optically active 2,3-butanediol by *Bacillus polymyxa*, *Biotechnology and Bioengineering*, 31,366–377.
- Mccall, K. B., Georgi, C. E., 1954, The production of 2,3-butanediol by fermentation of

sugar beet molasses., *Applied microbiology*, 2,355–359.

Mosier N, Wyman CDale B, Elander R, Lee Y, Holtzapple M, Ladisch M, 2005 Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass, *Bioresource Technology*, 96, 673–686.

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

Petrov, K. and Petrova, P. 2010, Enhanced production of 2,3-butanediol from glycerol by forced pH fluctuations, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, 943–949.

Ragauskas, A. J., Williams C.K., Davison B.H., Britovsek G, Cairney J., Eckert C.A., Frederick W.J., Hallett J.P., Leak D.J., 2006, The Path Forward for Biofuels and Biomaterials, *Science*, 311, 484–489.

Sivakumar, A., Swaminathan, T. and Baradarajan, A., 1995, Effect of urea on the production of 2, 3-butanediol by *K. oxytoca*, 13, 5–6.

Sun, L. H., Wang X-D., Dai J-Y., Xiu Z-L., 2009, Microbial production of 2,3-butanediol from Jerusalem artichoke tubers by *Klebsiella pneumoniae*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82, 847–852.

Syu, M. J., 2001, Biological production of 2,3-butanediol, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55, 10–18.

Voloch, M., Jansen N.B., Ladish M.R., Tsao G.T., Narayan R., Rodwell V.W., 1985, *Comprehensive Biotechnology: the principles, application and regulation of biotechnology in industry, agriculture and medicine, 2,3-Butanediol*, 933–947.

Wan, C. and Li, Y., 1994, Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass., *Biotechnology advances*, 30,1447–57.

Wang, A., Wang Y., Jiang T., Li L., Ma C., Xu P., 2010, Production of 2,3-butanediol from corncob molasses, a waste by-product in xylitol production, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, 965–970.

Willke, T. and Vorlop, K. D., 2004, Industrial bioconversion of renewable resources as an alternative to conventional chemistry, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66,131–142.

Yang, S.-T., El-Enshay, H. A. and Nuttha, T. (2013) *Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers, Technology.*

Yu, E. K. C., Levitin N., Saddler, J. N., 1982, Enhanced Production of 2, 3-Butanediol by *Klebsiella pneumoniae* grown on High Sugar Concentrations in the Presence of Acetic Acid', *Biotechnology letters*, 4, 777–784.

Zeng, A. P. and Sabra, W., 2011, Microbial production of diols as platform chemicals: Recent progresses, *Current Opinion in Biotechnology*, 22, 749–757.