



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS

**Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου  
Εργαστήριο Μηχανικής και Επεξεργασίας Τροφίμων  
ΠΜΣ: Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του  
Ανθρώπου  
Κατεύθυνση: Βιοδιεργασίες Τροφίμων και Βιοδιυλιστήρια**

### **Μεταπτυχιακή Διατριβή**

«Μελέτη της παρεμπόδισης των παραγόμενων προϊόντων και βελτιστοποίηση της βιοτεχνολογικής παραγωγής της 2,3-βουτανοδιόλης μέσω μικροβιακών ζυμώσεων»

του

**Βασιλείου Α. Σδράλλη**

**Επιβλέπων Καθηγητής:**

Κουτίνας Απόστολος, Επίκουρος Καθηγητής

**Αθήνα, Σεπτέμβριος 2018**



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS

**Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου  
Εργαστήριο Μηχανικής και Επεξεργασίας Τροφίμων  
ΠΜΣ: Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του  
Ανθρώπου  
Κατεύθυνση: Βιοδιεργασίες Τροφίμων και Βιοδιυλιστήρια**

### **Μεταπτυχιακή Διατριβή**

«Μελέτη της παρεμπόδισης των παραγόμενων προϊόντων και βελτιστοποίηση της βιοτεχνολογικής παραγωγής της 2,3-βουτανοδιόλης μέσω μικροβιακών ζυμώσεων»

του

**Βασιλείου Α. Σδράλλη**

**Επιβλέπων Καθηγητής:**

Κουτίνας Απόστολος, Επίκουρος Καθηγητής

**Αθήνα, Σεπτέμβριος 2018**

## **Μεταπτυχιακή Διατριβή**

«Μελέτη της παρεμπόδισης των παραγόμενων προϊόντων και βελτιστοποίηση της βιοτεχνολογικής παραγωγής της 2,3-βουτανοδιόλης μέσω μικροβιακών ζυμώσεων»

του

**Βασιλείου Α. Σδράλλη**

### **Επιβλέπων Καθηγητής:**

Κουτίνας Απόστολος, Επίκουρος Καθηγητής

### **Εξεταστική Επιτροπή:**

Κουτίνας Απόστολος, Επίκουρος Καθηγητής

Παπανικολάου Σεραφείμ, Αναπληρωτής Καθηγητής

Κούκος Ιωάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η 2,3-βουτανοδιόλη (2,3-BD) είναι ένα σημαντικό προϊόν για τη χημική βιομηχανία με εφαρμογές στην παραγωγή πολυμερών, φαρμακευτικών προϊόντων και χημικών ουσιών. Διάφορα συστήματα ζυμώσεων (διαλείποντος έργου, ημι-συνεχής και συνεχής) έχουν μελετηθεί με σκοπό τη βελτιστοποίηση της παραγωγής της 2,3-BD.

Στην παρούσα μελέτη, το βακτηριακό στέλεχος *Enterobacter ludwigii* χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή 2,3-BD με χρήση ακατέργαστης σακχαρόζης ως πηγή άνθρακα. Αρχικά, διεξήχθησαν δύο ημι-συνεχείς ζυμώσεις με διαφορετική αρχική συγκέντρωση βιομάζας (1 και 4 g·L<sup>-1</sup>). Υψηλές τιμές παραγωγικότητας (3,58 g·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>) παρατηρήθηκαν στην αρχή της ζύμωσης, στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε υψηλή αρχική συγκέντρωση βιομάζας, ωστόσο η τελική συγκέντρωση 2,3-BD, η απόδοση και η παραγωγικότητα ήταν παρόμοια στις δύο καλλιέργειες.

Η επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης σακχαρόζης και των μεταβολικών προϊόντων στην μικροβιακή αύξηση μελετήθηκε σε ζυμώσεις μικρού όγκου και σε κωνικές φιάλες. Συγκεντρώσεις ηλεκτρικού οξέος, οξικού οξέος και γαλακτικού οξέος άνω των 20 g·L<sup>-1</sup> οδήγησαν σε γραμμική μείωση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης. Επίσης, παρατηρήθηκε μείωση του ειδικού ρυθμού αύξησης κατά 71% όταν η αρχική συγκέντρωση μυρμηκικού οξέος αυξήθηκε από 5 g·L<sup>-1</sup> σε 15 g·L<sup>-1</sup>. Σχετικά με την επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης σακχαρόζης, η μέγιστη συγκέντρωση (55,5 g·L<sup>-1</sup>) και απόδοση της 2,3-BD (0,46 g·g<sup>-1</sup>) επιτεύχθηκαν με τη χρήση 120 g·L<sup>-1</sup> αρχικής συγκέντρωσης σακχαρόζης. Υψηλότερες συγκεντρώσεις σακχαρόζης οδήγησαν στην αύξηση των παραπροϊόντων, με αποτέλεσμα τη χαμηλότερη απόδοση 2,3-BD. Η μέγιστη παραγωγικότητα (1,14 g·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>) επιτεύχθηκε σε αρχική συγκέντρωση σακχάρων 75 g·L<sup>-1</sup>.

Τέλος, πραγματοποιήθηκαν συνεχείς ζυμώσεις σε διάφορους ρυθμούς αραίωσης. Η υψηλότερη συγκέντρωση 2,3-BD επιτεύχθηκε σε ρυθμούς αραίωσης 0,05 - 0,085 h<sup>-1</sup>. Σε ρυθμό αραίωσης 0,07 h<sup>-1</sup> παρατηρήθηκε η υψηλότερη απόδοση (0,49 g·g<sup>-1</sup>).

**Λέξεις κλειδιά:** 2,3-βουτανοδιόλη, *E. ludwigii*, ημι-συνεχής καλλιέργεια, μελέτη παρεμπόδισης, συνεχής καλλιέργεια

## ABSTRACT

2,3-butanediol (2,3-BD) is an important building block for the chemical industry with potential applications in polymer, pharmaceutical and fine chemical production. Different fermentation strategies (batch, fed-batch and continuous) have been evaluated for enhanced 2,3-BD production.

In this study, a newly isolated bacterial strain, namely *Enterobacter ludwigii* was used for 2,3-BD production using very high polarity cane sugar as carbon source. Two fed-batch fermentations were initially carried out with different initial concentrations of biomass (1 and 4 g·L<sup>-1</sup>). High values of productivity (3,58 g·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>) were reached when initial biomass concentration was 4 g·L<sup>-1</sup> at the first hours of fermentation. However, similar values of final 2,3-BD, yield and productivity were achieved in both experiments.

The effect of substrate and metabolic products on bacterial growth was studied in microplate and shake flask fermentations. Succinic acid, acetic acid and lactic acid concentrations higher than 20 g·L<sup>-1</sup> resulted in a linear reduction of specific growth rate. When initial formic acid concentration increased from 5 g·L<sup>-1</sup> to 15 g·L<sup>-1</sup>, the specific growth rate decreased by 71%. Regarding the effect of initial cane sugar concentration, high initial concentration of 120 g·L<sup>-1</sup> led to the highest 2,3-BD production (55,5 g·L<sup>-1</sup>) and yield (0,46 g·g<sup>-1</sup>). Higher cane sugar concentration led to increased by-product formation resulting in lower 2,3-BD conversion yield. The highest productivity (1,14 g·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>) was achieved when cane sugar concentration was 75 g·L<sup>-1</sup>.

Continuous cultures were conducted using different dilution rates. The highest 2,3-BD concentration was achieved at dilution rates in the range of 0,05 – 0,085 h<sup>-1</sup> and the highest yield (0,49 g·g<sup>-1</sup>) was achieved at dilution rate of 0,07 h<sup>-1</sup>.

**Keywords:** 2,3-butanediol, *E. ludwigii*, fed-batch fermentation, inhibition, continuous culture

## ***Ευχαριστίες***

*Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μηχανικής Τροφίμων, Επεξεργασίας και Συντήρησης Γεωργικών Προϊόντων στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του Ανθρώπου».*

*Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους όσοι συνέβαλαν με οποιονδήποτε τρόπο στην εκπόνηση αυτής της εργασίας, και κυρίως τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Απόστολο Κουτίνα, ο οποίος ήταν ο επιβλέπων της εργασίας μου, για την ευκαιρία και την ενθάρρυνση να ασχοληθώ με τον ευρύτερο τομέα των βιοδιαεργασιών, καθώς και για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου.*

*Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Σεραφείμ Παπανικολάου και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ιωάννη Κούκο, οι οποίοι όντας μέλη της τριμελούς επιτροπής με βοήθησαν με τις διορθώσεις και τα σχόλιά τους πάνω στην εργασία μου.*

*Ιδιαίτερες ευχαριστίες αξίζει η υποψήφια διδάκτωρ Σοφία Μάινα, η οποία με καθοδήγησε με υπομονή και επιμονή όλους αυτούς τους μήνες.*

*Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την κατανόηση και τη στήριξη που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού.*

*Βασίλης Σδράλλης*

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	14
<b>1.1 2,3-βουτανοδιόλη</b> .....	15
<b>1.1.1 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά</b> .....	15
<b>1.1.2 Βιομηχανικές εφαρμογές</b> .....	16
<b>1.1.3 Τρόποι παραγωγής</b> .....	17
<b>1.2 Βιοτεχνολογική παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης</b> .....	18
<b>1.2.1 Μεταβολικό μονοπάτι</b> .....	18
<b>1.2.2 Μικροοργανισμοί</b> .....	20
<b>1.2.3 Υποστρώματα</b> .....	21
<b>1.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης</b> .....	22
<b>1.3.1 pH</b> .....	22
<b>1.3.2 Θερμοκρασία</b> .....	23
<b>1.3.3 Αερισμός και ανάδευση</b> .....	23
<b>1.3.4 Σύσταση θρεπτικού μέσου</b> .....	25
<b>1.3.5 Αρχική συγκέντρωση σακχάρων</b> .....	26
<b>1.3.6 Παρεμπόδιση εκ των προϊόντων</b> .....	26
<b>1.4 Συστήματα καλλιέργειας</b> .....	27
<b>1.4.1 Κλειστή καλλιέργεια</b> .....	27
<b>1.4.2 Συνεχής καλλιέργεια</b> .....	28
<b>1.4.3 Ημι-συνεχής καλλιέργεια</b> .....	28
<b>1.5 Σκοπός της μελέτης</b> .....	29
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	30
<b>2.1 Βιολογικό υλικό</b> .....	30

2.2	<i>Παρασκευή εμβολίου</i> .....	30
2.3	<i>Θρεπτικό μέσο για την παραγωγή 2,3-BD</i> .....	30
2.4	<i>Ημι-συνεχείς ζυμώσεις</i> .....	31
2.4.1	<i>Παρασκευή εμβολίου</i> .....	31
2.4.2	<i>Ημι-συνεχείς ζυμώσεις με διαφορετική συγκέντρωση βιομάζας</i> .....	32
2.5	<i>Παρεμπόδιση εκ των προϊόντων και του υποστρώματος</i> .....	33
2.5.1	<i>Κλειστή καλλιέργεια σε κωνικές φιάλες</i> .....	33
2.5.2	<i>Κλειστή καλλιέργεια μικρού όγκου</i> .....	34
2.6	<i>Συνεχής ζύμωση</i> .....	35
2.7	<i>Αναλυτικές μέθοδοι</i> .....	36
2.7.1	<i>Προσδιορισμός βιομάζας</i> .....	36
2.7.2	<i>Προσδιορισμός σακχάρων και μεταβολικών προϊόντων</i> .....	36
2.7.3	<i>Προσδιορισμός ανόργανου φωσφόρου (IP)</i> .....	37
3.	<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	38
3.1	<i>Επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης βιομάζας σε ζυμώσεις ημι-συνεχούς καλλιέργειας</i> .....	38
3.1.1	<i>Παρασκευή εμβολίου σε βιοαντιδραστήρα</i> .....	38
3.1.2	<i>Ημι-συνεχείς ζυμώσεις με διαφορετική συγκέντρωση βιομάζας</i> .....	40
3.2	<i>Σύγκριση παρεμπόδισης εκ των προϊόντων σε κλειστή καλλιέργεια</i> .....	44
3.3	<i>Σύγκριση παρεμπόδισης εκ του υποστρώματος σε κλειστή καλλιέργεια</i> ....	49
3.4	<i>Συνεχής ζύμωση σε διαφορετικούς ρυθμούς αραίωσης</i> .....	53
4.	<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b> .....	59
5.	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ</b> .....	64



## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

<b>Πίνακας 1:</b> Συγκεντρώσεις παρεμποδιστών κατά τη μελέτη παρεμπόδισης (κωνικές φιάλες) .....	34
<b>Πίνακας 2:</b> Συγκεντρώσεις παρεμποδιστών κατά τη μελέτη παρεμπόδισης (microplate) .....	35
<b>Πίνακας 3:</b> Βιοτεχνολογική παραγωγή 2,3-BD σε ημι-συνεχείς ζυμώσεις .....	60
<b>Πίνακας 4:</b> Βιοτεχνολογική παραγωγή 2,3-BD σε συνεχείς ζυμώσεις .....	63

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

<b>Εικόνα 1:</b> Προετοιμασία εμβολίου σε αντιδραστήρα Ralf Advanced, Bioengineering, Switzerland (6.7-L).....	32
<b>Εικόνα 2:</b> Ημι-συνεχής ζύμωση σε αντιδραστήρα Labfors 4, Infors HT, Switzerland 3.6-L (1 L ενεργός όγκος) .....	33

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

<b>Σχήμα 1:</b> Στερεοϊσομερή 2,3-βουτανοδιόλης, προβολή Haworth (Celińska & Grajek, 2009).....	16
<b>Σχήμα 2:</b> Στερεοϊσομερή 2,3-βουτανοδιόλης, προβολή Fischer (Syu, 2001).....	16
<b>Σχήμα 3:</b> Μεταβολικό μονοπάτι παραγωγής της 2,3-BD (Ji et al., 2011) .....	19
<b>Σχήμα 4:</b> Προτεινόμενοι μηχανισμοί δημιουργίας ισομερών της 2,3-βουτανοδιόλης (για τα στελέχη <i>Klebsiella pneumoniae</i> και <i>Raenibacillus polymyxa</i> ). (Ji et al., 2011). 20	
<b>Σχήμα 5:</b> Επίδραση της σχετικής διαθεσιμότητας οξυγόνου στην απόδοση των προϊόντων για τον <i>B. polymyxa</i> (Celińska & Grajek, 2009).....	24
<b>Σχήμα 6:</b> Συγκέντρωση βιομάζας σε ζύμωση διαλείποντος έργου με τη χρήση συνθετικού (□) και οργανικού (■) μέσου σε αντιδραστήρα Labfors 4, Infors HT, Switzerland 3,6-L .....	38
<b>Σχήμα 7:</b> Συγκέντρωση βιομάζας σε ζύμωση διαλείποντος έργου με τη χρήση συνθετικού υποστρώματος σε βιοαντιδραστήρα Labfors 4, Infors HT, Switzerland 3,7-L (□) και Ralf Advanced, Bioengineering, Switzerland 6,7-L (○) .....	39
<b>Σχήμα 8:</b> Παραγωγή 2,3-BD (▲), βιομάζας (◄), ηλεκτρικού οξέος (▼), γαλακτικού οξέος (◆), μυρμηκικού οξέος (◄), οξικού οξέος (■) και αιθανόλης (×) και κατανάλωση σακχαρόζης (◇), γλυκόζης (Δ), φρουκτόζης (●) και φωσφόρου (□) κατά την ημι-συνεχή ζύμωση με $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ αρχικής συγκέντρωσης βιομάζας.....	41
<b>Σχήμα 9:</b> Παραγωγή 2,3-BD (▲), βιομάζας (◄), ηλεκτρικού οξέος (▼), γαλακτικού οξέος (◆), μυρμηκικού οξέος (◄), οξικού οξέος (■) και αιθανόλης (×) και κατανάλωση σακχαρόζης (◇), γλυκόζης (Δ), φρουκτόζης (●) και φωσφόρου (□) κατά την ημι-συνεχή ζύμωση με $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ αρχικής συγκέντρωσης βιομάζας.....	42
<b>Σχήμα 10:</b> Ρυθμός παραγωγής 2,3-BD σε ημισυνεχή ζύμωση με αρχική συγκέντρωση βιομάζας ίσης με $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (■) και $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (□) .....	43
<b>Σχήμα 11:</b> Μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης ( $\mu_{\max}$ ) κατά τη μελέτη παρεμπόδισης από 2,3-BD σε κλειστή καλλιέργεια σε κωνικές φιάλες (▲) και microplate (Δ) .....	45

<b>Σχήμα 12:</b> Μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης ( $\mu_{max}$ ) κατά τη μελέτη παρεμπόδισης από οξικό οξύ σε κλειστή ζύμωση σε κωνικές φιάλες (■) και microplate (□).....	45
<b>Σχήμα 13:</b> Μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης ( $\mu_{max}$ ) κατά τη μελέτη παρεμπόδισης από μυρμηκικό οξύ σε κλειστή ζύμωση σε κωνικές φιάλες (◄) και microplate (◄) .....	46
<b>Σχήμα 14:</b> Μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης ( $\mu_{max}$ ) κατά τη μελέτη παρεμπόδισης από γαλακτικό οξύ σε κλειστή ζύμωση σε κωνικές φιάλες (◆) και microplate (◇).....	47
<b>Σχήμα 15:</b> Μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης ( $\mu_{max}$ ) κατά τη μελέτη παρεμπόδισης από ηλεκτρικό οξύ σε κλειστή ζύμωση σε κωνικές φιάλες (▼) και microplate (∇).....	47
<b>Σχήμα 16:</b> Μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης ( $\mu_{max}$ ) κατά τη μελέτη παρεμπόδισης από 2,3-BD (▲), οξικό οξύ (■), μυρμηκικό οξύ (◄), γαλακτικό οξύ (◆) και ηλεκτρικό οξύ (▼) σε κλειστή ζύμωση σε κωνικές φιάλες .....	48
<b>Σχήμα 17:</b> Μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης ( $\mu_{max}$ ) κατά τη μελέτη παρεμπόδισης από 2,3-BD (Δ), οξικό οξύ (□), μυρμηκικό οξύ (◄), γαλακτικό οξύ (◇) και ηλεκτρικό οξύ (∇) σε κλειστή ζύμωση σε microplate .....	49
<b>Σχήμα 18:</b> Τελική συγκέντρωση 2,3-BD σε κωνικές φιάλες με διαφορετική αρχική συγκέντρωση σακχαρόζης.....	50
<b>Σχήμα 19:</b> Απόδοση (στήλης) και ρυθμός παραγωγής (◆) 2,3-BD σε κωνικές φιάλες με διαφορετική αρχική συγκέντρωση σακχαρόζης.....	51
<b>Σχήμα 20:</b> Παραγωγή οξικού οξέος, μυρμηκικού οξέος, γαλακτικού οξέος, ηλεκτρικού οξέος και αιθανόλης σε κωνικές φιάλες με διαφορετική αρχική συγκέντρωση σακχαρόζης.....	52
<b>Σχήμα 21:</b> Μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης ( $\mu_{max}$ ) σε κλειστές ζυμώσεις με διαφορετική αρχική συγκέντρωση σακχαρόζης σε κωνικές φιάλες (●) και σε microplate (○).....	53
<b>Σχήμα 22:</b> Συγκέντρωση 2,3-BD (Δ) σε διαφορετικούς ρυθμούς αραίωσης (●) σε συνεχή ζύμωση.....	55
<b>Σχήμα 23:</b> Μέση συγκέντρωση παραγόμενης 2,3-BD σε διαφορετικούς ρυθμούς αραίωσης σε συνεχή ζύμωση .....	55

<b>Σχήμα 24:</b> Παραγωγικότητα της 2,3-BD σε διαφορετικούς ρυθμούς αραίωσης σε συνεχή ζύμωση .....	56
<b>Σχήμα 25:</b> Απόδοση 2,3-BD ως προς τα καταναλωθέντα σάκχαρα (■) και απόδοση 2,3-BD ως προς τα συνολικά σάκχαρα του θρεπτικού μέσου (■) σε διαφορετικούς ρυθμούς αραίωσης σε συνεχή ζύμωση .....	57
<b>Σχήμα 26:</b> Παραγωγή οξικού οξέος (■), μυρμηκικού οξέος (□), γαλακτικού οξέος (■), ηλεκτρικού οξέος (■) και αιθανόλης (■) σε διαφορετικούς ρυθμούς αραίωσης σε συνεχή ζύμωση .....	58

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η διαχείριση των εναπομεινάντων ορυκτών πόρων είναι μείζονος σημασίας για τη βιώσιμη ανάπτυξη των κρατών όπως αποτυπώθηκε στην Agenda 21, ένα πρόγραμμα που αφορά τον εικοστό πρώτο αιώνα και υπογράφηκε από 178 μέλη τον Ιούνιο του 1992 στο Ρίο ντι Τζανέιρο. Για την πραγματοποίησή του, νέες τεχνολογίες πρέπει να εφαρμοστούν με στόχο την αντικατάσταση των ορυκτών καυσίμων και των προϊόντων τους (Kamm & Kamm, 2004). Η ενεργειακή ζήτηση έχει ολοένα και αυξανόμενο ρυθμό, ενώ ταυτόχρονα οι ορυκτοί πόροι μειώνονται δραματικά με αποτέλεσμα την αύξηση της τιμής τους. Το ενεργειακό ζήτημα αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά προβλήματα της εποχής, όχι μόνο σε πολιτικό και οικονομικό επίπεδο αλλά και περιβαλλοντικό.

Όσον αφορά στην κάλυψη της ενεργειακής ζήτησης διάφορες μορφές ανανεώσιμων πηγών ενέργειας, όπως η αιολική, η ηλιακή και η πυρηνική ενέργεια, αποτελούν εναλλακτικές πηγές που θα μπορούσαν να αντικαταστήσουν σχεδόν εξ ολοκλήρου τα ορυκτά καύσιμα. Η αξιοποίηση της βιομάζας για την παραγωγή προϊόντων που παράγονται από το πετρέλαιο έχει ευρέως μελετηθεί και αποτελεί εναλλακτική λύση. Με αυτόν τον τρόπο μπορούν να αξιοποιηθούν υλικά που σε διαφορετική περίπτωση θα θεωρούνταν χαμηλής ή και μηδενικής αξίας, όπως τα γεωργικά και κτηνοτροφικά υπολείμματα και τα αστικά απόβλητα (Taylor, 2008). Το όφελος σε αυτήν την περίπτωση θα είναι διπλό καθώς μειώνεται η ζήτηση σε ορυκτές πρώτες ύλες αλλά και γίνεται ταυτόχρονα προστασία του περιβάλλοντος.

Έχοντας ως βάση την αξιοποίηση της βιομάζας αναπτύχθηκε και άρχισε να εφαρμόζεται τα τελευταία χρόνια η ιδέα των βιοδιυλιστηρίων. Βιοδιύλιση, όπως ορίζεται από τον Διεθνή Οργανισμό Ενέργειας, είναι η βιώσιμη επεξεργασία της βιομάζας για την παραγωγή ενός εύρους εμπορεύσιμων προϊόντων και ενέργειας (Cherubini, 2007). Στόχος είναι στο μέλλον η παγκόσμια οικονομία να βασίζεται σε μια κοινωνία απαλλαγμένη από το πετρέλαιο, που θα χρησιμοποιεί βιοκαύσιμα και βιοϋλικά που θα παράγονται σε βιοδιυλιστήρια.

Σε αντίθεση με τις θερμοχημικές διεργασίες, οι βιοχημικές διεργασίες που συμβαίνουν σε ένα βιοδιυλιστήριο, πραγματοποιούνται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες και με χαμηλότερη ταχύτητα αντίδρασης. Οι κυριότεροι τύποι βιοχημικών διεργασιών είναι η ζύμωση και η αναερόβια χώνευση (Cherubini, 2010). Η αναερόβια χώνευση

περιλαμβάνει βακτήρια, τα οποία αποικοδομούν τη βιοδιασπώμενη οργανική ύλη απουσία οξυγόνου και σε θερμοκρασία 30-65 °C, με κύριο προϊόν το βιοαέριο (μίγμα κυρίως μεθανίου και διοξειδίου του άνθρακα). Το βιοαέριο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υποκατάστατο του φυσικού αερίου μετά από επεξεργασία που θα του προσδώσει πάνω από 97% καθαρότητα σε μεθάνιο.

Κατά τις ζυμώσεις χρησιμοποιούνται μικροοργανισμοί ή και ένζυμα για να μετατρέψουν ανανεώσιμες πρώτες ύλες σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας όπως οι αλκοόλες και τα οργανικά οξέα. Ένα από αυτά είναι η 2,3-βουτανοδιόλη (2,3-BD), ένα προϊόν υψηλής προστιθέμενης αξίας με πολλές βιομηχανικές εφαρμογές, και η οποία σήμερα παράγεται σχεδόν αποκλειστικά με χημικές μεθόδους (Celińska & Grajek, 2009). Η πρώτη φορά που μελετήθηκε η μικροβιακή παραγωγή της 2,3-BD ήταν το 1906 από τους Harden και Walpole με χρήση του μικροοργανισμού *Aerobacter aerogenes* (*Klebsiella pneumoniae*) και το 1926 από τον Donker με καλλιέργεια του *Bacillus polymyxa*. Ο Fulmer και οι συνεργάτες του πρότειναν για πρώτη φορά το 1933 την βιομηχανική παραγωγή της διόλης, αλλά η μεγαλύτερη προσοχή δόθηκε στην περίοδο του Β΄ Παγκοσμίου Πολέμου δεδομένης της μικρής διαθεσιμότητας 1,3-βουταδιενίου.

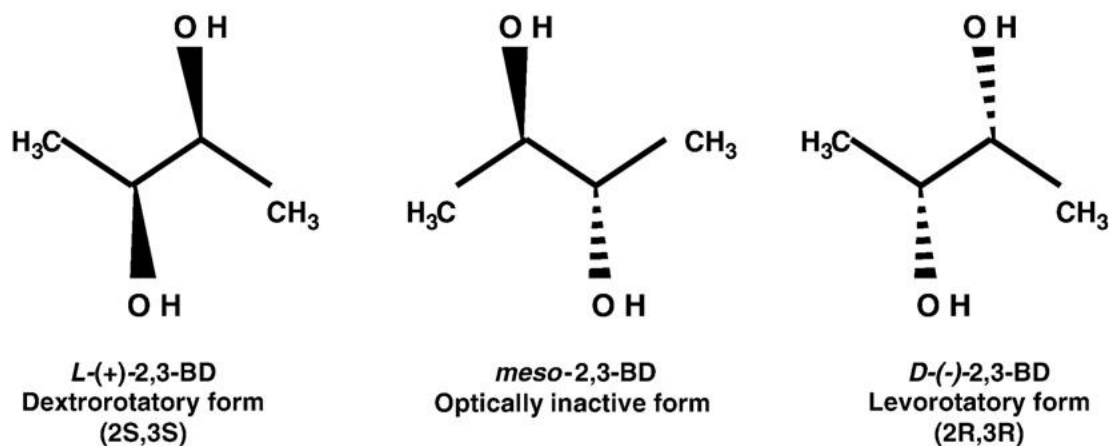
Το πλεονέκτημα της 2,3-BD είναι ότι μπορεί να παραχθεί από πληθώρα υποστρωμάτων πλούσιων σε σάκχαρα με τη χρήση κατάλληλων βακτηρίων. Υπάρχει όμως δυσκολία στο διαχωρισμό της από τα υπόλοιπα προϊόντα της ζύμωσης, με αποτέλεσμα τη μεγάλη αύξηση του κόστους παραγωγής της. Η εύρεση μιας νέας και οικονομικής μεθόδου ανάκτησης της 2,3-BD θα βοηθούσε πολύ στην παραγωγή της σε βιομηχανική κλίμακα (Garg & Jain, 1995).

## 1.1 2,3-βουτανοδιόλη

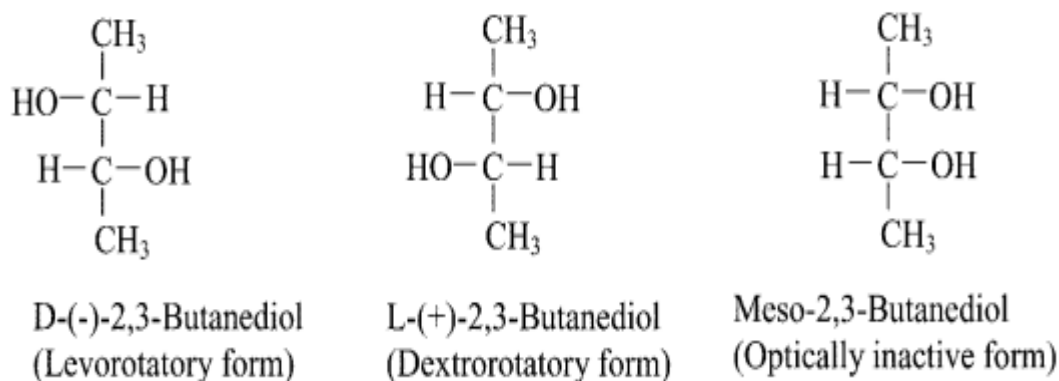
### 1.1.1 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά

Η 2,3-BD, γνωστή και ως 2,3-βουτυλενογλυκόλη ή διμεθυλενογλυκόλη, έχει μοριακό τύπο  $C_4H_{10}O_2$  και μοριακό βάρος 90.121 ( $g \cdot mol^{-1}$ ). Συναντάται σε τρεις ισομερείς μορφές (Σχήματα 1,2), τις D(-)-2,3-BD και L-(+)-2,3-BD που είναι οπτικά ενεργές και την meso-2,3-BD που είναι οπτικά ανενεργή (Celińska & Grajek, 2009). Το

σημείο βρασμού τους κυμαίνεται από 180-184 °C και το σημείο πήξεως είναι στους -60 °C. Πρόκειται για άχρωμο και άοσμο υγρό που απαντάται και σε κρυσταλλική μορφή.



**Σχήμα 1:** Στερεοϊσομερή 2,3-βουτανοδιόλης, προβολή Haworth (Celińska & Grajek, 2009)



**Σχήμα 2:** Στερεοϊσομερή 2,3-βουτανοδιόλης, προβολή Fischer (Syu, 2001)

### 1.1.2 Βιομηχανικές εφαρμογές

Η 2,3-BD είναι ένα προϊόν με δυνατότητα πολλών εφαρμογών και χρήσεων. Κυριότερη από αυτές είναι η μετατροπή του σε 1,2-βουταδιένιο και μετέπειτα σε συνθετικό καουτσούκ (Celińska & Grajek, 2009). Επίσης, η L-BD μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αντιψυκτικό λόγω του χαμηλού σημείου πήξεως (-60 °C). Η εμπορική αξιοποίηση της 2,3-BD δεν περιορίζεται στις παραπάνω εφαρμογές. Η θερμογόνος δύναμή της είναι  $27.198 \text{ J} \cdot \text{g}^{-1}$  (συγκρίσιμη με τη μεθανόλη:  $22.081 \text{ J} \cdot \text{g}^{-1}$  και

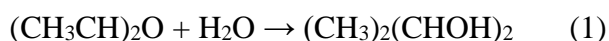


την αιθανόλη:  $29.055 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$ ) και αυτό την καθιστά ένα πολύ καλό πρόσθετο σε καύσιμα (Garg & Jain, 1995). Σύμφωνα με τους Yu και Saddler το 1982, ισομοριακό μίγμα αιθανόλης και 2,3-BD προσδίδουν συνδυαστικά θερμογόνο δύναμη ίση με  $27.660 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$  (E. K. C. Yu & Saddler, 1982). Μέσω της αφυδάτωσης της 2,3-BD παράγεται μεθυλοαιθυλο-κετόνη (MEK), ένα αποτελεσματικό πρόσθετο καυσίμου με υψηλότερη θερμογόνο δύναμη από την αιθανόλη. Η MEK μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ως διαλύτης για ρητίνες ή βερνίκια. Συμπύκνωση της ήδη υψηλής σε αριθμό οκτανίων 2,3-BD με MEK, ακολουθούμενη από υδρογόνωση, έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ισομερών οκτανίων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή υψηλής ποιότητας αεροπορικών καυσίμων.

Άλλα παραδείγματα εφαρμογών σύμφωνα με τους Bartowsky και Henschke, είναι η χρήση της 2,3-BD, μετά από αφυδρογόνωση και μετατροπή προς διακετύλιο, ως υψηλής αξίας πρόσθετου τροφίμων με βουτυρώδη γεύση και ως βακτηριοστατικό, καθώς εμποδίζει την ανάπτυξη μικροοργανισμών (Bartowsky & Henschke, 2004). Διάλυμα 0-1% αρκεί για να σκοτώσει τα περισσότερα παθογόνα βακτήρια. Ακόμα, η εστεροποίηση της διόλης με μηλικό οξύ έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία πρόδρομων αφρών πολυουρεθανών, που είναι χρήσιμες σε φάρμακα, καλλυντικά και αλοιφές. Τέλος, η 2,3-BD μπορεί να χρησιμοποιηθεί κατά την παραγωγή μελανιών και απολυμαντικών προϊόντων.

### **1.1.3 Τρόποι παραγωγής**

Υπάρχουν δύο τρόποι παραγωγής της 2,3-βουτανοδιόλης. Ο πρώτος και επικρατέστερος μέχρι σήμερα είναι μέσω της χημικής οδού από την πετροχημική βιομηχανία μετά από υδρόλυση του οξειδίου του 2,3-βουτενίου. Η αντίδραση που λαμβάνει χώρα είναι η εξής:



Ο δεύτερος τρόπος είναι αυτός της βιοτεχνολογικής οδού και οι έρευνες τα τελευταία χρόνια έχουν στραφεί σε αυτόν τον τομέα. Η κεντρική ιδέα είναι η αξιοποίηση των αποβλήτων των βιομηχανιών τροφίμων, αλλά και γεωργικών υπολειμμάτων για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί μέσω μικροβιακών ζυμώσεων. Στην περίπτωση της 2,3-BD, οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται επικρατέστερα είναι βακτήρια.

## 1.2 Βιοτεχνολογική παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης

### 1.2.1 Μεταβολικό μονοπάτι

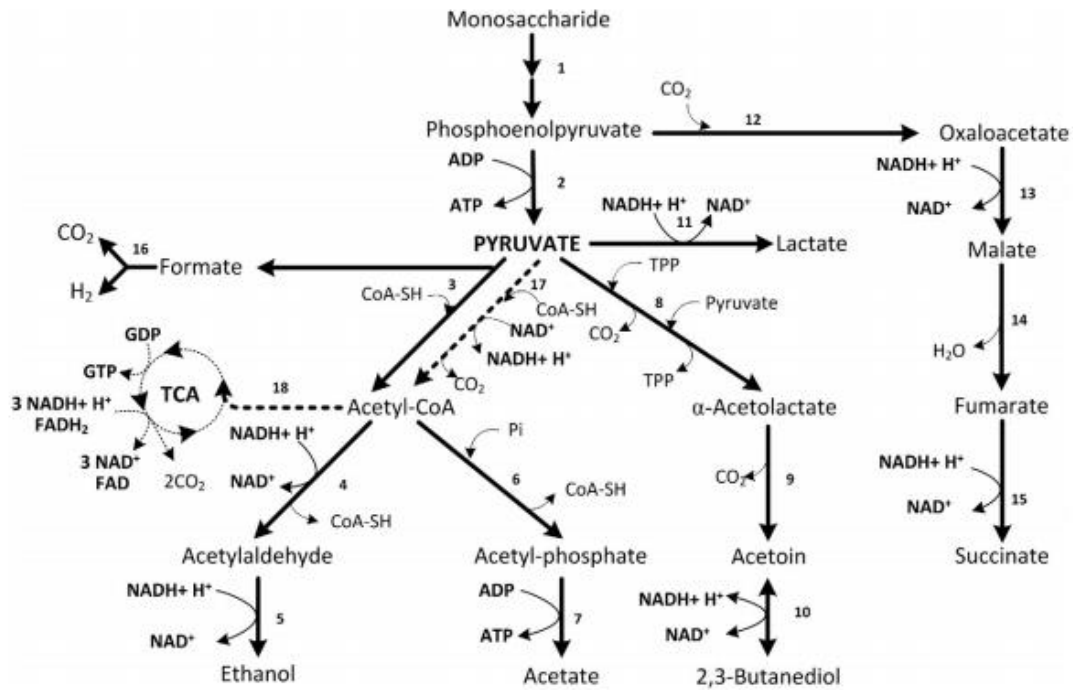
Για την βιοτεχνολογική παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης μέσω μικροβιακών ζυμώσεων μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορα υποστρώματα όπως μονοσακχαρίτες (πεντόζες, εξόζες), σακχαρόζη και γλυκερόλη (Syu, 2001).

Αρχικά, ο μονοσακχαρίτης μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό οξύ. Στην περίπτωση της γλυκόζης ακολουθείται το μονοπάτι της γλυκόλυσης μέσω της οδού Embden – Meyerhof (Magee & Kosaric, 1981). Στην περίπτωση όπου ο μονοσακχαρίτης είναι πεντόζη τότε γίνεται συνδυασμός του μονοπατιού των φωσφορικών πεντοζών και του Embden – Meyerhof. Άλλα προϊόντα που παράγονται πέρα από 2,3-BD είναι το οξικό, το γαλακτικό, το μυρμηκικό και το ηλεκτρικό οξύ, όπως επίσης και η ακετοΐνη και η αιθανόλη (Σχήμα 3). Ο μέγιστος θεωρητικός συντελεστής για τη μετατροπή της γλυκόζης σε 2,3-BD είναι 0.50 g/g (Jansen, Flickinger, & Tsao, 1984a). Η αντίστοιχη στοιχειομετρική αντίδραση δίνεται ως εξής:



Τα βασικά ένζυμα που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση της 2,3-βουτανοδιόλης είναι: η συνθάση του  $\alpha$ -ακετογαλακτικού οξέος (ALS, EC 4.1.3.18), η αποκαρβοξυλάση του  $\alpha$ -ακετογαλακτικού οξέος (ALDC, EC 4.1.1.5), και οι αφυδρογονάσεις της 2,3-BD (BDHs, EC 1.1.1.76). Όλα τα ένζυμα παράγονται στο τέλος της εκθετικής και στη στάσιμη φάση ανάπτυξης του μικροοργανισμού, όταν επικρατούν συνθήκες έλλειψης οξυγόνου (Celińska & Grajek, 2009).

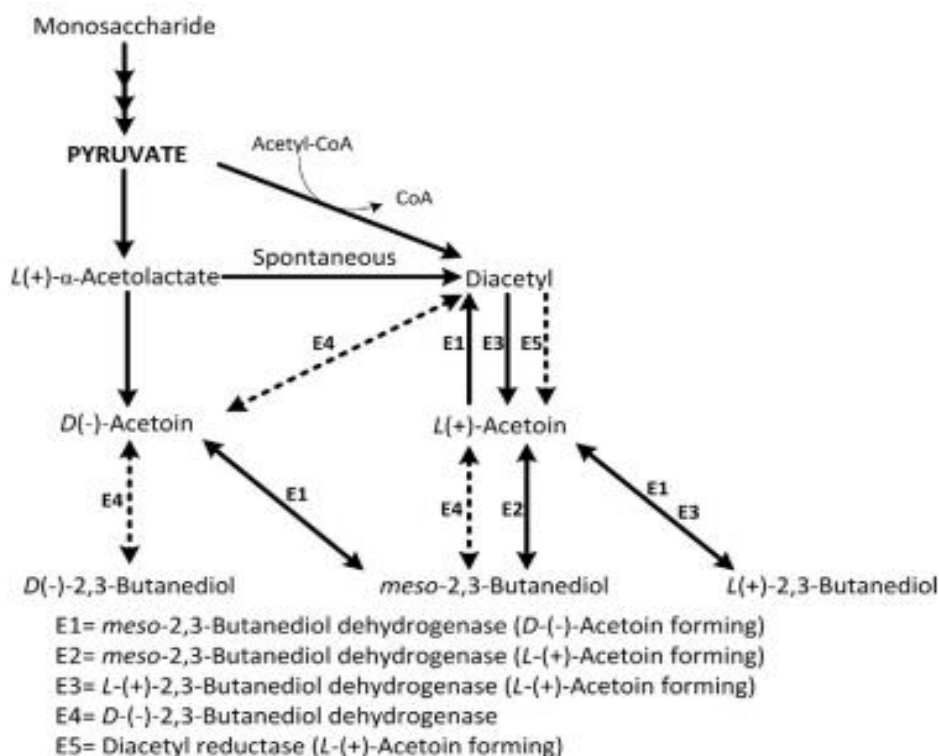
Το ένζυμο ALS έχει βέλτιστη εκλεκτικότητα σε ελαφρώς όξινες συνθήκες (pH 6) και συμμετέχει στις αντιδράσεις μετατροπής του πυροσταφυλικού οξέος σε  $\alpha$ -ακετογαλακτικό οξύ (Ji, Huang, & Ouyang, 2011). Το  $\alpha$ -ακετογαλακτικό οξύ παράγεται κυρίως όταν υπάρχει έλλειψη σε NADH. Ακολούθως μετατρέπεται σε ακετοΐνη, σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου. Υπό αερόβιες συνθήκες, το  $\alpha$ -ακετογαλακτικό οξύ αποκαρβοξυλιώνεται και μετατρέπεται σε διακετύλιο. Το διακετύλιο με τη σειρά του μπορεί να μετατραπεί αρχικά σε ακετοΐνη και στη συνέχεια σε 2,3-BD μετά από δράση των BDHs.



**Σχήμα 3:** Μεταβολικό μονοπάτι παραγωγής της 2,3-BD (Ji et al., 2011)

Υπό αερόβιες συνθήκες το ALS απενεργοποιείται ταχέως με αποτέλεσμα την αναστολή της παραγωγής της 2,3-BD. Ωστόσο, σε αυτήν την περίπτωση, το πυροσταφυλικό διασπάται σε ακετύλο-CoA μέσω της δράσης της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού, η οποία δεν συντίθεται σε αναερόβιες συνθήκες και γενικώς παρεμποδίζεται από το NADH. Στη συνέχεια το ακετύλο-CoA ενσωματώνεται στον κύκλο του κιτρικού οξέος.

Ο σχηματισμός των διαφορετικών ισομερών της 2,3-BD εξαρτάται από το είδος των BDHs. Οι προτεινόμενοι μηχανισμοί σχηματισμού των ισομερών απεικονίζονται στο Σχήμα 4 (Ji, Huang & Ouyang, 2011).



**Σχήμα 4:** Προτεινόμενοι μηχανισμοί δημιουργίας ισομερών της 2,3-βουτανοδιόλης (για τα στελέχη *Klebsiella pneumoniae* και *Paenibacillus polymyxa*). (Ji et al., 2011)

## 1.2.2 Μικροοργανισμοί

Αρκετές ζύμες έχουν την ικανότητα να σχηματίσουν 2,3-BD, ωστόσο η απόδοσή τους είναι πολύ μικρή. Το μεγαλύτερο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον για παραγωγή της 2,3-BD παρουσιάζουν τα βακτήρια (Garg & Jain, 1995) και κατά κύριο λόγο βακτήρια που ανήκουν στα γένη *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Bacillus* και *Serratia* (Ji et al., 2011).

Κάποια χαρακτηριστικά παραδείγματα μικροοργανισμών που ανήκουν στις παραπάνω κατηγορίες είναι τα εξής: *Aeromonas hydrophila*, *B. subtilis*, *Brevibacillus brevis S1*, *Corynebacterium glutamicum*, *E. aerogenes*, *K. pneumoniae* (γνωστός και ως *Aerobacter aerogenes*), *K. oxytoca*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis subsp. lactis bv. diacetylactis*, *Leuconostoc lactis*, *Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris*, *Oenococcus oeni*, *Pediococcus pentosaceus*, *Raoultella terrigena*, *Serratia marcescens*, *B. polymyxa*, *Klebsiella terrigena*, *Streptococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Aerobacter indologenes*, *rhizobacterium Pseudomonas chlororaphis* καθώς και θαλάσσια

μικροάλγη, όπως ο *Chlamydomonas perigranulata* (Celińska & Grajek, 2009). Μέχρι σήμερα οι πιο αποτελεσματικοί ως προς την παραγωγή 2,3-BD είναι οι *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* και *B. Polymyxa*.

### **1.2.3 Υποστρώματα**

Διάφορα υποστρώματα πλούσια σε υδατάνθρακες έχουν χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή 2,3-BD (Syu, 2001). Βασικός παράγοντας για την επιλογή του κατάλληλου υποστρώματος είναι το κόστος του, καθώς αυτό θα επηρεάσει και την τιμή του τελικού προϊόντος. Ως ιδανική λύση, θεωρούνται τα γεωργικά και βιομηχανικά απόβλητα όπως η γλυκερόλη, το τυρόγαλα ή τα γεωργικά υπολείμματα (Celińska & Grajek, 2009). Οι κυριότερες κατηγορίες υποστρωμάτων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην περίπτωση της 2,3-BD είναι τα λιγνοκυτταρινούχα και τα αγροτικά προϊόντα.

Τα υπολείμματα της βιομηχανίας τροφίμων αποτελούν ιδανική περίπτωση λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε σάκχαρα και της εύκολης ενσωμάτωσής τους στις βιοδιεργασίες (Perego, Converti, Del Borghi, & Canera, 2000). Στα υπολείμματα όπως και παραπροϊόντων της βιομηχανίας τροφίμων αλλά και τα αγροτικά προϊόντα που έχουν μελετηθεί για παραγωγή 2,3-BD περιλαμβάνονται υδρολύματα αμύλου μετά από επεξεργασία καλαμποκιού, μελάσα από την παραγωγή ζαχαροκάλαμου και τυρόγαλα από τη βιομηχανία γάλακτος. Ιδιαίτερα το υδρόλυμα αμύλου αποτελεί την πιο υποσχόμενη πρώτη ύλη καθώς υψηλές τιμές απόδοσης και παραγωγικότητας έχουν επιτευχθεί (Li et al., 2015). Εναλλακτικό υπόστρωμα που έχει χρησιμοποιηθεί για παραγωγή 2,3-BD αποτελεί το φυτό ‘αγκινάρα της Ιερουσαλήμ’ (*Helianthus tuberosus*) (Ji et al., 2011). Η αγκινάρα της Ιερουσαλήμ είναι ποώδες φυτό που περιέχει υψηλές ποσότητες υδατανθράκων (ινουλίνη και σακχαρόζη), σε ποσοστό 85% περίπου επί του ξηρού βάρους του. Επιπλέον, χαμηλού κόστους υπόστρωμα είναι η ακατέργαστη γλυκερόλη που παράγεται ως παραπροϊόν της διαδικασίας παραγωγής βιοντίζελ (T. Kim et al., 2017; Yang et al., 2013).

Τα κυτταρινούχα και ημικυτταρινούχα υποστρώματα μπορούν να παραληφθούν μετά από υδρόλυση αγροτικών υπολειμμάτων, όπως για παράδειγμα από υπολείμματα καλλιέργειας καλαμποκιού, ή υδρολύματα ξύλου (Syu, 2001). Η λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα μπορεί να αξιοποιηθεί για την παραγωγή χημικών ουσιών μέσω βιοτεχνολογικών οδών (Ragauskas et al., 2006). Τα κύρια συστατικά της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας είναι η λιγνίνη (10-20%), η κυτταρίνη (30-50%) και η

ημικυτταρίνη (15-35%). Η κυτταρίνη είναι ένα πολυμερές της γλυκόζης, ενώ η ημικυτταρίνη είναι πολυμερές που περιέχει κυρίως πεντόζες, όπως αραβινόζη, ξυλόζη και ριβόζη (Saha, 2003). Οι περισσότεροι μικροοργανισμοί δε μπορούν να αφομοιώσουν την κυτταρίνη, την ημικυτταρίνη και τη λιγνίνη λόγω των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών τους και για το λόγο αυτό είναι απαραίτητη η προεπεξεργασία τους (Wan & Li, 2012). Αν και η παραγωγικότητα της 2,3-BD με χρήση λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας δε μπορεί να συγκριθεί με τη γλυκόζη ως υπόστρωμα, αποτελεί ωστόσο μια αξιόλογη πρώτη ύλη με πολύ χαμηλό κόστος και σε μεγάλες ποσότητες (Motwani, Seth, Dagainawala, & Khanna, 1993).

### **1.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης**

Η παραγωγή της 2,3-BD επηρεάζεται από ένα εύρος παραγόντων όπως το pH, η θερμοκρασία, ο αερισμός, η σύσταση του θρεπτικού μέσου καθώς και η συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος και των προϊόντων. Ο τρόπος που επιδρά ο καθένας από τους παραπάνω παράγοντες αναλύεται διεξοδικά στη συνέχεια.

#### **1.3.1 pH**

Το pH είναι βασικός ρυθμιστής του βακτηριακού μεταβολισμού και επηρεάζει τις διαδικασίες σχηματισμού των προϊόντων. Ο μηχανισμός που επιδρά δεν έχει κατανοηθεί πλήρως, αλλά πιθανόν το δυναμικό μεταφοράς πρωτονίων στην πλασματική μεμβράνη μέσω ώσμωσης επηρεάζεται από την τιμή του pH. Σε αλκαλικές συνθήκες (pH πάνω από 6,3-6,5) ευνοείται ο σχηματισμός οργανικών οξέων με αποτέλεσμα τη μείωση στην απόδοση της 2,3-BD (Garg & Jain, 1995). Αντίθετα, η σύνθεση των οξέων είναι αρκετά μειωμένη σε όξινες συνθήκες, ενώ ταυτόχρονα η παραγωγή της 2,3-BD είναι μεγαλύτερη. Το βέλτιστο pH εξαρτάται από τον μικροοργανισμό και το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται και βρίσκεται μεταξύ των ορίων 5,5 έως 6,5 (Perego et al., 2000). Χαρακτηριστικά, ο μικροοργανισμός *Klebsiella sp.* σε ουδέτερο pH παράγει οξικό οξύ και αιθανόλη, ενώ σε pH κάτω από 6,3 παράγει 2,3-BD και αιθανόλη (Biebl, H.; Zeng, A. P.; Menzel, K.; Deckwer, 1998).

Στις περισσότερες αναερόβιες ζυμώσεις σχηματίζονται οργανικά οξέα και αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία όξινων συνθηκών στο μέσο της καλλιέργειας (Celińska & Grajek, 2009). Η ανάπτυξη τη βιομάζας και η εκμετάλλευση του

υποστρώματος σταδιακά σταματούν και η καλλιέργεια απενεργοποιείται (Biebl, H.; Zeng, A. P.; Menzel, K.; Deckwer, 1998). Κάποιοι μικροοργανισμοί έχουν αναπτύξει αμυντικούς μηχανισμούς με την αλλαγή του μεταβολισμού τους προς σχηματισμό λιγότερο τοξικών προϊόντων, όπως αλκοόλες (Van Houdt, Aertsen, & Michiels, 2007). Συγκεκριμένα, υψηλή παραγωγή 2,3-BD συμβαίνει σε όξινες συνθήκες περιβάλλοντος προκειμένου να εξισορροπηθεί το pH της καλλιέργειας.

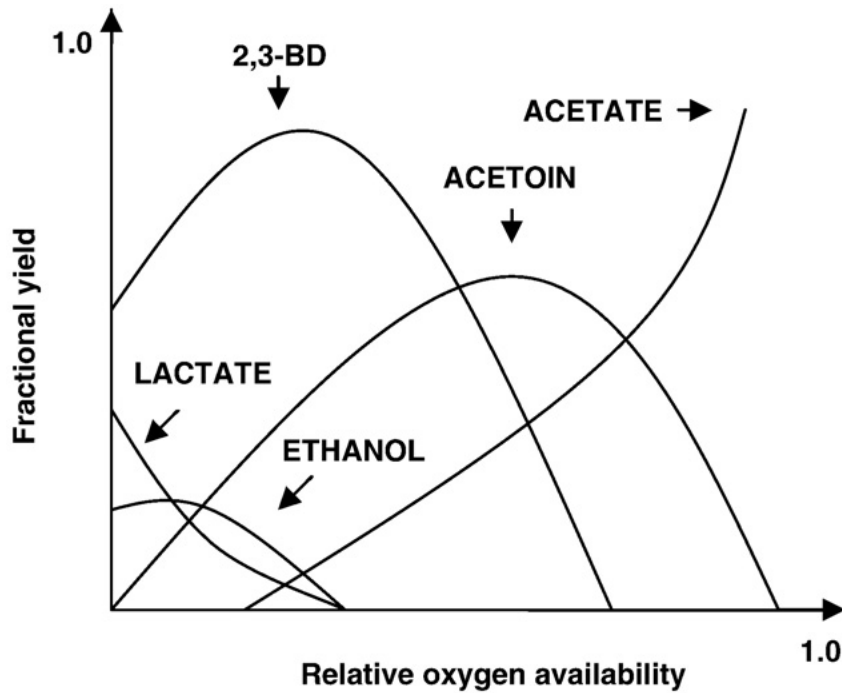
### **1.3.2 Θερμοκρασία**

Η απόδοση των βιοδιεργασιών είναι αυστηρά εξαρτώμενη από τη θερμοκρασία λόγω του συσχετισμού της με την ενζυμική δραστηριότητα και τη συντήρηση των κυττάρων (Garg & Jain, 1995). Εύρος θερμοκρασιών μεταξύ 30 και 35°C είναι συνήθως το βέλτιστο για μια ζύμωση, καθώς η απόδοση της βιομάζας είναι μεγαλύτερη τότε. Σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες κυριαρχεί η αποσύνθεση των κυττάρων. Αντίθετα, σε χαμηλότερες θερμοκρασίες η ρύθμιση του μεταβολισμού και ο ρυθμός παραγωγής βιομάζας επηρεάζεται αρνητικά (Celińska & Grajek, 2009).

Ωστόσο, κάθε μικροοργανισμός εμφανίζει τη μεγαλύτερη απόδοση σε διαφορετική θερμοκρασία. Για παράδειγμα, ο *K. pneumoniae* είχε τη μεγαλύτερη παραγωγή 2,3-BD όταν η θερμοκρασία μειώθηκε από τους 35°C στους 30°C (Biebl, H.; Zeng, A. P.; Menzel, K.; Deckwer, 1998; E. K. C. Yu & Saddler, 1982). Η βέλτιστη θερμοκρασία για τον *E. aerogenes* σε κλειστή ζύμωση είναι οι 39°C (Converti, Perego, & Del Borghi, 2003), ενώ για τον *B. polymyxa* οι 30°C (Hespell, 1996).

### **1.3.3 Αερισμός και ανάδευση**

Ο ρυθμός μεταφοράς οξυγόνου (Oxygen Transfer Rate - OTR) φέρεται να είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας κατά τη διάρκεια ζύμωσης με σκοπό την παραγωγή 2,3-BD. Υψηλότερος OTR οδηγεί κυρίως στην ανάπτυξη της βιομάζας. Σε μικρές παροχές οξυγόνου παράγεται οξικό οξύ, 2,3-BD, γαλακτικό οξύ και αιθανόλη (Syu, 2001). Όταν η παροχή οξυγόνου είναι εξαιρετικά χαμηλή, τότε παράγεται ισομοριακό μίγμα 2,3-BD και αιθανόλης. Επίσης, η ακετοΐνη μπορεί μέσω του NADH να αναχθεί σε 2,3-BD, με αποτέλεσμα η 2,3-BD να γίνει το κύριο προϊόν της ζύμωσης (Σχήμα 5).



**Σχήμα 5:** Επίδραση της σχετικής διαθεσιμότητας οξυγόνου στην απόδοση των προϊόντων για τον *B. polymyxa* (Celińska & Grajek, 2009)

Μικροοργανισμοί που παράγουν 2,3-BD μπορούν να πάρουν ενέργεια με δύο τρόπους: μέσω της αναπνοής και μέσω της ζύμωσης. Όταν η παροχή οξυγόνου είναι περιορισμένη, τότε τα δύο μονοπάτια ενεργοποιούνται αυτόματα. Η μείωση του οξυγόνου έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της απόδοσης της 2,3-BD επειδή μειώνεται η αναπνοή, ωστόσο μειώνεται και η βιομάζα, με συνέπεια τη μείωση της απόδοσής της. Σε κάθε μικροοργανισμό είναι απαραίτητο να μελετηθεί η παροχή οξυγόνου που θα δώσει την καλύτερη αναλογία βιομάζας και προϊόντων (Garg & Jain, 1995).

Η αιτία για την αλλαγή στον μεταβολισμό από την παραγωγή βιομάζας στην παραγωγή μίγματος οξέων και 2,3-BD είναι η διατήρηση του ισοζυγίου  $NAD^+/NADH$ . Υπό αερόβιες συνθήκες, το  $NADH$  από τη γλυκόλυση αναγεννάται μέσω της αναπνοής. Αυτό δε μπορεί να συμβεί σε αναερόβιες συνθήκες και έτσι τον σκοπό εξυπηρετούν μονοπάτια όπως αυτό της 2,3-BD. Με ελεγχόμενο τον αερισμό μπορεί η γλυκόζη να μετατραπεί εξ ολοκλήρου σε 2,3-BD (Zeng, Biebl, & Deckwer, 1990a) και να αποφευχθεί η παραγωγή παραπροϊόντων που μπορούν να δράσουν ανασταλτικά.



### 1.3.4 Σύσταση θρεπτικού μέσου

Το θρεπτικό μέσο της ζύμωσης θα πρέπει να περιέχει όλα τα απαραίτητα συστατικά για την ανάπτυξη και τη διατήρηση του μικροοργανισμού που χρησιμοποιείται. Εκτός από τις πηγές άνθρακα και αζώτου θα πρέπει να περιέχονται επίσης οι κατάλληλες βιταμίνες και ιχνοστοιχεία. Το εκχύλισμα ζύμης αποτελεί μια εξαιρετική πηγή αζώτου, αλλά το μεγάλο του κόστος το καθιστά απαγορευτικό για χρήση σε βιομηχανική κλίμακα (Magee & Kosaric, 1981). Η ουρία μπορεί να το αντικαταστήσει ως πιο οικονομική πηγή αζώτου στην περίπτωση της παραγωγής 2,3-BD. Σύμφωνα με τους Nigelaonkar et al. (1992), βρέθηκε ότι η προσθήκη πεπτόνης ή εκχυλίσματος κρέατος ενίσχυσε την παραγωγή 2,3-BD όταν χρησιμοποιήθηκε ο μικροοργανισμός *Bacillus licheniformis* (Garg & Jain, 1995).

Επιπλέον, προσθήκη  $Fe^{2+}$  και  $Mn^{2+}$  επιδρά θετικά στην απόδοση της 2,3-BD (Laube, Groleau, & Martin, 1984). Σύμφωνα με τους Murphy και Stranks (1951), η προσθήκη φωσφορικού άλατος με τη μορφή συνήθως φωσφορικού καλίου έχει θετική επίδραση στην παραγωγή 2,3-BD. Συγκεντρωτικά, οι τρεις αυτοί παράγοντες ( $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  και φωσφορικό άλας) είχαν ως αποτέλεσμα την αύξηση της παραγόμενης 2,3-BD κατά 89%.

Τέλος, η προσθήκη οξικού, πυροσταφυλικού ή ηλεκτρικού οξέος βελτιώνει την παραγωγή 2,3-BD για τον *B. polymyxa*, ενώ το βουτυρικό, το μυρμηκικό, το γαλακτικό και το μηλικό οξύ δεν έχουν κάποια θετική επίδραση (Yutaka Nakashimada, Mabwoto, Takashi, Toshihide, & Nishio, 2000). Ειδικά το οξικό οξύ, για συγκεντρώσεις μέχρι 200 mM, φαίνεται να είναι το πιο κατάλληλο πρόσθετο, καθώς οδηγεί σε υψηλές τιμές απόδοσης και συγκέντρωσης, με ταυτόχρονη μείωση της παραγωγής της αιθανόλης, του υδρογόνου και του γαλακτικού οξέος. Σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 200 mM το οξικό οξύ λειτουργούσε παρεμποδιστικά. Το φαινόμενο αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι το οξικό οξύ επιδρά στο μονοπάτι της 2,3-BD και συγκεκριμένα στα ένζυμα συνθάση του  $\alpha$ -ακετογαλακτικού οξέος, αποκαρβοξυλάση του  $\alpha$ -ακετογαλακτικού οξέος και αναγωγή της ακετοΐνης. Ρυθμίζει έτσι την ισορροπία μεταξύ ακετοΐνης και 2,3-BD (Bryn, Ulstrup, & Stormer, 1973).

### 1.3.5 Αρχική συγκέντρωση σακχάρων

Στις περισσότερες περιπτώσεις παραγωγής 2,3-BD η συνήθης συγκέντρωση των υδατανθράκων κυμαίνεται από 5 έως 10% (w/v) (Garg & Jain, 1995). Στις περιπτώσεις αξιοποίησης αποβλήτων όπως λιγνοκυτταρινούχα υδρολύματα και μελάσα, χαμηλές συγκεντρώσεις αρχικών σακχάρων χρησιμοποιούνται για την αποφυγή φαινομένων παρεμπόδισης από τις τοξικές ουσίες που απαντώνται σε αυτά (Long & Patrick, 1963).

Υψηλές αρχικές συγκεντρώσεις γλυκόζης (μεγαλύτερες των  $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) παρεμπόδιζαν την κατανάλωσή τους καθώς και την παραγωγή της 2,3-BD σε ζυμώσεις του *K. oxytoca* (Kim et al. 2016; Yu & Saddler, 1983). Αντιθέτως, συγκεντρώσεις μελάσας 4-6% (w/v) είχαν ως αποτέλεσμα τη μείωση του χρόνου της ζύμωσης (λιγότερο από 24 h). Σε πειράματα όπου υπήρχε σακχαρόζη έως 17% (w/v) η ζύμωση δεν ολοκληρωνόταν και ήταν λιγότερο αποδοτική. Σε άλλη μελέτη όπου χρησιμοποιήθηκε γλυκόζη, βρέθηκε ότι η ζύμωση θα μπορούσε να ολοκληρωθεί ακόμα και σε συγκεντρώσεις  $200 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , ενώ ταυτόχρονα ήταν αυξημένη η απόδοση της 2,3-BD (Celińska & Grajek, 2009). Σύμφωνα με τους Converti και Perego το 2002, σε πειράματα που έγιναν με χρήση του *E. aerogenes*, αποδείχθηκε ότι η αρχική συγκέντρωση της γλυκόζης ( $9\text{-}72 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) δεν παίζει ρόλο στην παραγωγή της 2,3-BD. Σε άλλες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν με τον *B. polymyxa*, η παρεμπόδιση άρχισε να παρατηρείται σε συγκεντρώσεις υποστρώματος μεγαλύτερες των  $150 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Biebl, H.; Zeng, A. P.; Menzel, K.; Deckwer, 1998). Συμπερασματικά, η επίδραση του τύπου του υποστρώματος και της συγκέντρωσής του επηρεάζει την παραγωγή της 2,3-BD ανάλογα με το είδος του μικροοργανισμού που χρησιμοποιείται.

### 1.3.6 Παρεμπόδιση εκ των προϊόντων

Η ύπαρξη μεταβολικών προϊόντων στο μίγμα της ζύμωσης των μικροοργανισμών λειτουργεί παρεμποδιστικά στην κυτταρική αύξηση αλλά και στην παραγωγή του κύριου προϊόντος. Χαρακτηριστικά, το οξικό οξύ σε συγκεντρώσεις πάνω από  $0.45 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , αποτελεί ισχυρό παρεμποδιστή της κυτταρικής αύξησης του *Klebsiella oxytoca* (E. K. Yu & Saddler, 1982). Παρόμοια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και κατά τη ζύμωση του *Enterobacter aerogenes* με χρήση λιγνοκυτταρινούχων υδρολυμάτων ως υπόστρωμα (Joo et al., 2016).

Η 2,3-BD δεν αποτελεί ισχυρό παρεμποδιστή στη ζύμωση του *K. oxytoca*, ωστόσο υψηλές συγκεντρώσεις 2,3-BD ( $105 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) επιδρούν αρνητικά στο ρυθμό παραγωγής της (Fond, Jansen, & Tsao, 1985). Το φαινόμενο αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις διόλης είναι αρκετά μειωμένη η ενεργότητα του νερού, η οποία είναι γνωστό ότι δρα αρνητικά στην κυτταρική αύξηση. Οι Jansen et al. (1984) επιβεβαίωσαν τα παραπάνω χρησιμοποιώντας υπόστρωμα ξυλόζης  $80 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , όπου ο ρυθμός αύξησης μειωνόταν γραμμικά με την αύξηση της 2,3-BD και η αύξηση σταμάτησε οριστικά όταν η συγκέντρωση της έφτασε τα  $65 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Jansen, Flickinger, & Tsao, 1984b).

Η προσθήκη αιθανόλης, ενός άλλου παραπροϊόντος της ζύμωσης του *E. aerogenes*, βρέθηκε επίσης ότι προκαλούσε γραμμική μείωση του ρυθμού κυτταρικής αύξησης. Συγκεκριμένα, έφτασε το 50% στα  $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  αιθανόλης και σταμάτησε στα  $45 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Zeng & Deckwer, 1991).

Στη μελέτη παρεμπόδισης των προϊόντων της ζύμωσης του *K. oxytoca* με υπόστρωμα γλυκόζης, ο μικροοργανισμός εμφάνιζε ιδιαίτερη ανθεκτικότητα σε 2,3-BD και ηλεκτρικό οξύ μέχρι συγκέντρωσης  $74 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  και  $72 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  αντίστοιχα. Όταν υπήρχε αιθανόλη ( $36 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) στο υγρό της ζύμωσης, παρατηρήθηκε πλήρης παρεμπόδιση της ανάπτυξης βιομάζας. Η ακετοΐνη, το μυρμηκικό και το ηλεκτρικό οξύ είχαν ως συνέπεια την παρεμπόδιση στην κυτταρική αύξηση ακόμα και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (D. K. Kim et al., 2016).

## 1.4 Συστήματα καλλιέργειας

Οι ζυμώσεις χαρακτηρίζονται ανάλογα με το είδος του υποστρώματος ως υγρή, στερεή ή μικτή. Ο τρόπος τροφοδοσίας του υποστρώματος όμως μπορεί περαιτέρω να διαχωρίσει τη ζύμωση σε κλειστή ή ασυνεχή, συνεχή και ημι-συνεχή. Τα τελευταία αναλύονται παρακάτω.

### 1.4.1 Κλειστή καλλιέργεια

Σε αυτόν τον τύπο ζύμωσης δεν υπάρχει προσθήκη και απομάκρυνση θρεπτικού υλικού. Η αρχική ποσότητα θρεπτικού υλικού εμβολιάζεται με την καλλιέργεια του μικροοργανισμού. Κατά την καλλιέργεια αυτή παρατηρούνται οι εξής φάσεις: λανθάνουσα, εκθετική, στατική και φάση θανάτου. Κατά τη λανθάνουσα φάση ο

πληθυσμός των μικροοργανισμών που προέρχεται από την αρχική καλλιέργεια παραμένει σχεδόν σταθερός. Αυτό οφείλεται στο ότι οι μικροοργανισμοί χρειάζονται κάποιο χρονικό διάστημα για να προσαρμοστούν στις καινούργιες συνθήκες και να αρχίσουν να αναπτύσσονται. Στη συνέχεια, ακολουθεί η φάση ανάπτυξης όπου παρατηρείται εκθετική αύξηση του μικροοργανισμού. Ακολουθεί η στατική φάση, κατά την οποία ο πληθυσμός των βακτηρίων δεν αυξάνεται, λόγω εξάντλησης κάποιου θρεπτικού συστατικού ή λόγω συσσώρευσης τοξικών προϊόντων από το μεταβολισμό των μικροοργανισμών. Κατά τη φάση θανάτου ο αριθμός των μικροοργανισμών μειώνεται. Παρά το γεγονός ότι η διαδοχή των φάσεων ανάπτυξης σε κάθε κλειστή καλλιέργεια είναι συγκεκριμένη, η διάρκεια κάθε φάσης διαφέρει ανάλογα με το είδος των μικροοργανισμών. Οι μικροοργανισμοί παράγουν χρήσιμα προϊόντα συνήθως κατά τη διάρκεια της εκθετικής και της στατικής φάσης ανάπτυξής τους.

#### ***1.4.2 Συνεχής καλλιέργεια***

Σε αυτόν τον τύπο καλλιέργειας οι μικροοργανισμοί τροφοδοτούνται συνεχώς με θρεπτικά συστατικά. Ταυτόχρονα, απομακρύνονται από την καλλιέργεια τα κύτταρα και τα προϊόντα. Μετά τον εμβολιασμό και τη φάση προσαρμογής, τα κύτταρα αναπτύσσονται λογαριθμικά μέχρι να φτάσουν σε ένα επιθυμητό επίπεδο, και στη συνέχεια αφαιρείται συνεχώς υπόστρωμα και βιομάζα, ενώ προστίθεται περίπου ισόποσος όγκος νέου υποστρώματος ώστε να μην υπάρχει πλέον αύξηση της βιομάζας, αλλά σταθερός ρυθμός παραγωγής προϊόντος.

#### ***1.4.3 Ημι-συνεχής καλλιέργεια***

Ως ημι-συνεχής καλλιέργεια ορίζεται η τεχνική όπου ένα ή περισσότερα θρεπτικά συστατικά τροφοδοτούνται στον βιοαντιδραστήρα κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας με σκοπό την πρόληψη της εξάντλησης θρεπτικών συστατικών. Συγκεκριμένα, ξεκινάει όπως μια ασυνεχής ζύμωση, αλλά λίγο πριν τελειώσουν τα θρεπτικά συστατικά, προστίθεται νέο θρεπτικό υπόστρωμα, ώστε να παραταθεί η φάση ανάπτυξης των μικροοργανισμών και η παραγωγή προϊόντων. Γενικά, η ημι-συνεχής καλλιέργεια είναι ανώτερη από την συμβατική ασυνεχή καλλιέργεια όταν ο έλεγχος των συγκεντρώσεων ενός θρεπτικού συστατικού (ή θρεπτικών συστατικών) επηρεάζει την απόδοση ή την παραγωγικότητα του επιθυμητού μεταβολικού προϊόντος.

## 1.5 Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης είναι η παραγωγή 2,3-BD αξιοποιώντας ακατέργαστη σακχαρόζη από ζαχαροκάλαμο ως υπόστρωμα και χρησιμοποιώντας το βακτηριακό στέλεχος *Enterobacter ludwigii*. Αρχικά πραγματοποιήθηκαν ημι-συνεχείς ζυμώσεις με τη χρήση διαφορετικής συγκέντρωσης εμβολίου. Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του υποστρώματος αλλά και των μεταβολικών προϊόντων στην κυτταρική αύξηση του βακτηρίου σε δυο τύπους ασυνεχών καλλιιεργειών (μικρού όγκου-microplate και κωνικών φιαλών). Τέλος, πραγματοποιήθηκε συνεχής ζύμωση με στόχο τη μελέτη διαφορετικών ρυθμών αραιώσεων.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Βιολογικό υλικό

Το βακτηριακό στέλεχος *Enterobacter ludwigii*, της οικογένειας *Enterobacteriaceae* χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή 2,3-BD. Το στέλεχος αυτό ανήκει στην τράπεζα του εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Η μακροπρόθεσμη διατήρηση του βακτηρίου πραγματοποιήθηκε στους -80 °C σε διάλυμα γλυκερόλης, ενώ για βραχυχρόνια διατήρηση αποθηκεύεται σε φιαλίδιο που περιέχει υγρό ζύμωσης και γλυκερόλη (50% v/v).

### 2.2 Παρασκευή εμβολίου

Η παρασκευή του εμβολίου πραγματοποιήθηκε σε κωνικές φιάλες (Erlenmeyer flasks) των 500 ml πληρωμένες μέχρι τα 250 ml και με σύσταση (σε g·L<sup>-1</sup>): 10 ακατέργαστη σακχαρόζη, 2 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 CH<sub>3</sub>COONa, 0.84 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.06 MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 5 πεπτόνη και 2.5 εκχύλισμα ζύμης. Τα υλικά και τα θρεπτικά συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν αποστειρώθηκαν στους 121°C για 20 min. Οι κωνικές φιάλες εμβολιάστηκαν από φιαλίδιο που περιείχε εναιώρημα κυττάρων του μικροοργανισμού και επώαστηκαν για 12-14 h στους 33.9°C υπό ανάδευση 180 rpm. Σε αυτήν την περίπτωση το βακτήριο βρίσκεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Στη συνέχεια ακολούθησε ο εμβολιασμός της κύριας καλλιέργειας (10% v/v) σε ασηπτικές συνθήκες.

### 2.3 Θρεπτικό μέσο για την παραγωγή 2,3-BD

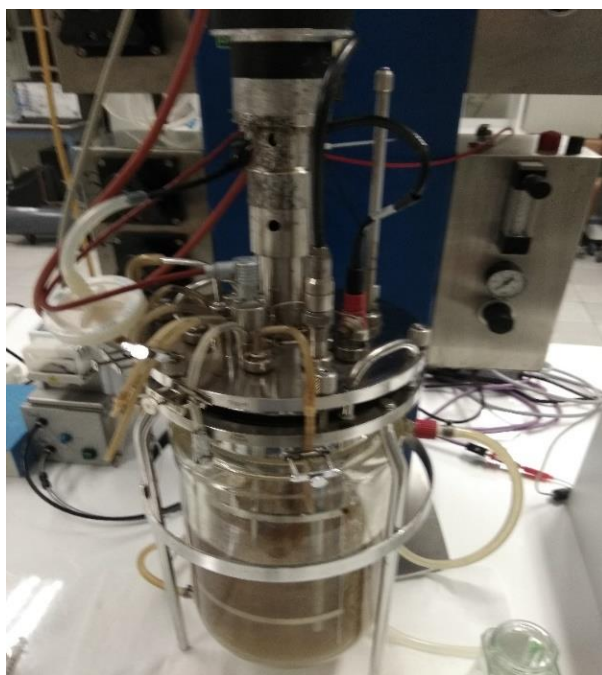
Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα που διενεργήθηκαν για την παραγωγή της 2,3-BD, είχε την ακόλουθη σύσταση (σε g·L<sup>-1</sup>) 7.2 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 6 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.45 KOH, 0.51 EDTA, 0.3 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.09 CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.0225 FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.0075 ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O και 0.0038 MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (Pirt & Callow, 1958). Η συγκέντρωση της πηγής άνθρακα όπως επίσης και των εξωτερικά προστιθέμενων μεταβολικών προϊόντων άλλαζε ανάλογα με τις εκάστοτε συνθήκες του πειράματος που μελετήθηκαν. Η πολυεθνική εταιρεία Petrobras από το Rio de Janeiro της Βραζιλίας

ήταν ο προμηθευτής της ακατέργαστης σακχαρόζης. Η αποστείρωση των υλικών γινόταν στους 121 °C για 20 min με την πηγή άνθρακα να αποστειρώνεται και να προστίθεται ξεχωριστά στο θρεπτικό μέσο υπό ασηπτικές συνθήκες.

## **2.4 Ημι-συνεχείς ζυμώσεις**

### **2.4.1 Παρασκευή εμβολίου**

Προκειμένου να επιλεγεί το κατάλληλο εμβόλιο, αρχικά πραγματοποιήθηκαν δύο πειράματα κλειστής καλλιέργειας σε βιοαντιδραστήρα 3.6-L (Labfors 4, Infors HT, Switzerland), με αερισμό 1 vvm, στα 400 rpm και στους 33.9°C. Στην πρώτη ζύμωση χρησιμοποιήθηκε σύνθετο οργανικό υπόστρωμα με σύσταση (σε g·L<sup>-1</sup>): 10 ακατέργαστη σακχαρόζη, 2 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 CH<sub>3</sub>COONa, 0.84 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.06 MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 5 πεπτόνη και 2.5 εκχύλισμα ζύμης, ενώ στη δεύτερη χρησιμοποιήθηκε συνθετικό υπόστρωμα σε σύσταση (σε g·L<sup>-1</sup>): 10 ακατέργαστη σακχαρόζη, 7.2 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και 6 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.45 KOH, 0.51 EDTA, 0.3 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.09 CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.0225 FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.0075 ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O και 0.0038 MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O. Τα αποτελέσματα από τα παραπάνω πειράματα τέθηκαν σε σύγκριση με πείραμα που έλαβε χώρα στις ίδιες συνθήκες, σε βιοαντιδραστήρα 6.7-L (Ralf Advanced, Bioengineering, Switzerland) με 3-L ενεργό όγκο και με συνθετικό υπόστρωμα. Οι ζυμώσεις σε κάθε περίπτωση διήρκεσαν 11 h με σκοπό την εύρεση της μέγιστης συγκέντρωσης βιομάζας.



**Εικόνα 1:** Προετοιμασία εμβολίου σε αντιδραστήρα Ralf Advanced, Bioengineering, Switzerland (6.7-L)

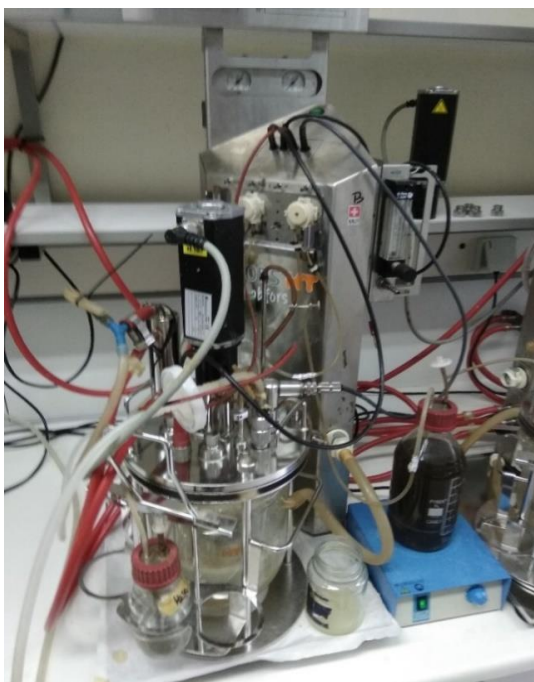
#### **2.4.2 Ημι-συνεχείς ζυμώσεις με διαφορετική αρχική συγκέντρωση βιομάζας**

Στη συγκεκριμένη σειρά πειραμάτων μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης εμβολίου στην παραγωγή της 2,3-BD. Για το σκοπό αυτό, δύο ημι-συνεχείς ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε βιοαντιδραστήρα 3.6-L (Labfors 4, Infors HT, Switzerland), με ενεργό όγκο 1-L, αερισμό 1 vvm, ρυθμό ανάδευσης 400 rpm, pH 6.4 και θερμοκρασία 33.9°C. Ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκε ακατέργαστη σακχαρόζη συγκέντρωσης 70 g·L<sup>-1</sup>. Η σύσταση του θρεπτικού μέσου που χρησιμοποιήθηκε αναφέρεται στην ενότητα 2.3. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, πυκνό διάλυμα ακατέργαστης σακχαρόζης (700 g·L<sup>-1</sup>) προστέθηκε με τη χρήση αντλίας, έτσι ώστε η συγκέντρωσή της στο υγρό της ζύμωσης να παραμένει σταθερή στα 40 g·L<sup>-1</sup>. Όλα τα πειράματα έγιναν δύο φορές και παρουσιάζεται ο μέσος όρος των επαναλήψεων.

Στο πρώτο πείραμα χρησιμοποιήθηκε εμβόλιο 10% (v/v). Για την παρασκευή του εφαρμόστηκαν οι συνθήκες που παρουσιάζονται στην ενότητα 2.2. Στο δεύτερο πείραμα χρησιμοποιήθηκε εμβόλιο που παρασκευάστηκε σε βιοαντιδραστήρα 6.7-L (Ralf Advanced, Bioengineering, Switzerland) με 3-L ενεργό όγκο και χρήση του



συνθετικού μέσου με την παρακάτω σύσταση (σε  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ): 10 ακατέργαστη σακχαρόζη, 7.2  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  και 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  $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 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  $\text{MnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Οι συνθήκες ζύμωσης ήταν:  $33.9^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH } 6.4 \pm 0.2$ , ανάδευση 400 rpm και αερισμός 1 vvm. Η διάρκεια της ζύμωσης ήταν 8 h και στόχος ήταν η ανάπτυξη βιομάζας περίπου  $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Η βιομάζα αυτή στη συνέχεια διαχωρίστηκε από το υγρό της ζύμωσης και υπό ασηπτικές συνθήκες μεταφέρθηκε στο βιοαντιδραστήρα.



**Εικόνα 2:** Ημι-συνεχής ζύμωση σε αντιδραστήρα Labfors 4, Infors HT, Switzerland 3.6-L (1 L ενεργός όγκος)

## 2.5 Παρεμπόδιση εκ των προϊόντων και του υποστρώματος

### 2.5.1 Κλειστή καλλιέργεια σε κωνικές φιάλες

Στην πρώτη φάση της πειραματικής διαδικασίας μελετήθηκε η παρεμπόδιση του υποστρώματος και των προϊόντων στην κυτταρική αύξηση του *E. ludwigii* σε κλειστή καλλιέργεια. Χρησιμοποιήθηκαν κωνικές φιάλες των 500 ml πληρωμένες μέχρι τα 100 ml, στους  $33.9^\circ\text{C}$  υπό ανάδευση 180 rpm και με το pH να ρυθμίζεται σε τακτά χρονικά διαστήματα και να διατηρείται σταθερό στο 6.4. Σκοπός ήταν να διατηρηθούν όλες οι

υπόλοιπες συνθήκες σταθερές έτσι ώστε να μελετηθεί η επίδραση του κάθε συστατικού ξεχωριστά. Αρχικά μελετήθηκε η παρεμπόδιση από το υπόστρωμα. Χρησιμοποιήθηκαν αυξανόμενες ποσότητες σακχαρόζης από συγκέντρωση 5 g·L<sup>-1</sup> έως 220 g·L<sup>-1</sup>. Στη συνέχεια, διατηρώντας σταθερή τη συγκέντρωση του υποστρώματος στα 30 g·L<sup>-1</sup>, προστέθηκαν ξεχωριστά σε διαφορετικές συγκεντρώσεις 2,3-BD, οξικό οξύ, ηλεκτρικό οξύ, μυρμηκικό οξύ και γαλακτικό οξύ. Τα πειράματα διεξήχθησαν εις διπλούν και τα αποτελέσματα αποτελούν τη μέση τιμή. Αναλυτικότερα, οι συγκεντρώσεις που εφαρμόστηκαν στην εκάστοτε περίπτωση παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 1:** Συγκεντρώσεις παρεμποδιστών κατά τη μελέτη παρεμπόδισης (κωνικές φιάλες)

Μεταβολικό προϊόν	Συγκέντρωση (g·L <sup>-1</sup> )			
2,3-BD	20	40	90	110
Οξικό οξύ	5	15	25	30
Ηλεκτρικό οξύ	5	10	20	25
Μυρμηκικό οξύ	5	10	15	25
Γαλακτικό οξύ	5	15	25	30

### 2.5.2 Κλειστή καλλιέργεια μικρού όγκου

Τα παραπάνω πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες, έγιναν και σε κλειστή καλλιέργεια μικρού όγκου (200μL) σε microplate 96 θέσεων (Infinite M200-PRO, TECAN) με ανάδευση με σκοπό την επιβεβαίωσή τους και την επεξήγηση τυχόν διαφορετικής ανταπόκρισης του βακτηρίου σε αυτού του είδους τη ζύμωση. Μέτρηση της απορρόφησης στα 660 nm γινόταν αυτόματα ανά 10 min. Οι συνθήκες ζύμωσης ήταν 33.9°C και αρχικό pH 6.4. Σκοπός ήταν η μελέτη της επίδρασης κάθε συστατικού ξεχωριστά διατηρώντας τις υπόλοιπες συνθήκες σταθερές και η σύγκριση με την μελέτη παρεμπόδισης στις κωνικές φιάλες. Μελετήθηκε η παρεμπόδιση από τη σακχαρόζη, σε διάφορες συγκεντρώσεις από 5 έως 200 g·L<sup>-1</sup> και στη συνέχεια

διατηρώντας σταθερή τη συγκέντρωση του υποστρώματος στα  $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , προστέθηκαν ξεχωριστά σε διαφορετικές συγκεντρώσεις 2,3-BD, οξικό οξύ, ηλεκτρικό οξύ, μυρμηκικό οξύ και γαλακτικό οξύ. Οι συγκεντρώσεις που εφαρμόστηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 2. Κάθε πείραμα έγινε με έξι επαναλήψεις και τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο των επαναλήψεων.

**Πίνακας 2:** Συγκεντρώσεις παρεμποδιστών κατά τη μελέτη παρεμπόδισης (microplate)

Μεταβολικό προϊόν	Συγκέντρωση ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )						
	20	40	60	80	120	140	160
2,3-BD	20	40	60	80	120	140	160
Οξικό οξύ	5	15	25	35			
Ηλεκτρικό οξύ	5	15	25	35			
Μυρμηκικό οξύ	5	10	15	20			
Γαλακτικό οξύ	5	15	25	35			

## 2.6 Συνεχής ζύμωση

Κατά τη συνεχή ζύμωση μελετήθηκε η απόκριση του *E. ludwigii* σε διαφορετικούς ρυθμούς αραίωσης όσον αφορά στην παραγωγή της 2,3-BD και των μεταβολικών παραπροϊόντων. Χρησιμοποιήθηκε αντιδραστήρας 2-L (Labfors 4, Infors HT, Switzerland), με 0,5-L ενεργό όγκο, αερισμό 1 vvm και με ανάδευση 300 rpm. Η θερμοκρασία διατηρήθηκε σταθερή στους  $33,9^\circ\text{C}$ , ενώ το pH ρυθμιζόταν αυτόματα στο  $6,3 \pm 0,2$  με προσθήκη NaOH 10 M ή  $\text{H}_2\text{SO}_4$  10%. Το θρεπτικό μέσο είχε σύσταση (σε  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ): 10 ακατέργαστη σακχαρόζη, 7,2  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  και 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  $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 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  $\text{MnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Pirt & Callow, 1958). Η συγκέντρωση της σακχαρόζης του πυκνού διαλύματος που τροφοδοτούσε την είσοδο του βιοαντιδραστήρα ήταν αρχικά  $90 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  και στη συνέχεια  $60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

## 2.7 Αναλυτικές μέθοδοι

### 2.7.1 Προσδιορισμός βιομάζας

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της βιομάζας έγινε άμεσα με τη μέτρηση του βάρους επί ξηρής βάσης, ενώ έμμεσα με τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (optical density, OD).

Συγκεκριμένα, στα διάφορα σημεία των ζυμώσεων όπου πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία 4 mL, 1,5 mL δείγματος τοποθετήθηκε σε δύο erpendorf χωρητικότητας 2 mL και ακολούθησε φυγοκέντριση των κυττάρων για 10 min στα 9000 rpm σε φυγόκεντρο τύπου Hettich Universal 320R. Σειρά είχε η έκπλυση των κυττάρων με απιονισμένο νερό και εκ νέου φυγοκέντριση. Στη συνέχεια έγινε μεταφορά της βιομάζας σε προ-ζυγισμένα φιαλίδια, τα οποία τοποθετήθηκαν σε φούρνο προς ξήρανση (~85°C) μέχρις σταθεροποίησης του βάρους τους. Το ξηρό υπόλειμμα ζυγίστηκε σε ζυγό ακριβείας 4 δεκαδικών ψηφίων (Sartorius Basic) και εκφράζεται σε  $g \cdot L^{-1}$  (Wang, Guo, Rong, & Chi, 2012).

Κατά την μέτρηση της οπτικής πυκνότητας, από τα 4 mL του δείγματος λήφθηκε μικρή ποσότητα δείγματος και μετά από κατάλληλη αραιώση με απιονισμένο νερό τοποθετήθηκε σε κυψελίδες των 2 mL. Η μέτρηση της OD πραγματοποιήθηκε σε μήκος κύματος 650 nm σε φασματοφωτόμετρο διπλής διπλής δέσμης (Hitachi U-2000).

### 2.7.2 Προσδιορισμός σακχάρων και μεταβολικών προϊόντων

Ο προσδιορισμός των σακχάρων και των μεταβολικών προϊόντων της ζύμωσης έγινε με την εφαρμογή της μεθόδου Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) και χρήση του συστήματος SHIMADZU UFLC XR. Η στήλη με την οποία επιτεύχθηκε ο διαχωρισμός των ενώσεων του δείγματος ήταν Phenomenex Rezex ROA (300 mm x 7.8 mm). Οι ενώσεις διαχωρίζονται με τη στατική φάση της στήλης ανάλογα με την ισχύ αλληλεπίδρασής τους με αυτήν και έτσι οι χρόνοι έκλουσής τους είναι διαφορετικοί. Η ταυτοποίησή τους βασίζεται στο χρόνο κατακράτησης, ο οποίος συγκρίνεται με γνωστά πρότυπα των ενώσεων αυτών. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε αραιό διάλυμα  $H_2SO_4$  10 mM με ροή  $0,6 mL \cdot min^{-1}$  και σε θερμοκρασία 65°C. Από τη στήλη περνούσαν 10  $\mu L$  δείγματος και η διάρκεια της ανάλυσης ήταν 24 min. Πριν από τη μέτρηση, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 10 min στα 9000 rpm. Το υπερκείμενο αραιώθηκε σε κάθε

περίπτωση κατάλληλα με διάλυμα  $\text{H}_2\text{SO}_4$  10 mM, φιλτραρίστηκε και τοποθετήθηκε σε φιαλίδια δείγματος HPLC.

### **2.7.3 Προσδιορισμός ανόργανου φωσφόρου (IP)**

Κατά τον προσδιορισμό του ανόργανου φωσφόρου (IP) γίνεται αναγωγή του φωσφορομολυβδαινικού οξέος με παράλληλη ανάπτυξη μπλε χρώματος (Herbert, Phipps, & Strange, 1971). Προκειμένου να εφαρμοστεί η μέθοδος προστίθεται υπερχλωρικό οξύ, το οποίο διευκολύνει την καταστροφή της οργανικής ουσίας. Στη συνέχεια ο φώσφορος με το μολυβδαινικό αμμώνιο σχηματίζουν σύμπλοκο (φωσφορομολυβδαινικό οξύ), που ανάγεται από το ασκορβικό οξύ προσδίδοντάς του το μπλε χρώμα.

Ειδικότερα, τα δείγματα προς μέτρηση, αραιώθηκαν κατάλληλα με απιονισμένο νερό σε δοκιμαστικούς σωλήνες (εις διπλούν) μέχρις τελικού όγκου 5 ml. Σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκαν 0,4 mL 70% (v/v) διαλύματος υπερχλωρικού οξέος και ανακινήθηκαν σε αναδευτήρα Vortex για 10 sec. Ακολούθως, προστέθηκαν 0,3 mL 1% (w/v) διαλύματος ασκορβικού οξέος και ανακινήθηκαν ξανά για 10 sec. Τέλος, έγινε προσθήκη 0,4 mL 5% (w/v) διαλύματος μολυβδαινικού αμμωνίου και πάλι ανακίνηση για 10 sec. Μετά από αναμονή 10 min έγινε μέτρηση της απορρόφησης στα 730 nm σε φασματοφωτόμετρο διπλής θλάσεως (Hitachi U-2000). Το τυφλό δείγμα περιείχε απιονισμένο νερό. Για την πρότυπη καμπύλη αναφοράς ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία χρησιμοποιώντας διαφορετικές αραιώσεις πρότυπου διαλύματος δισόξινου φωσφορικού καλίου.

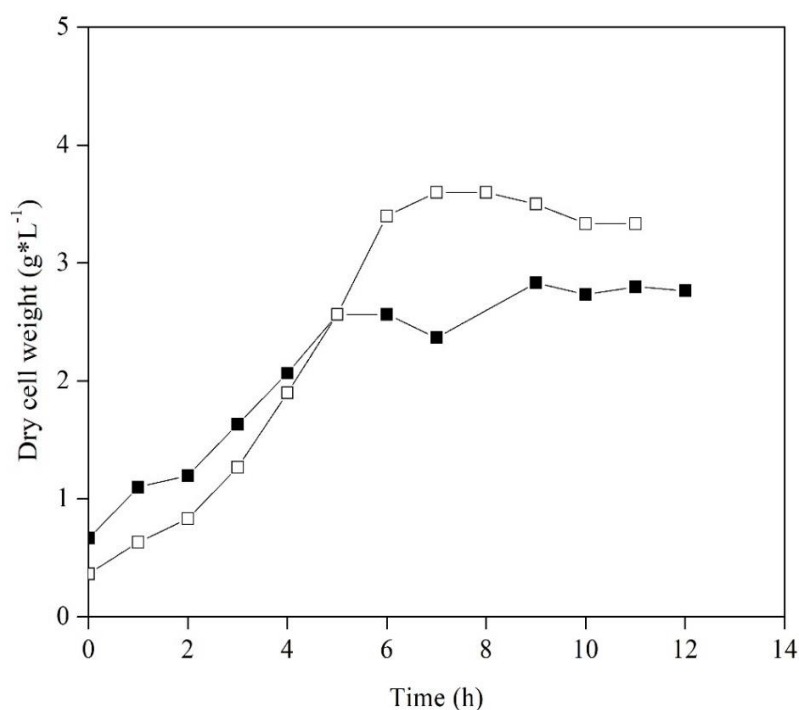
### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1 Επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης βιομάζας σε ζυμώσεις ημι-συνεχούς καλλιέργειας

Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, το βακτηριακό στέλεχος *E. ludwigii* παράγει 2,3-BD με υψηλή παραγωγικότητα και απόδοση με τη χρήση σακχαρόζης ως υπόστρωμα. Στην παρούσα μελέτη, αρχικά μελετήθηκε η επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης βιομάζας σε ημι-συνεχή ζύμωση με στόχο την αύξηση της παραγωγικότητας.

##### 3.1.1 Παρασκευή εμβολίου σε βιοαντιδραστήρα

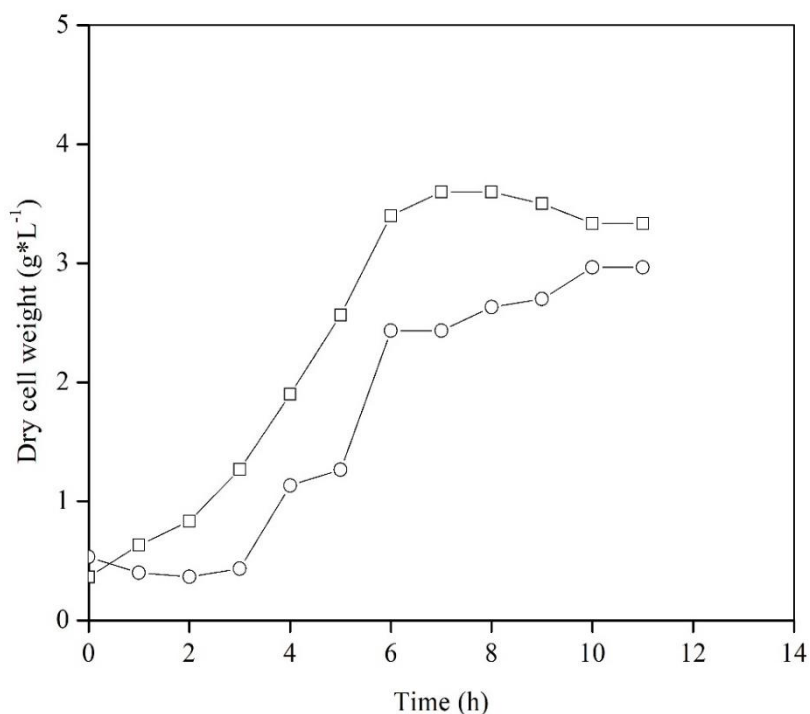
Αρχικά μελετήθηκε η παραγωγή του εμβολίου σε δύο τύπους βιοαντιδραστήρων με τη χρήση δύο διαφορετικών υποστρωμάτων (συνθετικό και οργανικό). Η κυτταρική ανάπτυξη του μικροοργανισμού για τα δύο υποστρώματα απεικονίζεται στο Σχήμα 6.



**Σχήμα 6:** Συγκέντρωση βιομάζας σε ζύμωση διαλείποντος έργου με τη χρήση συνθετικού (□) και οργανικού (■) μέσου σε αντιδραστήρα Labfors 4, Infors HT, Switzerland 3,6-L

Στις δύο περιπτώσεις η κυτταρική αύξηση αρχίζει από τη 1 h με εκθετικό ρυθμό μέχρι τη σταθεροποίησή της όπου λαμβάνει τη μέγιστη τιμή. Στο πείραμα με τη χρήση οργανικού μέσου η μέγιστη τιμή ( $2,7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) παρατηρείται στις 5 h, ενώ στην περίπτωση που έγινε χρήση συνθετικού μέσου, η μέγιστη τιμή της βιομάζας ( $3,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) παρατηρείται στις 6 h. Μετά από αυτή τη χρονική στιγμή, παρατηρείται στάσιμη φάση και στις δύο περιπτώσεις. Ο μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης για το οργανικό και το συνθετικό μέσο ήταν  $0,31 \text{ h}^{-1}$  και  $0,42 \text{ h}^{-1}$  αντίστοιχα. Δεδομένου του υψηλότερου ρυθμού ανάπτυξης, επιλέχθηκε το συνθετικό υπόστρωμα για περαιτέρω μελέτη.

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε αντίστοιχη ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα μεγαλύτερου όγκου ( $6,7\text{-L}$ ) με στόχο τη μελέτη επίδρασης των διαφορετικών διαστάσεων και όγκου. Η μέγιστη τιμή βιομάζας παρατηρήθηκε μετά τις 6 h λαμβάνοντας τιμή  $2,9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Σχήμα 7). Όπως φαίνεται, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο βιοαντιδραστήρων. Για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων υπολογίστηκε ο μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης. Στην περίπτωση του μεγαλύτερου όγκου βιοαντιδραστήρα ο μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης ήταν  $0.47 \text{ h}^{-1}$ .



**Σχήμα 7:** Συγκέντρωση βιομάζας σε ζύμωση διαλείποντος έργου με τη χρήση συνθετικού υποστρώματος σε βιοαντιδραστήρα Labfors 4, Infors HT, Switzerland  $3,7\text{-L}$  (□) και Ralf Advanced, Bioengineering, Switzerland  $6,7\text{-L}$  (○)

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, η παρασκευή του εμβολίου υψηλής συγκέντρωσης έγινε με τη χρήση συνθετικού υποστρώματος σε βιοαντιδραστήρα 6.7-L.

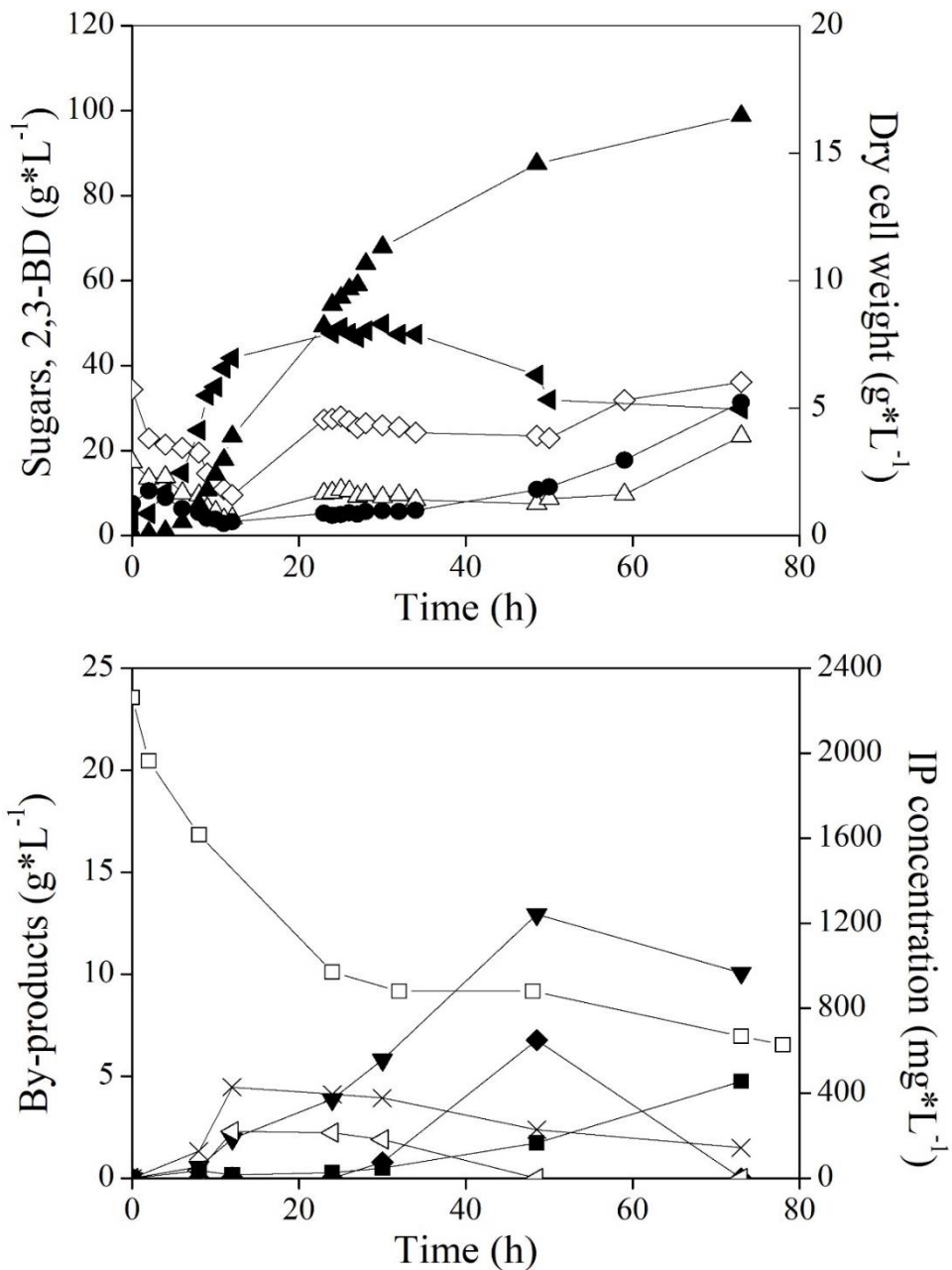
### **3.1.2 Ημι-συνεχείς ζυμώσεις με διαφορετική συγκέντρωση βιομάζας**

Για την επίδραση της συγκέντρωσης εμβολίου, πραγματοποιήθηκαν δύο ημι-συνεχείς ζυμώσεις με αρχική συγκέντρωση 1 και 4 g·L<sup>-1</sup>. Στα Σχήματα 8 και 9 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των ημι-συνεχών ζυμώσεων.

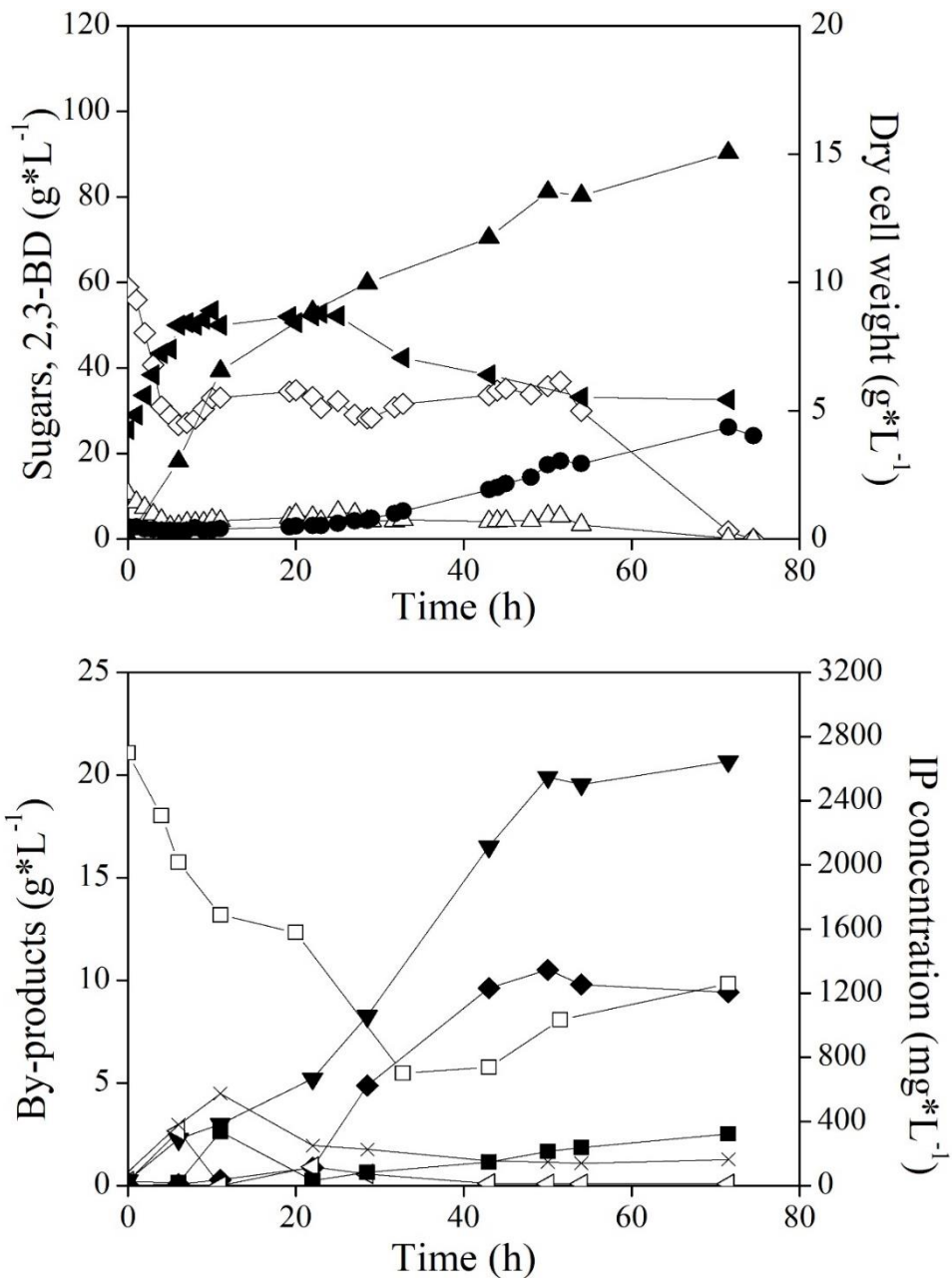
Στην περίπτωση με αρχική συγκέντρωση 1 g·L<sup>-1</sup>, ο ρυθμός παραγωγής της 2,3-BD μέχρι τις 24 h είναι εκθετικός και λαμβάνει τη μέγιστη τιμή (2,26 g·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>) με αντίστοιχη συγκέντρωση 2,3-BD 54,3 g·L<sup>-1</sup>. Ωστόσο, ο ρυθμός παραγωγής της 2,3-BD μετά τις 24 h μειώνεται σε 1,35 g·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> (Σχήμα 10) με αντίστοιχη παραγωγή 2,3-BD 98,8 g·L<sup>-1</sup>. Η μέγιστη παραγωγή βιομάζας παρατηρήθηκε επίσης στις 24 h με τιμή 8,2 g·L<sup>-1</sup> (Σχήμα 8). Χαρακτηριστικό είναι ότι όταν η συγκέντρωση του φωσφόρου μειώνεται κάτω από τα 900 mg·L<sup>-1</sup>, σταματάει η κυτταρική αύξηση και ο μεταβολισμός οδηγείται στην παραγωγή των προϊόντων. Μετά τις 24 h παρατηρείται υψηλός ρυθμός παραγωγής παραπροϊόντων, κυρίως ηλεκτρικό και γαλακτικό οξύ. Συγκεκριμένα, το ηλεκτρικό οξύ παράγεται με αυξανόμενο ρυθμό και στις 48 h λαμβάνει τη μέγιστη τιμή των 12,9 g·L<sup>-1</sup>, ενώ το γαλακτικό οξύ παράγεται έως 6,8 g·L<sup>-1</sup> και στη συνέχεια καταναλώνεται.

Λαμβάνοντας υπόψιν τα αποτελέσματα, επιλέχθηκε να μελετηθεί η παραγωγή της 2,3-BD με υψηλότερη αρχική συγκέντρωση βιομάζας με σκοπό την αύξηση της παραγωγικότητας και της παραγόμενης 2,3-BD. Όπως παρατηρείται στο Σχήμα 9, η τελική συγκέντρωση 2,3-BD έφτασε τα 90,4 g·L<sup>-1</sup> με αντίστοιχη παραγωγικότητα 1,26 g·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> και απόδοση 0,24 g·g<sup>-1</sup>. Κατά τις πρώτες ώρες της ζύμωσης (έως 11 h) παρατηρείται εκθετική αύξηση της 2,3-BD με αντίστοιχη παραγωγικότητα 3,58 g·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> καθώς και αύξηση της βιομάζας (Σχήμα 10). Μετά τη φάση αυτή και λαμβάνοντας τη μέγιστη τιμή της βιομάζας, ο ρυθμός παραγωγής της 2,3-BD μειώνεται στις 28 h με αντίστοιχη συγκέντρωση 2,3-BD ίση με 59,9 g·L<sup>-1</sup>. Όπως στην προηγούμενη περίπτωση, έτσι και σε αυτήν, μετά τις 25 h, όπου η συγκέντρωση του φωσφόρου είναι μειωμένη, σταματάει η κυτταρική αύξηση. Η τελική συγκέντρωση του ηλεκτρικού οξέος έφτασε τα 20,7 g·L<sup>-1</sup>, ενώ το γαλακτικό οξύ τα 9,4 g·L<sup>-1</sup>.





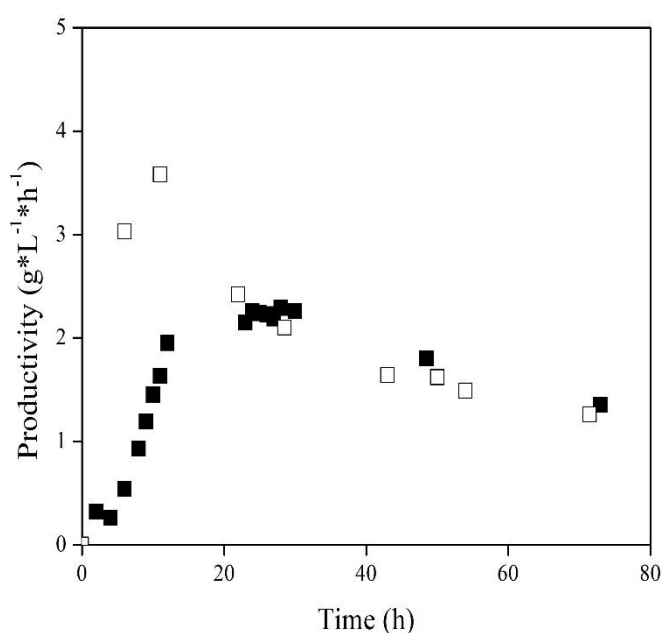
**Σχήμα 8:** Παραγωγή 2,3-BD (▲), βιομάζας (◄), ηλεκτρικού οξέος (▼), γαλακτικού οξέος (◆), μυρμηκικού οξέος (◁), οξικού οξέος (■) και αιθανόλης (×) και κατανάλωση σακχαρόζης (◇), γλυκόζης (Δ), φρουκτόζης (●) και φωσφόρου (□) κατά την ημι-συνεχή ζύμωση με  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  αρχικής συγκέντρωσης βιομάζας



**Σχήμα 9:** Παραγωγή 2,3-BD (▲), βιομάζας (◀), ηλεκτρικού οξέος (▼), γαλακτικού οξέος (◆), μυρμηκικού οξέος (◁), οξικού οξέος (■) και αιθανόλης (×) και κατανάλωση σακχαρόζης (◊), γλυκόζης (Δ), φρουκτόζης (●) και φωσφόρου (□) κατά την ημι-συνεχή ζύμωση με  $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  αρχικής συγκέντρωσης βιομάζας

Συγκρίνοντας τα παραπάνω αποτελέσματα, η υψηλή αρχική συγκέντρωση βιομάζας είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της παραγωγικότητας κατά τις πρώτες ώρες της ζύμωσης (Σχήμα 10), ωστόσο και στις δύο περιπτώσεις όταν η παραγωγή της 2,3-BD φτάνει τα  $53 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , ο ρυθμός παραγωγής μειώνεται με ταυτόχρονη αύξηση των

παραγόμενων παραπροϊόντων. Επιπλέον, στην περίπτωση με την υψηλότερη συγκέντρωση βιομάζας, η τελική συγκέντρωση της 2,3-BD είναι μειωμένη κατά 8% συγκριτικά με το ημι-συνεχές πείραμα με αρχική συγκέντρωση βιομάζας  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , ενώ η παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος και γαλακτικού οξέος είναι υψηλότερη. Όσον αφορά στην κυτταρική αύξηση, και στις δύο περιπτώσεις, η μέγιστη συγκέντρωση της βιομάζας παρατηρείται όταν λαμβάνεται η μέγιστη τιμή παραγωγικότητας και στη συνέχεια μειώνεται.



**Σχήμα 10:** Ρυθμός παραγωγής 2.3-BD σε ημισυνεχή ζύμωση με αρχική συγκέντρωση βιομάζας ίσης με  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (■) και  $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (□)

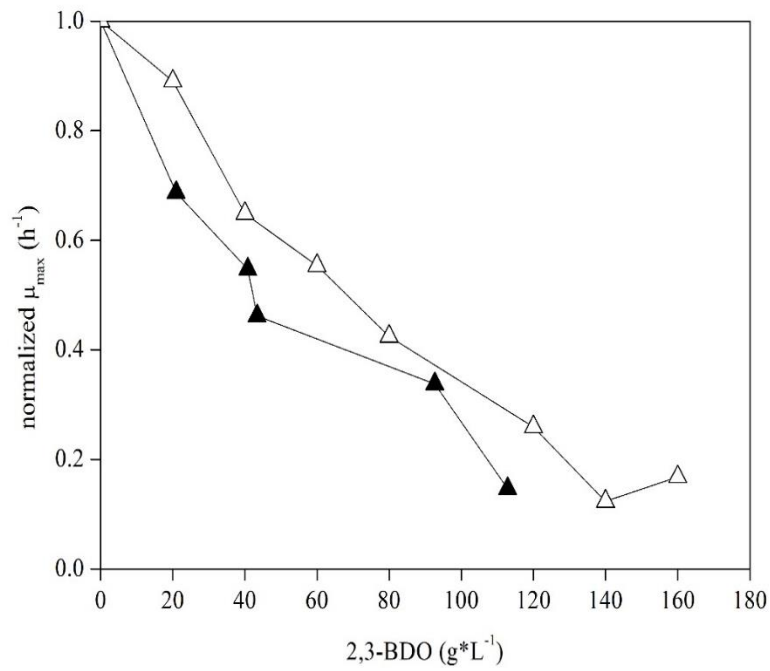
Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω αποτελέσματα, κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί η επίδραση της παρεμπόδισης των μεταβολικών προϊόντων της ζύμωσης στην κυτταρική ανάπτυξη του *E. ludwigii*.

### 3.2 Σύγκριση παρεμπόδισης εκ των προϊόντων σε κλειστή καλλιέργεια

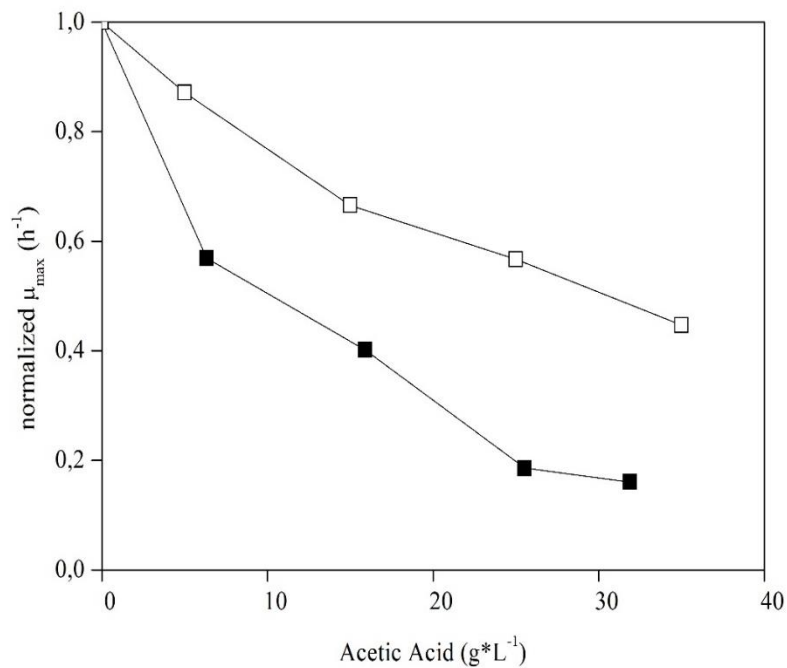
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των ημι-συνεχών ζυμώσεων, στόχος αυτής της σειράς πειραμάτων ήταν η μελέτη της επίδρασης των μεταβολικών προϊόντων της ζύμωσης στην κυτταρική ανάπτυξη του *E. ludwigii*. Για το σκοπό αυτό, μελετήθηκε η επίδραση του κάθε προϊόντος ξεχωριστά με σταθερές όλες τις υπόλοιπες συνθήκες σε κωνικές φιάλες και σε μικρού όγκου ζύμωση (microplate). Σε κάθε περίπτωση μετρήθηκε η ξηρή βιομάζα (Dry Cell Weight – DCW), ο ειδικός ρυθμός αύξησής της κυτταρικής μάζας ( $\mu$ ) και ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης ( $\mu_{max}$ ). Υπολογίστηκε τέλος ο κανονικοποιημένος  $\mu_{max}$  σε σχέση με το  $\mu_{max}$  ζύμωσης όπου δεν υπήρχε παρεμπόδιση. Τα αποτελέσματα των δύο τύπων ζυμώσεων αξιολογήθηκαν ξεχωριστά αλλά έγινε και σύγκριση μεταξύ των δύο ειδών καλλιέργειας. Τα προϊόντα για τα οποία έγιναν τα πειράματα ήταν 2,3-BD, οξικό οξύ, ηλεκτρικό οξύ, μυρμηκικό οξύ και γαλακτικό οξύ. Τα αντίστοιχα διαγράμματα παρουσιάζονται στη συνέχεια.

Αρχικά μελετήθηκε η παρεμπόδιση από την 2,3-BD αυξάνοντας τη συγκέντρωση από 20 έως 160 g·L<sup>-1</sup> (Σχήμα 11). Παρατηρείται μείωση του μέγιστου ειδικού ρυθμού αύξησης  $\mu_{max}$  όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της 2,3-BD στο υγρό της ζύμωσης. Η συμπεριφορά είναι παρόμοια μεταξύ των δύο ειδών καλλιέργειας. Στην περίπτωση όπου τα πειράματα διεξάχθηκαν σε microplate, ο  $\mu_{max}$  ήταν 0,89 h<sup>-1</sup> για 20 g·L<sup>-1</sup> 2,3-BD, ενώ παρατηρήθηκε γραμμική μείωση όπου έλαβε την τιμή 0,12 h<sup>-1</sup> όταν η συγκέντρωση 2,3-BD ήταν 140 g·L<sup>-1</sup>. Αντίστοιχα, για τις ζυμώσεις σε κωνικές φιάλες, ο  $\mu_{max}$  ήταν 0,69 h<sup>-1</sup> για 21 g·L<sup>-1</sup> 2,3-BD και έφτασε την τιμή 0,15 h<sup>-1</sup> για 113 g·L<sup>-1</sup> 2,3-BD.

Όσον αφορά στα πειράματα όπου προστέθηκε αρχικά οξικό οξύ στη ζύμωση (Σχήμα 12), η μείωση του  $\mu_{max}$  ήταν σχεδόν γραμμική, με την περίπτωση του μικρού όγκου καλλιέργειας να εμφανίζει αρκετά καλύτερη συμπεριφορά σε σχέση με τις καλλιέργειες σε κωνικές φιάλες. Ο  $\mu_{max}$  στο microplate για τα 5 g·L<sup>-1</sup> οξικού οξέος είναι 0,87 h<sup>-1</sup>, ενώ για τις κωνικές φιάλες 0,57 h<sup>-1</sup> (στα 6 g·L<sup>-1</sup> οξικού οξέος). Όταν η αρχική συγκέντρωση οξικού οξέος ήταν 35 g·L<sup>-1</sup> για το microplate και τα 31 g·L<sup>-1</sup> για τις κωνικές φιάλες, ο  $\mu_{max}$  μειώθηκε κατά 48 % (0,45 h<sup>-1</sup>) και 72 % (0,16 h<sup>-1</sup>) αντίστοιχα.



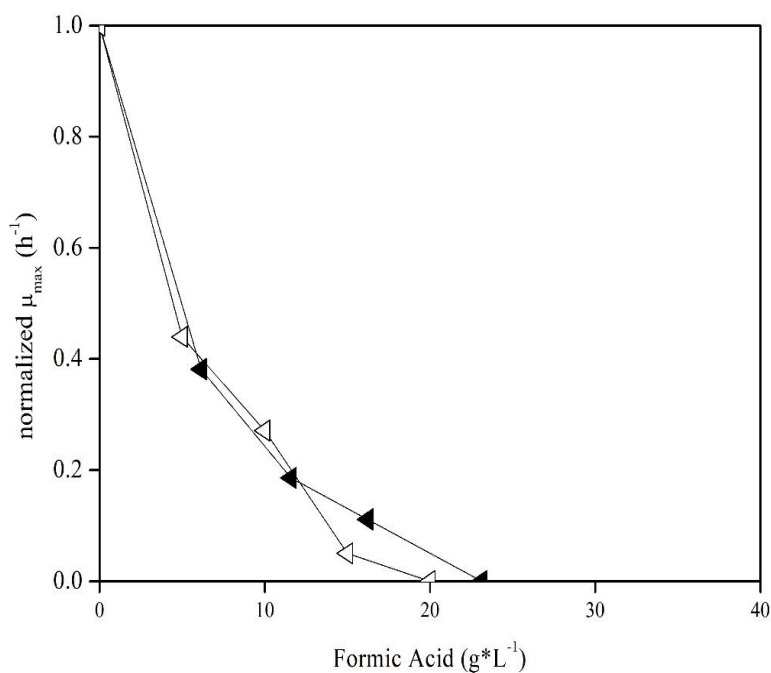
**Σχήμα 11:** Μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης ( $\mu_{max}$ ) κατά τη μελέτη παρεμπόδισης από 2,3-BD σε κλειστή καλλιέργεια σε κωνικές φιάλες (▲) και microplate (Δ)



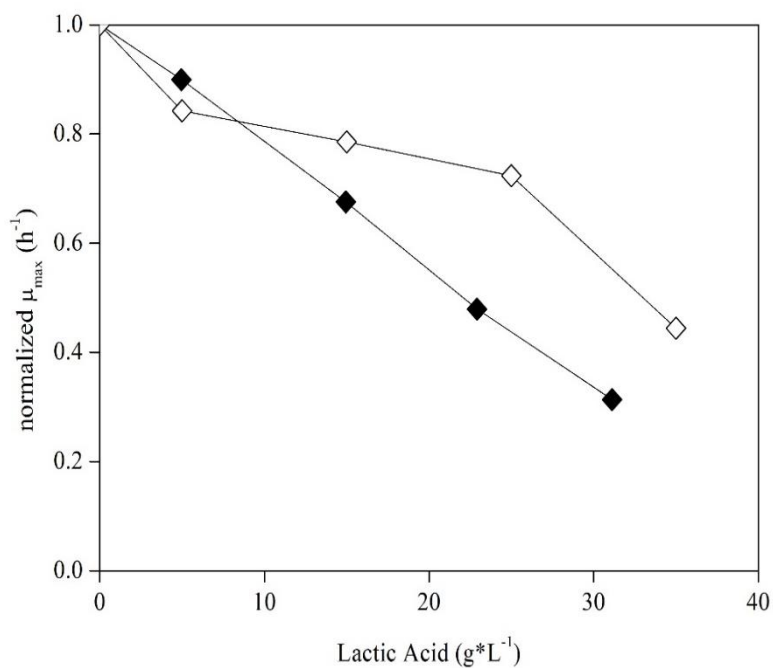
**Σχήμα 12:** Μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης ( $\mu_{max}$ ) κατά τη μελέτη παρεμπόδισης από οξικό οξύ σε κλειστή ζύμωση σε κωνικές φιάλες (■) και microplate (□)

Στα σχήματα 13 και 14 παρουσιάζονται η επίδραση στην κυτταρική αύξηση από το μυρμηκικό και το γαλακτικό οξύ αντίστοιχα. Το μυρμηκικό οξύ επιφέρει αρκετά απότομη μείωση στο  $\mu_{max}$  ακόμα και σε χαμηλές αρχικές συγκεντρώσεις. Χαρακτηριστικά, στα  $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  μυρμηκικού οξέος δεν παρατηρείται κυτταρική ανάπτυξη τόσο στο microplate όσο και στις κωνικές φιάλες. Ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις ( $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), ο μικροοργανισμός παρεμποδίζεται λαμβάνοντας τιμές  $\mu_{max}$  ίσε με  $0,38 \text{ h}^{-1}$  και  $0,44 \text{ h}^{-1}$  για τις κωνικές φιάλες και το microplate αντίστοιχα.

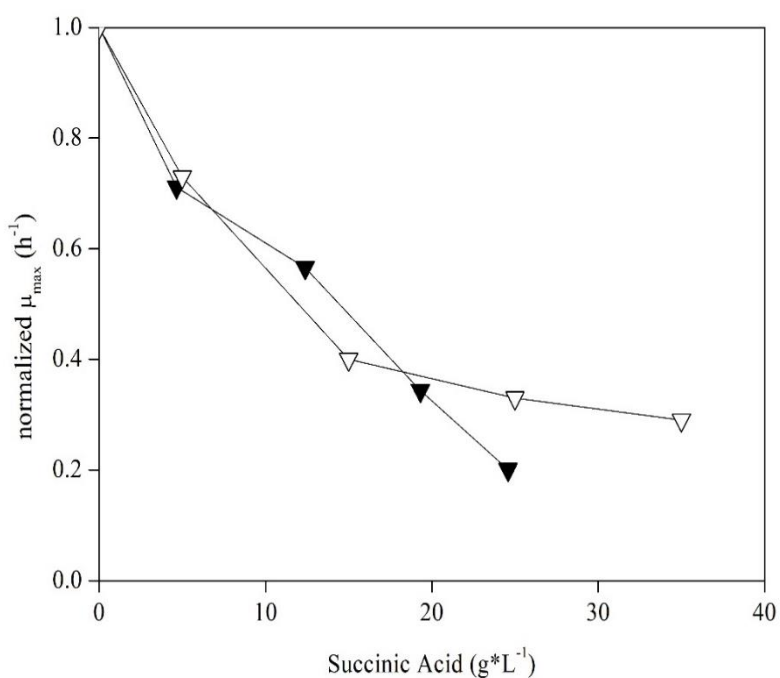
Αντίθετα, η συμπεριφορά με την προσθήκη γαλακτικού οξέος είναι διαφορετική. Δεν παρατηρείται σημαντική παρεμπόδιση για συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος έως  $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Ωστόσο, υψηλότερες συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος προκαλούν μείωση του  $\mu_{max}$  κατά  $65,5 \%$  και  $47,6 \%$  για τις κωνικές φιάλες και το microplate αντίστοιχα.



**Σχήμα 13:** Μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης ( $\mu_{max}$ ) κατά τη μελέτη παρεμπόδισης από μυρμηκικό οξύ σε κλειστή ζύμωση σε κωνικές φιάλες (▲) και microplate (◁)



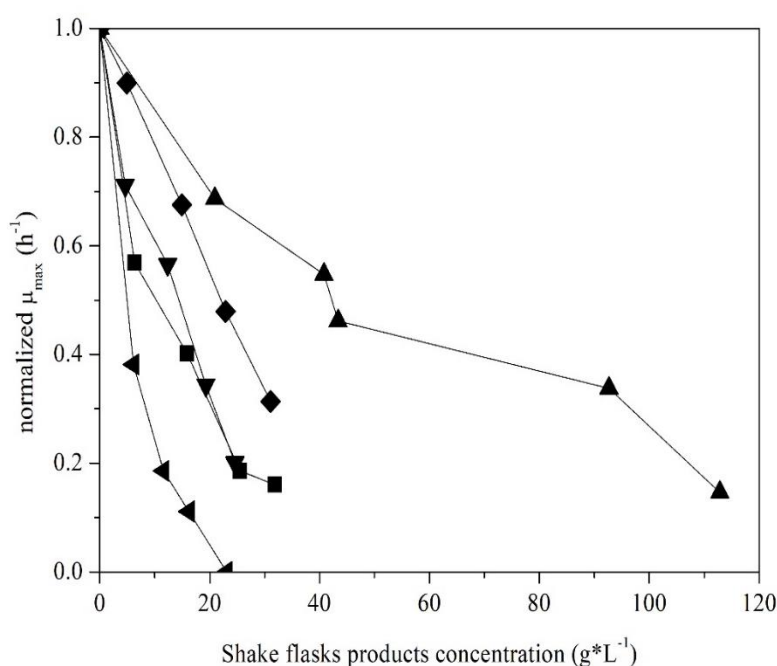
**Σχήμα 14:** Μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης ( $\mu_{max}$ ) κατά τη μελέτη παρεμπόδισης από γαλακτικό οξύ σε κλειστή ζύμωση σε κωνικές φιάλες (◆) και microplate (◇)



**Σχήμα 15:** Μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης ( $\mu_{max}$ ) κατά τη μελέτη παρεμπόδισης από ηλεκτρικό οξύ σε κλειστή ζύμωση σε κωνικές φιάλες (▼) και microplate (▽)

Τέλος, στα πειράματα όπου μελετήθηκε η παρεμπόδιση από ηλεκτρικό οξύ, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 15, ο ρυθμός μείωσης του  $\mu_{max}$  είναι παρόμοιος στις κωνικές φιάλες και το microplate. Στην πρώτη περίπτωση, μειώθηκε από  $0,71 \text{ h}^{-1}$  για  $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  ηλεκτρικού οξέος αρχικά σε  $0,20 \text{ h}^{-1}$  για  $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  ηλεκτρικού οξέος. Ενώ στο microplate, και για τις ίδιες αρχικές συγκεντρώσεις, ο  $\mu_{max}$  από  $0,73 \text{ h}^{-1}$  έφθασε στην τιμή των  $0,33 \text{ h}^{-1}$ .

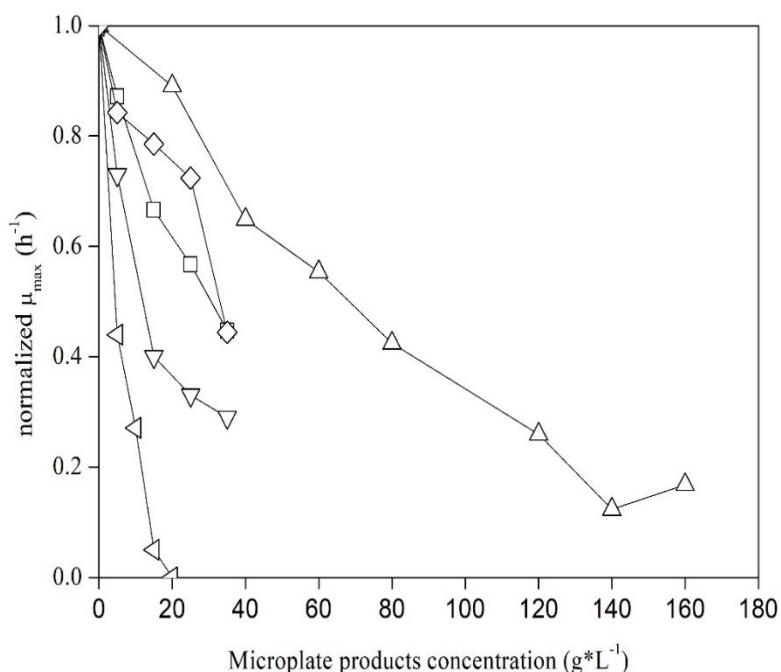
Στο σχήμα 16 γίνεται σύγκριση της παρεμπόδισης από τα μεταβολικά προϊόντα κατά τις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες. Η 2,3-BD, το κύριο προϊόν της ζύμωσης, φαίνεται να επιδρά λιγότερο σε σχέση με τα παραπροϊόντα, καθώς το  $\mu_{max}$  μειώνεται με μικρότερο ρυθμό. Ακολουθούν το γαλακτικό οξύ και στη συνέχεια το ηλεκτρικό και το οξικό οξύ με παρόμοιο ρυθμό παρεμπόδισης. Το μυρμηκικό οξύ παρεμποδίζει με διαφορά περισσότερο από τα υπόλοιπα προϊόντα τη ζύμωση. Σε συγκεντρώσεις περίπου  $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  μυρμηκικού οξέος δεν υπάρχει καθόλου κυτταρική αύξηση. Αντίθετα, για συγκεντρώσεις  $110 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  2,3-BD παρατηρείται μικρή αύξηση.



**Σχήμα 16:** Μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης ( $\mu_{max}$ ) κατά τη μελέτη παρεμπόδισης από 2,3-BD (▲), οξικό οξύ (■), μυρμηκικό οξύ (◄), γαλακτικό οξύ (◆) και ηλεκτρικό οξύ (▼) σε κλειστή ζύμωση σε κωνικές φιάλες



Αντίστοιχα, στα πειράματα σε microplate (Σχήμα 17), η 2,3-BD και πάλι ήταν το προϊόν με τη μικρότερη παρεμπόδιση στην κυτταρική αύξηση σε σχέση με τα υπόλοιπα μεταβολικά προϊόντα, και το μυρμηκικό οξύ αυτό με τη μεγαλύτερη. Όπως κατά την προηγούμενη περίπτωση, έτσι και σε αυτήν, οξικό, γαλακτικό και ηλεκτρικό οξύ εμφανίζουν παρόμοια αποτελέσματα.



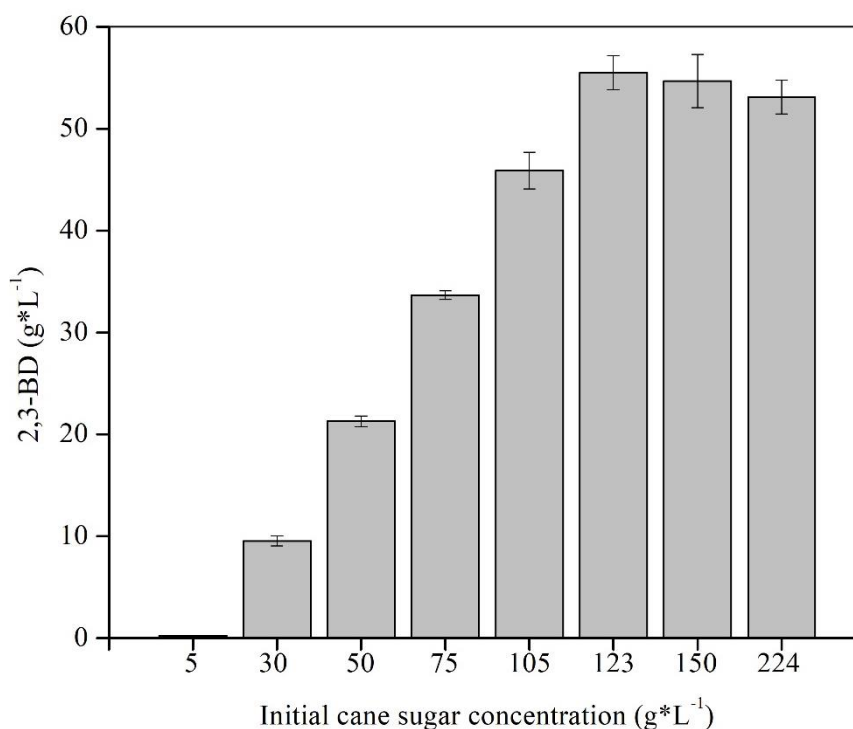
**Σχήμα 17:** Μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης ( $\mu_{max}$ ) κατά τη μελέτη παρεμπόδισης από 2,3-BD ( $\Delta$ ), οξικό οξύ ( $\square$ ), μυρμηκικό οξύ ( $\triangleleft$ ), γαλακτικό οξύ ( $\diamond$ ) και ηλεκτρικό οξύ ( $\nabla$ ) σε κλειστή ζύμωση σε microplate

### 3.3 Σύγκριση παρεμπόδισης εκ του υποστρώματος σε κλειστή καλλιέργεια

Αντίστοιχα με την προηγούμενη ενότητα, μελετήθηκε η παρεμπόδιση του υποστρώματος στην κυτταρική αύξηση και παραγωγή της 2,3-BD. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η επίδραση διαφορετικών αρχικών συγκεντρώσεων ακατέργαστης σακχαρόζης διατηρώντας σταθερές τις υπόλοιπες συνθήκες σε καλλιέργεια κωνικών φιαλών και σε microplate. Στη συνέχεια υπολογίστηκαν το ξηρό βάρος (DCW), ο  $\mu$ , ο  $\mu_{max}$  και ο κανονικοποιημένος  $\mu_{max}$ . Τα αποτελέσματα από τις δύο ζυμώσεις αξιολογήθηκαν και συγκρίθηκαν. Για την περίπτωση της καλλιέργειας σε κωνικές

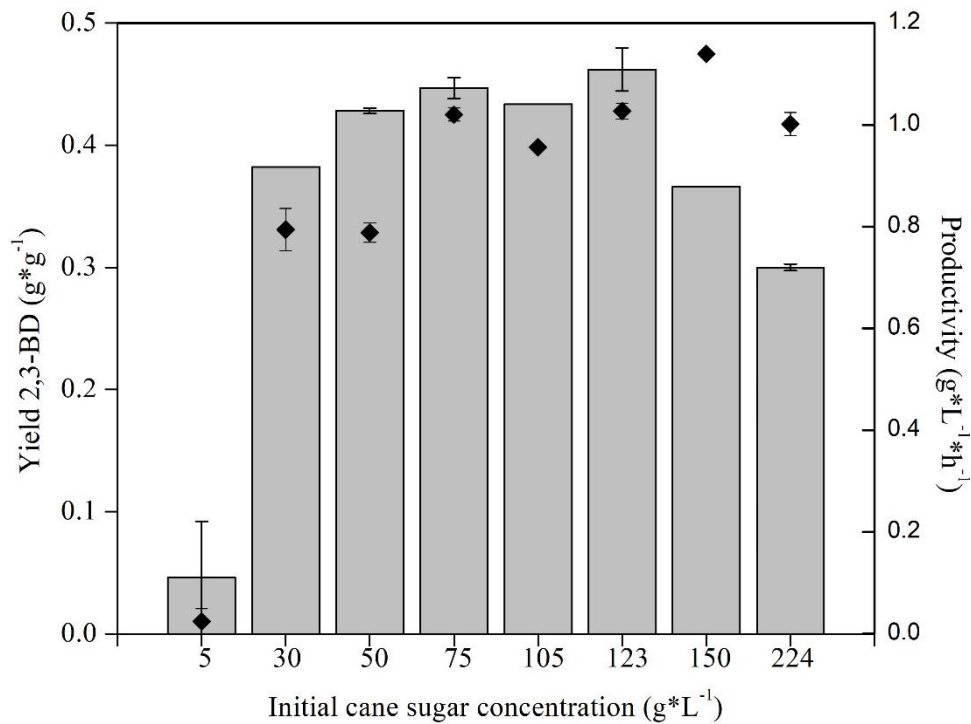
φιάλες υπολογίστηκαν επίσης η παραγωγικότητα και η απόδοση της παραγόμενης 2,3-BD.

Από το Σχήμα 18 γίνεται φανερό ότι η συγκέντρωση της 2,3-BD αυξάνεται όσο αυξάνεται η αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα. Αυτό συμβαίνει μέχρι τα 120  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  σακχαρόζης, όπου παρατηρείται και η μέγιστη τιμή της 2,3-BD ( $55 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Από το σημείο αυτό και στη συνέχεια η επιπλέον αύξηση της πηγής άνθρακα δεν έχει ως αποτέλεσμα την ταυτόχρονη αύξηση την τελικής συγκέντρωσης της 2,3-BD.



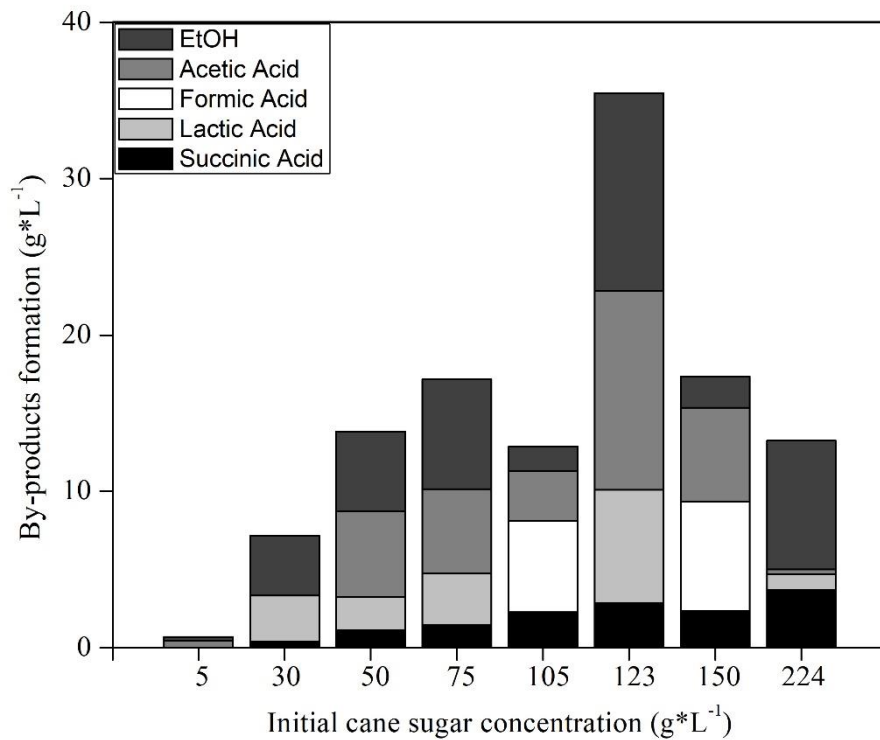
**Σχήμα 18:** Τελική συγκέντρωση 2,3-BD σε κωνικές φιάλες με διαφορετική αρχική συγκέντρωση σακχαρόζης

Αντίστοιχα, η απόδοση της παραγόμενης 2,3-BD λαμβάνει τη μέγιστη τιμή ( $0,46 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) όταν η αρχική συγκέντρωση σακχαρόζης είναι  $123 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Σχήμα 18). Υψηλότερες αρχικές συγκεντρώσεις έχουν σαν αποτέλεσμα τη μείωση της απόδοσης. Αντίθετα, η απόδοση είναι μεγάλη για συγκεντρώσεις σακχαρόζης από 50 έως  $105 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Η παραγωγικότητα της 2,3-BD εμφανίζει υψηλές τιμές έως και  $1,14 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  για συγκεντρώσεις σακχαρόζης από 75 έως  $150 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Σχήμα 19).



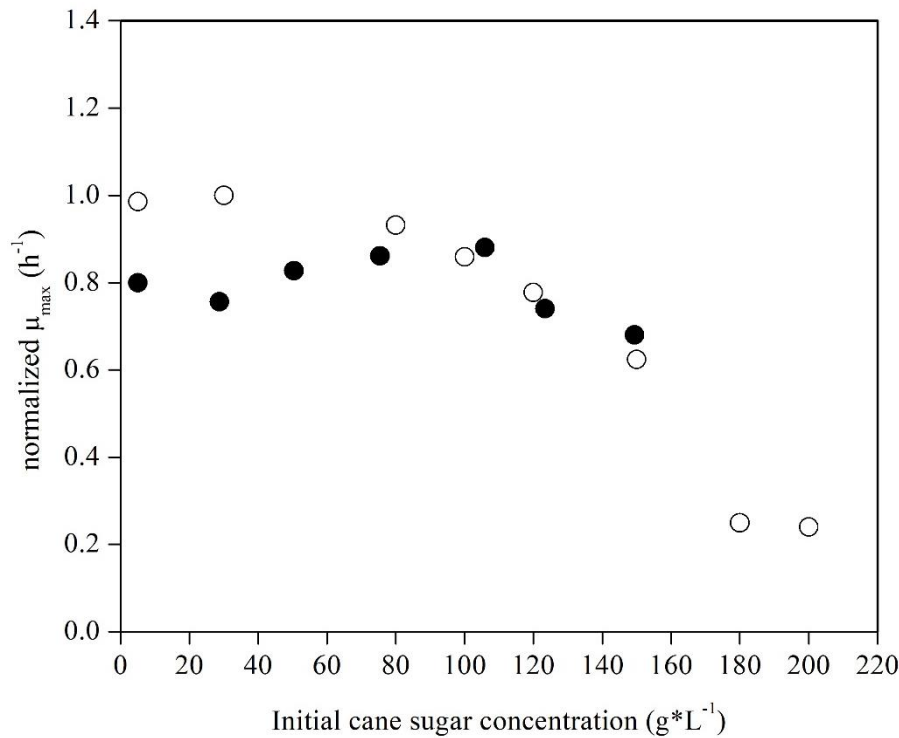
**Σχήμα 19:** Απόδοση (στήλες) και ρυθμός παραγωγής (♦) 2,3-BD σε κωνικές φιάλες με διαφορετική αρχική συγκέντρωση σακχαρόζης

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 20, για αρχική συγκέντρωση σακχαρόζης 123 g·L<sup>-1</sup> παράγονται τα περισσότερα παραπροϊόντα, έως και 36 g·L<sup>-1</sup>. Το οξικό οξύ και η αιθανόλη φτάνουν τα 13 g·L<sup>-1</sup> και αποτελούν τα κυριότερα παραπροϊόντα. Στις περιπτώσεις των 75, 105 και 150 g·L<sup>-1</sup> αρχικής συγκέντρωσης σακχαρόζης, η τελική συγκέντρωση συνολικά των παραπροϊόντων ήταν 22 g·L<sup>-1</sup>.



**Σχήμα 20:** Παραγωγή οξικού οξέος, μυρμηκικού οξέος, γαλακτικού οξέος, ηλεκτρικού οξέος και αιθανόλης σε κωνικές φιάλες με διαφορετική αρχική συγκέντρωση σακχαρόζης

Τέλος, κατά τη σύγκριση των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες σε σχέση με πειράματα στο microplate, φαίνεται ότι δεν παρουσιάζουν σημαντική απόκλιση μεταξύ τους ως προς τον ειδικό ρυθμό αύξησης (Σχήμα 21). Ειδικά για συγκεντρώσεις σακχαρόζης από  $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  έως  $150 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  η μείωση του  $\mu_{max}$  είναι γραμμική και ταυτόσημη για τις δύο περιπτώσεις. Το μέγιστο  $\mu_{max}$  ( $0,88 \text{ h}^{-1}$ ) για τις ζυμώσεις σε κωνικές φιάλες παρατηρήθηκε για αρχική συγκέντρωση σακχαρόζης  $105 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .



**Σχήμα 21:** Μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης ( $\mu_{max}$ ) σε κλειστές ζυμώσεις με διαφορετική αρχική συγκέντρωση σακχαρόζης σε κωνικές φιάλες (●) και σε microplate (○)

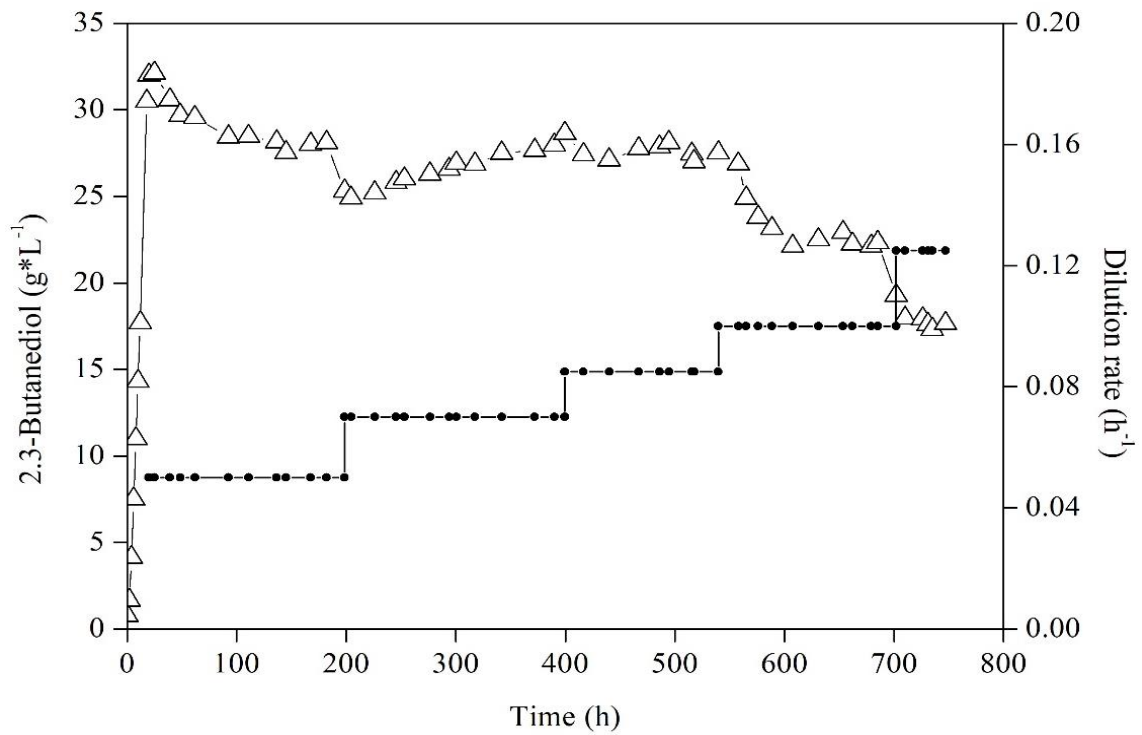
Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω αποτελέσματα, η αρχική συγκέντρωση  $75 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  επιλέχθηκε για τα επόμενα πειράματα, καθώς οι τιμές της παραγωγής, απόδοσης και παραγωγικότητας της 2,3-BD, όπως επίσης και η παραγωγή των παραπροϊόντων είναι βέλτιστες.

### 3.4 Συνεχής ζύμωση σε διαφορετικούς ρυθμούς αραίωσης

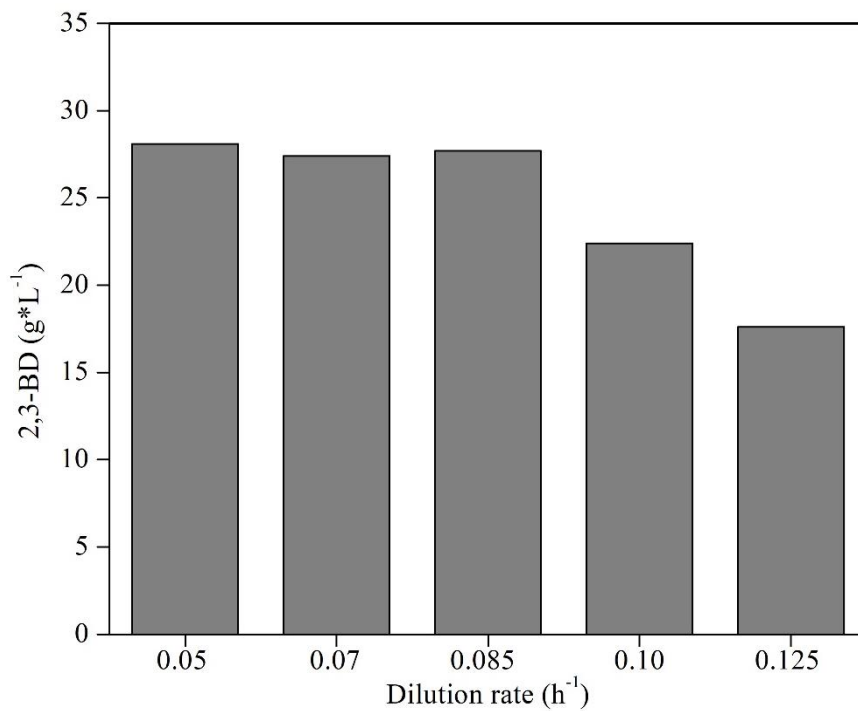
Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, η παραγωγή της 2,3-BD σχετίζεται άμεσα με την παραγωγή των παραπροϊόντων αλλά και το σύστημα καλλιέργειας. Όπως παρατηρήθηκε από τα αποτελέσματα των ημι-συνεχών ζυμώσεων και της μελέτης παρεμπόδισης, η παραγωγή της 2,3-BD φαίνεται να παρεμποδίζεται από τη αυξανόμενη παραγωγή των παραπροϊόντων με αποτέλεσμα τη μείωση της παραγωγικότητας και της απόδοσης. Οι συνεχείς ζυμώσεις αποτελούν ένα σύστημα καλλιέργειας κατά το οποίο υπάρχει ταυτόχρονη εισροή νέου θρεπτικού υγρού και απομάκρυνση των παραγόμενων

μεταβολικών προϊόντων. Με αυτό το είδος ζυμώσεων μπορεί να αποφευχθεί πιθανή παρεμπόδιση και αύξηση της παραγωγικότητας και της απόδοσης. Για το σκοπό αυτό, μελετήθηκε η παραγωγή 2,3-BD σε συνεχή ζύμωση. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η απόδοση του μικροοργανισμού σε διαφορετικές συνθήκες τροφοδοσίας και σε διαφορετικούς ρυθμούς αραίωσης. Έγινε δοκιμή σε ρυθμούς αραίωσης 0,05, 0,07, 0,085, 0,1 και 0,125 h<sup>-1</sup> ενώ η τροφοδοσία περιείχε 60 g·L<sup>-1</sup> ακατέργαστης σακχαρόζης. Το πείραμα σε κάθε έναν από τους ρυθμούς αραίωσης διατηρήθηκε για ικανό αριθμό χρόνων παραμονής (Hydraulic Retention Time – HRT), έτσι ώστε να επέλθει μόνιμη κατάσταση στο σύστημα και οι μετρήσεις θα είναι αντιπροσωπευτικές.

Στο Σχήμα 22 παρουσιάζεται η μεταβολή των ρυθμών αραίωσης με το χρόνο καθώς και η συγκέντρωση της 2,3-BD σε κάθε βήμα και στο Σχήμα 23 οι μέσες τιμές της παραγόμενης 2,3-BD για τους διαφορετικούς ρυθμούς αραίωσης. Χαρακτηριστικά, στον ρυθμό αραίωσης 0,05 h<sup>-1</sup> η 2,3-BD ξεκινά από τα τη μέγιστη τιμή των 32 g·L<sup>-1</sup> και σταθεροποιείται στη συνέχεια περίπου στα 28 g·L<sup>-1</sup>. Στους ρυθμούς αραίωσης 0,07 και 0,085 h<sup>-1</sup> δεν παρατηρείται μεγάλη διαφορά, ενώ και η συγκέντρωση της 2,3-BD είναι περίπου 27,5 g·L<sup>-1</sup>. Από το σημείο αυτό και μετά παρατηρείται απότομη πτώση στην παραγωγή 2,3-BD, καθώς φτάνει τα 22 g·L<sup>-1</sup> και τα 17,5 g·L<sup>-1</sup> για ρυθμούς αραίωσης 0,1 και 0,125 h<sup>-1</sup> αντίστοιχα.



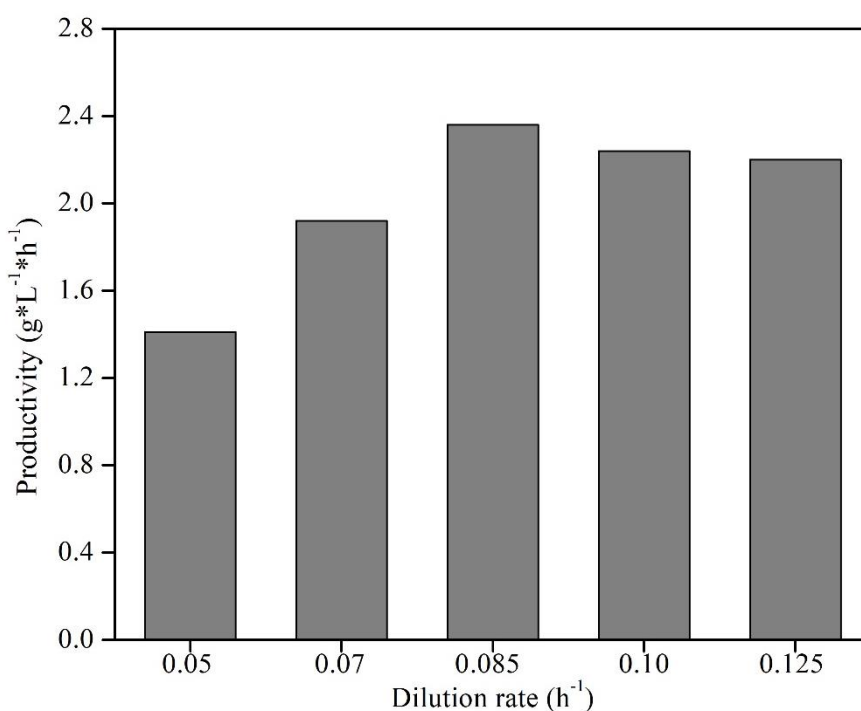
**Σχήμα 22:** Συγκέντρωση 2,3-BD (Δ) σε διαφορετικούς ρυθμούς αραίωσης (●) σε συνεχή ζύμωση



**Σχήμα 23:** Μέση συγκέντρωση παραγόμενης 2,3-BD σε διαφορετικούς ρυθμούς αραίωσης σε συνεχή ζύμωση

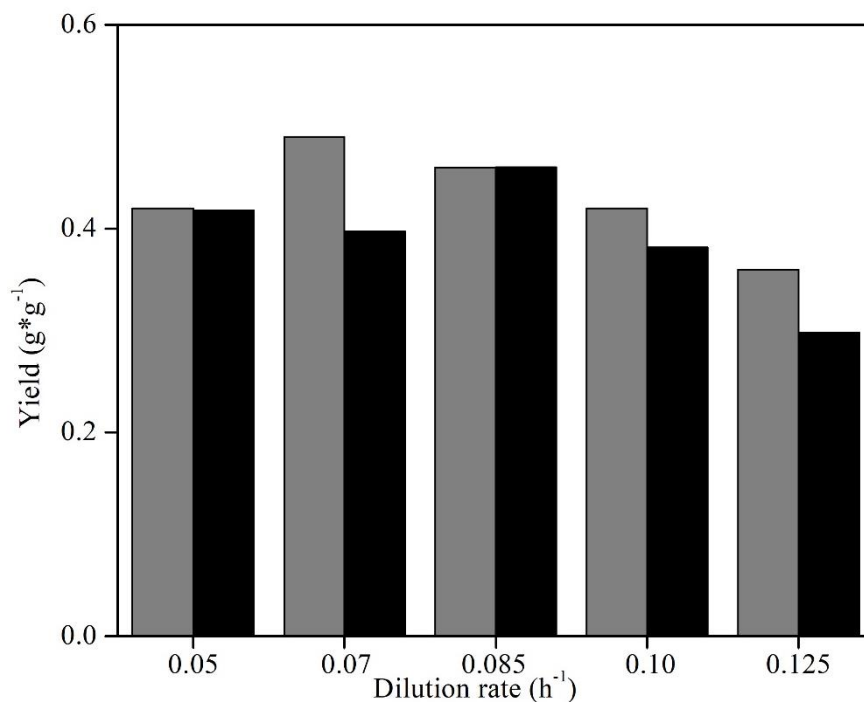
Όπως φαίνεται στα Σχήματα 22 και 23 οι μέσες τιμές της συγκέντρωσης της 2,3-BD είναι υψηλές για ρυθμούς αραίωσης από 0,05 έως 0,085 h<sup>-1</sup> και μειώνονται με την περαιτέρω αύξηση του ρυθμού αραίωσης. Ωστόσο, η παραγωγικότητά της 2,3-BD δεν ακολουθεί ανάλογη συμπεριφορά (Σχήμα 24). Είναι χαρακτηριστικό ότι η μέγιστη παραγωγικότητα (2,36 g·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>) επιτυγχάνεται σε ρυθμό αραίωσης 0,085 h<sup>-1</sup>, ενώ και στους ρυθμούς αραίωσης 0,1 και 0,125 h<sup>-1</sup> είναι περίπου 2.2 g·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>.

Όσον αφορά στην απόδοση της ζύμωσης ως προς τα καταναλωθέντα σάκχαρα (Σχήμα 25), η μέγιστη τιμή της ήταν 0,49 g·g<sup>-1</sup> σε ρυθμό αραίωσης 0,07 h<sup>-1</sup>. Αρκετά κοντά, και συγκεκριμένα 0,46 g·g<sup>-1</sup> ήταν και η απόδοση στις 0,085 h<sup>-1</sup>. Επιπλέον, η απόδοση της 2,3-BD ως προς τα συνολικά σάκχαρα του θρεπτικού μέσου είναι ίδια με την απόδοση της 2,3-BD ως προς τα καταναλωθέντα σάκχαρα για ρυθμούς αραίωσης 0,05 και 0,085 h<sup>-1</sup>, ενώ για τους άλλους ρυθμούς αραίωσης είναι χαμηλότερη.



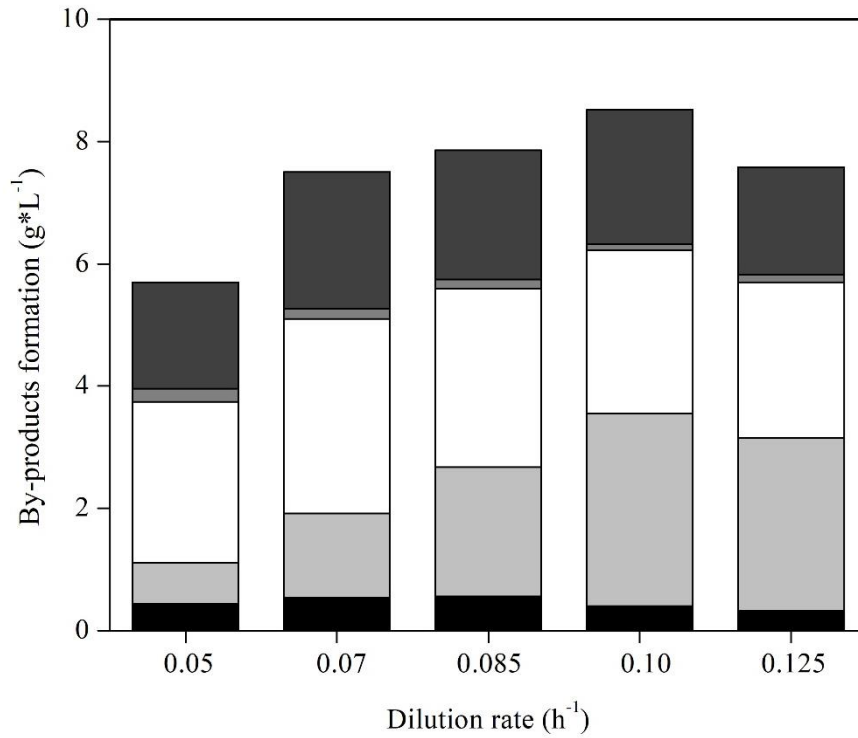
**Σχήμα 24:** Παραγωγικότητα της 2,3-BD σε διαφορετικούς ρυθμούς αραίωσης σε συνεχή ζύμωση





**Σχήμα 25:** Απόδοση 2,3-BD ως προς τα καταναλωθέντα σάκχαρα (■) και απόδοση 2,3-BD ως προς τα συνολικά σάκχαρα του θρεπτικού μέσου (■) σε διαφορετικούς ρυθμούς αραίωσης σε συνεχή ζύμωση

Τέλος, σχετικά με την παραγωγή των παραπροϊόντων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, όπως παρατηρείται στο Σχήμα 26, είναι φανερό ότι επηρεάζουν αρκετά την παραγωγή της 2,3-BD. Η τελική συγκέντρωση των συνολικών παραπροϊόντων φτάνει τα 6 έως 8 g·L<sup>-1</sup> ανάλογα με το ρυθμό αραίωσης. Τα κυριότερα παραπροϊόντα είναι το μυρμηκικό οξύ και η αιθανόλη με συγκεντρώσεις κατά μέσο όρο 2,8 g·L<sup>-1</sup> και 2 g·L<sup>-1</sup>. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η αύξηση της συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέος όσο αυξάνει ο ρυθμός αραίωσης. Στους ρυθμούς 0,1 και 0,125 η συγκέντρωσή του είναι 3 g·L<sup>-1</sup>. Αντιθέτως, το οξικό και το ηλεκτρικό οξύ παράγονται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις.



**Σχήμα 26:** Παραγωγή οξικού οξέος (■), μυρμηκικού οξέος (□), γαλακτικού οξέος (■), ηλεκτρικού οξέος (■) και αιθανόλης (■) σε διαφορετικούς ρυθμούς αραιώσης σε συνεχή ζύμωση

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η βιομηχανία έχει στρέψει τελευταία το ενδιαφέρον της προς την παραγωγή χημικών μέσω της χρήσης μικροοργανισμών σε βιοχημικές διεργασίες. Η παραγωγή της 2,3-BD με τη χρήση ανανεώσιμων υποστρωμάτων και βακτηρίων είναι μία χαρακτηριστική περίπτωση. Η 2,3-BD είναι μία χημική ένωση προστιθέμενης αξίας με πληθώρα εφαρμογών στις βιομηχανίες τροφίμων, καυσίμων, φαρμακευτικών και καλλυντικών σκευασμάτων. Τα κυριότερα υποστρώματα που έχουν μελετηθεί είναι η γλυκόζη αλλά και απόβλητα της βιομηχανίας τροφίμων πλούσια σε σάκχαρα. Σημαντικό ρόλο στην απόδοση της ζύμωσης παίζουν οι συνθήκες που εφαρμόζονται, όπως η θερμοκρασία, το pH, ο αερισμός, η ανάδευση, η σύσταση του θρεπτικού μέσου καθώς και το σύστημα καλλιέργειας.

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε αρχικά η παραγωγή 2,3-BD σε ημι-συνεχή ζύμωση εξετάζοντας δύο διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις βιομάζας. Στόχος ήταν η αύξηση της παραγωγικότητας και της τελικής συγκέντρωσης 2,3-BD. Συγκρίνοντας τα δύο πειράματα με αρχική συγκέντρωση βιομάζας 1 και 4 g·L<sup>-1</sup>, παρατηρείται ότι η παραγωγή της 2,3-BD ξεκινάει πολύ γρηγορά στην περίπτωση της υψηλής αρχικής συγκέντρωσης βιομάζας, με απόρροια υψηλές τιμές παραγωγικότητας (3.58 g·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>). Παρ' όλα αυτά, η τελική συγκέντρωση της 2,3-BD είναι μεγαλύτερη κατά 10 g·L<sup>-1</sup> στο ημι-συνεχές πείραμα με αρχική συγκέντρωση βιομάζας 1 g·L<sup>-1</sup>. Η μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας είναι παραπλήσια όπως επίσης και η απόδοση και στις δύο περιπτώσεις. Σημαντική είναι η παραγωγή ηλεκτρικού οξέος και γαλακτικού οξέος όταν χρησιμοποιήθηκε υψηλή συγκέντρωση βιομάζας. Αντίστοιχα αποτελέσματα έχουν διαπιστωθεί με τη χρήση εμπορικών σακχάρων (Πίνακας 3). Υψηλή συγκέντρωση 2,3-BD (85 g·L<sup>-1</sup>) με υψηλή απόδοση (0,48 g·g<sup>-1</sup>) παρουσιάστηκε στη μελέτη των Priya et al. (2016). Οι Cho et al. (2015) και Ji et al. (2010) έχουν πετύχει υψηλή παραγωγή 2,3-BD και παραγωγικότητα με τη χρήση γλυκόζης και του γενετικά τροποποιημένου στελέχους *K. oxytoca*.

**Πίνακας 3:** Βιοτεχνολογική παραγωγή 2,3-BD σε ημι-συνεχείς ζυμώσεις

Μικροοργανισμός	Πηγή άνθρακα	Αρχική βιομάζα (g·L <sup>-1</sup> )	2,3-BD (g·L <sup>-1</sup> )	Απόδοση (g·g <sup>-1</sup> )	Παραγωγικότητα (g·L <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )	Αναφορά
<i>E. ludwigii</i>	σακχαρόζη	1	98.8	0.32	1.35	Present study
		4	90.4	0.24	1.26	
<i>E. cloacae</i>	γλυκόζη	1	85.0	0.48	-	(Priya et al., 2016)
<i>K. oxytoca</i>	μαλτοδεξτρίνη	1	88.1	0.41	1.13	(Chan et al., 2016)
<i>K. oxytoca (budC)</i>	γλυκόζη	1	142.5	0.42	1.47	(Cho et al., 2015)
<i>K. oxytoca (ΔaldA)</i>	γλυκόζη	1	130.0	0.48	1.63	(Ji et al., 2010)
<i>K. pneumoniae</i>	λακτόζη	1	30.75	0.41	-	(Guo et al., 2017)

Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση των παραγόμενων προϊόντων καθώς και η αρχική συγκέντρωση σακχαρόζης στην κυτταρική αύξηση του βακτηρίου σε δύο τύπους καλλιέργειας. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι σε γενικές γραμμές δεν υπήρχε μεγάλη απόκλιση στις καλλιέργειες σε κωνικές φιάλες και microplate. Τυχόν διαφορές ίσως οφείλονται στο γεγονός των διαφορετικών συνθηκών αερισμού.

Όσον αφορά στη 2,3-BD, το βακτηριακό στέλεχος *E. ludwigii* φαίνεται να είναι αρκετά ανθεκτικό σε σχέση με τα παραπροϊόντα, αφού τόσο στις κωνικές φιάλες όσο και στο microplate έχει σημαντικό ρυθμό αύξησης ακόμα και σε συγκεντρώσεις περίπου 35 g·L<sup>-1</sup>. Το γαλακτικό οξύ παρουσιάζει αντίστοιχη συμπεριφορά μέχρι τα 30 και 35 g·L<sup>-1</sup> σε κωνικές φιάλες και microplate αντίστοιχα. Ωστόσο, σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις η παρεμπόδιση ήταν πλήρης, καθώς παρατηρήθηκε μείωση του  $\mu_{max}$  κατά 65,5 % για τις κωνικές φιάλες και 47,6 % για το microplate. Παρόμοια αποτελέσματα με αυτά του γαλακτικού οξέος είχε ο μικροοργανισμός στην παρουσία οξικού και ηλεκτρικού οξέος. Τα οξέα αυτά φαίνεται να είναι ελαφρώς πιο ισχυρά παρεμποδιστικά σε σχέση με το γαλακτικό. Το οξικό οξύ είναι τοξικό ακόμα και σε μικρές συγκεντρώσεις. Αυτό συμβαίνει γιατί διασπάται σε ανιόντα και κατιόντα όταν εισέρχεται στα κύτταρα, καταναλώνοντας παράλληλα ATP. Ως αποτέλεσμα, απελευθερώνει στη συνέχεια κατιόντα στο εξωτερικό του κυττάρου, ενώ τα ανιόντα εμποδίζουν τη γλυκόλυση, που είναι κρίσιμη για την κυτταρική αύξηση (Joo et al., 2016). Το ισχυρότερο παρεμποδιστικό προϊόν είναι το μυρμηκικό οξύ, όπου σε

συγκεντρώσεις  $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  παρεμποδίστηκε η κυτταρική αύξηση. Το παραπάνω γεγονός οφείλεται στην ιδιότητά του να έχει υψηλή διαλυτότητα σε λιπίδια και να διαπερνά έτσι εύκολα τη μεμβράνη. Το συσσωρευμένο οξύ μειώνει το pH εσωτερικά του κυττάρου από ουδέτερο σε όξινο και καθυστερεί με αυτόν τον τρόπο την κυτταρική αύξηση (Linnet et al., 2008).

Κατά τη μελέτη της επίδρασης της αρχικής συγκέντρωσης υποστρώματος, παρατηρήθηκε υψηλή συγκέντρωση 2,3-BD, απόδοση και παραγωγικότητα για αρχική συγκέντρωση  $120 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , ωστόσο σημαντική ήταν και η αύξηση των παραπροϊόντων. Αντίθετα, σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις υποστρώματος, τα παραπροϊόντα ήταν σε χαμηλές τιμές. Δεδομένου του γεγονότος ότι προκειμένου να καταστεί ένα βιοδιωλιστήριο βιώσιμο, θα πρέπει να υπάρχει υψηλή παραγωγικότητα, απόδοση και μειωμένη παραγωγή παραπροϊόντων για την αποφυγή φαινομένων παρεμπόδισης αλλά και μείωση του κόστους καθαρισμού, βάσει των αποτελεσμάτων, επιλέχθηκε η αρχική συγκέντρωση σακχάρων των  $75 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Επιπλέον, είναι κρίσιμο να παραχθεί μεγάλη ποσότητα κυττάρων με υψηλή παραγωγικότητα διατηρώντας τη βέλτιστη συγκέντρωση υποστρώματος (Kim et al., 2016). Αξιοποιώντας τα αποτελέσματα από τις κωνικές φιάλες και το microplate επιβεβαιώθηκε ότι χρησιμοποιώντας χαμηλότερη αρχική συγκέντρωση σακχαρόζης, η κυτταρική αύξηση είναι αρκετά γρήγορη σε σχέση με τα  $120 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  σακχαρόζης με  $\mu_{max}$  ίσο με  $0,86 \text{ h}^{-1}$ .

Τέλος πραγματοποιήθηκε συνεχής ζύμωση σε διαφορετικούς ρυθμούς αραίωσης ( $0,05, 0,07, 0,085, 0,1$  και  $0,125 \text{ h}^{-1}$ ) με στόχο την αύξηση της απόδοσης και της παραγωγικότητας της 2,3-BD καθώς και την αποφυγή φαινομένων παρεμπόδισης. Στους χαμηλούς ρυθμούς αραίωσης ( $0,05$  έως  $0,085 \text{ h}^{-1}$ ) η συγκέντρωσή της 2,3-BD είναι η υψηλότερη ( $\sim 28 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), ενώ περαιτέρω αύξηση του ρυθμού αραίωσης προκαλεί μείωση στη συγκέντρωση του προϊόντος. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι υψηλότεροι ρυθμοί αραίωσης έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση της απομάκρυνσης και μέρους των κυττάρων που έχουν αναπτυχθεί στον βιοαντιδραστήρα. Η υψηλότερη απόδοση ως προς τα καταναλωθέντα σάκχαρα ( $0,49 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) παρατηρήθηκε σε ρυθμό αραίωσης  $0,07 \text{ h}^{-1}$  και είναι υψηλότερη σε σχέση με τα συνολικά σάκχαρα. Ωστόσο, η παραγωγικότητα είναι αυξημένη στους μεγαλύτερους ρυθμούς αραίωσης. Τα κυριότερα παραπροϊόντα είναι το μυρμηκικό οξύ και η αιθανόλη.

Παρόμοια αποτελέσματα ως προς τη συγκέντρωση 2,3-BD και την απόδοση, είχαν επιτευχθεί στις μελέτες των Ramachandran & Goma (1987), με υψηλότερη όμως παραγωγικότητα. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 4, η υψηλότερη παραγωγή 2,3-BD σε συνεχή καλλιέργεια επιτεύχθηκε από τους Wong et al. (2014) με τον μικροοργανισμό *Klebsiella sp.* σε ρυθμό αραίωσης  $0,083 \text{ h}^{-1}$  και με τη χρήση γλυκόζης. Είναι σημαντικό ότι στις μελέτες των Menzel et al. (1997), Nakashimada et al. (1998) και Zeng et al. (1990) (a και b), όπου υπήρχαν υψηλοί ρυθμοί αραίωσης ( $>0,1 \text{ h}^{-1}$ ), το σύστημα οδηγήθηκε σε μειωμένη παραγωγή 2,3-BD.

**Πίνακας 4:** Βιοτεχνολογική παραγωγή 2,3-BD σε συνεχείς ζυμώσεις

Μικροοργανισμός	Πηγή άνθρακα	Ρυθμός αραίωσης (h <sup>-1</sup> )	2,3-BD (g·L <sup>-1</sup> )	Απόδοση (g·g <sup>-1</sup> )	Παραγωγικότητα (g·L <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )	Αναφορά
<i>E. ludwigii</i>	σακχαρόζη	0.085	27.7	0.46	2.36	This study
		0.1	22.4	0.42	2.24	
		0.125	17.6	0.36	2.20	
<i>K. oxytoca</i>	γλυκόζη	0.2	-	0.4	-	(Afscharet al., 1991)
		0.4	-	0.26	-	
		0.6	-	0.20	-	
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	γλυκόζη	0.1	1.2	-	-	(Nakashimada et al., 1998)
		0.2	1.4	-	-	
		0.3	0.9	-	-	
		0.4	0.5	-	-	
		0.5	0.5	-	-	
<i>K. pneumoniae</i>	γλυκόζη	0.1	35.0	0.42	4.25	(Ramachandran & Goma, 1987)
<i>Klebsiella sp.</i>	γλυκόζη	0.063	38.6	-	2.41	(Wong et al., 2014)
		0.083	33.8	-	2.82	
		0.125	18.8	-	2.35	
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	Υδρόλυμα σπόρων καλαμποκιού	0.06	8.7	0.18	0.52	(Ma et al., 2018)
<i>E. aerogenes</i>	γλυκόζη	0.2	21.5	-	-	(Zeng et al., 1990b)
<i>E. aerogenes</i>	γλυκόζη	0.1	22.8	-	-	(Zeng et al., 1990a)
		0.16	21.5	-	-	
		0.2	19.8	-	-	
		0.28	13.1	-	-	

#### 4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- Afschar, A. S., Bellgardt, K. H., Vaz Rossell, C. E., Czok, A., & Schaller, K. (1991). The production of 2,3-butanediol by fermentation of high test molasses. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 34(5), 582–585. <https://doi.org/10.1007/BF00167903>
- Bartowsky, E. J., & Henschke, P. A. (2004). The “buttery” attribute of wine - Diacetyl - Desirability, spoilage and beyond. *International Journal of Food Microbiology*, 96(3), 235–252. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.013>
- Biebl, H.; Zeng, A. P.; Menzel, K.; Deckwer, W. D. (1998). Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol and 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50(1), 24–29. <https://doi.org/10.1007/s002530051251>
- Bryn, K., Ulstrup, J. C., & Stormer, F. C. (1973). Effect of acetate upon the formation of acetoin in *Klebsiella* and *Enterobacter* and its possible practical application in a rapid voges-proskauer test. *Applied Microbiology*, 25(3), 511–512.
- Celińska, E., & Grajek, W. (2009). Biotechnological production of 2,3-butanediol- Current state and prospects. *Biotechnology Advances*, 27(6), 715–725. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.05.002>
- Chan, S., Jantama, S. S., Kanchanatawee, S., & Jantama, K. (2016). Process optimization on micro-aeration supply for high production yield of 2,3-butanediol from maltodextrin by metabolically-engineered *Klebsiella oxytoca*. *PLoS ONE*, 11(9), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161503>
- Cherubini, F. (2010). The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management*, 51(7), 1412–1421. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.01.015>
- Cho, S., Kim, T., Woo, H. M., Lee, J., Kim, Y., & Um, Y. (2015). Enhanced 2,3-butanediol production by optimizing fermentation conditions and engineering *Klebsiella oxytoca* M1 through overexpression of acetoin reductase. *PLoS ONE*, 10(9), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138109>



- Converti, A., Perego, P., & Del Borghi, M. (2003). Effect of specific oxygen uptake rate on *Enterobacter aerogenes* energetics: Carbon and reduction degree balances in batch cultivations. *Biotechnology and Bioengineering*, 82(3), 370–377. <https://doi.org/10.1002/bit.10570>
- Fond, O., Jansen, N. B., & Tsao, G. T. (1985). A Model of Acetic Acid and 2,3-Butanediol Inhibition of the Growth and Metabolism of *Klebsiella oxytoca*. *Biotechnology Letters*, 7, 727–732. <https://doi.org/10.1007/BF01032284>
- Garg, S. K. K., & Jain, a. (1995). Fermentative production of 2,3-butanediol: a review. *Bioresource Technology*, 51(2), 103–109. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(94\)00136-O](https://doi.org/10.1016/0960-8524(94)00136-O)
- Guo, X., Wang, Y., Guo, J., Wang, Q., Zhang, Y., Chen, Y., ... Xiao, D. (2017). Efficient production of 2,3-butanediol from cheese whey powder (CWP) solution by *Klebsiella pneumoniae* through integrating pulsed fed-batch fermentation with a two-stage pH control strategy. *Fuel*, 203, 469–477. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2017.04.138>
- Herbert, D., Phipps, P. J., & Strange, R. E. (1971). Chapter III Chemical Analysis of Microbial Cells. *Methods in Microbiology*, 5, 209–344. [https://doi.org/10.1016/S0580-9517\(08\)70641-X](https://doi.org/10.1016/S0580-9517(08)70641-X)
- Hespell, R. B. (1996). Fermentation of xylan, corn fiber, or sugars to acetoin and butanediol by *Bacillus polymyxa* strains. *Current Microbiology*, 32(5), 291–296. <https://doi.org/10.1007/s002849900052>
- Jansen, N., Flickinger, M. C., & Tsao, G. T. (1984a). Production of 2,3-Butanediol from D-Xylose by, XXVI, 362–369.
- Jansen, N., Flickinger, M. C., & Tsao, G. T. (1984b). Production of 2,3-Butanediol from D-Xylose by *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724. *Biotechnology and Bioengineering*, XXVI, 362–369.
- Ji, X. J., Huang, H., & Ouyang, P. K. (2011). Microbial 2,3-butanediol production: A state-of-the-art review. *Biotechnology Advances*, 29(3), 351–364. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.01.007>

- Ji, X. J., Huang, H., Zhu, J. G., Ren, L. J., Nie, Z. K., Du, J., & Li, S. (2010). Engineering *Klebsiella oxytoca* for efficient 2, 3-butanediol production through insertional inactivation of acetaldehyde dehydrogenase gene. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(6), 1751–1758. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2222-2>
- Joo, J., Lee, S. J., Yoo, H. Y., Kim, Y., Jang, M., Lee, J., ... Park, C. (2016). Improved fermentation of lignocellulosic hydrolysates to 2,3-butanediol through investigation of effects of inhibitory compounds by *Enterobacter aerogenes*. *Chemical Engineering Journal*, 306, 916–924. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.07.113>
- Kamm, B., & Kamm, M. (2004). Principles of biorefineries. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(2), 137–145. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1537-7>
- Kim, D. K., Park, J. M., Song, H., & Chang, Y. K. (2016). Kinetic modeling of substrate and product inhibition for 2,3-butanediol production by *Klebsiella oxytoca*. *Biochemical Engineering Journal*, 114, 94–100. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.06.021>
- Kim, T., Cho, S., Woo, H. M., Lee, S. M., Lee, J., Um, Y., & Seo, J. H. (2017). High production of 2,3-butanediol from glycerol without 1,3-propanediol formation by *Raoultella ornithinolytica B6*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(7), 2821–2830. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8094-y>
- Laube, V. M., Groleau, D., & Martin, S. M. (1984). The effect of yeast extract on the fermentation of glucose to 2,3-butanediol by *Bacillus polymyxa*. *Biotechnology Letters*, 6(8), 535–540. <https://doi.org/10.1007/BF00139998>
- Li, L., Li, K., Wang, Y., Chen, C., Xu, Y., Zhang, L., ... Xu, P. (2015). Metabolic engineering of *Enterobacter cloacae* for high-yield production of enantiopure (2R,3R)-2,3-butanediol from lignocellulose-derived sugars. *Metabolic Engineering*, 28, 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2014.11.010>
- Lin, S. K. C., Du, C., Koutinas, A., Wang, R., & Webb, C. (2008). Substrate and product inhibition kinetics in succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes*. *Biochemical Engineering Journal*, 41(2), 128–135. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.03.013>

- Long, K., & Patrick, R. (1963). The present status of the 2,3-butylene glycol fermentation. *Adv. Appl. Microbiol*, 5, 135–55.
- Ma, K., He, M., You, H., Pan, L., Wang, Z., Wang, Y., ... Maeda, T. (2018). Improvement of (R,R)-2,3-butanediol production from corn stover hydrolysate by cell recycling continuous fermentation. *Chemical Engineering Journal*, 332(July 2017), 361–369. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.09.097>
- Magee, R. J., & Kosaric, N. (1981). The microbial production of industrial chemicals. *Sci Am*, 245, 155–178.
- Motwani, M., Seth, R., Dagainawala, H. F., & Khanna, P. (1993). Microbial-Production of 2,3-Butanediol from Water Hyacinth. *Bioresource Technology*, 44(3), 187–195. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(93\)90151-Z](https://doi.org/10.1016/0960-8524(93)90151-Z)
- Nakashimada, Y., Kanai, K., & Nishio, N. (1998). Optimization of dilution rate, pH and oxygen supply on optical purity of 2,3-butanediol produced by *Paenibacillus polymyxa* in chemostat culture. *Biotechnology Letters*, 20(12), 1133–1138. <https://doi.org/10.1023/A:1005324403186>
- Nakashimada, Y., Mabwoto, B., Takashi, K., Toshihide, K., & Nishio, N. (2000). *Paenibacillus polymyxa*. *Australasian Plant Pathology*, 1(2), 293. <https://doi.org/10.1071/AP07006>
- Perego, P., Converti, A., Del Borghi, A., & Canepa, P. (2000). 2,3-Butanediol production by *Enterobacter aerogenes*: Selection of the optimal conditions and application to food industry residues. *Bioprocess Engineering*, 23(6), 613–620. <https://doi.org/10.1007/s004490000210>
- Pirt, S. J., & Callow, D. S. (1958). Exocellular Product Formation by Microorganisms in Continuous Culture. I. Production of 2,3-Butanediol by *Aerobacter aerogenes* in a Single Stage Process. *Journal of Applied Bacteriology*, 21(2), 188–205. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1958.tb00134.x>
- Priya, A., Dureja, P., Talukdar, P., Rathi, R., Lal, B., & Sarma, P. M. (2016). Microbial production of 2,3-butanediol through a two-stage pH and agitation strategy in 150 l bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 105, 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.09.016>

- Ragauskas, A. J., Williams, C. K., Davison, B. H., Britovsek, G., Cairney, J., Eckert, C. A., Tschaplinski, T. (2006). The path forward for biofuels and biomaterials. *Science*, *311*(5760), 484–489. <https://doi.org/10.1126/science.1114736>
- Ramachandran, K. B., & Goma, G. (1987). Effect of oxygen supply and dilution rate on the production of 2,3-butanediol in continuous bioreactor by *Klebsiella pneumoniae*. *Enzyme and Microbial Technology*, *9*(2), 107–111. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(87\)90152-9](https://doi.org/10.1016/0141-0229(87)90152-9)
- Saha, B. C. (2003). Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *30*(5), 279–291. <https://doi.org/10.1007/s10295-003-0049-x>
- Syu, M. J. (2001). Biological production of 2,3-butanediol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *55*(1), 10–18. <https://doi.org/10.1007/s002530000486>
- Taylor, G. (2008). Biofuels and the biorefinery concept. *Energy Policy*, *36*(12), 4406–4409. <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2008.09.069>
- Van Houdt, R., Aertsen, A., & Michiels, C. W. (2007). Quorum-sensing-dependent switch to butanediol fermentation prevents lethal medium acidification in *Aeromonas hydrophila AH-1N*. *Research in Microbiology*, *158*(4), 379–385. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2006.11.015>
- Wan, C., & Li, Y. (2012). Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass. *Biotechnology Advances*, *30*(6), 1447–1457. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.03.003>
- Wang, Q., Guo, F. J., Rong, Y. J., & Chi, Z. M. (2012). Lipid production from hydrolysate of cassava starch by *Rhodospiridium toruloides 21167* for biodiesel making. *Renewable Energy*, *46*, 164–168. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2012.03.002>
- Wong, C. L., Yen, H. W., Lin, C. L., & Chang, J. S. (2014). Effects of pH and fermentation strategies on 2,3-butanediol production with an isolated *Klebsiella sp. Zmd30* strain. *Bioresource Technology*, *152*, 169–176. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.101>

- Yang, T. W., Rao, Z. M., Zhang, X., Xu, M. J., Xu, Z. H., & Yang, S. T. (2013). Fermentation of biodiesel-derived glycerol by *Bacillus amyloliquefaciens*: Effects of co-substrates on 2,3-butanediol production Tao-Wei Yang1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(17), 7651–7658. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5048-x>
- Yu, E. K. C., & Saddler, J. N. (1982). Enhanced Production of 2,3-Butanediol by *Klebsiella pneumoniae* grown on High Sugar Concentrations in the Presence of Acetic Acid, 777–784.
- Yu, E. K., & Saddler, J. N. (1983). Fed-Batch Approach to Production of 2,3-Butanediol by *Klebsiella pneumoniae* grown on high substrate. *Appl Environ Microbiol*, 46(3), 630–635.
- Zeng, A. P., Biebl, H., & Deckwer, W. D. (1990a). 2,3-Butanediol production by *Enterobacter aerogenes* in continuous culture: role of oxygen supply. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 33(3), 264–268. <https://doi.org/10.1007/BF00164519>
- Zeng, A. P., Biebl, H., & Deckwer, W. D. (1990b). Effect of pH and acetic acid on growth and 2,3-butanediol production of *Enterobacter aerogenes* in continuous culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 33(5), 485–489. <https://doi.org/10.1007/BF00172538>
- Zeng, A. P., & Deckwer, W. D. (1991). A model for multiproduct-inhibited growth of *Enterobacter aerogenes* in 2,3-butanediol fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 35(1), 1–3. <https://doi.org/10.1007/BF00180625>