



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**



Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία
Βιοτεχνολογική αξιοποίηση γλυκερόλης προς παραγωγή βακτηριακής
1,3-προπανοδιόλης, 2,3-βουτανοδιόλης και ακετοΐνης



Ελένη Σ. Μωραΐτη

Επιβλέπων καθηγητής:
Παπανικολάου Σεραφείμ, Καθηγητής ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ, 2022

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Βιοτεχνολογική αξιοποίηση γλυκερόλης προς παραγωγή βακτηριακής
1,3-προπανοδιόλης, 2,3-βουτανοδιόλης και ακετοΐνης

“Biotechnological valorization of glycerol for bacterial
1,3-propanediol, 2,3-butanediol and acetoin production”

Ελένη Σ. Μωραΐτη

Εξεταστική Επιτροπή

Σεραφείμ Παπανικολάου, Καθηγητής ΓΠΑ (Επιβλέπων)

Αποστόλης Κουτίνας, Καθηγητής ΓΠΑ

Νικόλαος Στοφόρος, Καθηγητής ΓΠΑ

Βιοτεχνολογική αξιοποίηση γλυκερόλης προς παραγωγή βακτηριακής 1,3-προπανοδιόλης, 2,3-βουτανοδιόλης και ακετοΐνης

Π.Μ.Σ. Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου
Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μείωση των πόρων ορυκτών καυσίμων, τα ποικίλα περιβαλλοντικά ζητήματα που προκύπτουν, καθώς και η συνεχής ζήτηση για ενέργεια, έχουν συντελέσει στην αύξηση της παραγωγής βιοκαυσίμων. Το πιο κοινό βιοκαύσιμο που χρησιμοποιείται στην Ευρώπη είναι το βιοντίζελ, το οποίο παρασκευάζεται από φυτικά έλαια, ζωικά ή φυτικά ελαιούχα απόβλητα. Ωστόσο, η αύξηση στη ζήτηση και παραγωγή βιοντίζελ, έχει ως επακόλουθο τη τεράστια ποσότητα παραγόμενης ακάθαρτης γλυκερόλης, η οποία αποτελεί το κυριότερο παραπροϊόν της διεργασίας αυτής. Μελέτες έχουν δείξει τη δυνατότητα χρήσης του παραπροϊόντος αυτού ως κατάλληλη πρώτη ύλη για τη παραγωγή ενώσεων υψηλής προστιθέμενης αξίας από τους μικροοργανισμούς, όπως η 1,3-Προπανοδιόλη. Η βιοτεχνολογική παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης από βιομάζα αποβλήτων είναι μια πολλά υποσχόμενη και ελκυστική εναλλακτική λύση, έναντι της παραδοσιακής χημικής σύνθεσης, η οποία γίνεται μέσω της επεξεργασίας του οξειδίου του αιθυλενίου και της ακρολεΐνης. Η βιοτεχνολογική παραγωγή γίνεται μέσω ζύμωσης της γλυκερόλης από βακτήρια, όπως τα γένη *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Enterobacter* και *Clostridium*. Η παρούσα πειραματική μελέτη είχε ως στόχο να χρησιμοποιήσει τη γλυκερόλη στη καθαρή και ακάθαρτη μορφή της, που λαμβάνεται από τη διαδικασία παραγωγής βιοντίζελ, ως την κύρια πηγή άνθρακα, κυρίως για τη παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης, 2,3-βουτανοδιόλης και ακετοΐνης από τα βακτηριακά στελέχη *Citrobacter freundii* EMBT, *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176, *Bacillus subtilis* ACA-DC 1225 και *Lactobacillus brevis* ACA-DC 1716, τα οποία αποτελούν συλλογές του εργαστηρίου της Γαλακτοκομίας, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Η πειραματική διεργασία πραγματοποιήθηκε σε ασυνεχείς καλλιέργειες σε κωνικές φιάλες τύπου Erlenmeyer των 250 ml και φιάλες Duran των 100 ml, υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες. Αρχικά για τη καλλιέργεια όλων των στελεχών χρησιμοποιήθηκε εμπορική γλυκόζη, καθώς είναι η πιο εύκολα καταβόλισιμη πηγή άνθρακα, ενισχύοντας της μικροβιακή αύξηση. Στη πορεία εξετάστηκε η καθαρή γλυκερόλη, ενώ σε τελικό στάδιο έγινε χρήση της ακάθαρτης γλυκερόλης και στα τέσσερα βακτηριακά στελέχη. Επίσης εφαρμόστηκε συν-υπόστρωμα καθαρής γλυκερόλης και γλυκόζης για τη περίπτωση του *Lactobacillus brevis* ACA-DC 1716, καθώς αδυνατούσε να αναπτυχθεί σε υπόστρωμα με μοναδική πηγή άνθρακα τη γλυκερόλη. Σε όλες τις πειραματικές διεργασίες συνεκτιμήθηκε η αφομοίωση της πηγής άνθρακα, καθώς και η παραγωγή των κύριων μεταβολιτών: 1,3-προπανοδιόλη, 2,3-βουτανοδιόλη, ακετοΐνη και βιομάζας. Μεταξύ των εξεταζόμενων στελεχών ξεχώρισε το *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176 για την αυξημένη συγκέντρωση ακετοΐνης που παρήγαγε στο τέλος της ζύμωσης. Η καλλιέργειά του έγινε σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα καθαρή γλυκερόλη, συγκέντρωσης 70 ± 3 g/L, την οποία και κατανάλωσε πλήρως, σε διάστημα 115 ωρών, υπό αερόβιες συνθήκες. Η μέγιστη ποσότητα ακετοΐνης που καταγράφηκε για το στέλεχος αυτό ήταν 17,6 g/L με συντελεστή απόδοσης $Y \left(\frac{ACTN}{S} \right) = 0,27 \frac{g}{g}$.

Επιστημονική Περιοχή: Βιοτεχνολογική αξιοποίηση αποβλήτων

Λέξεις Κλειδιά: βιομετατροπή, βιοντίζελ, βιομηχανική γλυκερόλη, βακτήρια, 1,3-προπανοδιόλη, 2,3-βουτανοδιόλη, ακετοΐνη

Biotechnological valorization of glycerol for bacterial 1,3-propanediol, 2,3-butanediol and acetoin production

*M.Sc. Food Science & Technology
Department of Food Science & Human Nutrition
Laboratory of Food Microbiology & Biotechnology*

ABSTRACT

The reduction of fossil fuel resources, the various environmental issues that arise, as well as the constant demand for energy, fuels, and chemicals, have contributed to the increase in the production of Biofuels. The most common Biofuel used in Europe is biodiesel, which is made from vegetable oils, animal, or vegetable oily wastes. However, the increase in demand and production of biodiesel, leads to a huge amount of crude glycerol being produced. Glycerol, the main by-product of the biodiesel industry, can be a suitable raw material to produce high value-added compounds by microorganisms, such as 1,3-propanediol. The biotechnological production of 1,3-propanediol from waste biomass is a very promising and attractive alternative in addition to the traditional chemical composition, which is done through the treatment of ethylene oxide and acrolein. Biotechnological production is done by fermentation of glycerol from bacterial genera, including *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Lactobacillus* and *Enterobacillus*. The aim of this experimental study was to use glycerol in its pure and crude form, obtained from the biodiesel production process, as the main source of carbon, mainly to produce 1,3-propanediol, 2,3-butanediol and acetoin through bacterial strains of *Citrobacter freundii* EMBT, *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176, *Bacillus subtilis* ACA-DC 1225 and *Lactobacillus brevis* ACA-DC 1716, which are collections of the Dairy laboratory of the Agricultural University of Athens. The experimental process was performed on batch cultures under aerobic and anaerobic conditions, in flasks and Duran bottles respectively. Commercial glucose was initially used as a carbon source for the cultivation of all strains, as this substrate is the most easily catabolized source of carbon for enhancing microbial growth. In the next step, pure glycerol was tested, while in the final stage, crude glycerol was used in all four bacterial strains. Pure glycerol and glucose co-substrate was also applied in the case of *Lactobacillus brevis* ACA-DC 1716, as it was unable to grow on a substrate with glycerol as its sole carbon source. The assimilation of the carbon source, as well as the production of the major metabolites 1,3-propanediol, 2,3-butanediol, acetoin and biomass, were considered in all experimental processes. Among the examined strains, *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176 stood out for the increased concentration of acetoin that was produced in the end of fermentation. It was cultured on a substrate with a carbon source of pure glycerol, with a concentration of 70 ± 3 g/L, which was consumed completely, in a period of 115 hours, under aerobic conditions. The maximum amount of acetoin that was recorded for this strain was 17.6 g/L with a yield of 0.27 g/g.

Scientific Area: Biotechnological waste valorization

Keywords: bioconversion, biodiesel, industrial glycerol, bacteria, 1,3-propanediol, 2,3-butanediol, acetoin

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Φτάνοντας στο τέλος ενός υπέροχου αλλά συνάμα απαιτητικού κύκλου σπουδών για την απόκτηση του μεταπτυχιακού τίτλου Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων με ειδίκευση στην Επεξεργασία, Συντήρηση και Βιοτεχνολογικές Διεργασίες Τροφίμων – Ανάπτυξη Προϊόντων Βιο-οικονομίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα άτομα που συνέβαλλαν και στάθηκαν δίπλα μου κατά τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή της μεταπτυχιακής μου μελέτης, κ. Σεραφείμ Παπανικολάου, που είχα τη τύχη να γνωρίσω σε αυτά τα δύο χρόνια εκπαίδευσης. Στη πορεία της διπλωματικής μου μελέτης, οι γνώσεις που κατέκτησα μέσω της διδασκαλίας του στα αντικείμενα της Ενζυμολογίας, Μικροβιολογίας Τροφίμων και Βιομηχανικής Βιοτεχνολογίας, αποτέλεσαν τις βάσεις για τη διεξαγωγή και ολοκλήρωση της μελέτης αυτής.

Νοιώθω ιδιαίτερη ανάγκη να εκφράσω τις βαθύτερες ευχαριστίες μου σε όλα τα άτομα του εργαστηρίου για την αδιάλειπτη προσοχή και το ενδιαφέρον που μου έδειξαν-ο καθένας ξεχωριστά-καθ' όλη τη διάρκεια συνεργασίας μας στο εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Δημήτρη Καραγιάννη για τη συνεχή στήριξη και συνεργασία του.

Τέλος, αφιερώνω τη παρούσα διπλωματική μελέτη στους γονείς μου Σωτήριο και Βασιλική και τους ευχαριστώ για την αγάπη και την υπομονή τους, στηρίζοντας όλα μου τα βήματα στο σύνολο των σπουδών μου. Είμαι ευγνώμων για όλα όσα μου προσέφεραν, δίνοντάς μου δύναμη να συνεχίζω καθημερινά σε οποιαδήποτε απόφαση της ζωής μου.

Ελένη Σ. Μωραΐτη
Αθήνα
Σεπτέμβριος 2022

«Με την άδειά μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της»

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	II
ABSTRACT	III
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	IV
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1. Η έννοια του βιοντίζελ	4
1.2. Στάδια παρασκευαστικής διαδικασίας και διαχωρισμού γλυκερόλης σε βιομηχανική κλίμακα	6
1.2.1. Διεργασία Μετεστεροποίησης.....	6
1.2.2. Διαχωρισμός αλκοόλης και ανάκτηση βιοντίζελ.....	7
1.2.3. Διαχωρισμός της ακάθαρτης γλυκερόλης	8
1.2.4. Καθαρισμός αλκοόλης.....	9
1.3. Γλυκερόλη	10
1.3.1. Χρήσεις γλυκερόλης.....	10
1.3.2. Ακάθαρτη γλυκερόλη	11
1.4. 1,3-προπανοδιόλη (1,3-PDO).....	12
1.5. 2,3-βουτανοδιόλη (2,3-BDO).....	15
1.6. Ακετοΐνη.....	18
1.7. <i>Citrobacter freundii</i>	21
1.7.1. Τοξικότητα και χρήσεις του <i>Citrobacter freundii</i>	21
1.8. <i>Bacillus subtilis</i>	22
1.8.1. Τοξικότητα και χρήσεις του <i>Bacillus subtilis</i>	23
1.9. Βιοϋμένια.....	24
1.10. <i>Lactobacillus brevis</i>	25
1.10.1. Μεταβολικά μονοπάτια καταβολισμού των εξοζών και πεντοζών από τα γαλακτικά βακτήρια	25
1.10.2. Ομοζυμωτικός μεταβολισμός των γαλακτικών βακτηρίων.....	26
1.10.3. Ετεροζυμωτικός μεταβολισμός των γαλακτικών βακτηρίων	28
1.10.4. Εφαρμογές των γαλακτικών βακτηρίων στη βιομηχανία.....	29
1.11. Βιοχημικές οδοί σύνθεσης και κατανάλωσης ATP.....	31
1.12. Είσοδος και μεταβολισμός της γλυκερόλης στα βακτηριακά κύτταρα.....	31
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	36
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	38
3.1. Βιολογικό Υλικό.....	38
3.2. Μικροβιακή Καλλιέργεια.....	39

3.2.1.	Υπόστρωμα Υγρής Προκαλλιέργειας.....	39
3.2.2.	Υπόστρωμα Υγρής Καλλιέργειας.....	40
3.2.3.	Υπόστρωμα για διατήρηση σε Slants	42
3.3.	Συνθήκες Πρώτης Υγρής Προκαλλιέργειας- Εμβολιασμός και Διαπίστωση Επιβίωσης	44
3.3.1.	Διαλογή βακτηριακών στελεχών και διατήρηση σε Slants	45
3.4.	Συνθήκες Ασυνεχούς Καλλιέργειας	47
3.4.1.	Εμβολιασμός καλλιέργειών που προορίζονταν για ανάπτυξη υπό αερόβιες συνθήκες	47
3.4.2.	Εμβολιασμός καλλιέργειών που προορίζονταν για ανάπτυξη υπό αναερόβιες συνθήκες	48
3.5.	Αναλύσεις.....	48
3.5.1.	Μέτρηση pH	48
3.5.2.	Ποσοτική μέτρηση βιομάζας.....	48
3.5.3.	Μέθοδος ξήρανσης (Dry Weight) (Άμεση).....	49
3.5.4.	Μέθοδος μέτρησης οπτικής πυκνότητας (Optical Density) (Εμμεση)	49
3.5.5.	Ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός μεταβολικών προϊόντων και καταναλωθείσας πηγής άνθρακα	50
4.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ	52
4.1.	Εμβολιασμός Υγρής Προκαλλιέργειας από Slants (1 ^η Περίπτωση).....	53
4.1.1.	Καλλιέργεια του <i>Citrobacter freundii</i> EMBT	53
4.1.2.	Καλλιέργεια του <i>Bacillus subtilis</i> ACA-DC 1176.....	54
4.2.	Εμβολιασμός Υγρής Προκαλλιέργειας από Cryovial (2 ^η Περίπτωση)	57
4.2.1.	Καλλιέργεια του <i>Citrobacter freundii</i> EMBT	57
4.2.2.	Καλλιέργεια των στελεχών <i>Bacillus subtilis</i>	72
4.2.3.	Καλλιέργεια του <i>Bacillus subtilis</i> ACA-DC 1176.....	73
4.2.4.	Καλλιέργεια του <i>Bacillus subtilis</i> ACA-DC 1225.....	93
4.2.5.	Καλλιέργεια του <i>Lactobacillus brevis</i> ACA-DC 1716.....	111
5.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	126
6.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	148
7.	ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ	153
8.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	154

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η αυξημένη ζήτηση για πρώτες ύλες, εξαιτίας της αύξησης του παγκόσμιου πληθυσμού, συνεπάγεται έλλειψη πηγών παροχής πρώτων υλών και κυρίως πόρων αργού πετρελαίου. Πολλές χώρες, εξαιτίας της μειωμένης διαθεσιμότητας των πρώτων υλών, εξαρτώνται από άλλες για την κάλυψη των αναγκών τους, διογκώνοντας σε μεγαλύτερο βαθμό το πρόβλημα. Ταυτόχρονα, η εξόρυξη για την ανάκτηση πετροχημικών υλικών αυξάνουν το περιβαλλοντικό κόστος, λόγω της μεγάλης κατανάλωσης ενέργειας για την εξόρυξη, επεξεργασία και διάθεσή τους με επακόλουθο την εκπομπή διοξειδίου του άνθρακα και τη δραματική αύξηση εναπόθεσης αποβλήτων στο περιβάλλον. Σε όλα τα παραπάνω έρχεται να δώσει μία εναλλακτική προσέγγιση ο όρος της κυκλικής οικονομίας. Παλαιότερα το μοντέλο οικονομίας βασιζόταν στο πρότυπο «παίρνω-φτιάχνω-καταναλώνω-πετώ», το οποίο επέφερε την κατάσταση της περιβαλλοντικής υποβάθμισης που αντιμετωπίζουμε στις μέρες μας. Το νέο μοντέλο παραγωγής και κατανάλωσης αναλαμβάνει να δώσει μια αειφόρο λύση, μεταβαίνοντας από το γραμμικό μοντέλο στο κυκλικό, όπου τα προϊόντα, τα υλικά και οι πόροι επαναχρησιμοποιούνται, περιορίζοντας τη παραγωγή αποβλήτων. (Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο, 2015; 2021). Λαμβάνοντας υπόψη τη στροφή από τη γραμμική στη κυκλική οικονομία το συντομότερο δυνατό, με βασικό τομέα βελτίωσης, εκείνο των αέριων ρύπων και αποβλήτων, οι βιομηχανίες οδηγήθηκαν προς αναζήτηση εναλλακτικών καυσίμων, που να προέρχονται από βιολογικές ύλες και ανανεώσιμες πηγές ενέργειας, τα λεγόμενα βιοκαύσιμα. Η χρήση τους μπορεί να είναι σε κινητήρες οχημάτων, αλλά και σε διάφορες άλλες μηχανές εσωτερικής καύσης για θέρμανση και ηλεκτρική ενέργεια. Οι Ηνωμένες Πολιτείες και η Βραζιλία, οι δύο κορυφαίοι παραγωγοί βιοκαυσίμων, αντιπροσωπεύουν περίπου το 80% της παγκόσμιας παραγωγής. Η βιομηχανία υγρών βιοκαυσίμων παράγει αιθανόλη, βιοντίζελ (FAME: Fatty Acid Methyl Ester) και Υδροεπεξεργασμένο Φυτικό Έλαιο (HVO: Hydrotreated Vegetable Oil). Αυτά τα είδη περιλαμβάνουν σχεδόν όλη την τρέχουσα παγκόσμια παραγωγή και χρήση βιοκαυσίμων. Το πιο διαδεδομένο από τα βιοκαύσιμα στην Ευρώπη είναι το βιοντίζελ. Αποτελεί ένα εναλλακτικό καύσιμο έναντι του ορυκτού πετρελαίου ντίζελ, που προέρχεται από βιολογικές πηγές, όπως βρώσιμα και μη φυτικά έλαια ή φυτικά ελαιούχα απόβλητα. Το Βιολογικό Πετρέλαιο μέσω της καύσης του παράγει συγκριτικά με το κοινό ορυκτό πετρέλαιο ντίζελ την ίδια ποσότητα CO₂, ωστόσο η ποσότητα αυτή είναι αντίστοιχη με εκείνη που είχε προηγουμένως απορροφήσει το φυτό από την ατμόσφαιρα.

Συνεπώς το ισοζύγιο CO₂ χαρακτηρίζεται ως μηδενικό (Drożdżyńska A *et al.*, 2011; REN21, 2021). Τα βιοκαύσιμα και αντίστοιχα το βιοντίζελ ανάλογα με τη προέλευση και το είδος των πρώτων υλών κατατάσσονται σε 1^{ης}, 2^{ης} και 3^{ης} γενιάς. Για τη δημιουργία πρώτης γενιάς βιοντίζελ χρησιμοποιούνται φυτικά έλαια και ζωικά λίπη. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω το ισοζύγιο του CO₂, ενώ χαρακτηρίζεται ως μηδενικό, πρακτικά δεν είναι απόλυτα μηδενικό, εξαιτίας της έκλυσης CO₂ που παράγουν τα γεωργικά μηχανήματα κατά τη καλλιέργεια και συγκομιδή των πρώτων υλών, τη μεταφορά και τη χρήση λιπασμάτων. Επίσης η εκμετάλλευση αυτών των πόρων αποτελεί αρνητική επίδραση στη διαθεσιμότητα των τροφών και στη διατήρηση της βιοποικιλότητας, όπως και σημαντικό κομμάτι είναι και η εναπόθεση μεγάλων ποσοτήτων αποβλήτων στο περιβάλλον, μέσω της επεξεργασίας τους και της παραγωγής παραπροϊόντων. Το δεύτερης γενιάς βιοντίζελ αποτέλεσε λύση στο πρόβλημα αξιοποίησης των πρώτων υλών που χρησιμοποιούνται στη διατροφική αλυσίδα ανθρώπων και ζώων, αντικαθιστώντας τα με πηγές που δεν χρησιμοποιούνται για τροφή, όπως απόβλητα και υπολειμματικά φυτικά έλαια και ζωικά λίπη, όπως μαγειρικά έλαια (τηγανέλαια). Στη περίπτωση χρήσης των συγκεκριμένων πρώτων υλών η εναπόθεση του CO₂ στην ατμόσφαιρα στο σύνολο των διεργασιών είναι σαφώς μικρότερη, καθώς είναι απόβλητα, τα οποία επαναχρησιμοποιούνται, δεν απαιτούνται επιπλέον εκτάσεις για την καλλιέργειά τους αλλά ούτε και ο ίδιος μηχανολογικός εξοπλισμός για τη παραγωγή και συγκομιδή τους. Επιπροσθέτως, προστατεύεται το περιβάλλον από τις επιπτώσεις που θα είχε η απόρριψή τους. Το λεγόμενο 3^{ης} γενιάς βιοντίζελ είναι μία πολλά υποσχόμενη εναλλακτική λύση καυσίμου από Μικροφύκη. Τα Μικροφύκη που αξιοποιούνται για τη παραγωγή της τρίτης γενιάς βιοντίζελ, έχουν τη δυνατότητα να αναπτύσσονται εξαιρετικά γρήγορα και να δεσμεύουν μεγάλες ποσότητες αέριων ρύπων συγκριτικά με τα φυτά. Ένα ακόμη πλεονέκτημα είναι ότι καλλιεργούνται σε μέρη που δεν ανταγωνίζονται τις υπάρχουσες καλλιέργειες τροφίμων και μετασχηματίζονται εύκολα σε καύσιμο (Mata TM, 2010).

Η Ευρωπαϊκή Ένωση τα τελευταία χρόνια έχει θεσπίσει τη σχετική νομοθεσία που προβλέπει τη παραγωγή και την επιτακτική χρήση Βιολογικού Πετρελαίου (βιοντίζελ) και άλλων βιοκαυσίμων. Η μελλοντική προοπτική και στόχος είναι να αποκατασταθεί ένα μεγάλο μέρος ή και ολοκληρωτικά η χρήση ορυκτών καυσίμων με βιοκαύσιμα, ώστε να ενισχυθεί το πλαίσιο των ανανεώσιμων πηγών ενέργειας (ΥΠΕΝ, 2021).

Προς το παρόν το βιοντίζελ χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με άλλα μίγματα ορυκτών καυσίμων, σε μηχανές εσωτερικής καύσης, ενώ η ποσότητα βιοντίζελ που παράγεται κάθε χρόνο συνεχώς αυξάνεται, με τη παγκόσμια παραγωγή του να ανέρχεται από 3,9 δισεκατομμύρια λίτρα το έτος 2005, σε 46,5 δισεκατομμύρια λίτρα το 2019 (Rouhany M, Montgomery H, 2019).

Το 2020 θα μπορούσε να είναι μια χρονιά που θα άλλαζε τα δεδομένα, καθώς σύμφωνα με την Οδηγία 2009/28/EK και το ν. 3468/2006, η συμμετοχή της ενέργειας από ανανεώσιμες πηγές, στην τελική κατανάλωση ενέργειας στις μεταφορές, είχε ως στόχο να είναι τουλάχιστον 10% μέχρι το 2020, ωστόσο η πανδημία από τον COVID-19, έφερε επιπτώσεις και πλήρη κυρίως ο τομέας των μεταφορών (REN21, 2021; ΥΠΕΝ, 2021). Η παραγωγή βιοντίζελ παγκοσμίως μειώθηκε κατά 5%, λόγω των επιπτώσεων της πανδημίας, ωστόσο εμφάνισε μια πολύ μικρή αύξηση, λιγότερο από 1%, σε 46,8 δισεκατομμύρια λίτρα το 2020 σε παγκόσμια κλίμακα για τις χώρες της Ινδονησίας, Βραζιλίας και Ηνωμένες Πολιτείες. Η αύξηση αυτή οφείλεται στο ευρύτερο φάσμα πρώτων υλών βιοντίζελ που μπορούν να υποβληθούν σε επεξεργασία, όπως αναφέρθηκαν παραπάνω (IEA(a), 2021; REN21, 2021). Αντίθετα, το 2021 φάνηκε η ζήτηση για βιοντίζελ να ανακάμπτει, όπως και άλλες ανανεώσιμες πηγές ενέργειας που παρουσίασαν αύξηση πέρα από τα επίπεδα του 2019, με τη ζήτησή τους να ανέρχεται κατά 15% ή 7 δισεκατομμύρια λίτρα, πάνω από τα επίπεδα του 2019. Το μεγαλύτερο μέρος αυτής της αύξησης προκύπτει κυρίως από στις Ασιατικές χώρες, Ινδονησία και Μαλαισία. Ως μελλοντικές προοπτικές για τη παγκόσμια ζήτηση των βιοκαυσίμων αναμένεται να αυξηθεί κατά 28% για τα επόμενα χρόνια μέχρι και το 2026 (IEA(b), 2021).

Η αυξανόμενη, ωστόσο, παραγωγή βιοντίζελ έχει ως επακόλουθο τεράστια ποσά παραγόμενης ακάθαρτης γλυκερόλης που προκύπτει ως παραπροϊόν της επεξεργασίας βιοντίζελ. Η ακάθαρτη γλυκερόλη που προκύπτει, αποτελεί περίπου το 10% της παραγωγής βιοντίζελ, δηλαδή περίπου 1 κιλό ακάθαρτης γλυκερόλης ανά 10 κιλά παραγόμενου βιοντίζελ. Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες η ζήτηση για αγορά του παραπροϊόντος αυτού από τη παραγωγή ελαιοχημικών και βιοντίζελ είχε αύξηση με ετήσιο ρυθμό 7% κατά τη περίοδο 2007 με 2021, ενώ προβλέπεται να φτάσει τα 6 εκατομμύρια τόνους παραγωγής μέχρι και το 2025 (Ciriminna R *et al.*, 2014). Τα μεγάλα αυτά ποσά του παραπροϊόντος αναγεννούν σημαντικά προβλήματα, ένα από αυτά να είναι η αδυναμία διάθεσης των παραγόμενων ποσοτήτων, με επακόλουθο την απόρριψή της, που έχει δυσμενές οικονομικό και περιβαλλοντικό αντίκτυπο. Κατά την παραγωγή βιοντίζελ, η απομονωμένη φάση της γλυκερόλης που αποτελεί παραπροϊόν της διεργασίας, περιλαμβάνει και άλλα στοιχεία εκτός της γλυκερόλης, όπως μεθανόλη, μονο- και διακυλογλυκερόλες, λιπαρά οξέα και σάπωνες.

Εξαιτίας, λοιπόν των προσμίξεων που περιέχονται στην ακάθαρτη φάση της γλυκερόλης, έρχεται τελευταία σε προτίμηση συγκριτικά με τη καθαρή γλυκερόλη και το ευρύ φάσμα εφαρμογών της. Περίπου 200 με 300 τόνοι αυτής της ακάθαρτης φάσης παράγονται κάθε χρόνο, με μεγάλο κόστος για τη βιομηχανία, προκειμένου να προχωρήσει στον καθαρισμό της.

Επιπρόσθετο κόστος αποτελεί ακόμη και η μεταφορά και εναπόθεσή της σε εγκαταστάσεις ΧΥΤΑ, λόγω της μεγάλης ποσότητας, με αποτέλεσμα να επιβαρύνεται και το περιβάλλον. Το αυξανόμενο κόστος που καλούνται να διαχειριστούν οι βιομηχανίες για την επεξεργασία του παραπροϊόντος αυτού αποβαίνει ασύμφορο συγκριτικά με τη τιμή της καθαρής γλυκερόλης (Drożdżyńska A *et al.*, 2011; Ju J-H *et al.*, 2021). Το 2003, εξαιτίας της τεράστιας συσσώρευσης γλυκερόλης, είχε ως επακόλουθο τη μείωση με τον καιρό τόσο της τιμής της καθαρής όσο και της ακάθαρτης γλυκερόλης. Πιο συγκεκριμένα, η τιμή της ραφιναρισμένης γλυκερόλης μειώθηκε από τα 4000 ευρώ ανά παραγόμενο τόνο, το 2000, σε 450 ευρώ ανά παραγόμενο τόνο στις αρχές του 2010, ενώ η τιμή της ακάθαρτης γλυκερόλης είχε μηδενική αξία ανά παραγόμενο τόνο. Συνεπώς η γλυκερόλη αποτέλεσε ένα προϊόν χωρίς οικονομική αξία (Ciriminna R *et al.*, 2014). Ένας τρόπος λύσης αυτού του προβλήματος είναι η επαναχρησιμοποίηση της γλυκερόλης ως πηγή άνθρακα σε θρεπτικό υλικό για τη μικροβιακή αύξηση και τη συνεπακόλουθη παραγωγή μεταβολικών προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας, μέσω ζύμωσης, όπως η 1,3-προπανοδιόλη (Drożdżyńska A *et al.*, 2011).

1.1. Η ΕΝΝΟΙΑ ΤΟΥ ΒΙΟΝΤΙΖΕΛ

Το Βιολογικό Πετρέλαιο (βιοντίζελ) χρησιμοποιείται σε κινητήρες ντίζελ αυτοκινήτων, φορτηγών, λεωφορείων και άλλων οχημάτων, καθώς και σε σταθερές μηχανές εσωτερικής καύσης για παραγωγή θερμότητας. Συνήθως το μεγαλύτερο μέρος του βιοντίζελ παρασκευάζεται με χημική επεξεργασία χρησιμοποιημένων φυτικών ελαίων και ζωικών λιπών, προς παραγωγή μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων (FAME). Τα μαγειρικά επεξεργασμένα έλαια αποτελούν ρύπους που μολύνουν το περιβάλλον και για αυτό το λόγο είναι πολύ σημαντική η επαναχρησιμοποίησή τους. Πριν την χρήση των ελαίων, θα πρέπει να γίνει ραφινάρισμα και φιλτράρισμα αυτών, ώστε να προχωρήσουν στη διαδικασία παρασκευής βιοντίζελ (REN21, 2021). Η ελαιούχος πρώτη ύλη είναι απαραίτητο να πληροί ορισμένες προϋποθέσεις προκειμένου να μετατραπεί σε βιοντίζελ, συνεπώς η περιεκτικότητα σε υγρασία δεν θα πρέπει να ξεπερνά το 0,05% κ.β. και η περιεκτικότητα σε ελεύθερα λιπαρά οξέα να μη ξεπερνά το 0,5% κ.β.

Για αυτό το λόγο οι όξινες ελαιούχες ύλες αναμειγνύονται με μεθανολικό διάλυμα και έτσι μειώνονται τα επίπεδα οξύτητας κάτω από 0,5%. Η αντίδραση σύνθεσης του βιοντίζελ είναι η αντίδραση μετεστεροποίησης των λιπαρών οξέων ή αλλιώς αλκοόλυση και γίνεται με την ανάμειξη των παραπάνω βρώσιμων ή μη λιπών και ελαίων με κάποια αλκοόλη, συνήθως τη μεθανόλη και έναν καταλύτη. Ως καταλύτες, χρησιμοποιούνται κυρίως ισχυρές βάσεις, όπως υδροξείδιο του νατρίου (NaOH), υδροξείδιο του καλίου (KOH), μονοξείδιο του νατρίου (CH₃ONa) κ.α. Επίσης, σπανιότερα γίνεται χρήση και όξινων καταλυτών, είτε μεμονωμένα, είτε σε συνδυασμό με τους βασικούς καταλύτες, όπως είναι το πυκνό θεικό οξύ (H₂SO₄), καθώς αποτρέπουν τη παραγωγή σαπώνων. Ωστόσο, τα μειονεκτήματα της χρήσης τους, είναι πως η αντίδρασή τους ολοκληρώνεται πολύ πιο αργά (≈50 ώρες) συγκριτικά με τους αλκαλικούς καταλύτες (≈1 ώρα) και εξαιτίας του όξινου χαρακτήρα τους δημιουργούν διάβρωση στον μηχανολογικό εξοπλισμό. Το είδος του καταλύτη είναι πολύ σημαντικό να λαμβάνεται υπόψη, καθώς είναι καθοριστικός παράγοντας για την επιλογή των πρώτων υλών. Η μεθανόλη που χρησιμοποιείται στη διαδικασία αποτελεί παραπροϊόν της διύλισης πετρελαίου και είναι ένα υλικό αρκετά επικίνδυνο, τοξικό και εύφλεκτο, συνεπώς η επεξεργασία του για τη παραγωγή του βιοντίζελ γίνεται σε ειδικά κατασκευασμένα εργοστάσια, ώστε να ελέγχεται η οποιαδήποτε πιθανή ανάφλεξη που μπορεί να προκληθεί. Άλλες αλκοόλες, κατάλληλες για την αντίδραση είναι η αιθανόλη, η προπανόλη και η βουτανόλη. Η επιλογή της μεθανόλης συγκριτικά με τις άλλες αλκοόλες είναι το χαμηλό της κόστος και τα χημικά και φυσικά της πλεονεκτήματα (Kumar N *et al.*, 2017).

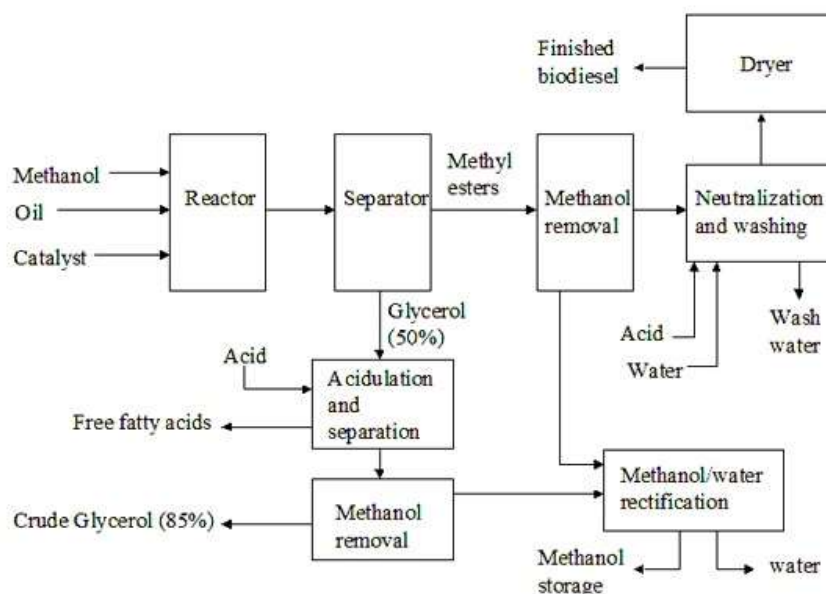
1.2. ΣΤΑΔΙΑ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΤΙΚΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ ΣΕ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗ ΚΛΙΜΑΚΑ

1.2.1. ΔΙΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕΤΕΣΤΕΡΟΠΟΙΗΣΗΣ

Η μετεστεροποίηση ή αλκοόλυση αποτελεί μία από τις επεξεργασίες των τριγλυκεριδίων που περιέχονται στο έλαιο για τη παρασκευή του βιοντίζελ. Στη διαδικασία γίνονται τρεις διαδοχικές αντιδράσεις, όπου αντιδρά ο τριεστέρας της γλυκερόλης (τριγλυκερίδιο) με τρεις αλκοόλες, παράγοντας ένα μίγμα εστέρων αλκοόλης με τα λιπαρά οξέα του τριεστέρα. Αρχικά η αλκοόλη μεταβιβάζει το υδρογόνο της στη θέση 3 του τριγλυκεριδίου, αντικαθιστώντας το ακύλιο που βρίσκεται στη θέση αυτή. Με την αλλαγή αυτή παράγεται ένας αλκυλεστέρας λιπαρού οξέος και ένα διγλυκερίδιο. Σε επόμενο στάδιο η δεύτερη αλκοόλη μεταβιβάζει το υδρογόνο της στη θέση 2 του διγλυκεριδίου και με αντίστοιχο τρόπο παράγεται ένας δεύτερος αλκυλεστέρας λιπαρού οξέος και ένα μονογλυκερίδιο. Η τρίτη αλκοόλη αντιδρά με το μονογλυκερίδιο, αποσπώντας του το τελευταίο ακύλιο της θέσης 1, σχηματίζοντας έναν τρίτο αλκυλεστέρα λιπαρού οξέος. Στο τέλος της αντίδρασης θα έχουν σχηματιστεί τρεις (3) αλκυλεστέρες λιπαρών οξέων και μια γλυκερόλη. Στο μίγμα αυτό οι αλκυλεστέρες των λιπαρών οξέων αποτελούν το βιοντίζελ και ως παραπροϊόν της διαδικασίας παραλαμβάνεται και η γλυκερόλη.

Η διαδικασία ορισμένες φορές χωρεί σε δύο στάδια, όπου σε πρώτη φάση μεταφέρεται το λάδι με ειδικές αντλίες από τις δεξαμενές αποθήκευσης του, σε ειδικό σταθερό αναδευτήρα, όπου αναμειγνύεται με 80% αλκοόλη και καταλύτη και αφήνονται να θερμανθούν για περίπου μια ώρα σε θερμοκρασία 60-64 °C, ώστε να επιτευχθεί η διαδικασία μετεστεροποίησης. Σε μικρές εγκαταστάσεις οι αντιδραστήρες που χρησιμοποιούνται είναι συνήθως κλειστού τύπου Batch, ενώ οι μεγαλύτερες χρησιμοποιούν συνεχούς τύπου βιοαντιδραστήρες με χωρητικότητα μεγαλύτερη των 4^{ων} εκατομμυρίων λίτρων το χρόνο, σε συνδυασμό με συνεχούς τύπου αντιδραστήρες ανάδευσης (CSTR: Continuous Stirred Tank Reactor). Σε δεύτερη φάση, το όλον που έχει αντιδράσει, απομακρύνεται από το πρώτο αναδευτήρα για να περάσει από το στάδιο αφαίρεσης της ακάθαρτης γλυκερόλης, πριν εισέλθει σε ένα δεύτερο συνεχή αναδευτήρα.

Το υπόλοιπο 20% της αλκοόλης και του καταλύτη προστίθεται στο δεύτερο αναδευτήρα, μειώνοντας έτσι τη ποσότητα χρησιμοποιούμενης αλκοόλης και καταλύτη συγκριτικά με τα συστήματα ενός σταδίου (Εικ.1).

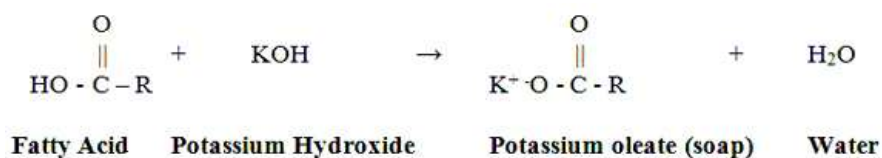


Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση διεργασίας παραγωγής βιοντίζελ σε βιομηχανική κλίμακα. Πηγή: Van Gerpen J, 2019

1.2.2. ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΑΛΚΟΟΛΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΚΤΗΣΗ ΒΙΟΝΤΙΖΕΛ

Μετά το διαχωρισμό της ακάθαρτης γλυκερόλης, που αναλύεται στο επόμενο στάδιο παρακάτω, το ρεύμα συνεχίζει προς αφαίρεση της αλκοόλης, όπου περνά από ειδικό εξοπλισμό καθαρισμού (alcohol stripper), με διαδικασία απόσταξης. Το καθαρό από αλκοόλη ρεύμα στη συνέχεια προχωρά προς εξουδετέρωση του υπολειμματικού βασικού καταλύτη με τη προσθήκη οργανικού ή ανόργανου οξέος, βοηθώντας και στη διάλυση τυχόν σχηματισμένων σαπώνων που μπορεί να έχουν προκληθεί κατά τη διάρκεια της αντίδρασης (Εικ.2). Η αντίδραση του οξέος με τους σάπωνες θα προκαλέσει το σχηματισμό υδατοδιαλυτών αλάτων και ελεύθερων λιπαρών οξέων, όπου στη συνέχεια με τη έκπλυση τα άλατα, ο υπολειμματικός καταλύτης, οι σάπωνες, η αλκοόλη και η γλυκερόλη που μπορεί να έχουν παραμείνει, θα αφαιρεθούν και θα απομείνουν τα ελεύθερα λιπαρά οξέα. Η διαδικασία εξουδετέρωσης με τη προσθήκη οξέος πριν την έκπλυση, μειώνει την απαιτούμενη ποσότητα νερού και τη δυνατότητα σχηματισμού γαλακτωμάτων στο βιοντίζελ. Τέλος το βιοντίζελ θα περάσει από εξατμιστήρα, ώστε να απομακρυνθεί το υπόλοιπο νερό.

Τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιούνται διαδικασίες έκπλυσης χωρίς τη προσθήκη νερού, μειώνοντας τη διάρκεια τελικής επεξεργασίας και διάθεσης λυμάτων. Μόλις το βιοντίζελ πάρει τη τελική του μορφή, εμπλουτίζεται με πρόσθετα και βελτιωτικά για τη μείωση των εκπομπών αερίων, καθώς και απαραίτητα συστατικά για τη σωστή λειτουργία των μηχανών, προσδίδοντας οικονομία στο καύσιμο.



Εικόνα 2: Σαπωνοποίηση. Πηγή: Van Gerpen, J, 2019

1.2.3. ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΚΑΘΑΡΤΗΣ ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ

Ύστερα από την αντίδραση μετεστεροποίησης, σχηματίζονται δύο ευκρινείς φάσεις στο υγρό, όπου η πάνω φάση αποτελεί το βιοντίζελ και η κάτω φάση την ακάθαρτη γλυκερόλη. Εξαιτίας της χαμηλής διαλυτότητας της γλυκερόλης στους εστέρες ο διαχωρισμός γίνεται γρήγορα και επιτυγχάνεται είτε σε δεξαμενές καθίζησης, είτε με φυγοκέντριση, ωστόσο η περίσσεια αλκοόλης μπορεί να επιβραδύνει τη διαδικασία διαχωρισμού, αφού δρα ως διαλυτοποιητής. Έχοντας, λοιπόν, διαχωριστεί η ακάθαρτη γλυκερόλη από τους αλκυλεστέρες, ένα νέο ρεύμα προχωρά προς την απομάκρυνση της καθιζάνουσας γλυκερόλης από το υγρό και τον καθαρισμό της από την αλκοόλη. Επειδή η αντίδραση μετεστεροποίησης είναι αναστρέψιμη και υπάρχει περίπτωση ανασυνδυασμού της γλυκερόλης με τους αλκυλεστέρες προς σχηματισμό μονογλυκεριδίων, η αλκοόλη απομακρύνεται σε επόμενο στάδιο, στο οποίο έχει απομακρυνθεί η γλυκερόλη από το ρεύμα αντίδρασης.

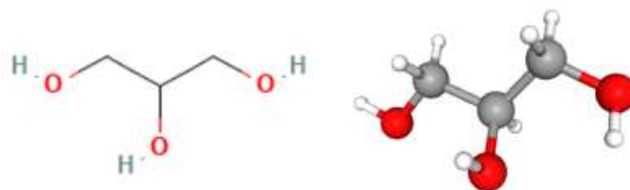
Στο ρεύμα της διαχωρισμένης ακάθαρτης γλυκερόλης υπάρχει 50% γλυκερόλη, ενώ το υπόλοιπο υγρό αποτελείται από αλκοόλη, καταλύτη και σχηματισμένους σάπωνες. Για τον καθαρισμό της γλυκερόλης, χρησιμοποιείται κάποιο οξύ, ώστε να διαχωριστούν οι σάπωνες σε άλατα και ελεύθερα λιπαρά οξέα. Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα απομακρύνονται εύκολα, καθώς έχουν ανέλθει στην επιφάνεια και στη συνέχεια ανακυκλώνονται, ενώ τα άλατα είναι πιο δύσκολο να αφαιρεθούν.

Συνήθως, εάν δεν καταβυθιστούν με προσθήκη κροκιδωτικών, γίνεται ανάμειξη κάποιου καταλύτη, συνήθως υδροξειδίου του καλίου (ΚΟΗ), και φωσφορικού οξέος (H_3PO_4) για εξουδετέρωση της αντίδρασης, ώστε να αντιδράσουν με τα άλατα και να σχηματιστεί φωσφορικό κάλιο (K_3PO_4). Το φωσφορικό κάλιο (K_3PO_4) μπορεί να χρησιμοποιηθεί περαιτέρω ως λίπασμα. Σε επόμενο στάδιο διαχωρίζεται η αλκοόλη με διαδικασία εξάτμισης και η γλυκερόλη που λαμβάνεται έχει καθαρότητα περίπου 85%. Για να καθαριστεί επιπλέον, πωλείται συνήθως σε ξεχωριστή μονάδα διύλισης, όπου μετά τη διαδικασία εξευγενισμού της, με διεργασίες απόσταξης ή ανταλλαγής ιόντων, αποκτά καθαρότητα έως και 99,5 με 99,7%.

1.2.4. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΑΛΚΟΟΛΗΣ

Η αλκοόλη που απομακρύνεται από τα ρεύματα διαχωρισμού βιοντίζελ και γλυκερόλης, συλλέγει αναπόφευκτα και περίσσιο νερό κατά την επεξεργασία. Το νερό αυτό θα πρέπει ωστόσο να αφαιρεθεί από την αλκοόλη, καθώς εκείνη εξαιτίας του μεγάλου της κόστους θα επαναχρησιμοποιηθεί στην αντίδραση. Αυτό θα επιτευχθεί με διέλευση του μίγματος από στήλη απόσταξης, όπου και διαχωρίζεται η αλκοόλη, ενώ στη συνέχεια περνά από μοριακό κόσκινο για την απομάκρυνση της περίσσιας υγρασίας (Van Gerpen, J, 2019).

1.3. ΓΛΥΚΕΡΟΛΗ



Εικόνα 3: Απεικόνιση Χημικής Δομής της τρισθενούς αλκοόλης, γλυκερόλη. Πηγή: NCBI, 2022(a)

Η γλυκερόλη ή διαφορετικά Γλυκερίνη ή 1,2,3-Προπανοτριόλη, είναι μια ουσία με μοριακό τύπο $C_3H_8O_3$ και σχετική μοριακή μάζα 92.094 g/mol (Εικ.3). Πρόκειται για ουσία ημίρρευστη σε κανονική θερμοκρασία, με σημείο τήξης τους 18,2 °C, ενώ χαμηλότερα από τη θερμοκρασία αυτή βρίσκεται σε κατάσταση ιξώδους μορφής. Επίσης έχει σημείο ζέσεως στους 290 °C, όπου και παρατηρείται ταυτόχρονη αποσύνθεση. Χαρακτηρίζεται ως μια αλκοόλη με τρεις υδροξυλομάδες, οι οποίες της προσδίδουν υγροσκοπική φύση και είναι αναμίξιμη σε όλες τις αναλογίες με το νερό. Σε κανονικές συνθήκες είναι άχρωμη, άοσμη και παχύρρευστη, με γλυκιά γεύση. Μεγάλοι όγκοι υπολειμματικής γλυκερόλης έχουν δημιουργηθεί τις τελευταίες δεκαετίες από την παραγωγή βιοντίζελ παγκοσμίως, μέσω προϊόντων αντίδρασης μετεστεροποίησης. Η εμπορική παραγωγή γλυκερόλης μπορεί, επίσης να πραγματοποιηθεί βιολογικά, με μικροβιακή ζύμωση ή με χημική σύνθεση πετροχημικών. Επιπλέον, μπορεί να ληφθεί κατά τη διεργασία σαπωνοποίησης και ως υποπροϊόν της υδρόλυσης λίπους. Από τις παραπάνω διαδικασίες προκύπτει ως ακατέργαστη βιομηχανική γλυκερόλη σε ποσοστό καθαρότητας 70 με 80 %. Τέλος, αφού συλλεχτεί καθαρίζεται μέχρι και 99 %, μέσω διαδοχικών σταδίων ραφινάριατος (Tan HW *et al.*, 2013).

1.3.1. ΧΡΗΣΕΙΣ ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ

Η καθαρή μορφή της γλυκερόλης χρησιμοποιείται για την παραγωγή νιτρογλυκερίνης η οποία είναι συστατικό της πυρίτιδας και των εκρηκτικών υλικών, ενώ η περαιτέρω τροποποίηση της σχετίζεται με εκλεκτική εστεροποίηση λιπαρών οξέων, ώστε να παραχθούν εστέρες γλυκερόλης για χρήση ως γαλακτωματοποιητές ή ως μη ιοντικά επιφανειοδραστικά απορρυπαντικά. Εξαιτίας των αντιμικροβιακών και αντιϊκών ιδιοτήτων της χρησιμοποιείται ευρέως για τη θεραπεία πληγών και εγκαυμάτων.

Επίσης, επειδή είναι ουσία λιγότερο ακριβή, χρησιμοποιείται συχνά στη βιομηχανία τροφίμων και φαρμάκων ως γλυκαντικό χαμηλού γλυκαιμικού δείκτη, αντικαθιστώντας τη σορβιτόλη και τη προπυλενογλυκόλη και ως ουσία που διατηρεί των υγρασία φαρμακευτικών σκευασμάτων αντίστοιχα, καθώς λόγω της παρουσίας τριών υδροξυλομάδων, γίνεται εύκολα αναμίξιμη με το νερό. Συνεπώς χρησιμοποιείται από πολλούς κατασκευαστές δημητριακών και αποξηραμένων φρούτων, εξαιτίας της ικανότητάς της να ενισχύει τη διάρκεια ζωής των προϊόντων (αποτρέποντας την απώλεια υγρασίας, διατηρώντας την υφή των προϊόντων διατροφής, αυξάνοντας την υγρασία στα δημητριακά, τις σταφίδες και τα αποξηραμένα φρούτα). Τέλος έχει δειχθεί πως χρησιμοποιείται και στην παρασκευή αντισηπτικών (Ciriminna R *et al.*, 2014).

1.3.2. ΑΚΑΘΑΡΤΗ ΓΛΥΚΕΡΟΛΗ

Η βιομετατροπή της ακατέργαστης γλυκερόλης, η οποία λαμβάνεται από τη παραγωγή βιοντίζελ συνιστάται για τη χρήση της ως υπόστρωμα μικροβιακής καλλιέργειας, λόγω της αφθονίας της ως παραπροϊόν της επεξεργασίας βιοντίζελ, του χαμηλού της κόστους, αλλά και του άμεσου οφέλους της, καθώς επαναχρησιμοποιείται και δεν αποτελεί πλέον απόβλητο που θα μόλυνε το περιβάλλον. Επίσης συγκριτικά με άλλα υποστρώματα, ακριβότερα, όπως η γλυκόζη, δίνει τη δυνατότητα για παραγωγή βιοαποικοδομήσιμων πολυμερών, συνεπώς εκτός από το όφελος στο περιβάλλον, προωθεί και τη χρήση βιοντίζελ, μειώνοντας την εξάρτηση από το πετρέλαιο. Ένα ενδιαφέρον παράδειγμα αξιοποίησης της ακάθαρτης γλυκερόλης είναι η παραγωγή του πολυτριμεθυλοτερεφθαλικού εστέρα (polytrimethylene terephthalate / PTT) (Drożdżyńska A *et al.*, 2011).

1.4. 1,3-ΠΡΟΠΑΝΟΔΙΟΛΗ (1,3-PDO)



Εικόνα 4: Απεικόνιση χημικής δομής της 1,3-προπανοδιόλης. Πηγή: NCBI, 2022(b)

Είναι γνωστή και με την ονομασία τριμεθυλο-γλυκόλη, 1,3-διυδροξυ-προπάνιο ή προπανιο-1,3-διόλη. Ο μοριακός της τύπος είναι $C_3H_8O_2$ και η σχετική μοριακή μάζα 76,09 g/mol (Εικ.4). Το σημείο βρασμού της είναι 210-212 °C και σημείο τήξης -28°C (Drożdżyńska A *et al.*, 2011).

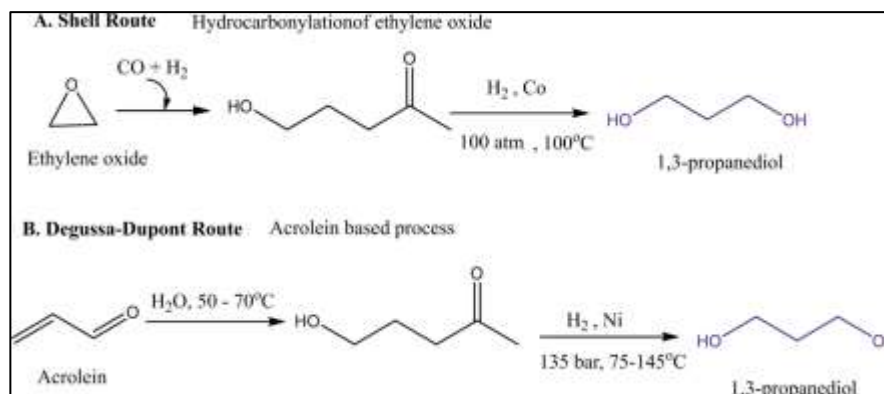
Είναι ένα μη εύφλεκτο, χαμηλής τοξικότητας, παχύρευστο υγρό, το οποίο μπορεί να αναμιχθεί με το νερό, την αλκοόλη και τον αιθέρα (Kaur G *et al.*, 2012). Αποτελεί ένα από τα πιο ευρέως μελετημένα προϊόντα προστιθέμενης αξίας που μπορεί να παρασκευαστεί μέσω μηχανισμών ζύμωσης γλυκερόλης από βακτήρια. Χρησιμοποιείται από τις βιομηχανίες ως ενδιάμεσο για την παραγωγή πολυμερών από πετροχημικές ενώσεις, ενώ η κύρια εφαρμογή του είναι για την παραγωγή πολυτριμεθυλο-τερεφθαλικού εστέρα (polytrimethylene terephthalate, PTT), που προκύπτει από τη συμπύκνωση ή μετεστεροποίηση των πολυμερών, από τα μονομερή που είναι η 1,3-προπανοδιόλη και το τερεφθαλικό οξύ. Η χρήση του PTT στις βιομηχανίες είναι κυρίως ως ίνες χαλιών, ενώ από τη χρήση της 1,3-προπανοδιόλης παράγεται και η πολυουρεθάνη (polyurethane, PU). Η παραγωγή τέτοιων πολυμερών με τη χρήση βιολογικών τεχνικών έχει έναν αριθμό πλεονεκτημάτων έναντι κλασικών χημικών τεχνικών. Έχει αποδειχθεί πως οι εκπομπές αερίων θερμοκηπίου στη παραγωγή βιο-1,3-προπανοδιόλης, είναι πολύ μικρότερες συγκριτικά με τη πετροχημική του εκδοχή. Ένα ακόμη προτέρημα είναι πως η ανακύκλωση του PTT πραγματοποιείται ευκολότερα, εξαιτίας της απουσίας βαρέων μετάλλων στο προϊόν συγκριτικά με το PET και το Nylon (Drożdżyńska A *et al.*, 2011)

Σταδιακά παρατηρείται μια αλλαγή στη προτίμηση των καταναλωτών για προϊόντα που βασίζονται σε βιολογικές πηγές σε όλο τον κόσμο. Η αυξανόμενη ευαισθητοποίηση των καταναλωτών, οι αυστηρότεροι κυβερνητικοί κανονισμοί και η εξάντληση των συμβατικών πηγών, έχουν ωθήσει τις εταιρείες να καινοτομούν και να εμπορεύονται πιο βιώσιμα προϊόντα.

Η 1,3-προπανοδιόλη είναι ένα τέτοιο βιοχημικό που εκτιμάται ότι θα έχει μεγάλη ζήτηση τα επόμενα χρόνια. Σύμφωνα με μελέτες η παγκόσμια αγορά της 1,3-προπανοδιόλης προβλέπεται να φτάσει τα 690,6 εκατομμύρια δολάρια έως και το 2025, όταν το 2020 η αγορά της είχε ήδη φτάσει τα 401,7 εκατομμύρια δολάρια. Η Αμερική αποτελεί τη μεγαλύτερη, μέχρι σήμερα, αγορά για την 1,3-προπανοδιόλη, ενώ ακολουθούν η Ασία-Ειρηνικός, Ευρώπη, Μέση Ανατολή και η Αφρική (Market Research Report, 2020).

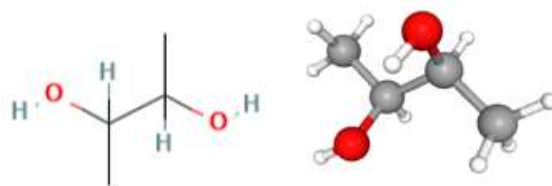
Η 1,3-προπανοδιόλη έχει πολλές άλλες βιομηχανικές χρήσεις, ως διαλύτης, συστατικό σε βαφές και κόλλες, επιστρώσεις, πολυστρωματικά υλικά, προϊόντα προσωπικής φροντίδας κ.α. Βιολογικά μπορεί να παραχθεί, όπως έχει δείχθει μέχρι σήμερα, με τη χρήση γλυκερόλης ως υπόστρωμα από φυσικά βακτήρια, όπως *Klebsiella* sp., *Citrobacter* sp., *Clostridium* sp., *Lactobacillus* sp., υπό αναερόβιες κυρίως συνθήκες, αν και πλέον η παραγωγή της μπορεί να γίνει και μέσω αερόβιας ζύμωσης (Du C & Webb C, 2011; Jolly J *et al.*, 2014; Maervoet V *et al.*, 2014; Oh BR *et al.*, 2018; Papanikolaou S *et al.*, 2004). Ωστόσο, έχει δείχθει και η παραγωγή της από γλυκόζη μέσω αερόβιας ζύμωσης από γενετικά τροποποιημένα βακτηρία *E. Coli* (Eriksen DT *et al.*, 2013).

Η χημική της σύνθεση προκύπτει από τη χρήση δύο μεθόδων (Εικ.5). Η πρώτη βασίζεται στην επεξεργασία του οξειδίου του αιθυλενίου (ethylene oxide) ως πρώτη ύλη, που εφαρμόστηκε αρχικά από την εταιρία «Shell», και περιλαμβάνει δύο στάδια υδροφορμυλίωσης του οξειδίου του αιθυλενίου σε 3-υδροξυπροπιοναλδεΐδη (3-HPA) και την επακόλουθη υδρογόνωσή του σε 1,3-προπανοδιόλη (1,3-PDO). Η δεύτερη μέθοδος ανήκει στην εταιρία «Degussa-DuPont», βασισμένη στην ακρολεΐνη (acrolein) ως πρώτη ύλη, η οποία αρχικά δέχεται ενυδάτωση για τη παραγωγή της 3-HPA και στη συνέχεια υδρογονώνεται περαιτέρω για να παραχθεί η 1,3-PDO. Ωστόσο, η χρήση των συγκεκριμένων μεθόδων αποτελεί μειονέκτημα από οικονομικής και περιβαλλοντικής πλευράς, καθώς οι τεχνικές υψηλής πίεσης και θερμοκρασίας που χρειάζονται για να επιτευχθούν οι παραπάνω χημικές επεξεργασίες, είναι οικονομικά ασύμφωρες και επιβαρύνουν το περιβάλλον (Kraus G, 2008).



Εικόνα 5: Παραδοσιακές συνθετικές μέθοδοι για την παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης. Πηγή: Kraus G, 2008

1.5. 2,3-ΒΟΥΤΑΝΟΔΙΟΛΗ (2,3-BDO)



Εικόνα 6: Απεικόνιση Χημικής Δομής της 2,3-βουτανοδιόλης. Πηγή: NCBI, 2022(c)

Η 2,3-βουτανοδιόλη, ή διαφορετικά βουτάνιο-2,3-διόλη είναι μια διόλη, με τέσσερα (4) άτομα άνθρακα και υδροξυλομάδες στις θέσεις 2 και 3. Έχει μοριακό τύπο $C_4H_{10}O_2$ και σχετική μοριακή μάζα 90.12 g/mol (Εικ.6). Μπορεί να χαρακτηριστεί ως μια χημική ένωση, με πολλά πλεονεκτήματα στη χρήση της, καθώς είναι ένα από τα υποσχόμενα μελλοντικά βιομηχανικά προϊόντα. Ιστορικά η μικροβιακή παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης ξεκινά με τη μελέτη της, μέσω βακτηριακών ζυμώσεων και τη χρήση του *Klebsiella pneumoniae*, το 1906 από τους Harden και Walpole μέχρι και το 1912 από τους Harden και Norris. Αργότερα το 1926 εξετάστηκε η απομόνωσή της από το βακτήριο *Paenibacillus polymyxin* (Magee R *et al.*, 1987). Ο πρωταρχικός σκοπός της εξεύρεσης και η περαιτέρω μελέτη των ιδιοτήτων της 2,3-βουτανοδιόλης, καταγράφεται στη περίοδο του 2^{ου} Παγκοσμίου Πολέμου. Πολλά από τα εμπόλεμα έθνη, θέλοντας να ανεξαρτητοποιηθούν από τις ελεγχόμενες από τη Βρετανική αυτοκρατορία, φυτείες καουτσούκ, αναζήτησαν άλλα πετροχημικά υλικά τα οποία να μπορούν να συνθέσουν τεχνητό καουτσούκ. Η απάντηση στη μελέτη αυτή ήταν το 1,3-βουταδιένιο ($(CH_2=CH)_2$), ένα οργανικό προϊόν το οποίο με πολυμερισμό καταλήγει στη παραγωγή συνθετικού καουτσούκ. Αργότερα, ωστόσο, όταν τα αποθέματα του 1,3-βουταδιένιου, άρχισαν να μειώνονται, στράφηκε η έρευνα στις δυνατότητες της 2,3-βουτανοδιόλης μέσω βακτηριακής ζύμωσης, με απώτερο σκοπό τη μετατροπή της σε 1,3-βουταδιένιο (Ji X-J *et al.*, 2011).

Σύμφωνα με μελέτες η παγκόσμια αγορά της 2,3-βουτανοδιόλης αποτιμήθηκε για το έτος 2019 στα 175 εκατομμύρια δολάρια, ενώ προβλέπεται να αυξηθεί μέχρι και το 2027 στα 225 εκατομμύρια δολάρια (MMR, 2022). Προς το παρόν παράγεται σε εμπορική κλίμακα με τη χρήση χημικών διεργασιών με βάση το πετρέλαιο κυρίως, από υδρόλυση του οξειδίου του 2,3-βουτάνιου, κάτω από απαιτητικές σε ηλεκτρική ενέργεια και θερμότητα συνθήκες (160-220 °C και 50 bar) (Gräfje H *et al.*, 2019). Επιπλέον οι διεργασίες αυτές παράγουν πολλά υποπροϊόντα, προκαλώντας επιπρόσθετο κόστος για τον καθαρισμό της 2,3-βουτανοδιόλης (Ge Y *et al.*, 2016).

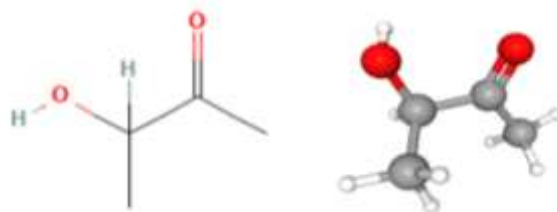
Λαμβάνοντας τα παραπάνω υπόψη, δόθηκε έναυσμα στην ανάπτυξη εναλλακτικών μεθόδων δημιουργίας της 2,3-βουτανοδιόλης, μέσω μικροβιακής παραγωγής, ώστε να αποτελεί μια πιο οικονομικά αποδοτική και φιλική προς το περιβάλλον διεργασία (Song CW *et al.*, 2019). Πρόσφατα, η μικροβιακή παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης έχει προσελκύσει μεγάλη προσοχή παγκοσμίως, ειδικά στις Ασιατικές χώρες, καθώς η ανανεώσιμη βιομάζα, αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη οδό για την ανάπτυξη μιας οικονομίας βασισμένης σε χαμηλές εκπομπές άνθρακα, καθώς και για ένα πιο βιώσιμο μέλλον (Li ZJ *et al.*, 2010).

Αρκετοί μικροοργανισμοί είναι σε θέση να συσσωρεύσουν 2,3-βουτανοδιόλη, ωστόσο λίγοι είναι εκείνοι που μπορούν να παραγάγουν σημαντικές ποσότητες για βιομηχανική χρήση. Τα είδη που σημειώνονται για την ικανότητα αυτή ανήκουν στα γένη *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Bacillus* και *Serratia* (Maddox IS, 1996). Αυτά τα βακτηριακά είδη έχουν τη δυνατότητα παράγοντας τη 2,3-βουτανοδιόλη να αποτρέψουν την ενδοκυτταρική οξίνιση (Tsau JL *et al.*, 1992), να ρυθμίσουν την ισοροπία NADH και NAD⁺, καθώς και να αποθηκεύσουν ενέργεια (Xiao Z, Xu P, 2007). Ο αποτρεπτικός, ωστόσο, παράγοντας που δυσχεραίνει την επιλογή της μικροβιακής παραγωγής της 2,3-βουτανοδιόλης σε βιομηχανική κλίμακα, είναι πως τα βακτήρια αυτά στη πλειοψηφία τους ταξινομούνται ως παθογόνα της Ομάδας κινδύνου 2 (παθογόνο για τον άνθρωπο) (Celińska E. & Grajek W, 2009). Εξαιρέση στη κατηγορία των παθογόνων αποτελούν τα βακτήρια *Klebsiella oxytoca* και *Bacillus* spp., καθώς είναι αναγνωρισμένα ως GRAS= Generally Recognized As Safe, ενώ μπορούν να αναπτυχθούν και να μεταβολίσουν διάφορα υποστρώματα για παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης (Park JM *et al.*, 2013).

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρώτη ύλη για ποικίλες εφαρμογές στον βιομηχανικό τομέα, όπως για κατασκευή μελανιών εκτύπωσης, αρωμάτων, μαλακτικών, υγραντικών, αντιψυκτικών, πρόσθετων σε φαρμακευτικά προϊόντα, υγρά καύσιμα και τρόφιμα (Liu X *et al.*, 2016). Η υψηλή θερμαντική του αξία και ικανότητά του να αυξάνει τον αριθμό οκτανίων των καυσίμων την καθιστούν ως ένα πολλά υποσχόμενο προσθετικό καύσιμο. Επίσης, μέσω ενυδάτωσής της, μπορεί να παραχθεί μεθυλαιθυλοκετόνη (MEK=methyl ethyl ketone), η οποία χρησιμοποιείται ως πρόσθετο καυσίμου και ως οργανικός διαλύτης για ρητίνες και βερνίκια (Haveren J *et al.*, 2008). Μετά από συνδυασμό με MEK και αντίδραση υδρογόνωσης, η 2,3-βουτανοδιόλη μπορεί να μετατραπεί σε οκτάνιο, το οποίο χρησιμοποιείται για τη παραγωγή υψηλής ποιότητας καυσίμου αεροσκαφών.

Εφαρμογή βρίσκει και στον τομέα της κοσμετολογίας, καθώς λειτουργεί ως συντηρητικό σε καλλυντικά, εξαιτίας των αντιβακτηριακών ιδιοτήτων της, κυρίως τα στερεοϊσομερή της 2,3-βουτανοδιόλης: (2R,3R)-βουτανοδιόλη και μεσο-βουτανοδιόλη, λόγω των φυσικοχημικών τους ιδιοτήτων (Baek HS *et al.*, 2016). Επιπρόσθετες χρήσεις έχει στον τομέα της γεωργίας, λόγω της επιβεβαιωμένης αποτελεσματικότητας για την προστασία των φυτών από καταστροφικά βακτήρια, μύκητες και ιογενείς λοιμώξεις (Kong HG *et al.*, 2018).

1.6. ΑΚΕΤΟΪΝΗ



Εικόνα 7: Απεικόνιση Χημικής Δομής της ακετοΐνης. Πηγή: NCBI, 2022(d)

Η ακετοΐνη ή αλλιώς 3-υδροξυ-2-βουτανόνη, είναι μια οργανική ένωση με μοριακό τύπο $C_4H_8O_2$ και μοριακή μάζα 88,11 g/mol. Είναι άχρωμο προς ωχροκίτρινο υγρό με άρωμα που προσομοιάζει με εκείνο της κρέμας και του βουτύρου. Επίσης έχει σημείο βρασμού στους 143 °C και σημείο τήξεως στους 15 °C (NCBI, 2022 (d)).

Αυτή η ένωση είναι υπεύθυνη για το άρωμα στις φράουλες, τις μπανάνες, τα σμέουρα, τη βανίλια, το βούτυρο, τη καρύδα και το καφέ, και ως εκ τούτου, χρησιμοποιείται ως πρόσθετο στη βιομηχανία τροφίμων, ως αρωματικό στα καλλυντικά και στα υγρά για τα ηλεκτρονικά τσιγάρα. Επίσης, εντοπίζεται στο καλαμπόκι, στο κακάο, στα μήλα, στα γαλακτοκομικά, στο κρέας κ.α. Επιπλέον η ακετοΐνη είναι μια ένωση υψηλής προστιθέμενης αξίας, της οποίας τα παράγωγα προϊόντα μπορούν να εφαρμοστούν στη φαρμακοβιομηχανία, κοσμετολογία, χημική βιομηχανία, βιομηχανία χρωμάτων κ.α. (Tian Y *et al.*, 2016).

Οι πωλήσεις στη παγκόσμια αγορά φυσικής ακετοΐνης αναμένεται να αυξηθούν σύμφωνα με τον ετήσιο μέσο ρυθμό αύξησης των εσόδων (CAGR: compound annual growth rate) σε ποσοστό 4% με 5% για τη περίοδο μεταξύ 2022 και 2032. Η αύξηση αυτή προκύπτει από τη χρήση τόσο της ίδιας της ακετοΐνης, όσο και των ενδιάμεσων ενώσεων που προκύπτουν, για τη σύνθεση σπάνιων φαρμάκων. Ένας ακόμη λόγος είναι η μεγαλύτερη έμφαση των βιομηχανιών τροφίμων και ποτών στη χρήση φυσικών συστατικών, ως πρόσθετα, σε επεξεργασμένα τρόφιμα, γαλακτοκομικά και προϊόντα αρτοποιίας, εξαιτίας της στροφής της προτίμησης των καταναλωτών σε έτοιμα γεύματα, λόγω του γρήγορου τρόπου ζωής και του αυξανόμενου εργαζόμενου πληθυσμού (FMI, 2019).

Ωστόσο, οι πρώτες ύλες για την εξαγωγή της ακετοΐνης, όπως το κακάο, το κρέας και άλλες, είναι ακριβές και δύσκολο να αποθηκευτούν. Επί του παρόντος, όπως και για τις προηγούμενες αναφερθείσες 1,3-προπανοδιόλη και 2,3-βουτανοδιόλη, έτσι και για την ακετοΐνη, η βιομηχανική της παραγωγή εξακολουθεί να βασίζεται σε χημική σύνθεση, χρησιμοποιώντας μη ανανεώσιμες πηγές ενέργειας, όπως είναι οι πετροχημικές πρώτες ύλες. Πλέον με τη σταδιακή εξάντληση των παγκόσμιων πετροχημικών πόρων, την επιδείνωση των περιβαλλοντικών προβλημάτων, αλλά και την ευαισθητοποίηση και ταυτόχρονη βελτίωση της ζήτησης των ανθρώπων για πιο βιώσιμα προϊόντα, έχει ξεκινήσει ήδη να ανατρέπεται η παραδοσιακή διαδικασία χημικής σύνθεσης. Εναλλακτικά η παραγωγή της ακετοΐνης μπορεί να γίνει με μικροβιακή ζύμωση, έχοντας ως βασικό πλεονέκτημα τη λήψη καθαρού φυσικού προϊόντος, με τη διαδικασία σύνθεσής της να συμβάλει στη μείωση ρύπανσης του περιβάλλοντος και κατανάλωσης ενέργειας.

Η σύνθεσή της προκύπτει από το μεταβολισμό της γλυκόζης ή άλλων πηγών άνθρακα μέσω της οδού EMP (Embden-Meyerhof pathway), διαδραματίζοντας ζωτικό ρόλο στη κυτταρική ανάπτυξη, συμπεριλαμβανομένης της αποφυγής της ενδοκυτταρικής οξίνισης του μέσου αύξησης, της ρύθμισης της ισορροπίας μεταξύ NADH και NAD, καθώς αποθηκεύεται και ως πηγή άνθρακα. Συνεπώς, το μεταβολικό μονοπάτι που λαμβάνει χώρα για τη βιοσύνθεσή της από τους μικροοργανισμούς ξεκινά μέσω του Πυροσταφυλικού που έχει συντεθεί από τη Γλυκολυτική οδό, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη κάποιο σάκχαρο, ενώ στη συνέχεια τα δύο μόρια Πυροσταφυλικού που έχουν παραχθεί μετασχηματίζονται σε α-ακετογαλακτικό και CO₂, μέσω της συνθάσης του α-ακετογαλακτικού (ASL, α-acetolactate synthase) και στη συνέχεια το α-ακετογαλακτικό μετατρέπεται σε ακετοΐνη, μέσω της ακετογαλακτικής αποκαρβοξυλάσης (ALDC, acetolactate decarboxylase) (Tian Y *et al.*, 2016).

Πολλά στελέχη είναι ικανά να μεταβολίζουν τη πηγή άνθρακα και να παραγάγουν ακετοΐνη, καθώς είναι ένας σημαντικός μεταβολίτης για τη βιωσιμότητα του κυττάρου. Ορισμένα από τα στελέχη αυτά είναι το *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Salmonella*, *Saccharomyces cerevisiae* κ.α. Ωστόσο λίγα είναι τα παραγωγικά στελέχη που είναι γνωστά ως καλοί παραγωγοί ακετοΐνης και αυτά είναι το *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter aerogenes*, *Paenibacillus polymyxa* και *Bacillus subtilis* (Xiao ZJ *et al.*, 2006).

Σε πρώτες μελέτες, η ακετοΐνη αναφέρεται ως ένα υποπροϊόν της παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης, όταν βιοσυντίθεται μικροβιακά. Πιο συγκεκριμένα, για το βακτήριο *Klebsiella pneumoniae* αναφέρεται παραγωγή 52,4 g/L 2,3-βουτανοδιόλης και 8,4 g/L ακετοΐνης όταν ο μικροοργανισμός καλλιεργήθηκε σε φιάλες, καταναλώνοντας 137 g/L γλυκόζη, ενώ σε ημι-συνεχείς συνθήκες παρήγαγε 92,4 g/L 2,3-βουτανοδιόλη και 13,1 g/L ακετοΐνη από 215 g/L γλυκόζη (Qin J *et al.*, 2006). Αντίστοιχες τιμές αναφέρονται για τα στελέχη *Klebsiella oxytoca* (Ji X-J *et al.*, 2009), *Serratia marcescens* (Zhang L *et al.*, 2010) κ.α. Σήμερα η παραγωγή της έχει προσελκύσει μεγαλύτερο ενδιαφέρον, με αποτέλεσμα να έχουν εντοπιστεί και απομονωθεί πιθανά στελέχη που να παράγουν την ένωση αυτή σε συγκεντρώσεις που να μπορούν να υποστηρίξουν τη παραγωγή βιομηχανικής κλίμακας (Tian Y *et al.*, 2016). Ένα από αυτά που αναφέρεται στη βιβλιογραφία είναι το στέλεχος *Bacillus subtilis* CICC 10025, το οποίο όταν καλλιεργήθηκε σε υπόστρωμα με πηγή αζώτου Εκχύλισμα Ζύμης και Βακτηριακή Πεπτόνη παρήγαγε $\approx 20,9$ g/L ακετοΐνη, χρησιμοποιώντας Σακχαρόζη ή Μελάσα ως πηγή άνθρακα (126 και 125,5 g/L αντίστοιχα), ενώ αντικαθιστώντας τα συστατικά αυτά με υδρόλυμα σογιαλεύρου (SMH, soybean meal hydrolysate) το ίδιο στέλεχος παρήγαγε 37,9 g/L σε αναδευόμενες φιάλες (Xiao ZJ *et al.*, 2006). Στη πειραματική μελέτη που πραγματοποίησαν οι Tian Y *et al.*, (2016), στην οποία χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *Bacillus subtilis* SF4-3, η συγκέντρωση της ακετοΐνης που καταγράφηκε ήταν 48,9 g/L και 5,5 g/L 2,3-βουτανοδιόλης, με 150 g/L γλυκόζη ως πηγή άνθρακα και ασυνεχείς συνθήκες καλλιέργειας σε 5 L βιοαντιδραστήρα. Η συγκέντρωση αυτή επιτεύχθηκε ύστερα από πολλές διαφοροποιήσεις σε συνθήκες ανάδευσης, μεταξύ των οποίων η αποτελεσματικότερη φάνηκε να είναι τα 300 rpm, συγκριτικά με χαμηλότερες και υψηλότερες στροφές ανάδευσης το λεπτό. Συνεπώς από τις παραπάνω πειραματικές βιβλιογραφικές αναφορές, γίνεται αντιληπτό πως για την επιτυχή παραγωγή και αύξηση σε υψηλές συγκεντρώσεις ακετοΐνης, θα πρέπει να συμπεριληφθούν υπόψη, τόσο η ποιότητα όσο και ο ποσότητα της πηγής άνθρακα και αζώτου που θα χρησιμοποιηθούν, καθώς οι μικρές ποσότητες καταναλώνονται άμεσα και στη συνέχεια στρέφεται ο μικροοργανισμός προς τη κατανάλωση των μεταβολικών του προϊόντων, όπως είναι η ακετοΐνη. Επίσης οι συνθήκες καλλιέργειας διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο, καθώς οι ταχύτητες ανάδευσης όταν εφαρμόζονται σε υψηλές στροφές, δημιουργούν υψηλό διαλυτό οξυγόνο, προκαλώντας ενισχυμένη αερόβια αναπνοή, κατά την οποία ο μικροοργανισμός χρησιμοποιεί τα NAD μέσω της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων και μετατρέπει τη παραχθείσα 2,3-βουτανοδιόλη σε ακετοΐνη.

1.7. *Citrobacter freundii*

Από το 1881 ο Freund είχε παρατηρήσει τη μετατροπή της γλυκερόλης σε 1,3-προπανοδιόλη. Αργότερα το 1928, παρουσιάστηκαν δύο στελέχη βακτηρίων από τον Braak ικανά να μεταβολίζουν τη γλυκερόλη παράγοντας 1,3-προπανοδιόλη και προς τιμήν του Freund τα στελέχη αυτά ορίστηκαν ως *Bacterium freundii*. Ένα από τα στελέχη αργότερα ονομάστηκε ως *Citrobacter freundii* από τους Werkman και Gillen, το 1932, εξαιτίας της ικανότητάς του να μεταβολίζει κιτρικά και να ζυμώνει τη λακτόζη, με την ονομασία αυτή να καθιερώνεται επιστημονικά το 1958 από τη Διεθνή Υποεπιτροπή Ταξινόμησης των Εντεροβακτηρίων. Τα μέλη του γένους *Citrobacter* είναι Gram-αρνητικά βακτήρια, μη σποριογόνα και ραβδόμορφα. Ταξινομούνται στην οικογένεια *Enterobacteriaceae* και βάση της ονοματολογίας τους μπορούν και χρησιμοποιούν το κιτρικό άλας ως μοναδική πηγή άνθρακα για να αναπτυχθούν. Ανήκουν στα προαιρετικά αναερόβια, με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης μεταξύ 30 και 37 °C, ενώ ύστερα από 24 ώρες ανάπτυξης, οι αποικίες που έχουν σχηματίσει, έχουν διάμετρο 2 με 3 mm. Επίσης τα κύτταρά τους είναι κινητά μέσω περιτριχοειδών μαστιγίων. Τα βακτήρια του γένους *Citrobacter* μπορούν να ζυμώνουν τη γλυκόζη και άλλους υδατάνθρακες με τη παραγωγή οξέος και αερίου (Borenshtein D & Schauer DB, 2006).

1.7.1. Τοξικότητα και χρήσεις του *Citrobacter freundii*

Σπάνια απομονώνονται από τα κόπρανα και περιστασιακά προκαλούν λοιμώξεις σε ανθρώπους και ζώα, ωστόσο το *Citrobacter freundii* sp., όπως και το *Citrobacter koseri* θεωρούνται ευκαιριακά παθογόνα και όπως τα περισσότερα του είδους τους, έχουν βρεθεί σε ούρα, αίμα και πληγές. Θεωρούνται ως κοινοί κάτοικοι του εντέρου ανθρώπων και ζώων και πιθανόν επειδή βρίσκονται εκεί να περάσουν στα κόπρανα και με την αποβολή τους στο περιβάλλον, να απομονωθούν εν τέλει από το νερό, τα λύματα και το έδαφος (Borenshtein D & Schauer DB, 2006). Στη βιοτεχνολογία, τα βακτηριακά στελέχη του *Citrobacter freundii* sp. παράγουν πολλά σημαντικά ένζυμα, όπως είναι η φωσφατάση. Η δράση της θεωρείται ότι εμπλέκεται στη συσσώρευση μολύβδου, ουσία χρήσιμη για τη βιομηχανία της βιοτεχνολογίας (Levinson HS & Mahler I, 1998).

1.8. *Bacillus subtilis*

Ο *Bacillus subtilis* ανήκει στα θετικά κατά Gram βακτήρια έχει ραβδόμορφο σχήμα και ικανότητα να σχηματίζει θερμοάντοχα, αδρανή σπόρια, προκειμένου να επιβιώσει σε αντίξοες συνθήκες. Κατατάσσεται στα προαιρετικά αερόβια βακτήρια, χρησιμοποιώντας το οξυγόνο ως τον τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων, όταν αναπτύσσεται υπό αερόβιες συνθήκες, ενώ έχει βρεθεί πως μπορεί να αναπτυχθεί και σε αναερόβιες συνθήκες, είτε με ζύμωση, είτε με αναπνοή με τα νιτρικά (ή νιτρώδη) ως τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων. Έχει την ικανότητα να αναπαράγεται σε θερμοκρασίες από 10 μέχρι 55 °C, με τη μέγιστη ανάπτυξη να εντοπίζεται στους 35 με 42 °C. Σχηματίζει σπόρια σε θερμοκρασίες έως περίπου 44 °C, ανάλογα το στέλεχος και το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης. Στις περισσότερες μελέτες η θερμοκρασία που εφαρμόζεται είναι περίπου 37 °C, όπου ο *Bacillus subtilis* αναπτύσσεται σε χρόνο διπλασιασμού, περίπου 30 λεπτών, σε πλούσιο θρεπτικό μέσο.

Δεν είναι παθογόνο και εντοπίζεται συχνότερα στο έδαφος και στη βλάστηση. Χρησιμοποιείται πολύ συχνά στον εργαστηριακό τομέα, καθώς το γονιδιώμά του μπορεί να τροποποιηθεί εύκολα γενετικά, όπως επίσης, και για το λόγο ότι παράγει σημαντικά μεταβολικά προϊόντα, χρήσιμα για τις βιομηχανίες. Ένα από τα προτερήματα του *Bacillus subtilis* είναι η ικανότητά του να αναπτύσσεται σε μέσα που περιέχουν τα ελάχιστα απαραίτητα συστατικά, όπως άλατα, πηγή άνθρακα, πηγή αζώτου και φωσφόρου. Ως πηγές άνθρακα, στις οποίες μπορεί να επιβιώσει και να αναπαραχθεί είναι ένα εύρος μονο-, δι-, ολιγο- και πολυσακχαριτών, αλκοόλες που προέρχονται από σάκχαρα, καθώς και αμινοξέα πεπτίδια και ενώσεις με 2, 3 ή και 4 άτομα άνθρακα. Η πηγή αζώτου, που θα μπορούσε να καταναλώσει και να αναπτυχθεί, είναι τα ιόντα αμμωνίου, τα νιτρικά, αμινοξέα και πεπτίδια. Ως πηγή φωσφόρου χρησιμοποιείται συνήθως το φωσφορικό άλας, ωστόσο στον *Bacillus subtilis* μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ο φωσφορικός εστέρας. Επίσης τα 10 ή και παραπάνω μαστίγια που περιβάλλουν το βακτηριακό κύτταρο, του προσδίδουν την ιδιότητα να μετακινείται με ευκολία στο θρεπτικό μέσο. Κατά την εκθετική φάση και σε πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά μέσο, ο *Bacillus subtilis* σχηματίζει συχνά κυτταρικές αλυσίδες, οι οποίες δεν αποτελούνται από μαστίγια και έτσι παραμένουν ακίνητες. Στο τέλος της εκθετικής φάσης οι αλυσίδες σπάνε και τα βακτήρια αποκτούν και πάλι κίνηση (Piggot PJ, 2009).

Τα βακτήρια *Bacillus subtilis* περιέχουν πέντε (5) γονίδια πεπτιδάσης σημαντικά για τη παραγωγή και έκκριση αντιβιοτικών ουσιών. Τα αντιβιοτικά έχουν την ιδιότητα να αλληλοεπιδρούν με τους λιποπολυσακχαρίτες της εξωτερικής μεμβράνης των Gram αρνητικών βακτηρίων και να μεταβάλλουν τη διαπερατότητά της, προκαλώντας κυτταρικό θάνατο. Συνεπώς, όταν κατά τη φάση της μέσης εκθετικής ανάπτυξης και μέχρι τη πρόιμη στατική φάση, ο *Bacillus subtilis* αντιμετωπίζει πενία θρεπτικών συστατικών στο μέσο ανάπτυξης, θα προσπαθήσει να αντιμετωπίσει την αλλαγή των περιβαλλοντικών συνθηκών, είτε με την έκκριση αποικοδομητικών ενζύμων, είτε με σύνθεση αντιβιοτικών ή ανάπτυξη κινητικότητας, είτε με σχηματισμό βιοϋμενίων. Αυτή η μετα-εκθετική φάση ανάπτυξης ονομάζεται συνήθως μεταβατικό στάδιο. Επιπλέον ένα κοινό χαρακτηριστικό του *Bacillus subtilis* είναι η ικανότητά του να μεταβαίνει σε λειτουργία σύνθεσης θερμοάντοχων αδρανών σπορίων (Hirooka K, 2014; Serra CR *et al.*, 2014).

1.8.1. Τοξικότητα και χρήσεις του *Bacillus subtilis*

Είναι ενδιαφέρον ότι ενώ ο *Bacillus subtilis* δεν θεωρείται ένα παθογόνο βακτηριακό στέλεχος, παράγει πολύπλοκα ιζήματα βιομεμβρανών, τα οποία έχουν παρατηρηθεί επανειλημμένα σε σούπες από πατάτες και σε εμπορικές μορφές ζωμών κρέατος. Φαίνεται πως ο *Bacillus subtilis* είναι ένα από τα λίγα είδη που μπορούν να επιβιώσουν στο ψήσιμο, δημιουργώντας μεγάλους πληθυσμούς, εξαιτίας της ικανότητάς του να αποικίζει στις διεπαφές αέρος-υγρού (Κονάς ΑΤ & Dragoš A, 2019). Συνεπώς το στέλεχος αυτό έχει τη δυνατότητα να επιμολύνει τρόφιμα, κάτω από μη φυσικές συνθήκες και ως εκ τούτου να θεωρηθεί ως ένα ευκαιριακό παθογόνο, με πιθανότητα να αποτελέσει κίνδυνο σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα. Για την εμπορική του εκμετάλλευση, εξαιτίας της ανάπτυξης ανθεκτικών θερμοάντοχων σπορίων, έχουν παρασκευαστεί σκευάσματα που περιέχουν το στέλεχος αυτό, καθώς τα σπόρια του *Bacillus subtilis*, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε λαχανικά και φυτά ως μυκητοκτόνο, λόγω της ικανότητάς τους να παράγουν αντιβιοτικά. Ο *Bacillus subtilis* κατοικεί στο ριζικό σύστημα του φυτού ανταγωνιζόμενος τους οργανισμούς που προκαλούν ασθένειες, έχοντας επίσης την ιδιότητα να παράγει τοξίνες αποθητικές για τα έντομα. Συνεπώς τα στελέχη αυτά χρησιμοποιούνται από τους καλλιεργητές για την προστασία των οπωροκηπευτικών τους προϊόντων. Επίσης τα στελέχη αυτά βρίσκουν εφαρμογή και ως μοντέλα στις διαδικασίες ελέγχου αποτελεσματικότητας των σποριοκτόνων και των αποστειρωτικών σκευασμάτων πριν κυκλοφορήσουν στην αγορά (Hirooka K, 2014). Τέλος χρησιμοποιείται για τη παραγωγή υδρολυτικών ενζύμων, στη ζύμωση των τροφίμων και πρόσφατα ως προβιοτικό (Arnaouteli S *et al.*, 2021).

1.9. ΒΙΟΪΜΕΝΙΑ

Τα βακτήρια μπορούν να αναπτυχθούν και να επιβιώσουν κυρίως σε πολύ καλά οργανωμένες και διαδραστικές κοινότητες που ονομάζονται Βιοϋμένια ή Βιοφίλμ. Τα βιοϋμένια χαρακτηρίζονται ως μια αλληλεξαρτώμενη μορφή ακίνητων κοινοτήτων βακτηρίων, οι οποίες στεγάζονται σε μια αυτοπαραγόμενη συγκολλητική μήτρα που αποτελείται από εξωκυτταρικές πολυμερείς ουσίες (EPS: extracellular polymeric substances), συμπεριλαμβανομένων των πολυσακχαριτών, πρωτεϊνών, λιπιδίων και νουκλεϊκών οξέων. Οι περιοχές στις οποίες εντοπίζονται τα βιοϋμένια μπορεί να είναι οποιαδήποτε επιφάνεια στην οποία να μπορούν να αποικήσουν βακτήρια, καθώς έχουν βρεθεί σε διεπαφές αέρος-στερεού, σχηματίζοντας αποικίες (colonies), στερεού-υγρού, σχηματίζοντας βυθισμένες βιομεμβράνες (submerged biofilms), υγρού-υγρού, με τη μορφή σωματιδιακών μεμβρανών (particulate biofilms), ή αέρος-υγρού, σχηματίζοντας βιομεμβράνες ιζημάτων (pellicle biofilms) (Rajitha K *et al.*, 2020). Τα βιοϋμένια μπορεί να αποτελούνται από έναν πληθυσμό που αναπτύχθηκε από ένα είδος ή μια κοινότητα που προέρχεται από πολλαπλά μικροβιακά είδη και μπορούν να επικαθίσουν σε μια τεράστια ποικιλία αβιοτικών και βιοτικών επιφανειών. Τα βακτήρια σχηματίζουν επίσης φυσικά συγκροτήματα σε εναιωρήματα, όπως οι αναερόβιοι χωνευτές, στους οποίους κατά προτίμηση συσσωματώνονται για να σχηματίσουν κροκίδες (flocs) ή κόκκους ιλύος (sludge granules) (Davey ME & O'toole GA, 2000). Έχουν πολλαπλά οφέλη κυρίως για τους ίδιους τους μικροοργανισμούς, προστατεύοντας τους από τις αλλαγές του pH, αντίστασής τους έναντι άλλων μικροοργανισμών, καθώς και σε βιομηχανικό επίπεδο διαδραματίζοντας κεντρικό ρόλο στη διαδικασία ενεργοποιημένης ιλύος, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως στην επεξεργασία αστικών και βιομηχανικών λυμάτων (Gao N *et al.*, 2018).

1.10. *Lactobacillus brevis*

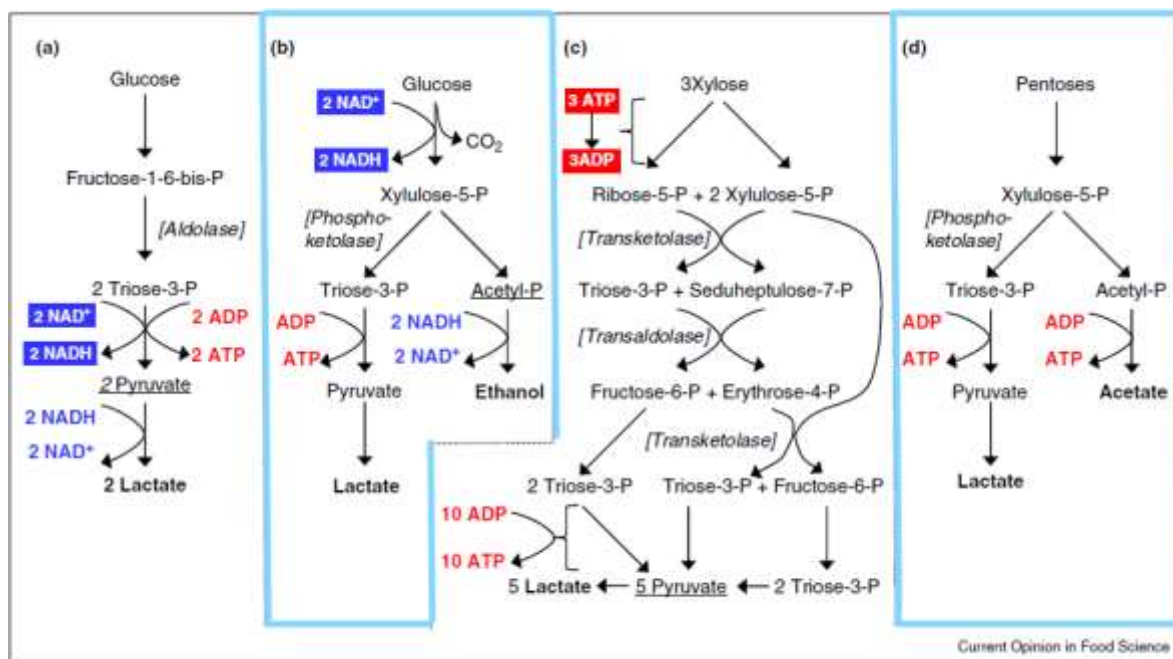
Τα γαλακτικά βακτήρια (LAB, lactic Acid Bacteria) είναι Gram-θετικά βακτήρια με σχήμα ραβδόμορφο ή κόκκων και ανήκουν στην οικογένεια *Lactobacillaceae*. Είναι πολύ ανθεκτικά σε χαμηλές τιμές pH συγκριτικά με άλλα βακτήρια, καθώς το κυριότερο μεταβολικό προϊόν που παράγουν είναι το γαλακτικό οξύ. Επιπλέον, ταξινομούνται ως ομοζυμωτικά και ετεροζυμωτικά βακτήρια, όταν στη πρώτη περίπτωση το μοναδικό μεταβολικό προϊόν που παράγουν είναι το γαλακτικό οξύ, μετατρέποντας ένα (1) μόριο γλυκόζης σε δύο (2) μόρια Πυροσταφυλικού και κατ' επέκταση σε δύο (2) μόρια γαλακτικού οξέος, παράγοντας δύο (2) μόρια ATP. Στη δεύτερη περίπτωση το γαλακτικό οξύ είναι ο κυριότερος μεταβολίτης μεταξύ άλλων μεταβολιτών, με τη μετατροπή ενός (1) μορίου γλυκόζης σε ένα (1) μόριο γαλακτικού, ένα (1) μόριο αιθανόλης ή οξικού, ένα (1) ή δύο (2) μόρια ATP (δύο στη περίπτωση που παραχθεί οξικό οξύ) και ένα (1) μόριο CO₂ (Gänzle MG, 2015).

1.10.1. ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΚΑΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΕΞΟΖΩΝ ΚΑΙ ΠΕΝΤΟΖΩΝ ΑΠΟ ΤΑ ΓΑΛΑΚΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ

Το γαλακτικό βακτήριο *Lactobacillus brevis* ανήκει στους προαιρετικά αναερόβιους ή μικροαερόφιλους, υποχρεωτικά ετεροζυμωτικούς μικροοργανισμούς. Ως ετεροζυμωτικό παράγει ένα μείγμα μεταβολιτών όπως γαλακτικό οξύ, αιθανόλη, οξικό οξύ και CO₂, χρησιμοποιώντας το μονοπάτι της Φωσφοκετολάσης (Phosphoketolase pathway) για να μεταβολίσει πεντόζες και εξόζες, σε αντίθεση με τα ομοζυμωτικά τα οποία χρησιμοποιούν το μονοπάτι Emden-Meyerhoff (EMP) για τον μεταβολισμό των εξοζών, ενώ για το μεταβολισμό των πεντοζών ακολουθούν το μονοπάτι των Φωσφοπεντοζών (Pentose phosphate pathway), το οποίο συμβαίνει παράλληλα με εκείνο της Γλυκόλυσης.

Για τα γαλακτικά βακτήρια που μεταβολίζουν μέσω EMP, οι εξόζες μεταφέρονται κατά κύριο λόγο μέσω συστημάτων Φωσφοτρανσφοράσης (PTS) στο κύτταρο, έχοντας ως κεντρικό σημείο διακλάδωσης το Πυροσταφυλικό (Pyruvate), ενώ για τη περίπτωση των γαλακτικών βακτηρίων που μεταβολίζουν τους υδατάνθρακες μέσω Φωσφοκετολάσης το PTS δεν είναι λειτουργικό, ειδικά για τη γλυκόζη, τη Φρουκτόζη και τη Λακτόζη, ενώ προτιμάται ο μεταβολισμός άλλων υδατανθράκων (π.χ. Μαλτόζη, Αραβινόζη, Ριβόζη) από τη ζύμωση του μονοσακχαρίτη γλυκόζης, όπου το κεντρικό σημείο διακλάδωσης είναι το Ακέτυλο φωσφορικό (Acetyl phosphate).

Ο *L. brevis* δεν μπορεί να αναπτυχθεί σε χημικά καθορισμένα μέσα που έχουν ως μοναδική πηγή άνθρακα πεντόζες. Μελέτες, ωστόσο έχουν δείξει πως κατά την αναερόβια ανάπτυξη του *L. brevis* παρουσία Φρουκτόζης, επάγεται η σύνθεση ενός συστήματος Φωσφοτρανσφεράσης και γλυκολυτικών ενζύμων που επιτρέπουν στη Φρουκτόζη να μεταβολιστεί μέσω της οδού Embden-Meyerhof, ενώ μπορεί να γίνει και μετατροπή της σε Μαννιτόλη. (Gänzle MG, 2015).



Εικόνα 8: Ολοκληρωμένη εικόνα μεταβολισμού υδατανθράκων από τα γαλακτικά βακτήρια (LAB). (a) Μεταβολικό μονοπάτι των ομοζυμωτικών βακτηρίων για τη περίπτωση διάσπασης εξοζών μέσω EMP. (b) Μεταβολικό μονοπάτι ετεροζυμωτικών βακτηρίων για τη περίπτωση διάσπασης εξοζών μέσω Φωσφοκετολάσης. (c) Αντίδραση Τρανσαλδολάσης-Τρανσκετολάσης στα ομοζυμωτικά βακτήρια για τη περίπτωση διάσπασης πεντοζών μέσω Φωσφοπεντοζών. (d) Μεταβολικό μονοπάτι ετεροζυμωτικών βακτηρίων για τη περίπτωση διάσπασης πεντοζών μέσω Φωσφοκετολάσης. Πηγή: Gänzle MG, 2015

1.10.2. ΟΜΟΖΥΜΩΤΙΚΟΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Ο ομοζυμωτικός μεταβολισμός των εξοζών, όπως αναφέρθηκε έχει ως βασικό σημείο διακλάδωσης το Πυροσταφυλικό. Το διαθέσιμο οξυγόνο, αλλά και η σύσταση του υποστρώματος, είναι εκείνα που θα καθορίσουν και την κατάληξη του Πυροσταφυλικού. Όταν κατά τον αναερόβιο καταβολισμό υπάρξει περιορισμός υποστρώματος στο μέσο της αύξησης, σημαίνει πως έχει δράσει η Μυρμηκική λυάση του Πυροσταφυλικού (PFL, pyruvate formate lyase), το ένζυμο που μετατρέπει το Πυροσταφυλικό και το CoA σε Ακέτυλο-CoA και μυρμηκικό οξύ (Gänzle MG, 2015; Shepard EM & Broderick JB, 2010).

Σε αντίθετη περίπτωση όπου η καλλιέργεια γίνεται υπό αερόβιες συνθήκες, τα μεταβολικά προϊόντα είναι περισσότερα, ωστόσο ο κυριότερος μεταβολίτης είναι το γαλακτικό οξύ. Αρκετά είδη LAB έχουν διπλό μεταβολισμό, καθώς μπορούν να περάσουν από τη ζύμωση σε μεταβολισμό αερόβιας αναπνοής όταν παρέχονται με αίμη, και για ορισμένα βακτήρια, αίμη και μενακινόνη, όπως για τη περίπτωση του *Lactobacillus brevis* (Gänzle MG, 2015; Pedersen MB *et al.*, 2012; Shepard EM & Broderick JB, 2010). Κατά την αναπνοή μετατοπίζεται ο ομοζυμωτικός μεταβολισμός προς παραγωγή οξικού και ακετοΐνης.

Επίσης τα γονίδια που απαιτούνται για τον αναπνευστικό μεταβολισμό εκφράζονται ακόμη και με απουσία οξυγόνου. Συνεπώς γίνεται αντιληπτό πως τα LAB έχουν προτίμηση για την αναπνοή όταν οι συνθήκες είναι δυνατές, με βασικό κομμάτι τα συστατικά του υποστρώματος τα οποία φαίνεται να διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στον αερόβιο μεταβολισμό.

Τα ομοζυμωτικά γαλακτικά βακτήρια μεταβολίζουν τις εξόζες μέσω του μονοπατιού της Γλυκόλυσης (EMP), κατά την οποία ένας υδατάνθρακας όπως η γλυκόζη διασπάται, φτάνοντας σε ένα σημείο όπου έχει παραγάγει δύο (2) μόρια 3-φωσφορο-τριόζης (Εικ.8(a)). Σε επόμενο στάδιο οι τριόζες μετατρέπονται σε δύο (2) μόρια Πυροσταφυλικού, τα οποία είναι και ο τελικός αποδέκτης των ηλεκτρονίων για την παραγωγή δύο (2) μορίων γαλακτικού. Η διαδικασία αυτή έχει καθαρό κέρδος δύο (2) μόρια ATP από ένα μόριο γλυκόζης (6 άτομα άνθρακα). Σε αντίθεση με τις εξόζες, οι πεντόζες (π.χ. Ξυλόζη, Ριβόζη) μεταβολίζονται μέσω του μονοπατιού των Φωσφοπεντοζών (Εικ.8(c)). Ο ομοζυμωτικός μεταβολισμός των πεντοζών είχε αρχικά παρατηρηθεί σε ένα στέλεχος που αργότερα ταξινομήθηκε ως *Lactobacillus vini*. Στο μονοπάτι αυτό τρία (3) mol πεντοζών μέσω αντιδράσεων Τρανσκετολάσης και Τρανσαλδολάσης, αποδίδουν πέντε (5) mol 3-φώσφορο τριόζης. Το καθαρό ενεργειακό κέρδος που προκύπτει είναι επτά (7) mol ATP ανά τρία (3) mol πεντόζης. Συνεπώς, από (3) mol πεντοζών (15 άτομα άνθρακα) που μεταβολίζονται μέσω των Φωσφοπεντοζών, είναι σχετικά υψηλότερο το καθαρό ενεργειακό κέρδος συγκριτικά με τον καταβολισμό των πεντοζών μέσω της Φωσφοκετολάσης (Gänzle MG, 2015).

1.10.3. ΕΤΕΡΟΖΥΜΩΤΙΚΟΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Τα ετεροζυμωτικά LAB όπως προαναφέρθηκε χρησιμοποιούν το μονοπάτι της Φωσφοκετολάσης για το μεταβολισμό των εξοζών και των πεντοζών. Η ενεργειακή απόδοση καταβολισμού των εξοζών και πεντοζών εξαρτάται από τα παραγόμενα μεταβολικά προϊόντα (Εικ.8(b), Εικ.8(d)), τα οποία διακρίνονται σε γαλακτικό οξύ, αιθανόλη ή οξικό οξύ και CO₂. Συνεπώς, έχουν αναζητηθεί μεταβολικές στρατηγικές για να βελτιώσουν την αποτελεσματικότητα στη μεταβολική αυτή οδό, με βασικότερη να είναι η χρήση εναλλακτικών δεκτών ηλεκτρονίων για την αποφυγή μετατροπής του Ακετυλο-φωσφορικού σε αιθανόλη που δεν παράγονται ATP, αλλά σε οξικό οξύ κατά την οποία παράγεται.

Η οδός της Φωσφοκετολάσης διακρίνεται από το βασικό ένζυμο διάσπασης, τη φωσφοκετολάση. Έχοντας εισέλθει στο κύτταρο η εξόζη, δέχεται φωσφοριλίωση με κατανάλωση ενός (1) ATP, ενώ στη συνέχεια μετατρέπεται σε 6-φωσφορο-γλυκονολακτόνη, έπειτα σε 6-φωσφορο-γλυκονικό οξύ και τέλος σε 5-φωσφορο-ριβουλόζη. Η τελευταία θα μετατραπεί σε 5-φωσφορο-ξυλουλόζη και στη φωσφορική αυτή πεντόζη θα δράσει η φωσφοκετολάση, διασπώντας τη σε 3-φωσφορο-γλυκεραλδεΐδη και Ακετυλο-φωσφορικό. Στη συνέχεια η 3-φωσφορο-γλυκεραλδεΐδη μετατρέπεται σε γαλακτικό οξύ μέσω των ίδιων ενζύμων με το μονοπάτι του EMP. Αυτός ο κλάδος της οδού περιέχει οξειδωση σε συνδυασμό με αναγωγή και παράγονται 2 μόρια ATP, στο σημείο μετατροπής του 1,3-δι-φωσφορο-γλυκεριδικού οξέος σε 3-φωσφορο-γλυκεριδικό και στη μετατροπή του φωσφορο-ενολο-πυροσταφυλικού σε Πυροσταφυλικό. Το ένα από τα δύο ATP καταναλώνονται στη φωσφοριλίωση της γλυκόζης. Το Ακετυλο-φωσφορικό ανάγεται σε δύο στάδια, τα οποία περιλαμβάνουν τη μετατροπή του, είτε σε Ακεταλδεΐδη, είτε απευθείας σε οξικό οξύ. Στη περίπτωση μετατροπής του σε Ακεταλδεΐδη, εξισορροπεί τις δύο οξειδώσεις που πραγματοποιήθηκαν πριν τη διάσπαση, χωρίς να αποδίδεται επιπλέον ATP, με τελικό προϊόν την αιθανόλη. Στη περίπτωση απευθείας μετατροπής του από Ακετυλο-φωσφορικό σε οξικό οξύ θα αποδοθεί ένα (1) επιπλέον ATP.

1.10.4. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ

Η ζύμωση είναι μια από τις πιο οικονομικές μεθόδους παραγωγής και συντήρησης τροφίμων. Επί του παρόντος χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων σε τρόφιμα που έχουν υποστεί ζύμωση, ειδικά στη γαλακτοβιομηχανία. Τα γαλακτικά βακτήρια μπορούν να αποσυνθέσουν μακρομοριακές ουσίες στα τρόφιμα, συμπεριλαμβανομένης της αποδόμησης των δύσπεπτων πολυσακχαριτών και του μετασχηματισμού ανεπιθύμητων αρωματικών ουσιών. Μπορούν επίσης να παράγουν μια ποικιλία μεταβολικών προϊόντων, όπως λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου, αμίνες, βακτηριοσίνες, βιταμίνες και εξωπολυσακχαρίτες κατά τη διάρκεια του μεταβολισμού. Με βάση τα προαναφερθέντα μεταβολικά χαρακτηριστικά, τα γαλακτικά βακτήρια παρέχουν ποικιλία εφαρμογών στη βιομηχανία τροφίμων, καθώς χρησιμοποιούνται για τη βελτίωση της γεύσης των τροφίμων με τη διαδικασία της ζύμωσης, την αύξηση της θρεπτικής αξίας των τροφίμων, τη μείωση των επιβλαβών ουσιών, την αύξηση της διάρκειας ζωής τους, τη μείωση του pH, ενώ παράλληλα, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως προβιοτικά για την προώθηση της υγείας στον οργανισμό (Wang Y *et al.*, 2021). Ωστόσο, δεν χρησιμοποιούνται όλα τα γαλακτικά βακτήρια στις διεργασίες ζύμωσης των τροφίμων με τον ίδιο τρόπο. Ο *Lactobacillus brevis* λαμβάνει μέρος στην παραγωγή ενός σημαντικού ποσοστού ποικίλων ζυμούμενων προϊόντων.

Ορισμένα από τα τρόφιμα αυτά έχουν αναπτυχθεί από φυσικές ζυμώσεις στην επιλογή και χρήση με συγκεκριμένα στελέχη εκκίνησης. Οι ζυμώσεις των λαχανικών είναι περιορισμένης κλίμακας, αλλά μεταξύ των πιο σημαντικών ζυμούμενων λαχανικών εμπορικής σημασίας είναι το ξινολάχανο (Sauerkraut), τα τουρσιά και οι ελιές. Τέλος το προζύμι που χρησιμοποιείται ως διογκωτικό της ζύμης του ψωμιού, αποτελεί μια από τις παλαιότερες βιοτεχνολογικές διαδικασίες στη παραγωγή τροφίμων. Είναι γνωστή η χρήση των ζυμών με την κοινή ονομασία μαγιάς, το προζύμι όμως, μπορεί να περιέχει και γαλακτικά βακτήρια *Lactobacillus* (*L.brevis*, *L.delbrueckii*, *L.fermentum*, *L.plantarum*, *L.sanfrancisco* κ.λπ.), κυρίως για τη παραγωγή ψωμιού σίκαλης, ανάμεικτου σίκαλης, ψημένων προϊόντων με προζύμι κέικ (πχ. Panettone) και ψωμιού σίτου (Batt C & Tortorello M, 2014). Παρακάτω παρουσιάζονται τα προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση με τη χρήση του *Lactobacillus brevis* (Εικ.9).

<i>Product</i>	<i>Raw material</i>	<i>Area</i>
Burong mustala	Mustard	Philippines
Busaa	Maize, finger millet, sorghum	Kenya
Cheese	Milk	Worldwide
Fufu	Cassava tubers	Nigeria
Kefir	Milk	Caucasus
Kimchi	Korean cabbage, Korean radish root	Korea
Kishk	Milk, wheat	Egypt, Iraq
Laban zeer	Sour milk	Egypt
Mesu	Bamboo shoot	India
Nham	Pork, rice	Thailand
Olives	Green olives	Worldwide
Pickles	Vegetables, cucumbers	Worldwide
Pulque	Agave juice	Mexico
Sauerkraut	White cabbage	Worldwide
Sausages	Pork, beef	Worldwide
Sourdoughs	Wheat, rye	Worldwide

Εικόνα 9: Χρήση του *Lactobacillus brevis* για ζύμωση τροφίμων. Πηγή: Batt C & Tortorello M, 2014

1.11. ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΟΔΟΙ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗΣ ΑΤΡ

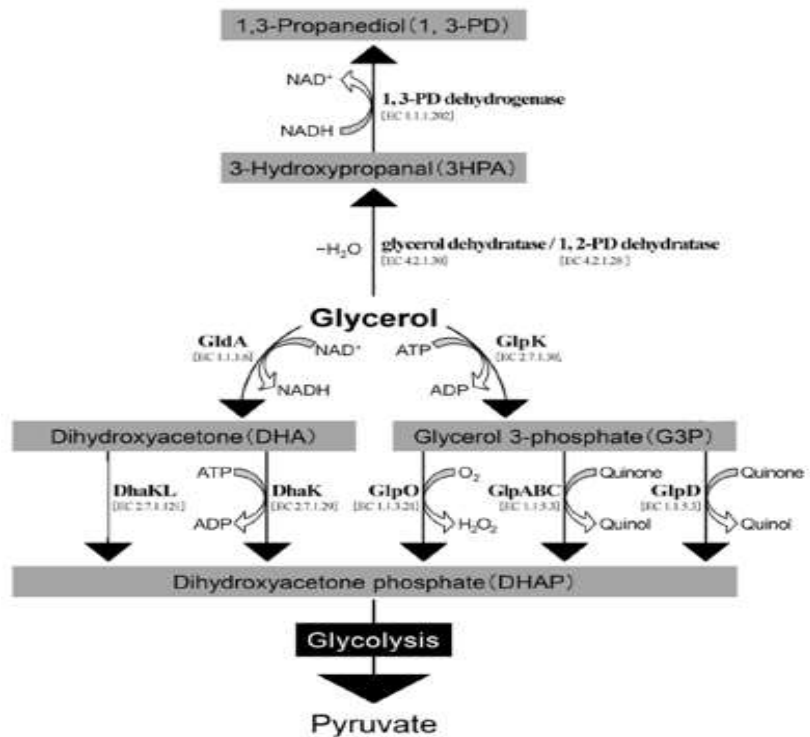
Ο μεταβολισμός αναφέρεται σε βιοχημικές οδούς, που παράγουν μέσω βιολογικών συστημάτων ενέργεια, είτε την καταναλώνουν για να επιτρέψουν την ανάπτυξη. Η πρώτη περίπτωση χαρακτηρίζεται ως καταβολισμός και η δεύτερη ως αναβολισμός. Στο καταβολισμό μετατρέπεται η χημική και ηλεκτρομαγνητική ενέργεια σε υψηλής ενέργειας δεσμούς του ΑΤΡ (ένα ενεργειακό νόμισμα), ενώ στον αναβολισμό χρησιμοποιείται η ενέργεια του ΑΤΡ για τη βιοσύνθεση κυτταρικών συστατικών. Ορισμένες οδοί είναι αυστηρά καταβολικές και άλλες αυστηρά αναβολικές, ενώ τα κεντρικά μονοπάτια δεν είναι απολύτως καθορισμένα. Μπορεί να λεχθεί ότι συνεισφέρουν τόσο σε ενέργεια, όσο και σε βιοσύνθεση κυτταρικών συστατικών, με τη Γλυκόλυση να είναι μία από αυτές τις οδούς. Συνεπώς τα μεταβολικά μονοπάτια ποικίλουν ανάλογα με το είδος του μικροοργανισμού και τις συνθήκες που αναπτύσσεται (Wolfe AJ, 2015).

1.12. ΕΙΣΟΔΟΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ ΣΤΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Η είσοδος της γλυκερόλης στο κύτταρο των προκαρυωτικών μικροοργανισμών συμβαίνει μέσω δύο μηχανισμών μεταφοράς, τη παθητική και τη διευκολυνόμενη διάχυση. Η γλυκερόλη αν και είναι ένα πολικό μόριο μπορεί να διαπεράσει τη κυτοπλασματική, κυτταρική ή πλασματική μεμβράνη με παθητική διάχυση. Η παθητική διάχυση είναι ένας μηχανισμός μεταφοράς που πραγματοποιείται σπάνια σε ζώντα κύτταρα, αλλά είναι πιθανόν να συμβεί όταν χρησιμοποιείται η γλυκερόλη ως πηγή άνθρακα στο υπόστρωμα. Είναι μία αυθόρμητη διεργασία που δεν απαιτεί τη κατανάλωση ενέργειας, ωστόσο βασική προϋπόθεση είναι η προς διακίνηση ουσία να βρίσκεται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από εκείνη του εσωτερικού της μεμβράνης. Ωστόσο, στις περισσότερες περιπτώσεις των προκαρυωτικών κυττάρων, είναι πιθανότερο να συμβαίνει διευκολυνόμενη μεταφορά της γλυκερόλης. Η μεταφορά αυτή συμβαίνει μέσω εξειδικευμένων διαμεμβρανικών πρωτεϊνών και εξαρτάται από τις συγκεντρώσεις των προς διάχυση μορίων εκατέρωθεν της μεμβράνης, καθώς και από την επάρκεια της μεμβράνης σε πρωτεΐνες-φορείς. Επίσης οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες-φορείς ρυθμίζονται από τη λιπιδιακή σύσταση της μεμβράνης, καθώς η αλλαγή της σύστασης των λιπιδίων της μεμβράνης επηρεάζει το ρυθμό μεταφοράς της γλυκερόλης.

Ο ρυθμός αυτός αυξάνει όταν αντίστοιχα αυξάνεται και η ρευστότητα της μεμβράνης. Όσο, λοιπόν, πιο ακόρεστα είναι τα λιπαρά οξέα της κυτοπλασματικής μεμβράνης, τόσο πιο υψηλή είναι η ρευστότητα και ζωτικότητα της.

Συνεπώς, κατά την διευκολυνόμενη διάχυση η πρωτεΐνη-φορέας που βρίσκεται στη κυτοπλασματική μεμβράνη, προσδένεται με το επιθυμητό μόριο και στη συνέχεια το μεταφέρει. Σύμφωνα με τη παραπάνω διεργασία μεταφοράς το εισερχόμενο μόριο στο κύτταρο, δεν υφίσταται φωσφοριλίωση, και ως εκ τούτου δεν υπάρχει κατανάλωση ενέργειας.



Εικόνα 10: Μεταβολικά μονοπάτια διάσπασης της γλυκερόλης, μέσω συμπλέγματος (regulon) dha και glp.
Πηγή: Doi Y, 2019

Ο καταβολισμός της γλυκερόλης στα βακτηριακά κύτταρα συμβαίνει μέσω διαφορετικών οδών ανάλογα με τις επιθυμητές συνθήκες αεροβίωσης που επιτρέπουν στο εκάστοτε βακτήριο να αναπτυχθεί. Τα βακτήρια δύναται να αφομοιώνουν τη γλυκερόλη είτε υπό αερόβιες συνθήκες, για τη περίπτωση των αερόβιων ή προαιρετικά αερόβιων ειδών, είτε υπό αναερόβιες συνθήκες, που δεν υφίσταται εξωτερικός αποδέκτης ηλεκτρονίων, για τη περίπτωση των προαιρετικά αναερόβιων ή αυστηρώς αναερόβιων ειδών (Εικ.10). Κατανοώντας τα παραπάνω, μπορεί να λεχθεί ότι ο *Citrobacter freundii* που ανήκει στην οικογένεια *Enterobacteriaceae* και είναι ένα προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο, θα μεταβολίσει τη γλυκερόλη κυρίως υπό αναερόβιες συνθήκες, όπως και στη περίπτωση του *Lactobacillus brevis*, που είναι ένα μικροαερόφιλο βακτήριο. Σε αντίθετη περίπτωση, όπως εκείνη του *Bacillus subtilis*, που είναι ένα προαιρετικά αερόβιο βακτήριο, η γλυκερόλη θα καταβολιστεί μέσω διαφορετικών οδών που συμβαίνουν υπό αερόβιες συνθήκες.

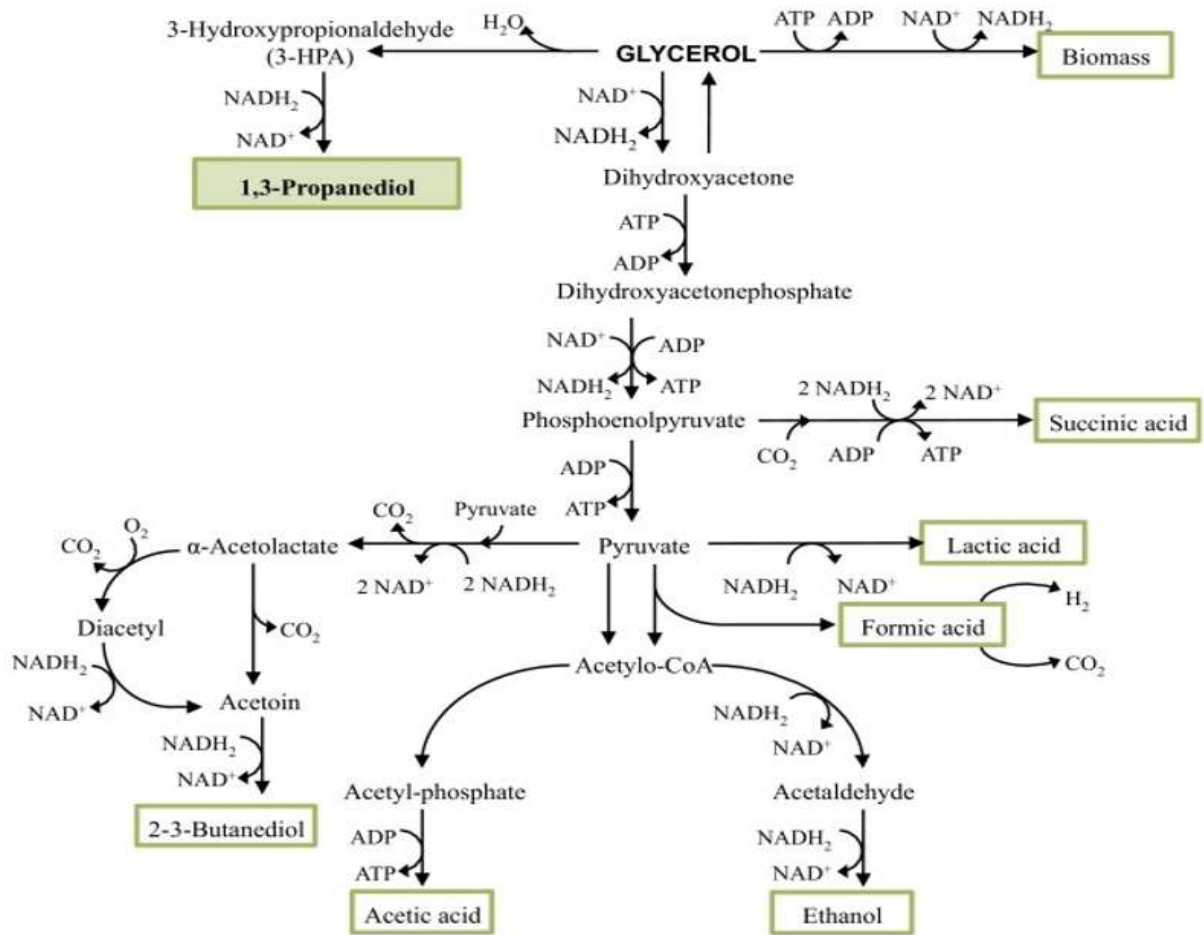
Συνεπώς, κατά τον αερόβιο καταβολισμό η γλυκερόλη θα μεταβολιστεί μέσω της οδού της Φωσφοριλίωσης και της Οξειδωσης, μέσω γονιδίων που κωδικοποιούν τη σύνθεση των απαραίτητων ενζύμων και αποτελούν το σύμπλεγμα GLP. Στην οδό της Φωσφοριλίωσης θα δράσει η κινάση της γλυκερόλης και θα φωσφοριλιώσει τη γλυκερόλη προς 3-φωσφορο-γλυκερόλη (glycerol 3-phosphate, G3P), η οποία στη συνέχεια θα οξειδωθεί προς ένα σύμπλοκο φωσφόρου, τη φωσφορο-διυδροξυ-ακετόνη (Dihydroxyacetone phosphate, DHAP), μια αντίδραση καταλυόμενη από μια NAD εξαρτώμενη αφυδρογονάση. Ομοίως, στην οξειδωτική οδό η γλυκερόλη αρχικά οξειδώνεται προς διυδροξυ-ακετόνη (Dihydroxyacetone, DHA) και τη συνέχεια φωσφορυλιώνεται σε φωσφορο-διυδροξυ-ακετόνη (Dihydroxyacetone phosphate, DHAP). Η αντίδραση αυτή καταλύεται από μια αφυδρογονάση, η οποία δρα υπό αναερόβιες συνθήκες.

Ο αναερόβιος καταβολισμός της γλυκερόλης, συμβαίνει μέσω γονιδίων που κωδικοποιούν τη σύνθεση των απαραίτητων ενζύμων, αποτελώντας το σύμπλεγμα DHA. Η διεργασία αυτή λαμβάνει χώρα μέσω δύο οδών, της Αναγωγικής και Οξειδωτικής οδού. Σύμφωνα με τα στάδια που τελούνται κατά την αναγωγική οδό, το προϊόν που βιοσυντίθεται είναι η 1,3-προπανοδιόλη. Πιο συγκεκριμένα μέσω της αφυδρατάσης της γλυκερόλης (glycerol dehydratase, GDHt) που κωδικοποιείται από το γονίδιο *dhaB*, η γλυκερόλη μετατρέπεται σε 3-υδροξυ-προπιοναλδεΐδη (3-HPA) και στη συνέχεια η 3-HPA, που αποτελεί τον τελικό αποδέκτη των ηλεκτρονίων, συνθέτει την 1,3-προπανοδιόλη, μέσω μιας NAD εξαρτώμενης οξειδοαναγωγάσης (PDOR) που κωδικοποιείται από το ένζυμο *dhaT*. Η αφυδρατάση της γλυκερόλης (GDHt) είναι εξαρτώμενη από το B12 συνένζυμο.

Κατά την κατάλυση το ανενεργό συνένζυμο B12 ενώνεται με τη GDHt και σταματά η κατάλυση. Ένα βοηθητικό ένζυμο, η αντιδράση αφυδρατάση της γλυκερόλης, απελευθερώνει το συνένζυμο και η προκύπτουσα ελεύθερη GDHt καταλύει τη μετατροπή από γλυκερόλη σε 3-HPA (Eriksen DT *et al.*, 2013). Όλη η διαδικασία βιοσύνθεσης της 1,3-προπανοδιόλης, έχει σκοπό τη σύνθεση NAD, προκειμένου να διατηρηθεί η οξειδοαναγωγική ισορροπία στο εσωτερικό του κυττάρου. Κατά την οξειδωτική οδό, η γλυκερόλη οξειδώνεται σε διυδροξυ-ακετόνη (Dihydroxyacetone, DHA), μέσω της αφυδρογονάσης της γλυκερόλης (DHAD) που κωδικοποιείται από το γονίδιο *dhaD*. Σε επόμενο στάδιο η DHA θα φωσφοριλιωθεί σε φωσφορο-διυδροξυ-ακετόνη (Dihydroxyacetone phosphate, DHAP), μέσω της κινάσης της διυδροξυ-ακετόνης (DHAK), κωδικοποιούμενη από το γονίδιο *dhaK*, συνεχίζοντας στη Γλυκόλυση (Drożdżynska A *et al.*, 2011; Papanikolaou S, 2009).

Συνεπώς και κατά την αερόβια διεργασία καταβολισμού της γλυκερόλης και κατά την αναερόβια, όπου το τελικό προϊόν είναι η φωσφορο-διυδροξυ-ακετόνη (Dihydroxyacetone phosphate, DHAP), η μετατροπή του στη συνέχεια θα δώσει Πυροσταφυλικό, το οποίο θα ακολουθήσει συγκεκριμένη πορεία για κάθε βακτήριο, παράγοντας διαφορετικά μεταβολικά προϊόντα (Drożdżynska A *et al.*, 2014).

Το Πυροσταφυλικό μπορεί να ακολουθήσει διαφορετικά μονοπάτια σύνθεσης μεταβολιτών από τη στιγμή που θα βιοσυντεθεί. Για τα βακτήρια της οικογένειας *Enterobacteriaceae*, η μετατροπή του Πυροσταφυλικού σε Ακέτυλο-CoA και μυρμηκικό οξύ είναι ένα από αυτά, που θα συμβεί μέσω της μυρμηκικής λύσης του Πυροσταφυλικού, και ως εκ τούτου το Ακέτυλο-CoA θα μετασχηματιστεί σε οξικό οξύ (acetic) ή αιθανόλη (ethanol), ενώ για τη περίπτωση του μυρμηκικού θα διασπαστεί σε CO₂ και μόρια Υδρογόνου. Ένα διαφορετικό μονοπάτι είναι εκείνο της συμπύκνωσής του σε α-ακετογαλακτικό (α-Acetolactate) και μετατροπής του απευθείας ή μέσω ενδιάμεσης μετατροπής του σε Διακετύλιο (Diacetyl), προς παραγωγή ακετοΐνης (acetoin), ενώ στη συνέχεια θα δώσει 2,3-βουτανοδιόλη (2,3-butanediol). Το γαλακτικό οξύ (lactic) είναι επίσης ένα παράγωγο της διάσπασης του Πυροσταφυλικού, ενώ και το ηλεκτρικό οξύ (succinic) μπορεί να συντεθεί από το μεταβολισμό της γλυκερόλης, παραγόμενο από το φωσφο-ενολο-πυροσταφυλικό (Phospho-enolpyruvate, PEP) (Εικ.11).



Εικόνα 11: Μεταβολικά μονοπάτια ζύμωσης της γλυκερόλης από βακτήρια της οικογένειας Enterobacteriaceae. Πηγή: Drożdżyńska A *et al.*, 2014

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η αυξημένη χρήση πετροχημικών, καθώς και η εναπόθεση των βλαβερών ρύπων και αποβλήτων από τις διεργασίες επεξεργασίας τους στον αέριο και υδροφόρο ορίζοντα, έχουν αποτελέσει ανάγκη για εξεύρεση εναλλακτικών καυσίμων, περιβαλλοντικά και οικονομικά φιλικότερων. Τα εναλλακτικά καύσιμα τα οποία χρησιμοποιούνται ήδη στις μέρες μας σε συνδυασμό με τα συμβατικά είναι το βιολογικό πετρέλαιο ή αλλιώς βιοντίζελ, καθώς και άλλα είδη όπως το Βιοαέριο και η Βιοαιθανόλη. Ωστόσο, η ανάπτυξη του τομέα αυτού αν και έχει μειώσει τη χρήση συμβατικών καυσίμων, συνεχίζει να αποτελεί σημαντικό πρόβλημα, εξαιτίας της αυξημένης εναπόθεσης παραπροϊόντων από την επεξεργασία του βιοντίζελ. Η διεργασία παραγωγής βιοντίζελ έχει σαν αποτέλεσμα τη περίσσεια σε απόθεμα γλυκερόλης, και ως εκ τούτου την ανάγκη για περαιτέρω αξιοποίησή της. Οι εξαιρετικά μεγάλες ποσότητες παραγόμενης γλυκερόλης και η αναπόφευκτη απόρριψή της, αποτελούν μια δαπανηρή εκδοχή για τις βιομηχανίες επεξεργασίας του βιοντίζελ, γεγονός που σημειώνει αρκετά χρόνια τώρα κομμάτι ερευνητικών μελετών για εξεύρεση λύσης. Ένας εναλλακτικός τρόπος αξιοποίησής της είναι βιοτεχνολογικά, με τη χρήση της ως πηγή άνθρακα και τη περαιτέρω παραγωγή χρήσιμων μεταβολιτών, σε αερόβιες και αναερόβιες καλλιέργειες, προς παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης και 2,3-βουτανοδιόλης. Υπάρχουν, όμως ορισμένοι περιορισμοί που, ενώ η εναλλακτική αξιοποίηση της γλυκερόλης σε ακάθαρτη βιομηχανική μορφή έχει σημαντικά πλεονεκτήματα, λόγω του χαμηλότερου κόστους τόσο σε οικονομικό, όσο και σε περιβαλλοντικό κομμάτι, αποφεύγεται η χρήση της σε πλήθος ερευνητικών μελετών, καθώς είναι μια πηγή άνθρακα που φέρει πολλές προσμίξεις. Δεδομένου, λοιπόν των υπολειμμάτων που προέρχονται από τη διεργασία διαχωρισμού της, περιέχονται σε αυτή σάπωνες, μεθανόλη και καταλύτες, που εμποδίζουν την ανάπτυξη ορισμένων μικροοργανισμών.

Σκοπός της μελέτης ήταν να αξιολογηθεί η γλυκερόλη στην καθαρή ή ακάθαρτη βιομηχανική μορφή της, για την ικανότητά της να λειτουργήσει ως υπόστρωμα καλλιέργειας άγριων βακτηριακών στελεχών, τα οποία δεν έχουν προηγουμένως μελετηθεί σε συνθήκες που περιγράφονται στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία, προς παραγωγή χρήσιμων μεταβολιτών, όπως 1,3-προπανοδιόλη, 2,3-βουτανοδιόλη και ακετοΐνη. Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το *Citrobacter freundii* EMBT, *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176, *Bacillus subtilis* ACA-DC 1225 και *Lactobacillus brevis* ACA-DC 1716.

Τα συγκεκριμένα στελέχη βακτηρίων προήλθαν από τη συλλογή του εργαστηρίου της Γαλακτοκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Σε πρώτο στάδιο προκειμένου να διαπιστωθεί η ανάπτυξη των μικροοργανισμών, προετοιμάστηκαν υγρές προκαλλιέργειες που εμβολιάστηκαν με το κάθε στέλεχος που βρισκόταν αποθηκευμένο σε Cryovial με μπίλιες και αφέθηκαν να επωαστούν για μία με δύο ημέρες σε κλίβανο στους 30 °C. Εν συνεχεία τα βακτήρια μεταφέρθηκαν σε Slants για να αποθηκευτούν. Συνεπώς, στη παρούσα διπλωματική εργασία εξετάζονται υπό διαφορετικές συνθήκες ασυνεχούς καλλιέργειας σε φιάλες και υπό αναερόβιες ή αερόβιες συνθήκες, τα παραπάνω στελέχη που αναπτύχθηκαν, για τη δυνατότητά τους να μεταβολίζουν τη γλυκερόλη καθαρότητας $\approx 99\%$, και ακάθαρτης γλυκερόλης καθαρότητας $\approx 81\%$. Τέλος μελετήθηκε η δυνατότητα, των πιο υποσχόμενων από τα προηγουμένως επιλεχθέντα στελέχη βακτηρίων, να αναπτυχθούν σε αυξημένης κλίμακας γλυκερόλη και να παραγάγουν χρήσιμα μεταβολικά προϊόντα.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στο κεφάλαιο αυτό αναλύονται η σύσταση των θρεπτικών μέσων και οι τεχνικές προετοιμασίας αυτών, ενώ παράλληλα γίνεται περιληπτική αναφορά στους τρόπους αποθήκευσης και συντήρησης των μικροοργανισμών. Επίσης παρουσιάζονται το βιολογικό υλικό που αξιολογήθηκε, οι συνθήκες καλλιέργειας, όπως και ο μηχανολογικός και εργαστηριακός εξοπλισμός που αποτέλεσε βασικό κομμάτι στον προσδιορισμό της κυτταρικής αύξησης και των μεταβολικών προϊόντων της παρούσας μελέτης.

Τα υπό μελέτη στελέχη βακτηρίων διατηρούνταν σε συνθήκες κατάψυξης (-18 °C) σε Cryovial στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Προκειμένου να ξεκινήσει η καλλιέργεια τους, πριν τη διεξαγωγή της πειραματικής μελέτης, κάθε ένα βακτηριακό στέλεχος εμβολιάστηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες με υγρό υπόστρωμα προκαλλιέργειας (Πρώτη Υγρή Προκαλλιέργεια, Πίν.1), ώστε να διαπιστωθεί η ανάπτυξή του. Η επώαση των μικροοργανισμών έγινε σε κλίβανο, χωρίς ανάδευση και σε θερμοκρασία 30 °C. Ύστερα από τη διαπίστωση της ανάπτυξης, το κάθε στέλεχος εμβολιάστηκε σε Slants (σωλήνες με κεκλιμένο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα) και αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία 6 °C. Σε κάθε πειραματική διεργασία προετοιμαζόταν νέο υπόστρωμα Υγρής Προκαλλιέργειας (Πίν.1), στο οποίο εμβολιαζόταν το κάθε στέλεχος, ώστε να φτάσει σε εκθετική φάση ανάπτυξης και ύστερα να είναι έτοιμο να εμβολιαστεί στο υπόστρωμα της κύριας καλλιέργειας.

3.1. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν είναι φυσικά βακτηριακά στελέχη των οικογενειών *Enterobacteriaceae*, *Bacillaceae* και *Lactobacillaceae*. Πιο συγκεκριμένα εξετάστηκαν ως προς την ανάπτυξή τους σε προκαθορισμένο υπόστρωμα και συνθήκες αερισμού, οι μικροοργανισμοί *Citrobacter freundii* EMBT, *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176, *Bacillus subtilis* ACA-DC 1225 και *Lactobacillus brevis* ACA-DC 1716. Τα υπό μελέτη στελέχη βακτηρίων διατηρούνταν σε συνθήκες κατάψυξης (-18 °C) σε Cryovial στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Υπήρξαν δύο φάσεις της πειραματικής μελέτης των μικροοργανισμών προκειμένου να διαπιστωθεί ο βέλτιστος τρόπος εμβολιασμού και ανάπτυξης του κάθε στελέχους στη προκαλλιέργεια και έπειτα στο υπόστρωμα της κύριας καλλιέργειας.

Στη πρώτη περίπτωση όπου καλλιεργήθηκαν οι *Citrobacter freundii* EMBT και *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176, χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό της προκαλλιέργειας Slant, στο οποίο είχε διατηρηθεί ο κάθε μικροοργανισμός. Σε δεύτερη περίπτωση, όπου και επανα-καλλιεργήθηκαν τα δύο προηγούμενα στελέχη, το βιολογικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε στον εμβολιασμό της υγρής προκαλλιέργειας, κάθε πειραματικής μελέτης, προερχόταν από προετοιμασμένο Cryovial. Τα Cryovial περιείχαν γλυκερόλη και εναιώρημα προηγούμενης προκαλλιέργειας με το εκάστοτε επιθυμητό στέλεχος, αποθηκευμένα σε κατάψυξη (-18 °C).

3.2. ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

3.2.1. ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΥΓΡΗΣ ΠΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Το υγρό θρεπτικό υπόστρωμα της προκαλλιέργειας που προετοιμάστηκε είναι το μέσο στο οποίο θα εμβολιαστεί ο μικροοργανισμός, προκειμένου να μπορέσει να αναπτυχθεί φτάνοντας στην εκθετική του φάση, ώστε μετά το πέρας 24 ή 48 ωρών (στη περίπτωση του *Lactobacillus brevis*) να εμβολιαστεί στο υπόστρωμα της κύριας υγρής καλλιέργειας. Συνεπώς προετοιμάστηκε υπόστρωμα, το οποίο αποτελούνταν από γλυκόζη, Βακτηριακή Πεπτόνη και Εκχύλισμα Ζύμης, οι συγκεντρώσεις των οποίων φαίνονται παρακάτω (Πίν.1). Αρχικά τα συστατικά του υποστρώματος ζυγίστηκαν σε ηλεκτρονικό ζυγό ακριβείας (Mettler PM 600) και αναμίχθηκαν με απιονισμένο νερό, σε ποτήρι ζέσεως, με τη χρήση μαγνητικού αναδευτήρα (Velp Scientifica). Στη συνέχεια προετοιμάστηκαν κωνικές φιάλες τύπου Erlenmeyer 250 ml, στις οποίες προστέθηκαν, με τη βοήθεια ογκομετρικού κυλίνδρου, 50 ml από το υπόστρωμα. Οι φιάλες πωματίστηκαν με βαμβάκι, και οδηγήθηκαν για αποστείρωση. Η αποστείρωση έγινε στους 121,1 °C για 15 λεπτά και με την ολοκλήρωσή της, οι φιάλες με το υπόστρωμα αφέθηκαν σε θερμοκρασία 25 με 30 °C, ώστε να αποκτήσουν συνθήκες κατάλληλες για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών.

Πίνακας 1: Σύσταση Θρεπτικού Υποστρώματος Υγρής Προκαλλιέργειας, * Condalab, Spain

Συστατικά	Συγκέντρωση (g/L)
Γλυκόζη (Glucose)	10
Βακτηριακή Πεπτόνη (Bacteriological Peptone)*	10
Εκχύλισμα Ζύμης (Yeast extract)*	10

3.2.2. ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΥΓΡΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Στις παρακάτω πειραματικές διεργασίες που εφαρμόστηκαν, διαπιστώθηκε η ικανότητα ανάπτυξης των βακτηριακών στελεχών σε υπόστρωμα με διαφορετική πηγή άνθρακα, ενώ τα υπόλοιπα άλατα και ιχνοστοιχεία παρέμεναν σε κάθε υπόστρωμα καλλιέργειας σταθερά. Συνεπώς η πηγή άνθρακα που χρησιμοποιήθηκε ήταν γλυκόζη (D(+)) glucose anhydrous, Carlo Erba, Italy) ή γλυκερόλη καθαρότητας ≈99% (J.T.Baker), ή ακάθαρτη βιομηχανική γλυκερόλη καθαρότητας ≈81%, είτε συν-υπόστρωμα γλυκερόλης (≈99%) και γλυκόζης σε αναλογία 1:2. Η Ακάθαρτη Βιομηχανική γλυκερόλη καθαρότητας ≈81%, προήλθε από την ελληνική βιομηχανία παραγωγής βιοκαυσίμων ΕΛΙΝ ΒΙΟΚΑΥΣΙΜΑ Α.Ε. (Αττική), θυγατρική της ΕΛΙΝΟΙΛ Α.Ε. (Πίν.2), η οποία επεξεργάζεται τηγανέλαια (Used Cooking Oil). Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί πως η καθαρότητα της ακάθαρτης βιομηχανικής γλυκερόλης, λήφθηκε υπόψη για τον υπολογισμό της τελικής συγκέντρωσης.

Πίνακας 2: Σύσταση Ακάθαρτης Βιομηχανικής γλυκερόλης

ΕΛΙΝ Βιοκαύσιμα Α.Ε.	
Προσμίξεις	Συγκέντρωση (% κ.β.)
Γλυκερόλη	81,2
Νερό	5,0
Ελεύθερα Λιπαρά Οξέα	4,8
Άλατα	-
Μεθανόλη	<0,2

Η συγκέντρωση της γλυκερόλης καθαρότητας $\approx 99\%$ στις περιπτώσεις όπου χρησιμοποιήθηκε ως μοναδική πηγή άνθρακα κυμάνθηκε από 20 ± 2 g/L μέχρι 70 ± 2 g/L, ανάλογα με το σκοπό της πειραματικής μελέτης. Τα υπόλοιπα συστατικά του υποστρώματος παρέμεναν για κάθε πειραματική μελέτη τα ίδια (Πίν.3). Αρχικά σε ποτήρι ζέσεως, προστέθηκε απιονισμένο νερό για διαλυτοποίηση των συστατικών και καθ' όλη τη διάρκεια προσθήκης τους, το μίγμα ήταν τοποθετημένο σε μαγνητικό αναδευτήρα για την ομογενοποίηση των συστατικών. Μόλις το θρεπτικό μέσο ήταν έτοιμο, ελέγχθηκε το pH του, ώστε η τιμή του μέσου να είναι ίση με $7,3 \pm 2$. Η μέτρηση του pH έγινε με τη βοήθεια επιτραπέζιου ηλεκτρονικού πεχάμετρου (pH/OPR Meter HI 2211-Hanna Instruments).

Η μέτρηση έγινε τοποθετώντας το ηλεκτρόδιο στο θρεπτικό μέσο και σε περίπτωση που η τιμή απέκλινε από την επιθυμητή, προστίθεντο καυστικό νάτριο 5 M (NaOH), στη περίπτωση που το μέσο ήταν χαμηλότερα του επιθυμητού ορίου, ή υδροχλωρικό οξύ 5 M (HCl), στη περίπτωση που το μέσο υπερέβαινε κατά πολύ το επιθυμητό όριο. Οι καλλιέργειες που έλαβαν χώρα, πραγματοποιήθηκαν υπό Αερόβιες και υπό Αναερόβιες συνθήκες. Συνεπώς για τη πρώτη περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν φιάλες τύπου Erlenmeyer των 250 mL, όπου τοποθετήθηκαν 50 mL του θρεπτικού μέσου, πωματίστηκαν με βαμβάκι και οδηγήθηκαν προς αποστείρωση για 15 λεπτά, στους $121,1$ °C, ενώ στη δεύτερη περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν φιάλες Duran των 100 mL, όπου τοποθετήθηκαν 80 mL του θρεπτικού μέσου, σφραγίστηκαν με βιδωτό καπάκι και οδηγήθηκαν προς αποστείρωση για 15 λεπτά, στους $121,1$ °C. Μόλις η θερμοκρασία τους από το τέλος της αποστείρωσης απέκτησε θερμοκρασία δωματίου, ήταν έτοιμες για εμβολιασμό με το εναιώρημα της προκαλλιέργειας.

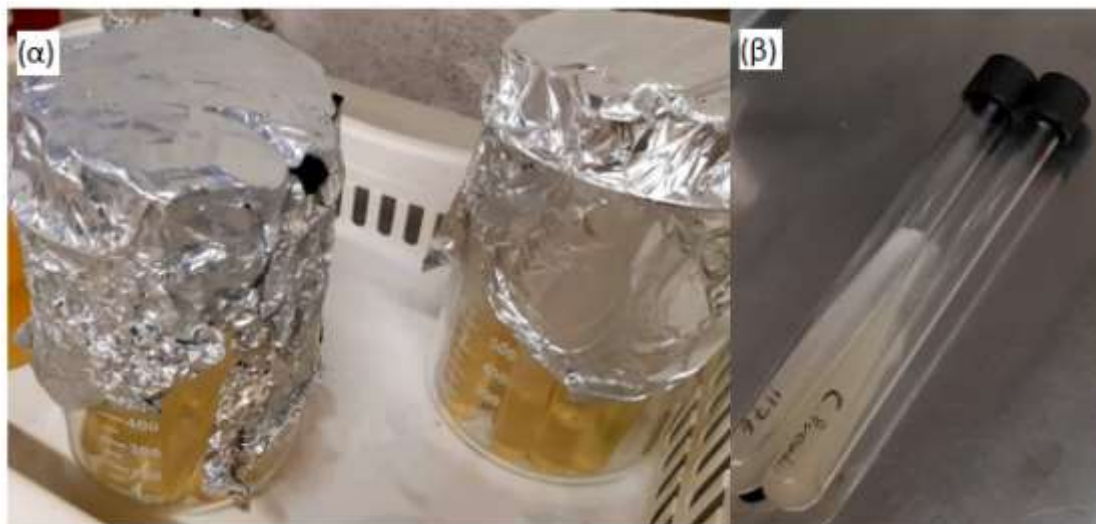
Πίνακας 3: Σύσταση Θρεπτικού Υποστρώματος Καλλιέργειας

Συστατικά	Συγκέντρωση g/L ή mL/L
Βακτηριακή πεπτόνη (Bacteriological Peptone)	5
Εκχύλισμα κρέατος (Meat extract)	5
Εκχύλισμα ζύμης (Yeast extract)	2,5
Φωσφορικό κάλιο (K₂HPO₄)	2
Οξικό νάτριο (CH₃COONa)	5
Θεικό μαγνήσιο (MgSO₄)	1
Θεικό μαγγάνιο (MnSO₄*H₂O)	3,3

3.2.3. ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΓΙΑ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΣΕ SLANTS

Ένα θρεπτικό υπόστρωμα είναι δυνατόν να παρασκευαστεί και να αποθηκευτεί για μελλοντική χρήση σε περίπτωση που χρειαστεί να εμβολιαστεί σε αυτό μικροοργανισμός, εξοικονομώντας χρόνο, καθώς θα είναι διαθέσιμο οποιαδήποτε στιγμή. Το Άγαρ είναι μια ουσία που εξάγεται από τα κυτταρικά τοιχώματα των κόκκινων φυκών και μπορεί να λειτουργήσει ως υπόστρωμα για την καλλιέργεια μικροοργανισμών, ωστόσο θα πρέπει να εμπλουτιστεί με θρεπτικά συστατικά όπως Yeast extract και Πεπτόνη προκειμένου να υποστηριχθεί η ζωή. Στη συγκεκριμένη πειραματική μελέτη χρησιμοποιήθηκαν Slants, τα οποία περιείχαν γλυκόζη 10 g/L, Πεπτόνη 10 g/L και μείγμα Εκχύλισμα Ζύμης-Άγαρ 20 g/L. Το μείγμα τοποθετήθηκε αρχικά σε φιάλη Duran και οδηγήθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να φτάσει το σημείο βρασμού και να ενεργοποιηθεί το Άγαρ. Ενώ ήταν ακόμη ζεστό, με πιπέτα απομονώθηκαν 5ml από το θρεπτικό υλικό και τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες με βιδωτό καπάκι. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες οδηγήθηκαν προς αποστείρωση στους 121,1 °C για 15 λεπτά. Μόλις ολοκληρώθηκε η αποστείρωση και πριν ακόμη κρυώσει και σταθεροποιηθεί το Άγαρ, οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετήθηκαν σε οριζόντια θέση, ώστε το θρεπτικό υλικό να καλύψει τη μισή πλευρά του δοκιμαστικού σωλήνα και εν τέλη όταν κρυώσει και ακολουθήσει ο εμβολιασμός του μικροοργανισμού, να μπορέσει να καταλάβει όσο το δυνατό μεγαλύτερη επιφάνεια χρειαστεί για να αναπτυχθεί. Όταν το Άγαρ κρύωσε, οι δοκιμαστικοί σωλήνες αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία 6 °C, με το Άγαρ στο εσωτερικό να έχει μία λοξή εμφάνιση (Εικ.14).

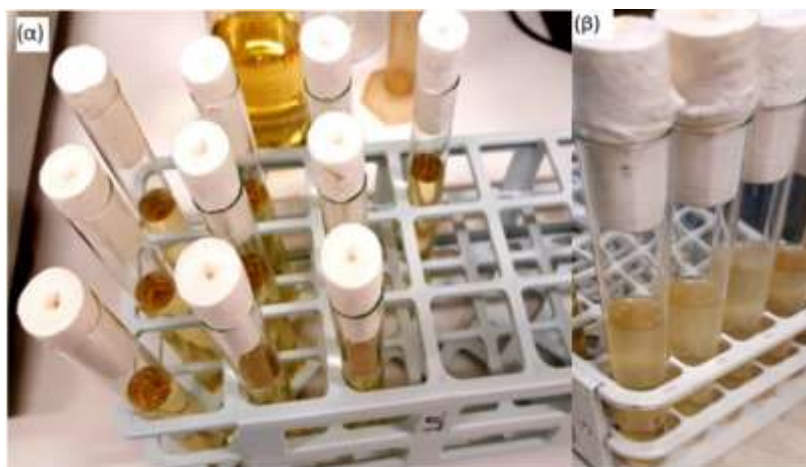
Σκοπός της προετοιμασίας των προκαλλιιεργειών σε Slants είναι η διατήρηση της ζωτικότητάς τους και η ευκολότερη ταυτοποίηση των βακτηριακών κυττάρων, καθώς τα βακτήρια λόγω του μικρού τους μεγέθους είναι δύσκολο να αναγνωριστούν σε ένα μεγάλο δείγμα. Σε κεκλιμένο υπόστρωμα τα βακτηριακά κύτταρα διαιρούνται γρηγορότερα, ενώ μέσα σε αρκετές ώρες θα έχουν αναπαραγάγει αρκετά κύτταρα για να εξεταστούν μικροσκοπικά (Osman E, 2021).



Εικόνα 14: (α) Ποτήρια ζέσεως μέσα στα οποία τοποθετήθηκαν σε όρθια θέση οι δοκιμαστικοί σωλήνες με το θρεπτικό υλικό για να αποστειρωθούν. (β) Slants που προετοιμάστηκαν και εμβολιάστηκαν με τα στελέχη *Citrobacter freundii* EMBT και *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176.

3.3. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΠΡΩΤΗΣ ΥΓΡΗΣ ΠΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ- ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΔΙΑΠΙΣΤΩΣΗ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ

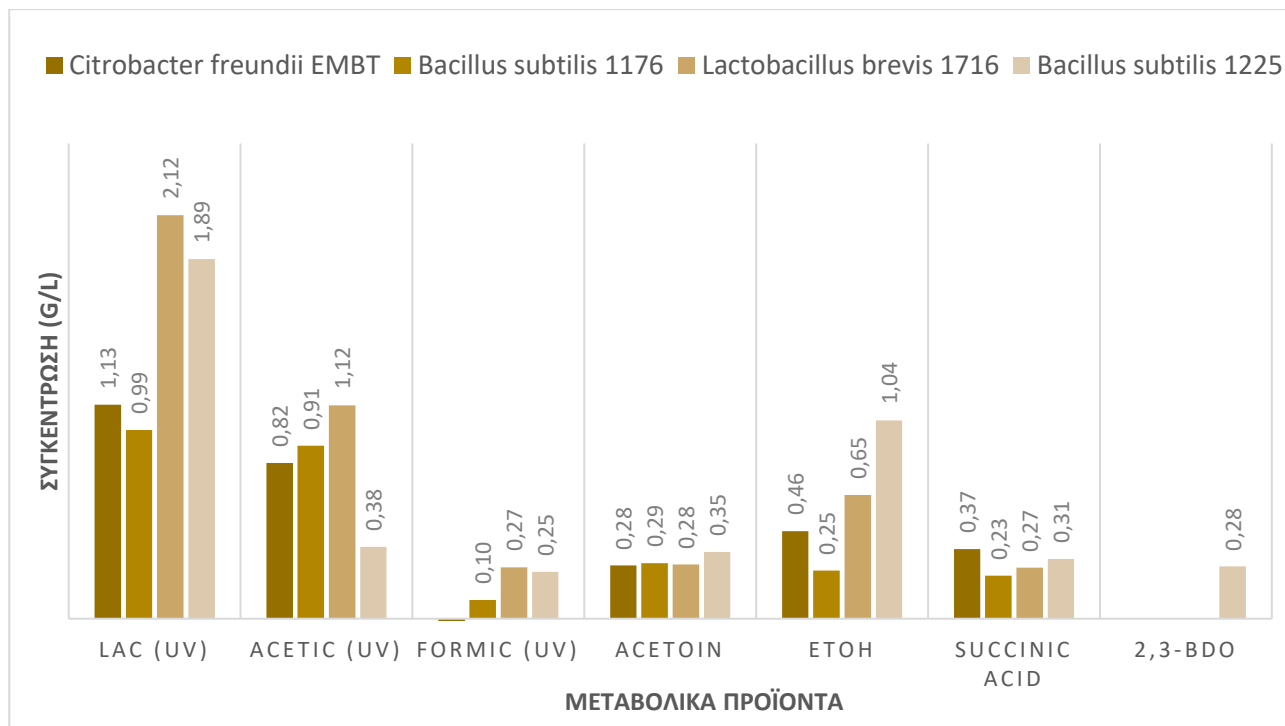
Σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες μοιράστηκαν 15 ml θρεπτικού υλικού, συνολικού όγκου 250 ml. Το θρεπτικό υλικό που αποτέλεσε τη πρώτη υγρή προκαλλιέργεια περιείχε τα συστατικά και τις συγκεντρώσεις που περιγράφονται παραπάνω (Πίν.1). Οι δοκιμαστικοί σωλήνες πωματίστηκαν και οδηγήθηκαν προς αποστείρωση στους 121.1 °C για 15 λεπτά. Με το πέρας της αποστείρωσης οι δοκιμαστικοί σωλήνες αφέθηκαν να κρυώσουν, μέχρι να φτάσουν σε συνθήκες κατάλληλες (≈25 °C) να επιβιώσει και να αναπτυχθεί μικροοργανισμός. Μόλις το υπόστρωμα της προκαλλιέργειας κρύωσε ήταν έτοιμο να εμβολιαστεί με τον μικροοργανισμό, ο οποίος είχε αποθηκευτεί στη κατάψυξη, σε ειδικά φιαλίδια Cryovial. Οι συνθήκες που επικράτησαν κατά τη διαδικασία εμβολιασμού ήταν ασηπτικές για την αποφυγή επιμόλυνσης, συνεπώς χρησιμοποιήθηκε καθ' όλη τη διάρκεια, θάλαμος κάθετης νηματικής ροής (Laminar). Εντός του θαλάμου κάθετης νηματικής ροής και με τη βοήθεια αποστειρωμένης βελόνας απομονώθηκε από κάθε ένα φιαλίδιο Cryovial, με ξεχωριστό βακτηριακό στέλεχος, μία μπίλια που περιέχει τον μικροοργανισμό και με προσοχή εμβολιάστηκε η υγρή προκαλλιέργεια. Οι γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες πωματίστηκαν και οδηγήθηκαν σε θερμοστατούμενο κλίβανο, χωρίς ανάδευση και σε θερμοκρασία 30 °C για μία έως δύο ημέρες, συνθήκες βέλτιστες για την ανάπτυξη των βακτηριακών στελεχών. Η επιτυχής ανάπτυξή τους έγινε εμφανής με τη θόλωση του θρεπτικού υγρού μέσου (Εικ.15). Μετά το πέρας 48 ωρών από την ημέρα εμβολιασμού διαπιστώθηκε η επιβίωση και των τεσσάρων βακτηριακών στελεχών: *Citrobacter freundii* EMBT, *Lactobacillus brevis* ACA-DC 1716 και *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176 και *Bacillus subtilis* ACA-DC 1225.



Εικόνα 15: (α) Προετοιμασία πρώτης υγρής προκαλλιέργειας που μοιράστηκε σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες πριν οδηγηθούν προς αποστείρωση. (β) Δοκιμαστικοί σωλήνες με τη προκαλλιέργεια, αφού εμβολιάστηκαν και ύστερα από το πέρας 48 ωρών ανάπτυξης των βακτηριακών στελεχών σε φούρνο θερμοκρασίας 30 °C, χωρίς ανάδευση, με εμφανή τη θόλωση του μέσου.

3.3.1. ΔΙΑΛΟΓΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΣΕ SLANTS

Προκειμένου να διαπιστωθεί ποια από τα τέσσερα (4) στελέχη που αναπτύχθηκαν επιτυχώς στη πρώτη υγρή προκαλλιέργεια, ήταν ικανά να μεταβολίσουν τη γλυκόζη και να παραγάγουν σημαντικά μεταβολικά προϊόντα, απομονώθηκε από τον κάθε ένα δοκιμαστικό σωλήνα με διαφορετικό στέλεχος, δείγμα 1,4 ml. Στη συνέχεια αποθηκεύτηκε σε Eppendorf για φυγοκέντριση σε φυγόκεντρο Hettich Zentrifugen Mikro 12-24, ώστε να διαχωριστεί η βιομάζα που παρήγαγε ο μικροοργανισμός, από το υπερκείμενο υγρό. Με την ολοκλήρωση της φυγοκέντρισης ελήφθησαν 1,2 ml από το υπερκείμενο και εξετάστηκε η σύσταση των μεταβολικών προϊόντων με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα, όπου καταγράφονται όλα τα μεταβολικά προϊόντα που παρήγαγαν τα εξεταζόμενα βακτηριακά στελέχη και οι συγκεντρώσεις τους, αναπτυσσόμενα στη πρώτη υγρή προκαλλιέργεια, και σε διάστημα 48 ωρών από τον εμβολιασμό (Γραφ.1).



Γράφημα 1: Ποιοτική και ποσοτική παρουσίαση των μεταβολικών προϊόντων από τα βακτηριακά στελέχη που αναπτύχθηκαν για 48 ώρες σε υπόστρωμα υγρής προκαλλιέργειας σε δοκιμαστικούς σωλήνες.

Στη συνέχεια σε έτοιμα Slants, τα οποία είχαν προετοιμαστεί και αποθηκευτεί στους 6 °C για να διατηρηθεί το υπόστρωμα ακέραιο, εμβολιάστηκαν τα διαφορετικά στελέχη βακτηρίων από τη πρώτη υγρή προκαλλιέργεια. Ο εμβολιασμός έγινε σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής, για να διατηρηθούν ασηπτικές συνθήκες και με τη βοήθεια αποστειρωμένου κρίκου απομονώθηκε, από τον κάθε ένα δοκιμαστικό σωλήνα με το μικροοργανισμό, μέρος του υγρού μέσου. Τέλος, τα Slants πωματίστηκαν, ονοματίστηκαν το κάθε ένα με τον μικροοργανισμό που περιείχαν και αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία 6 °C για να διατηρηθούν.

3.4. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΣΥΝΕΧΟΥΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Τα βακτηριακά στελέχη που αναλύονται, αξιολογήθηκαν για την ικανότητα ανάπτυξής τους υπό 2 διαφορετικές συνθήκες, όσον αφορά τη παρουσία ή μη οξυγόνου. Πιο συγκεκριμένα υπό αερόβιες συνθήκες, η καλλιέργεια έγινε σε κωνικές φιάλες τύπου Erlenmeyer των 250 ml με υψηλό διαθέσιμο οξυγόνο και με ανάδευση 180 rpm, ενώ υπό αναερόβιες συνθήκες, η καλλιέργεια έγινε σε φιάλες Duran των 100 ml, με χαμηλό διαθέσιμο οξυγόνο και με ανάδευση 100 rpm. Στο σημείο αυτό χρειάζεται να αναφερθεί πως οι αναερόβιες συνθήκες πραγματοποιήθηκαν με την επερχόμενη εξάντληση του Οξυγόνου στο εσωτερικό της φιάλης από την ίδια την ανάπτυξη του μικροοργανισμού, καθώς με το σφράγισμα της φιάλης, ύστερα από τον εμβολιασμό της, δεν υπήρξε είσοδος Οξυγόνου. Ο κύκλος ανάπτυξης της κάθε βακτηριακής καλλιέργειας είχε διάρκεια συνήθως τέσσερα (4) 24ωρα σε περίπτωση που η πηγή άνθρακα είχε συγκέντρωση 20 ± 3 g/L, ενώ η πλήρης αφομοίωση της πηγής άνθρακα είχε ρόλο περιοριστικού παράγοντα σταματώντας την ανάπτυξη. Η τιμή του pH ήταν άλλος ένας καθοριστικός παράγοντας για τον περιορισμό της ανάπτυξης ορισμένων βακτηριακών στελεχών, με το επιθυμητό όριο να βρίσκεται σε σταθερή τιμή $7,3 \pm 2$. Στις περιπτώσεις κατά τις οποίες υπήρξε διαπίστωση ότι η τιμή του pH εμπόδιζε την ανάπτυξη του μικροοργανισμού, εφαρμόστηκε επανακαλλιέργεια με διαδικασία διόρθωσης pH με τη προσθήκη NaOH 5 M, ώστε να διορθωθεί το όξινο περιβάλλον της ζύμωσης και να κυμαίνεται στα επιθυμητά όρια ανάπτυξης.

3.4.1. ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΟΡΙΖΟΝΤΑΝ ΓΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΥΠΟ ΑΕΡΟΒΙΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ

Υπό ασηπτικές συνθήκες και κατ' επέκταση σε θάλαμο νηματικής ροής (Laminar), μεταφέρθηκαν 0,5 ml (1%) εναιωρήματος της προκαλλιέργειας, σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 250 ml που περιείχαν 50 ml θρεπτικού υλικού της κύριας καλλιέργειας, ώστε να ξεκινήσει εκ νέου η μικροβιακή αύξηση στο νέο υπόστρωμα. Το εναιώρημα της προκαλλιέργειας αφαιρέθηκε με πιπέτα, χρησιμοποιώντας αποστειρωμένα τσιπς. Τέλος, οι φιάλες με τη κύρια καλλιέργεια αφού εμβολιάστηκαν, πωματίστηκαν με βαμβάκι και οδηγήθηκαν προς ανάδευση στον ανακινούμενο θάλαμο επώασης (Shaker) (New Brunswick Sc, U.S.A.), ώστε να ξεκινήσει η ζύμωση, σε θερμοκρασία 30 °C και 180 rpm.

3.4.2. ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΟΡΙΖΟΝΤΑΝ ΓΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΥΠΟ ΑΝΑΕΡΟΒΙΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ

Σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής μεταφέρθηκαν 4 ml (5%) εναιωρήματος της προκαλλιέργειας, σε φιάλες Duran των 100 ml που περιείχαν 80 ml θρεπτικού υλικού της κύριας καλλιέργειας, ώστε να ξεκινήσει εκ νέου η μικροβιακή αύξηση στο νέο υπόστρωμα. Το εναιώρημα της προκαλλιέργειας αφαιρέθηκε με πιπέτα, χρησιμοποιώντας αποστειρωμένα τιπς. Τέλος, οι φιάλες με τη κύρια καλλιέργεια αφού εμβολιάστηκαν, σφραγίστηκαν με βιδωτό καπάκι και οδηγήθηκαν προς ανάδευση στον ανακινούμενο θάλαμο επώασης, ώστε να ξεκινήσει η ανάπτυξη, σε θερμοκρασία 30 °C και 100 rpm.

3.5. ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

3.5.1. ΜΕΤΡΗΣΗ pH

Η μέτρηση του pH του θρεπτικού μέσου της καλλιέργειας πριν και μετά τον εμβολιασμό, έγινε με τη βοήθεια επιτραπέζιου ηλεκτρονικού πεχάμετρου (pH/OPR Meter HI 2211-Hanna Instruments).

3.5.2. ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΜΕΤΡΗΣΗ ΒΙΟΜΑΖΑΣ

Η συγκέντρωση της βιομάζας προέκυψε από μέτρηση που βασίστηκε σε τυπική μέθοδο φυγοκέντρωσης για τον διαχωρισμό του υπερκείμενου υγρού μέσου από τα κύτταρα και εν συνεχεία ζυγίζοντας το ξηρό βάρος. Για επιβεβαίωση και ταχύτερο προσδιορισμό της βιομάζας, η παραπάνω διαδικασία συνδυάστηκε με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 600 nm (φωτομετρική), ώστε να δημιουργηθεί μια συσχέτιση. Δεδομένου ότι η διαδικασία μέτρησης του ξηρού βάρους διαρκεί 20-26 ώρες, ενώ πιο γρήγορος είναι ο προσδιορισμός της οπτικής πυκνότητας (≈ 10 λεπτά), έγινε συνδυασμός των δύο μεθόδων.

3.5.3. ΜΕΘΟΔΟΣ ΞΗΡΑΝΣΗΣ (DRY WEIGHT) (ΑΜΕΣΗ)

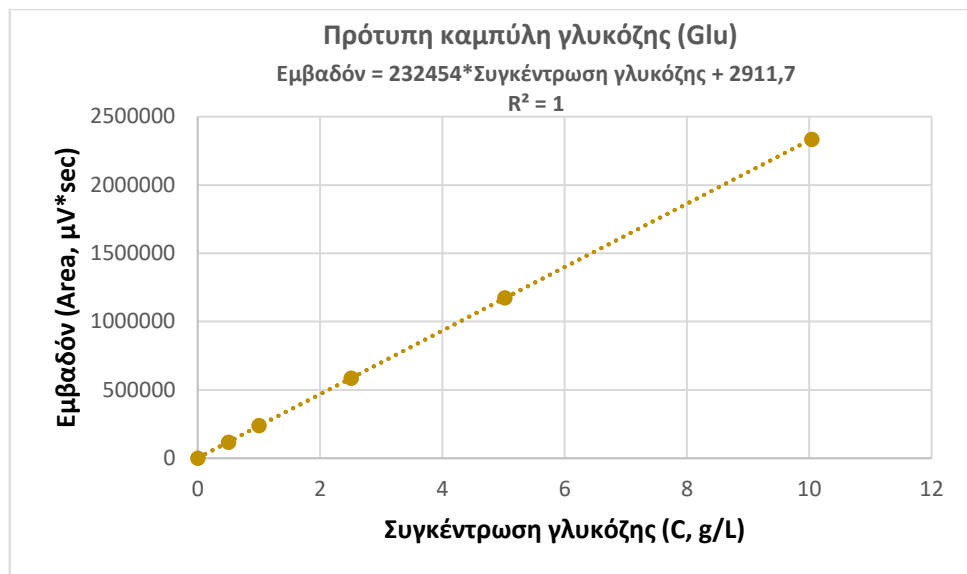
Το θρεπτικό υγρό της καλλιέργειας φυγοκεντρήθηκε σε Falcons με τη χρήση φυγόκεντρου τύπου Hettich Zentrifugen Universal 320 R, για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία 4 °C και 9000 στροφές, ώστε να διαχωριστούν τα κύτταρα από το υγρό. Στη συνέχεια απορρίφθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκε απιονισμένο νερό, ώστε να επαναδιαλυτοποιηθεί η βιομάζα και να ομογενοποιηθεί με το απιονισμένο νερό. Κατά συνέπεια, το διάλυμα οδηγήθηκε ξανά για δεύτερη φυγοκέντριση για να απομακρυνθεί το περίσσιο υγρό της καλλιέργειας από τη βιομάζα. Με την ολοκλήρωση της φυγοκέντρισης, το περίσσιο υγρό απορρίφθηκε και προστέθηκε εκ νέου απιονισμένο νερό στο Falcon με τη βιομάζα για να διαλυτοποιηθεί και πάλι. Τέλος το μίγμα μεταφέρθηκε σε προζυγισμένα γυάλινα παχύτοιχα φιαλίδια McCartney, τα οποία τοποθετήθηκαν σε φούρνο τύπου Gallenkamp Oven BS OV-160 για ξήρανση στους 80 °C και χρονικό διάστημα 24 ώρες. Το ξηρό υπόλειμμα της βιομάζας επαναζυγίστηκε σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας τύπου Kern ABJ-NM/ABS-N και η διαφορά των δύο μετρήσεων αποτελούσε τη τιμή του καθαρού βάρους της παραχθείσας βιομάζας, εκφρασμένο σε g/L.

3.5.4. ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΟΠΤΙΚΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ (OPTICAL DENSITY) (ΕΜΜΕΣΗ)

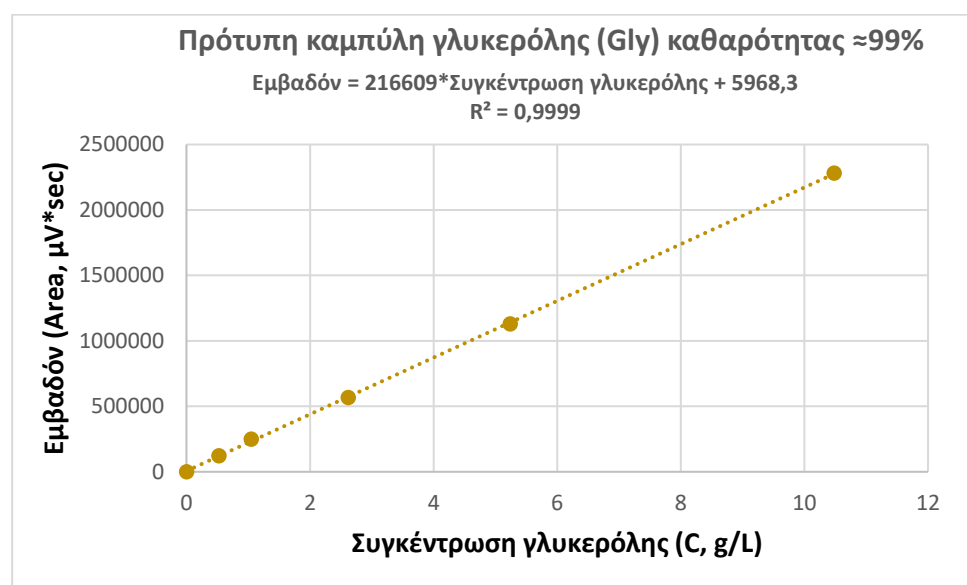
Από τις καλλιέργειες των βακτηριακών στελεχών λαμβανόταν δείγμα 2ml μετά τον εμβολιασμό και μεταφερόταν σε φιαλίδια Eppendorf. Ως τυφλό σημείο χρησιμοποιούνταν προηγουμένως δύο (2) κυβέτες των 1,5 mL συμπληρωμένες με απιονισμένο νερό, οι οποίες τοποθετούνταν σε ειδικές υποδοχές του φασματοφωτόμετρου τύπου Hitachi U-2000 (Hitachi Ltd, Tokyo, Japan). Ύστερα από το μηδενισμό της μέτρησης, η μία από τις δύο κυβέτες συμπληρωνόταν εκ νέου με το δείγμα που είχε αποθηκευτεί στα Eppendorf, αφού πρώτα αναδευόταν για να ομογενοποιηθεί και επανατοποθετούταν στην ειδική υποδοχή. Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας γινόταν σε μήκος κύματος $\lambda=600$ nm, κατά την οποία λαμβανόταν η τιμή απορρόφησης του περιεχόμενου στη κυβέτα δείγματος, ενώ ακολουθούσε και δεύτερη μέτρηση της τιμής απορρόφησης του ίδιου δείγματος με μεσολάβηση φυγοκέντρισης, προκειμένου να διαπιστωθεί κατά πόσο επηρεάζει την οπτική πυκνότητα του δείγματος η βιομάζα. Η διαφορά των δύο μετρήσεων αποτελούσε τη τιμή της καθαρής απορρόφησης του δείγματος, εκφρασμένη σε Absorbance (A).

3.5.5. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΚΑΙ ΚΑΤΑΝΑΛΩΘΕΙΣΑΣ ΠΗΓΗΣ ΑΝΘΡΑΚΑ

Ο προσδιορισμός των μεταβολικών προϊόντων, των συγκεντρώσεων αυτών καθώς και της μέτρησης της καταναλωθείσας ποσότητας πηγής άνθρακα, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (H.P.L.C., High Performance Liquid Chromatography) και υγρό χρωματογράφο τύπου Shimadzu, με ανιχνευτές UV και RI (2414 Refractive Index). Τα οργανικά οξέα, όπως οξικό οξύ (acetic), γαλακτικό οξύ (lactic) και μυρμηκικό οξύ (formic), προσδιορίστηκαν στον ανιχνευτή απορρόφησης υπεριώδους ακτινοβολίας (U.V.) και μήκους κύματος $\lambda=210$ nm, ενώ για τον προσδιορισμό της γλυκόζης, γλυκερόλης, 1,3-προπανοδιόλης, ακετοΐνης, 2,3-βουτανοδιόλης, μέσο-2,3-βουτανοδιόλης και αιθανόλης, έγινε με τη βοήθεια ανιχνευτή R.I. (2414 Refractive Index). Τα μεταβολικά προϊόντα ταυτοποιήθηκαν βάση του χρόνου κατακράτησης (Retention Time, min) της ουσίας του κάθε δείγματος στη στήλη, συγκριτικά με τον χρόνο κατακράτησης γνωστών δειγμάτων. Η διαχωριστική στήλη ήταν τύπου ROA-Organic Acid H^+ (Phenomenex) και η θερμοκρασία λειτουργίας της ήταν 60 °C, ενώ ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε υδατικό διάλυμα Θεικού οξέος (H_2SO_4) σε ποσότητα 10 mM, με ροή 0,6 mL/min. Ο όγκος του δείγματος που περνούσε από τη στήλη ήταν καθορισμένος στα 20 μ L και η διάρκεια της ανάλυσης στα 30 λεπτά. Τα δείγματα προς ανάλυση, φιλτράρονταν με φίλτρα τύπου Whatman διαμέτρου 0,22 μ m και τοποθετούνταν σε ειδικά φιαλίδια (vials) της H.P.L.C., όπου εν συνεχεία μεταφέρονταν σε ειδικό σύστημα εισαγωγής του δείγματος για να μετρηθούν. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ουσιών, γινόταν μέσω των αποτελεσμάτων που καταγράφονταν σε οθόνη ηλεκτρονικού υπολογιστή, στον οποίο παρουσιαζόταν το εμβαδό της κάθε κορυφής του χρωματογραφήματος (Area, $\mu V \cdot sec$) και το οποίο εφαρμόζοταν σε εξίσωση που προέκυπτε από τη πρότυπη συγκέντρωση γνωστών διαλυμάτων για τη κάθε ουσία. Συγκεκριμένα για τον προσδιορισμό της 2,3-βουτανοδιόλης, χρησιμοποιήθηκαν γνωστά διαλύματα 2,3-βουτανοδιόλης και μέσο-2,3-βουτανοδιόλης, από όπου υπολογίστηκαν οι πρότυπες καμπύλες, ώστε κάθε φορά που στο δείγμα της καλλιέργειας παρουσιάζονταν και η 2,3-βουτανοδιόλη και το στερεοϊσομερές μέσο-2,3-βουτανοδιόλη, η τελική συγκέντρωσή της 2,3-βουτανοδιόλης, να προκύπτει από το άθροισμα των συγκεντρώσεών τους. Παρακάτω παρουσιάζονται οι πρότυπες καμπύλες αναφοράς για το μονοσακχαρίτη γλυκόζη και τη τρισθενή αλκοόλη γλυκερόλη, που χρησιμοποιήθηκαν με βάση τις εξισώσεις του γραμμικού μοντέλου (Διάγρ. 1, Διάγρ. 2).



Διάγραμμα 1: Πρότυπη καμπύλη προσδιορισμού του μονοσακχαρίτη γλυκόζη



Διάγραμμα 2: Πρότυπη καμπύλη προσδιορισμού της τριθενούς αλκοόλης, γλυκερόλη

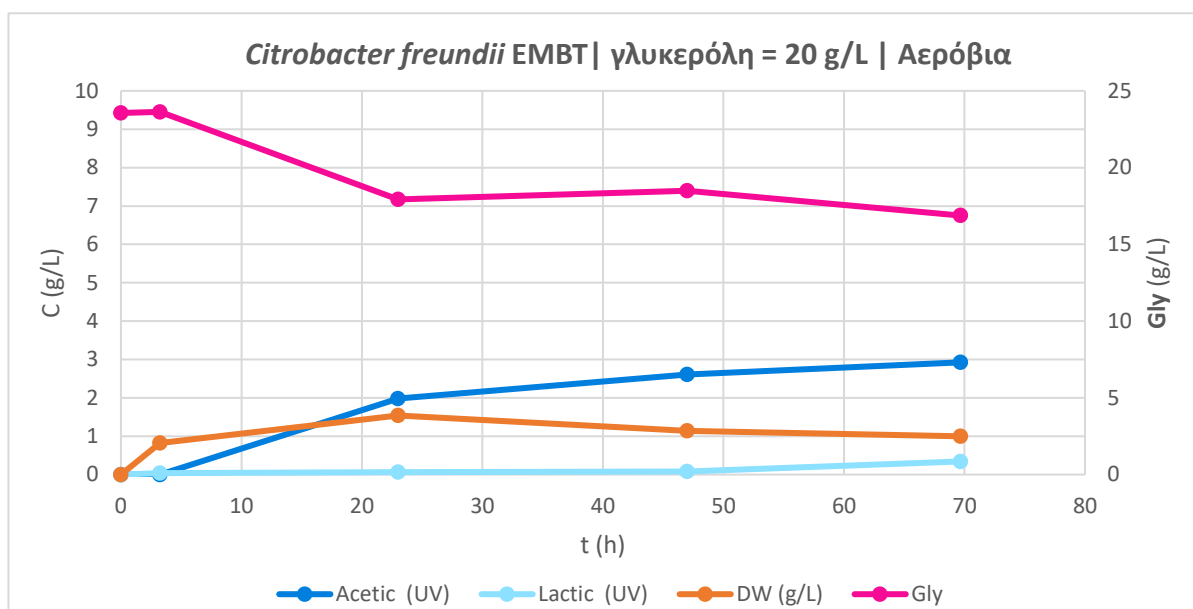
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ

Στη παρούσα πειραματική μελέτη εξετάστηκαν τέσσερα (4) διαφορετικά άγρια βακτηριακά στελέχη και αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να αφομοιώνουν, υπό διαφορετικές συνθήκες οξυγόνου, την επιθυμητή πηγή άνθρακα και να παράγουν μεταβολικά προϊόντα, αλλά και επαρκή ποσότητα βιομάζας. Όλοι οι μικροοργανισμοί καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα γλυκόζη, γλυκερόλη καθαρότητας $\approx 99\%$ και ακάθαρτης βιομηχανικής γλυκερόλης καθαρότητας $\approx 81\%$ και εξετάστηκε η κινητική τους. Η συγκέντρωση της γλυκόζης που χρησιμοποιήθηκε στο θρεπτικό υπόστρωμα ήταν 20 ± 3 g/L, η συγκέντρωση της γλυκερόλης καθαρότητας $\approx 99\%$ ήταν 20 ± 3 g/L, 40 ± 3 g/L και 70 ± 3 g/L, καθώς και η συγκέντρωση της ακάθαρτης βιομηχανικής γλυκερόλης καθαρότητας $\approx 81\%$ ήταν 20 ± 3 g/L. Στη διάρκεια των πειραμάτων προσδιορίστηκε η ολική αφομοίωση της πηγής άνθρακα $S_{\text{cons}(\text{total})}$, οι συγκεντρώσεις των μεταβολικών προϊόντων, η συγκέντρωση του ξηρού βάρους της βιομάζας (D.W.), η οπτική πυκνότητα του δείγματος (O.D.), καθώς επίσης και ο μέγιστος συντελεστής απόδοσης της παραγόμενης βιομάζας προς το καταναλωθέν υπόστρωμα $Y\left(\frac{X}{S}\right)$, ο μέγιστος συντελεστής απόδοσης του παραχθέντος προϊόντος προς το καταναλωθέν υπόστρωμα $Y\left(\frac{PD}{S}\right)$, $Y\left(\frac{BD}{S}\right)$, $Y\left(\frac{ACTN}{S}\right)$, για τη περίπτωση που το κύριο μεταβολικό προϊόν είναι η 1,3-προπανοδιόλη (1,3-PDO), 2,3-βουτανοδιόλη (2,3-BDO) και ακετοΐνη (acetoin) αντίστοιχα, η μέγιστη παραγωγικότητα της ξηρής βιομάζας $P_{(X_{\text{max}})}$, η παραγωγικότητα των προϊόντων $P_{(1,3\text{-PDO})}$, $P_{(2,3\text{-BDO})}$, $P_{(\text{acetoin})}$ και τέλος ο μέγιστος ρυθμός κατανάλωσης του υποστρώματος $r_{(S)}$. Τέλος, ως $S_{\text{cons}(X_{\text{max}})}$ αναφέρεται η αφομοίωση της πηγής άνθρακα που καταγράφηκε στο χρονικό σημείο της ζύμωσης, για τη μέγιστη συγκέντρωση του ξηρού βάρους της βιομάζας.

4.1. ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ ΥΓΡΗΣ ΠΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΑΠΟ SLANTS (1^H ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ)

Σε πρώτο στάδιο των πειραμάτων έγινε χρήση των προετοιμασμένων σε Slant μικροοργανισμών *Citrobacter freundii* EMBT και *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176, για τον εμβολιασμό του υποστρώματος υγρής προκαλλιέργειας (Πιν.1), ώστε μετά την επώασή τους να εμβολιαστούν στο θρεπτικό υπόστρωμα της κύριας καλλιέργειας (Πιν.3). Οι δύο καλλιέργειες που παρουσιάζονται παρακάτω αφορούν τη χρήση καθαρής γλυκερόλης ως πηγή άνθρακα, σε αερόβιες συνθήκες, 180 rpm και 30 °C.

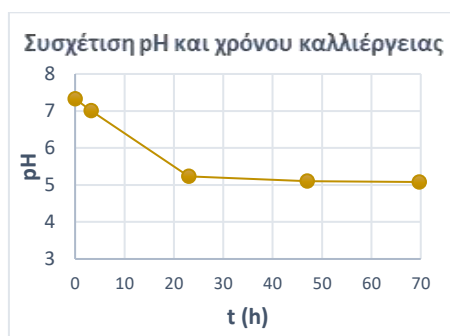
4.1.1. Καλλιέργεια του *Citrobacter freundii* EMBT



Διάγραμμα 3: Κινητική ανάπτυξης *C. freundii* EMBT σε αερόβια καλλιέργεια με θρεπτικό μέσο γλυκερόλης 20 g/L

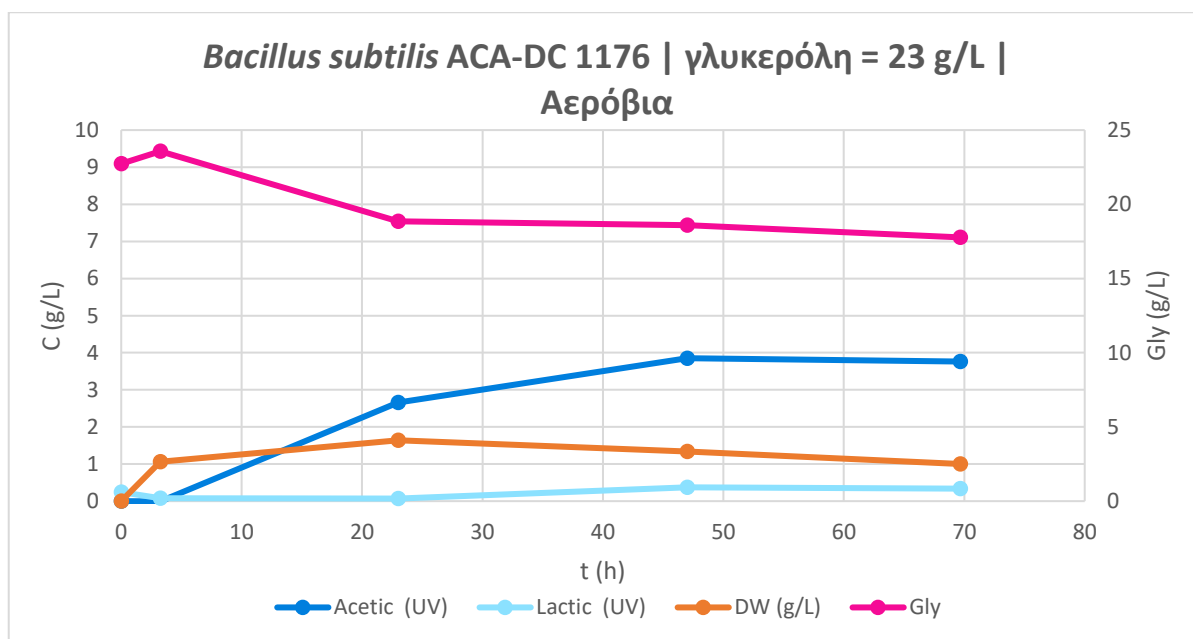
Στη παραπάνω περίπτωση καλλιέργειας του *Citrobacter freundii* EMBT, παρατηρείται μικρή αφομοίωση της γλυκερόλης (Gly) με $S_{\text{cons}(\text{total})} = 6,68$ g/L στις 70 ώρες ζύμωσης (Διάγρ.3). Στο διάστημα αυτό παράγονται βιομάζα (DW) με μέγιστη συγκέντρωση 1,54 g/L και $S_{\text{cons}(X_{\text{max}})} = 5,62$ g/L στις 23 ώρες. Το οξικό οξύ (acetic) απέκτησε μέγιστη συγκέντρωση 3 g/L στις 70 ώρες ζύμωσης, από την αρχική συγκέντρωση 4,85 g/L. Παράλληλα παράχθηκαν σε αμελητέες συγκεντρώσεις γαλακτικό οξύ (lactic) και μυρμηκικό οξύ (formic).

Ο συντελεστής απόδοσης ως προς τη βιομάζα ήταν $Y\left(\frac{X}{S}\right) = 0,23 \frac{\text{g βιομάζας(max)}}{\text{g υποστρώματος}}$ και η παραγωγικότητα βιομάζας ($P_{(X_{\max})}$) ήταν 0,07 g/L/h. Ο μέγιστος ρυθμός κατανάλωσης υποστρώματος ($r_{(S)}$) ήταν 0,24 g/L/h μέχρι τις 70 ώρες ζύμωσης. Το pH από αρχική τιμή 7,33 μειώθηκε στις πρώτες 24 ώρες στο 5,23 και στις 70 ώρες, μειώθηκε περαιτέρω στο 5,1 (Διαγρ.4).



Διάγραμμα 4: Διακύμανση του pH συγκριτικά με τον χρόνο καλλιέργειας

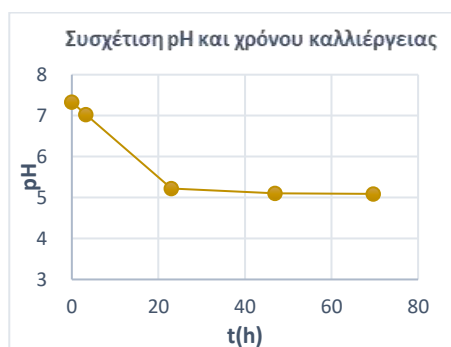
4.1.2. Καλλιέργεια του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176



Διάγραμμα 5: Κινητική ανάπτυξης του *B. subtilis* ACA-DC 1176 σε αερόβια καλλιέργεια με θρεπτικό μέσο γλυκερόλης 23 g/L

Στη παραπάνω περίπτωση όπου ο *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176 εμβολιάζεται σε προκαλλιέργεια, όταν αρχικά είχε διατηρηθεί σε Slant, παρατηρείται μικρή αφομοίωση της γλυκερόλης (Gly) με $S_{\text{cons}(\text{total})} = 4,95 \text{ g/L}$ στις 70 ώρες ζύμωσης (Διαγρ.5). Στο διάστημα αυτό παράγονται βιομάζα (DW) με μέγιστη συγκέντρωση $1,64 \text{ g/L}$ και $S_{\text{cons}(X_{\text{max}})} = 3,87 \text{ g/L}$ στις 23 ώρες. Το οξικό οξύ (acetic) απέκτησε μέγιστη συγκέντρωση $3,85 \text{ g/L}$ στις 47 ώρες ζύμωσης, από την αρχική τιμή στο θρεπτικό μέσο $4,3 \text{ g/L}$. Παράλληλα παράχθηκαν σε αμελητέες συγκεντρώσεις γαλακτικό οξύ (lactic) και μυρμηκικό οξύ (formic).

Ο συντελεστής απόδοσης ως προς τη βιομάζα ήταν $Y\left(\frac{X}{S}\right) = 0,42 \frac{\text{g βιομάζας (max)}}{\text{g υποστρώματος}}$ και η παραγωγικότητα βιομάζας ($P_{(X_{\text{max}})}$) ήταν $0,07 \text{ g/L/h}$. Το pH από αρχική τιμή $7,33$ μειώθηκε στις πρώτες 23 ώρες στο $5,22$ και στις 70 ώρες, μειώθηκε περαιτέρω στο $5,09$ (Διαγρ.6).



Διάγραμμα 6: Διακύμανση του pH συγκριτικά με τον χρόνο καλλιέργειας

Συνεπώς, για τις καλλιέργειες των *Citrobacter freundii* EMBT και *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176, δεδομένου της καθυστέρησης αφομοίωσης της πηγής άνθρακα μέχρι τις 70 ώρες, καθώς και της αδυναμίας παραγωγής άλλων μεταβολιτών, εξετάστηκε η πιθανότητα να ευθύνεται η τεχνική εμβολιασμού της προκαλλιέργειας, η οποία έγινε από τον μικροοργανισμό που ήταν αποθηκευμένος σε Slant. Επίσης και στα δύο βακτηριακά στελέχη παρατηρήθηκε μεγάλη μείωση του pH από τις πρώτες 24 ώρες, με τον παράγοντα αυτό να επηρεάζει αρνητικά την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Και τα δύο στελέχη που είχαν αποθηκευτεί στα Slants, όπως έχει αναφερθεί παραπάνω, προέρχονταν από υπόστρωμα υγρής προκαλλιέργειας χωρίς ανάδευση του μέσου, ενώ μετά τη μεταφορά και τη διατήρησή τους στα Slants εμβολιάστηκαν εκ νέου σε νέο υπόστρωμα προκαλλιέργειας.

Η ανακαλλιέργεια και μεταφορά των μικροοργανισμών στα διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα προκαλλιέργειας και καλλιέργειας, αλλά και η απουσία ανάδευσης του θρεπτικού μέσου της πρώτης προκαλλιέργειας, θεωρήθηκε βασικός παράγοντας αδυναμίας ανάπτυξης τους στις συγκεκριμένες καλλιέργειες. Συνεπώς σε επόμενο στάδιο ο εμβολιασμός των προκαλλιιεργειών για τα υπόλοιπα πειράματα έγινε με διαφορετική τεχνική, κατευθείαν από Cryovial.

4.2. ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ ΥΓΡΗΣ ΠΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΑΠΟ CRYOVIAL (2^H ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ)

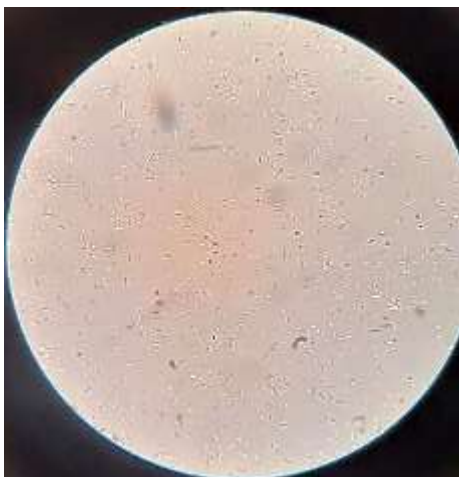
Σε δεύτερο στάδιο των πειραμάτων έγινε χρήση των προετοιμασμένων σε Cryovial μικροοργανισμών, για τον εμβολιασμό του υποστρώματος υγρής προκαλλιέργειας (Πιν.1) σε φιάλες τύπου Erlenmeyer, με ανάδευση 180 rpm και 30 °C, ώστε μετά την επώασή τους να εμβολιαστούν στο θρεπτικό υπόστρωμα της κύριας καλλιέργειας (Πιν.3).

4.2.1. Καλλιέργεια του *Citrobacter freundii* EMBT

Παρακάτω παρουσιάζονται όλες οι συνθήκες καλλιέργειας που αξιολογήθηκαν για τον *Citrobacter freundii* EMBT, στα παρακάτω πειράματα συνολικά, αναφέροντας όλων των ειδών τις πηγές άνθρακα που χρησιμοποιήθηκαν, μαζί με τις συγκεντρώσεις τους (Πίν.4).

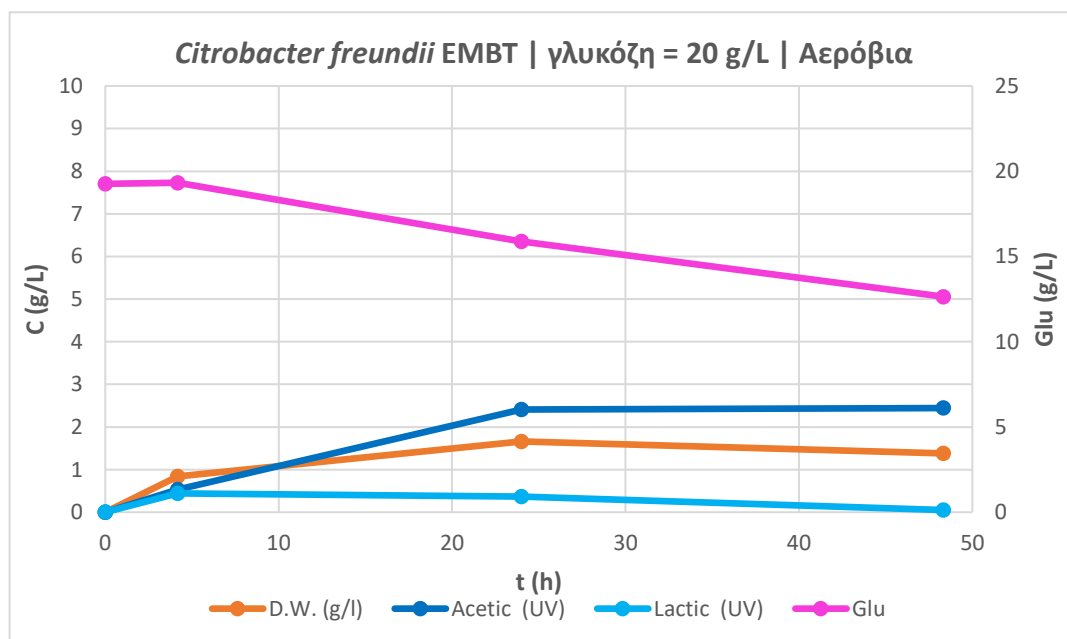
Πίνακας 4: Συνθήκες καλλιέργειας *Citrobacter freundii* EMBT

<i>Citrobacter freundii</i> EMBT	
Πηγή Άνθρακα	<ul style="list-style-type: none"> • Γλυκόζη (Glu) • Γλυκερόλη (Gly) καθαρότητας ≈ 99% • Βιομηχανική γλυκερόλη (Cr.Gly) καθαρότητας ≈ 81%
Συνθήκες Καλλιέργειας	<ul style="list-style-type: none"> ○ Χωρίς ρύθμιση pH ○ Με ρύθμιση pH ○ Αερόβιες – Κωνικές φιάλες με 180 rpm (υψηλό O₂) ○ Αναερόβιες – Φιάλες Duran με 100 rpm (χαμηλό O₂) ○ Θερμοκρασία επώασης 30 °C
Συγκέντρωση Πηγής Άνθρακα	20±3 g/L



Εικόνα 16: Μικροσκοπική παρατήρηση κυττάρων του *Citrobacter freundii* EMBT σε οπτικό μικροσκόπιο (μεγέθυνσης x100)

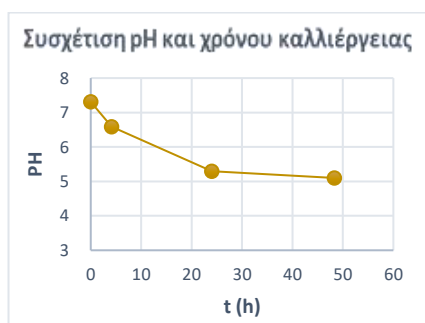
4.2.1.1. Καλλιέργεια του *Citrobacter freundii* EMBT σε υγρό θρεπτικό μέσο γλυκόζης (Glu), υπό αερόβιες συνθήκες (Χωρίς ρύθμιση pH)



Διάγραμμα 7: Κινητική ανάπτυξης *C. freundii* EMBT σε αερόβια καλλιέργεια με θρεπτικό μέσο γλυκόζης 20 g/L

Στις αερόβιες συνθήκες, όπου καλλιιεργήθηκε ο *Citrobacter freundii* EMBT με πηγή άνθρακα γλυκόζη 20 g/L και σε χρονικό διάστημα 48 ωρών ζύμωσης, δεν πρόλαβε να αφομοιωθεί πλήρως η πηγή άνθρακα με $S_{\text{cons (total)}} = 6,68 \text{ g/L}$ (Διαγρ.7). Συνεπώς η μέγιστη παραγωγή βιομάζας (D.W.) ήταν 1,66 g/L με $S_{\text{cons (Xmax)}} = 3,44 \text{ g/L}$ στις 24 ώρες. Η συγκέντρωση του οξικού οξέος (acetic) ήταν 2,44 g/L στις 48 ώρες, από τα 4,08 g/L που υπήρχαν αρχικά. Παράλληλα παράχθηκαν σε αμελητέες συγκεντρώσεις γαλακτικό οξύ (lactic) και μυρμηκικό οξύ (formic).

Ο συντελεστής απόδοσης ως προς τη βιομάζα ήταν $Y\left(\frac{X}{S}\right) = 0,48 \frac{\text{g βιομάζας(max)}}{\text{g υποστρώματος}}$ και η παραγωγικότητα βιομάζας ($P_{(X_{\text{max}})}$) ήταν 0,07 g/L/h. Ο μέγιστος ρυθμός κατανάλωσης υποστρώματος ($r_{(S)}$) ήταν 0,20 g/L/h μέχρι τις 48 ώρες ζύμωσης. Το pH από αρχική τιμή 7,31 μειώθηκε στις πρώτες 24 ώρες στο 5,3, ενώ ύστερα από 48 ώρες, μειώθηκε περαιτέρω στο 5,1 (Διαγρ.8).

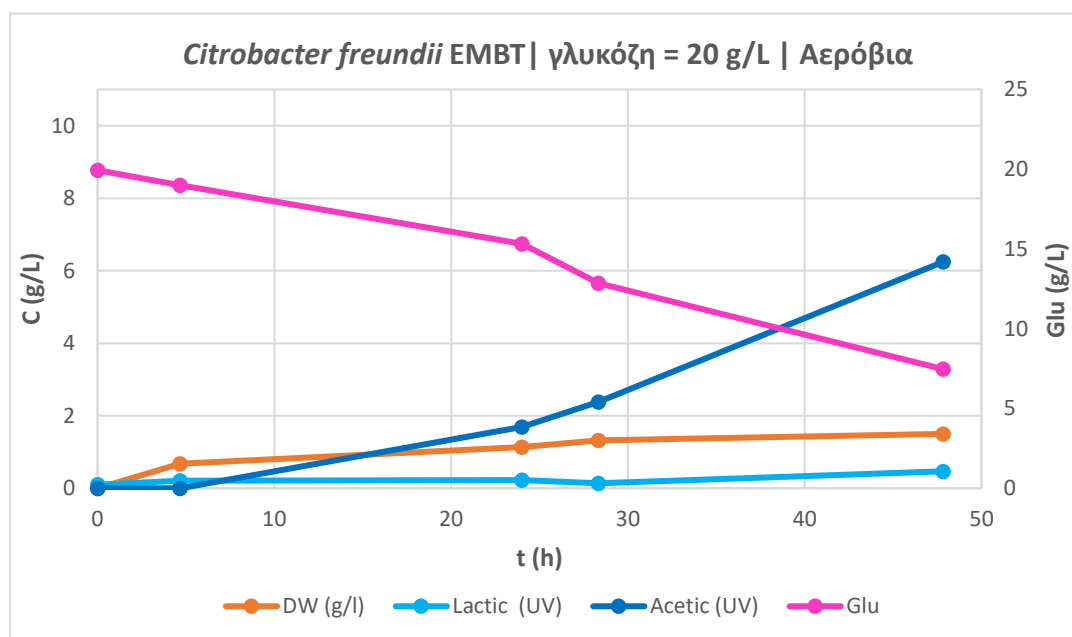


Διάγραμμα 8: Διακύμανση του pH συγκριτικά με τον χρόνο καλλιέργειας

Συνεπώς, η απότομη μείωση του pH ήδη από τις 4 ώρες καλλιέργειας μπορεί να οφείλεται στην αύξηση του οξικού οξέος (acetic), το οποίο έχει την τάση να παράγεται καθ' όλη τη διάρκεια της αύξησης του μικροοργανισμού. Επίσης το γεγονός ότι μειώθηκε το pH στο 5,3 στις 24 ώρες, μπορεί να δικαιολογήσει την αδυναμία του *Citrobacter freundii* EMBT να αφομοιώσει περαιτέρω τη γλυκόζη (Glu) και να μη παραγάγει επιπλέον μεταβολικά προϊόντα, μειώνοντας το ρυθμό της ανάπτυξης μετά τις 24 ώρες, εξαιτίας του όξινου περιβάλλοντος. Στο ίδιο συμπέρασμα φαίνεται να καταλήγουν και άλλοι ερευνητές που μελέτησαν την ανάπτυξη του ίδιου βακτηρίου σε υπόστρωμα γλυκερόλης αλλά και γλυκόζης, όπως οι Drożdżyńska A *et al.*, (2011), οι οποίοι παρατήρησαν μείωση του pH περίπου στο 4,8 όταν δεν ρυθμιζόταν, καθώς ο *Citrobacter freundii* EMBT παράγει κυρίως οργανικά οξέα, οδηγώντας σε πρόωρη παύση της ανάπτυξής του και ατελή χρήση του υποστρώματος.

Βάση της παραπάνω πειραματικής μελέτης του *Citrobacter freundii* EMBT, και των αποτελεσμάτων της καλλιέργειας, φαίνεται πως η ρύθμιση του pH είναι μείζονος σημασίας για να μπορέσει να συνεχιστεί περαιτέρω η ανάπτυξή του.

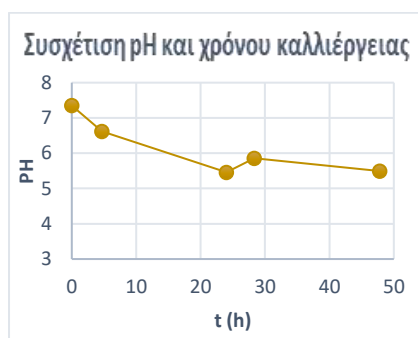
4.2.1.2. Καλλιέργεια του *Citrobacter freundii* EMBT σε υγρό θρεπτικό μέσο γλυκόζης (Glu), υπό αερόβιες συνθήκες (Με ρύθμιση pH)



Διάγραμμα 9: Κινητική ανάπτυξης *C. freundii* EMBT σε αερόβια καλλιέργεια με θρεπτικό μέσο γλυκόζης 20 g/L

Στη περίπτωση ρύθμισης του pH κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του *Citrobacter freundii* EMBT σε αερόβια καλλιέργεια με πηγή άνθρακα γλυκόζη, ώστε να μη μειωθεί η τιμή του κάτω από 5,4 (τιμή στην οποία φάνηκε από τη περίπτωση χωρίς ρύθμιση pH, να συνεχίζει να καταναλώνεται η πηγή άνθρακα, άρα και να επιβιώνει ο μικροοργανισμός), σημειώθηκε καλύτερη αφομοίωση της γλυκόζης (Glu), μέχρι τις 48 ώρες καλλιέργειας, με $S_{\text{cons}(\text{total})} = 12,47 \text{ g/L}$ (Διαγρ.9). Η βιομάζα (DW), καθώς και τα υπόλοιπα μεταβολικά προϊόντα της ζύμωσης δεν αναπτύχθηκαν σημαντικά. Η βιομάζα έλαβε τη μέγιστη συγκέντρωσή της, στις 48 ώρες με $1,5 \text{ g/L}$ και $S_{\text{cons}(\text{Xmax})} = 12,27 \text{ g/L}$. Το οξικό οξύ (acetic) απέκτησε τιμή $6,24 \text{ g/L}$ στις 48 ώρες ζύμωσης από την αρχική συγκέντρωση $4,51 \text{ g/L}$. Παράλληλα παράχθηκαν σε αμελητέες συγκεντρώσεις γαλακτικό οξύ (lactic) και μυρμηκικό οξύ (formic)

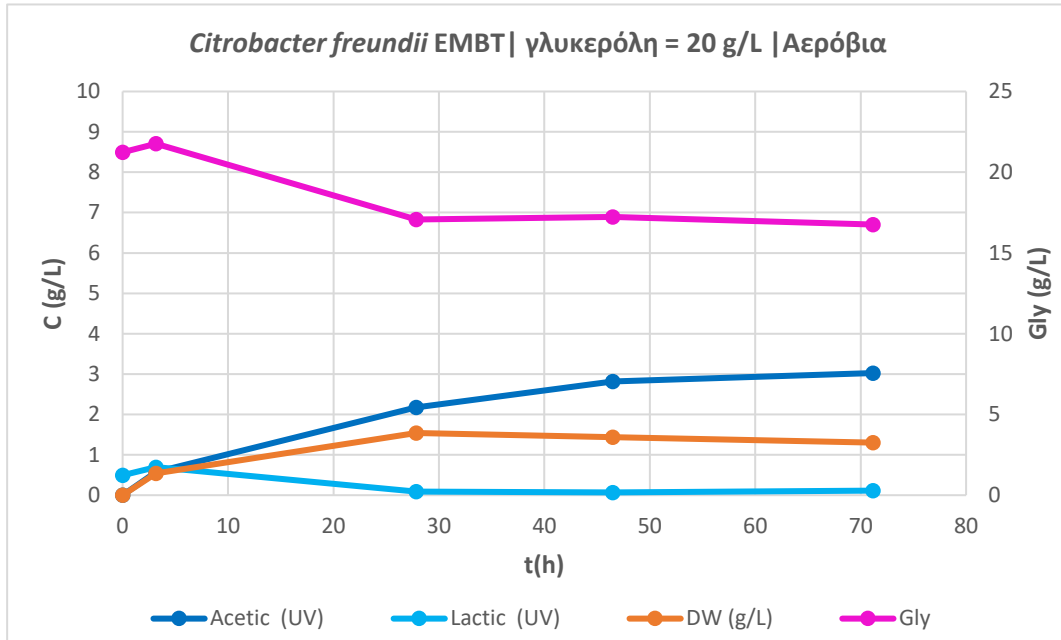
Ο συντελεστής απόδοσης ως προς τη βιομάζα ήταν $Y\left(\frac{X}{S}\right) = 0,12 \frac{\text{g βιομάζας(max)}}{\text{g υποστρώματος}}$ και η παραγωγικότητα βιομάζας ($P_{(X_{\max})}$) ήταν 0,03 g/L/h. Ο μέγιστος ρυθμός κατανάλωσης υποστρώματος ($r_{(S)}$) ήταν 0,26 g/L/h μέχρι τις 48 ώρες ζύμωσης. Το pH από αρχική τιμή 7,35 μειώθηκε στο 5,46 στις 24 ώρες, ύστερα ρυθμίστηκε στο 7,4 με διάλυμα NaOH 5 M και μέχρι τις 48 ώρες που σταμάτησε η ζύμωση και με δεύτερη ρύθμιση στο 7,4 μειώθηκε μέχρι τη τιμή 5,49 (Διαγρ.10). Συνολικά το pH ρυθμίστηκε 2 φορές.



Διάγραμμα 10: Διακύμανση του pH συγκριτικά με τον χρόνο καλλιέργειας

Σύμφωνα με τα παραπάνω, με ρύθμιση του pH παρατηρήθηκε διπλασιασμός του ρυθμού αφομοίωσης της γλυκόζης (Glu) συγκριτικά με τη περίπτωση που δεν ρυθμίστηκε, αλλά και καλύτερη αφομοίωση της γλυκόζης (Glu), σχεδόν 63% της συνολικής πηγής άνθρακα. Η γρήγορη πτώση του pH, ήδη από το πρώτο 24ωρο, μπορεί να ευθύνεται για την αδυναμία του *Citrobacter freundii* EMBT να καταναλώσει τη γλυκόζη (Glu) στο χρονικό διάστημα των 48 ωρών, δεδομένου ότι είχε προλάβει να παραχθεί σημαντική ποσότητα οξικού οξέος, ικανή να καταστείλει την ανάπτυξή του. Συνεπώς η ρύθμιση του pH πρέπει να γίνει σε πιο τακτά χρονικά διαστήματα, ώστε να μη προλάβει το θρεπτικό μέσο να γίνει παραπάνω όξινο από αυτό που μπορεί να επιβιώσει ο μικροοργανισμός. Επίσης η καλλιέργεια θα πρέπει να διαρκέσει μεγαλύτερο χρονικό διάστημα για να φανεί εάν μπορεί ο *Citrobacter freundii* EMBT να αφομοιώσει πλήρως τη πηγή άνθρακα, καθώς και αν θα υπήρχε παραγωγή περισσότερων μεταβολικών προϊόντων.

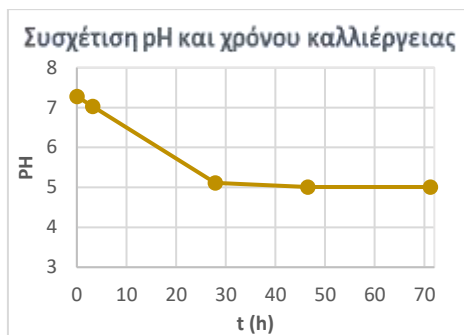
4.2.1.3. Καλλιέργεια του *Citrobacter freundii* EMBT σε υγρό θρεπτικό μέσο γλυκερόλης (Gly) καθαρότητας $\approx 99\%$, υπό αερόβιες συνθήκες (Χωρίς ρύθμιση pH)



Διάγραμμα 11: Κινητική ανάπτυξης *C. freundii* EMBT σε αερόβια καλλιέργεια με θρεπτικό μέσο γλυκερόλης 20 g/L

Στη περίπτωση της καλλιέργειας του *Citrobacter freundii* EMBT σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα γλυκερόλη (Gly), υπό αερόβιες συνθήκες, αλλά με διαφορετική τεχνική εμβολιασμού της προκαλλιέργειας, παρατηρείται μετά τις 3 ώρες μέχρι και τις 27 ώρες σχετική αφομοίωση της γλυκερόλης (Gly) από το βακτήριο, ωστόσο και σε αυτή τη περίπτωση η γλυκερόλη (Gly) δεν αφομοιώνεται πλήρως με $S_{consumed} = 5,00$ g/L, ενώ στις 27 ώρες, παράγεται μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας (DW) 1,54 g/L με $S_{cons(X_{max})} = 0,33$ g/L (Διαγρ.11). Η γλυκερόλη (Gly) μετά τις 27 ώρες δεν παρουσίασε σημαντική αφομοίωση και παρέμεινε στάσιμη, με το οξικό οξύ (acetic) να παρουσιάζει μια μικρή αύξηση στη συγκέντρωση, όπου και είχε τη μεγαλύτερη τιμή του στις 70 ώρες με 3,02 g/L από την αρχική τιμή 4,17 g/L. Παράλληλα παράχθηκαν σε αμελητέες συγκεντρώσεις γαλακτικό οξύ (lactic) και μυρμηκικό οξύ (formic).

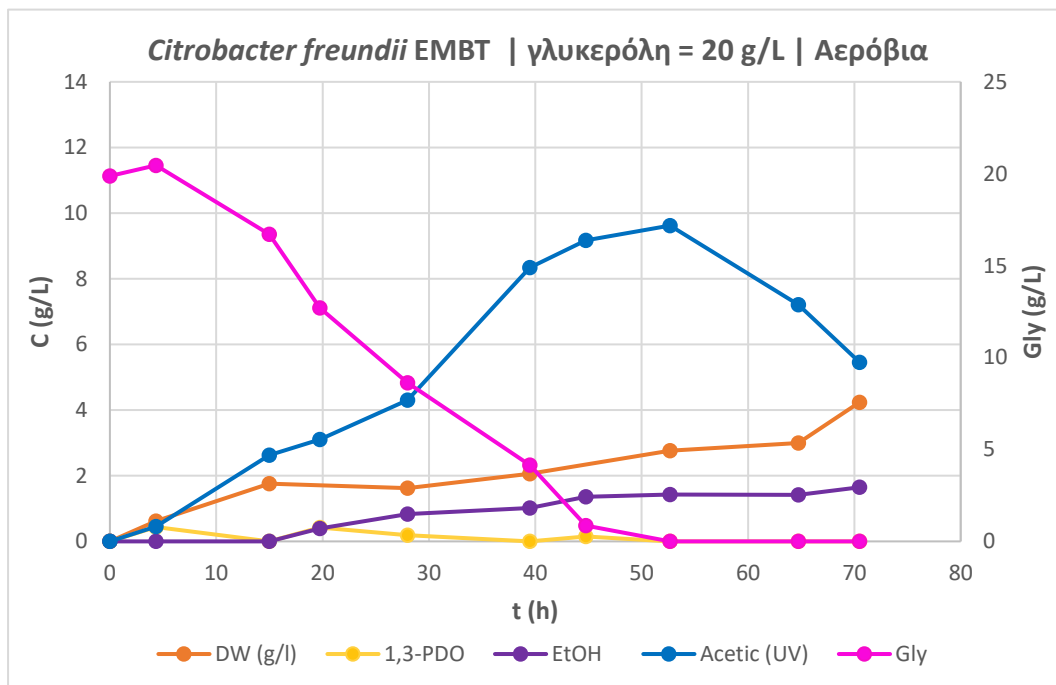
Ο συντελεστής απόδοσης ως προς τη βιομάζα ήταν $Y\left(\frac{X}{S}\right) = 0,33 \frac{\text{g βιομάζας (max)}}{\text{g υποστρώματος}}$ και η παραγωγικότητα βιομάζας ($P_{(X_{max})}$) ήταν 0,06 g/L/h. Ο μέγιστος ρυθμός κατανάλωσης υποστρώματος ($r_{(S)}$) ήταν 0,07 g/L/h μέχρι τις 70 ώρες ζύμωσης. Το pH από αρχική τιμή 7,28, μετά τις 70 ώρες μειώθηκε στο 5,01 (Διαγρ.12).



Διάγραμμα 12: Διακύμανση του pH συγκριτικά με τον χρόνο καλλιέργειας

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα ο *Citrobacter freundii* EMBT δε φαίνεται να έχει σημαντική αλλαγή στην ανάπτυξη και αφομοίωση της γλυκερόλης ως πηγή άνθρακα στο μέσο της καλλιέργειας υπό αερόβιες συνθήκες, ούτε μετά την επανακαλλιέργειά του με διαφορετική τεχνική εμβολιασμού της προκαλλιέργειας. Ο εμβολιασμός της προκαλλιέργειας, δηλαδή, από έτοιμα Cryovial με το εναιώρημα του μικροοργανισμού, και στη συνέχεια η καλλιέργειά του σε γλυκερόλη, απέδωσε μικρότερο ρυθμό αφομοίωσης και λιγότερη αναλωθείσα γλυκερόλη, καθώς στη πρώτη περίπτωση το βακτήριο κατανάλωσε 6,68 g/L γλυκερόλη, ενώ με τη δεύτερη τεχνική 5 g/L. Επίσης, τα μεταβολικά προϊόντα ποιοτικά και ποσοτικά ήταν σχεδόν ίδια με ελάχιστη αύξηση της συγκέντρωσης. Η αφομοίωση της γλυκερόλης εμφανώς παρεμποδίζεται, εξαιτίας της οξίνισης του μέσου ανάπτυξης. Το pH, λόγω της γρήγορης μείωσής του, στο 5,11 από τις πρώτες 27 ώρες, που ευθύνεται η παρουσία αυξημένης συγκέντρωσης οξικού οξέος (acetic), φαίνεται να επηρεάζει τη μικροβιακή αύξηση και να σταματά την ανάπτυξη. Συνεπώς σε επόμενο πείραμα επανακαλλιεργήθηκε ο *Citrobacter freundii* EMBT στις ίδιες συνθήκες αλλά με ρύθμιση του pH στη τιμή $7,4 \pm 2$, τιμή στην οποία αναπτύσσεται ο *Citrobacter freundii* EMBT, ώστε να διαπιστωθεί η πιθανότητα βελτίωσης της αφομοιώνοντας της πηγής άνθρακα και παραγωγής διαφορετικών μεταβολικών προϊόντων.

4.2.1.4. Καλλιέργεια του *Citrobacter freundii* EMBT σε υγρό θρεπτικό μέσο γλυκερόλης (Gly) καθαρότητας $\approx 99\%$, υπό αερόβιες συνθήκες (Με ρύθμιση pH)



Διάγραμμα 13: Κινητική ανάπτυξης *C. freundii* EMBT σε αερόβια καλλιέργεια με θρεπτικό μέσο γλυκερόλης 20 g/L

Στη περίπτωση αερόβιας καλλιέργειας του *Citrobacter freundii* EMBT σε υπόστρωμα καθαρής γλυκερόλης (Gly) για 71 ώρες καλλιέργειας, με ρύθμιση του pH στη τιμή $7,4 \pm 2$, έγινε σύγκριση της διάρκειας ζύμωσης και των παραγόμενων μεταβολικών προϊόντων, με τη περίπτωση κατά την οποία οι συνθήκες καλλιέργειας είναι ίδιες, ωστόσο το pH δεν ρυθμίστηκε (Διαγρ.13).

Αρχικά παρατηρήθηκε πλήρης αφομοίωση της γλυκερόλης (Gly) πριν τις 50 ώρες ζύμωσης, όταν στη περίπτωση που το pH δεν ρυθμιζόταν, η κατανάλωση της γλυκερόλης (Gly) είχε σταματήσει πριν τις 27 ώρες. Στο διάστημα αυτό παράγονται βιομάζα (DW) με μέγιστη συγκέντρωση 4,24 g/L και $S_{\text{cons}(X_{\text{max}})} = 20,46$ g/L στις 70 ώρες. Το οξικό οξύ (acetic) απέκτησε μέγιστη συγκέντρωση 9,62 g/L στις 52 ώρες ζύμωσης, από την αρχική τιμή 3,84 g/L. Επίσης παρατηρήθηκε παραγωγή αιθανόλης (ethanol) από τις 20 ώρες ζύμωσης, με τη μέγιστη τιμή 1,65 g/L στις 71 ώρες. Σε αραιά χρονικά διαστήματα παρατηρείται παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης (1,3-PDO) σε πολύ χαμηλή τιμή, με μέγιστη συγκέντρωση 0,42 g/L και $S_{\text{cons}(PDO_{\text{max}})} = 11,83$ g/L στις 28 ώρες ζύμωσης.

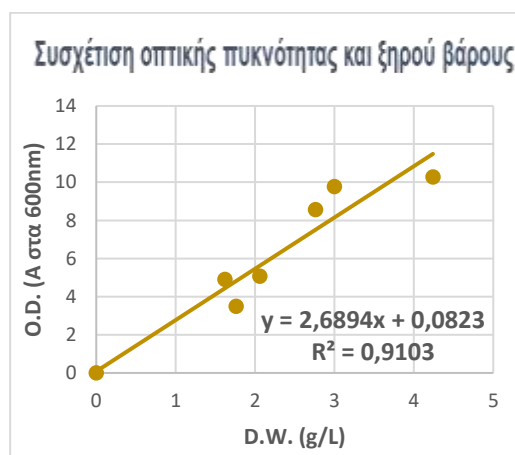
Παράλληλα παράχθηκαν σε αμελητέες συγκεντρώσεις γαλακτικό οξύ (lactic) μυρμηκικό οξύ (formic) και ηλεκτρικό οξύ (succinic).

Ο συντελεστής απόδοσης ως προς τη βιομάζα ήταν $Y\left(\frac{X}{S}\right) = 0,21 \frac{\text{g βιομάζας(max)}}{\text{g υποστρώματος}}$. Η παραγωγικότητα βιομάζας ($P_{(X_{\max})}$) ήταν 0,06 g/L/h. και ο μέγιστος ρυθμός κατανάλωσης υποστρώματος ($r_{(S)}$) ήταν 0,43 g/L/h στις 48 ώρες ζύμωσης. Το pH από την αρχική τιμή 7,44 μειώθηκε στο 5,46 στις 15 ώρες, παραμένοντας κοντά στη τιμή αυτή, με ρυθμιζόμενο pH χρησιμοποιώντας διάλυμα NaOH 5M, μέχρι και τις 44 ώρες ζύμωσης, ενώ από εκείνο το χρονικό σημείο και έπειτα άρχισε να αυξάνεται, λαμβάνοντας τη τιμή 8,58 στις 71 ώρες ζύμωσης (Διαγρ.14). Συνολικά το pH ρυθμίστηκε 7 φορές.



Διάγραμμα 14: Διακύμανση του pH συγκριτικά με τον χρόνο καλλιέργειας

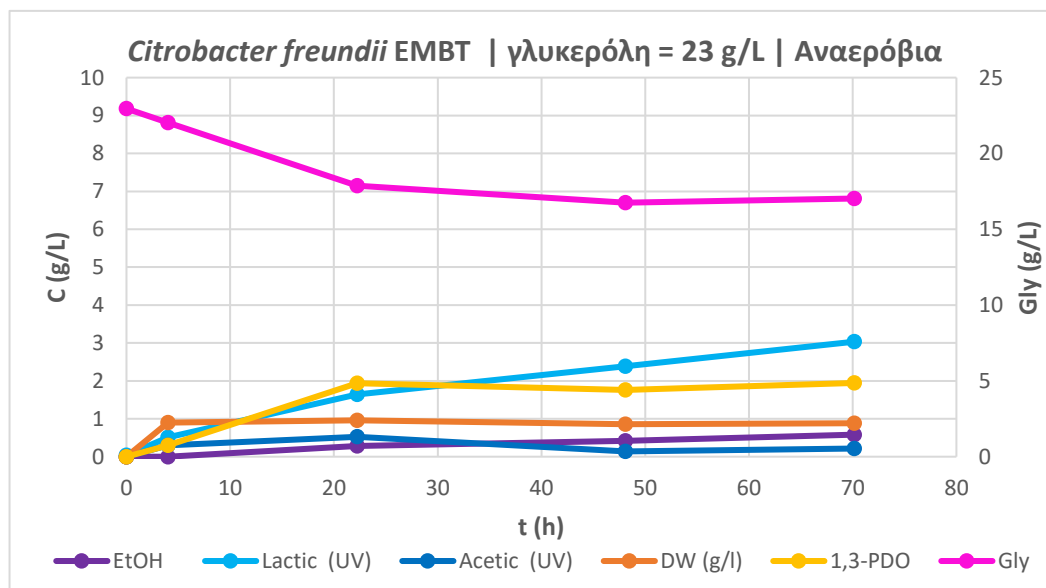
Τέλος για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της παραγόμενης βιομάζας, προσδιορίστηκε η καμπύλη συσχέτισης της οπτικής πυκνότητας (OD) στα 600 nm του δείγματος, συγκριτικά με τη συγκέντρωση του ξηρού βάρους της βιομάζας (DW) (Διαγρ.15). Η μέγιστη τιμή της οπτικής πυκνότητας (OD) στα 600 nm ήταν 10,28 A στις 71 ώρες καλλιέργειας.



Διάγραμμα 15: Καμπύλη συσχέτισης της οπτικής πυκνότητας και της συγκέντρωσης της βιομάζας

Συμπερασματικά, με τη ρύθμιση του pH φάνηκε καθαρά η διαφορά αφομοίωσης της γλυκερόλης, η οποία καταναλώθηκε πλήρως πριν τις 50 ώρες ζύμωσης, όπως επίσης και ο ρυθμός αφομοίωσής της αυξήθηκε από 0,07 g/L/h στη τιμή 0,43 g/L/h. Από την κινητική ανάπτυξης του *Citrobacter freundii* EMBT (Διαγρ.13), διακρίνεται μετά τις 50 ώρες ζύμωσης, σταδιακή μείωση του οξικού οξέος, γεγονός που οφείλεται στην ανάγκη του μικροοργανισμού να καλύψει τις ενεργειακές του απαιτήσεις. Όταν στο θρεπτικό μέσο καταναλώθηκε πλήρως η γλυκερόλη και είχαν αυξηθεί τόσο το pH, όσο και η βιομάζα, ο μικροοργανισμός ξεκίνησε να καταναλώνει το οξικό οξύ, που παρήγαγε μέσω της διεργασίας του καταβολισμού. Επίσης υπήρξε καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης παραγόμενη 1,3-προπανοδιόλη, όταν στη περίπτωση που δεν ρυθμίστηκε το pH δεν παράχθηκε καθόλου. Τέλος η βιομάζα αυξήθηκε από 1,54 g/L στη τιμή 4,24 g/L. Συνεπώς γίνεται αντιληπτό, πως βασικός παράγοντας παρεμπόδισης της διεργασίας της ζύμωσης και της αφομοίωσης της γλυκερόλης υπό αερόβιες συνθήκες, είναι η οξίνιση του μέσου αύξησης, που προκαλείται από τη μεγάλη συγκέντρωση του παραγόμενου οξικού οξέος.

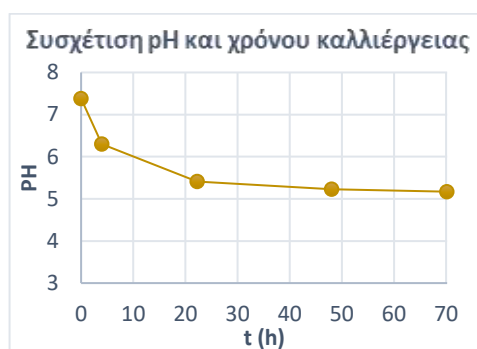
4.2.1.5. Καλλιέργεια του *Citrobacter freundii* EMBT σε υγρό θρεπτικό μέσο γλυκερόλης (Gly) καθαρότητας $\approx 99\%$, υπό αναερόβιες συνθήκες. (Χωρίς ρύθμιση pH)



Διάγραμμα 16: Κινητική ανάπτυξης *C. freundii* EMBT σε αναερόβια καλλιέργεια με θρεπτικό μέσο γλυκερόλης 23 g/L

Στις αναερόβιες συνθήκες με υπόστρωμα καθαρή γλυκερόλη (Gly), ο *Citrobacter freundii* EMBT δεν αφομοίωσε πλήρως τη γλυκερόλη (Gly), ύστερα από 70 ώρες ανάπτυξης με $S_{\text{cons(total)}} = 5,93 \text{ g/L}$ (Διαγρ.16). Στο διάστημα αυτό παράγονται οι μέγιστες συγκεντρώσεις βιομάζας (DW) με 1 g/L και $S_{\text{cons}(X_{\text{max}})} = 5,09 \text{ g/L}$ στις 22 ώρες. Το οξικό οξύ (acetic) απέκτησε συγκέντρωση $0,52 \text{ g/L}$ στις 22 ώρες, από την αρχική τιμή $4,04 \text{ g/L}$ και το γαλακτικό οξύ (lactic) $3,03 \text{ g/L}$ στις 70 ώρες. Επίσης παρατηρήθηκε παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης (1,3-PDO) με μέγιστη συγκέντρωση $1,95 \text{ g/L}$ στις 22 ώρες ζύμωσης. Παράλληλα παράχθηκαν σε αμελητέες συγκεντρώσεις μυρμηκικό οξύ (formic) και αιθανόλη (ethanol).

Ο συντελεστής απόδοσης ως προς τη βιομάζα ήταν $Y\left(\frac{X}{S}\right) = 0,19 \frac{\text{g βιομάζας (max)}}{\text{g υποστρώματος}}$. Η παραγωγικότητα βιομάζας ($P_{(X_{\text{max}})}$) ήταν $0,04 \text{ g/L/h}$ και ο μέγιστος ρυθμός κατανάλωσης υποστρώματος ($r_{(S)}$) ήταν $0,23 \text{ g/L/h}$ στις 22 ώρες ζύμωσης. Το pH από αρχική τιμή $7,38$ μειώθηκε μετά από 70 ώρες στη τιμή $5,17$ (Διαγρ.17).

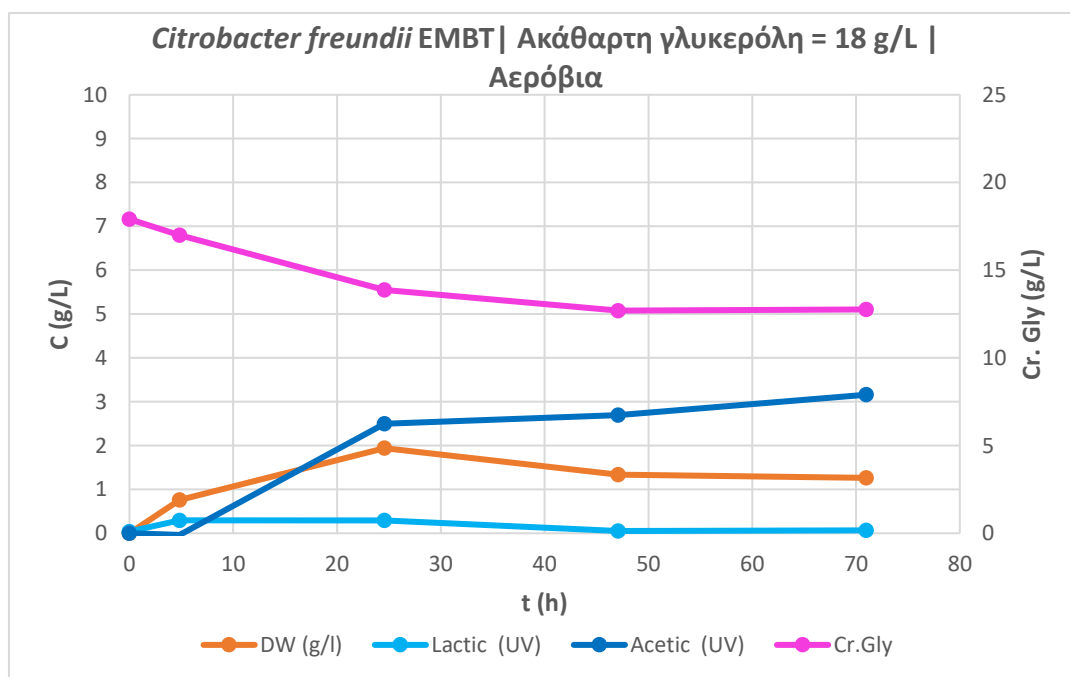


Διάγραμμα 17: Διακύμανση του pH συγκριτικά με τον χρόνο καλλιέργειας

Στη περίπτωση καλλιέργειας του *Citrobacter freundii* EMBT παρατηρείται καλός ρυθμός αφομοίωσης της γλυκερόλης μέχρι τις 20 ώρες αύξησης, ενώ από το σημείο αυτό και έπειτα φαίνεται ξανά να παρεμποδίζεται η αφομοίωση της. Στη περίπτωση αυτή η συγκέντρωση του παραγόμενου οξικού οξέος δεν φαίνεται να αλλάζει από εκείνη που υπήρχε αρχικά στα συστατικά του θρεπτικού μέσου, ωστόσο στη περίπτωση της αναεροβίωσης παρατηρείται μεγάλη αύξηση του γαλακτικού ακόμη και μετά την παύση αφομοίωσης της πηγής άνθρακα. Αξίζει να σημειωθεί, πως υπήρξε παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης σε αξιοσημείωτη συγκέντρωση, η οποία παρατηρείται, ύστερα από τις 22 ώρες από τον εμβολιασμό, όταν δηλαδή σταματά η κατανάλωση της γλυκερόλης και όχι από την αρχή της αύξησης.

Συνεπώς, η αύξηση του γαλακτικού φαίνεται να είναι ένας παράγοντας που επηρεάζει την αφομοίωση της γλυκερόλης, μειώνοντας το pH και με ρύθμιση του στο μέσο της καλλιέργειας, πιθανόν να βελτιωθεί η κατανάλωσή της από το βακτήριο και κατ' επέκταση η αύξηση της παραγόμενης βιομάζας. Οι αναερόβιες συνθήκες αποτέλεσαν ανασταλτικό παράγοντα για την αφομοίωση της γλυκερόλης, όπως και για τη παραγόμενη βιομάζα, η οποία μειώθηκε, συγκριτικά με τις αερόβιες συνθήκες. Αντιθέτως, παρατηρήθηκε αύξηση στη παραγωγή των κύριων μεταβολιτών, στη περίπτωση της αναερόβιας καλλιέργειας, με την 1,3-προπανοδιόλη να σημειώνει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση, συγκριτικά με την αερόβια καλλιέργεια με πηγή άνθρακα γλυκερόλη καθαρότητας $\approx 99\%$.

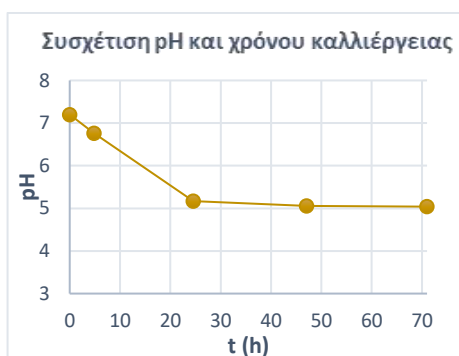
4.2.1.6. Καλλιέργεια του *Citrobacter freundii* EMBT σε υγρό θρεπτικό μέσο Βιομηχανικής γλυκερόλης (Cr.Gly) καθαρότητας $\approx 81\%$, υπό αερόβιες συνθήκες (Χωρίς ρύθμιση pH)



Διάγραμμα 18: Κινητική ανάπτυξης *C. freundii* EMBT σε αερόβια καλλιέργεια με θρεπτικό μέσο ακάθαρτης γλυκερόλης 18 g/L

Στην αερόβια καλλιέργεια των 71 ωρών ζύμωσης, του *Citrobacter freundii* EMBT με υπόστρωμα ακάθαρτη γλυκερόλη (Cr.Gly), δε παρατηρήθηκε σημαντική αφομοίωση της με $S_{\text{cons}(\text{total})}=5,15$ g/L μέχρι τις 71 ώρες ζύμωσης. Ως επακόλουθο δεν υπήρξε πληθώρα παραγωγής μεταβολικών προϊόντων (Διαγρ.18). Η βιομάζα (DW) απέκτησε τη μέγιστη τιμή της στις 24 ώρες με 1,94 g/L, ενώ από τις 47 ώρες μέχρι και τις 71 ώρες ζύμωσης μειωνόταν. Το οξικό οξύ (acetic) παρουσίασε σημαντική αύξηση μετά τις 4 ώρες ζύμωσης, καταγράφοντας εκθετική πορεία μέχρι και τις 71 ώρες, με μέγιστη συγκέντρωση 3,16 g/L, από την αρχική τιμή 4,16 g/L. Το γαλακτικό οξύ (lactic) και μυρμηκικό οξύ (formic) παρουσίασαν μια αμελητέα αύξηση στη συγκέντρωσή τους με τη μέγιστη τιμή να βρίσκεται στις 24 ώρες και στη συνέχεια να μειώνεται.

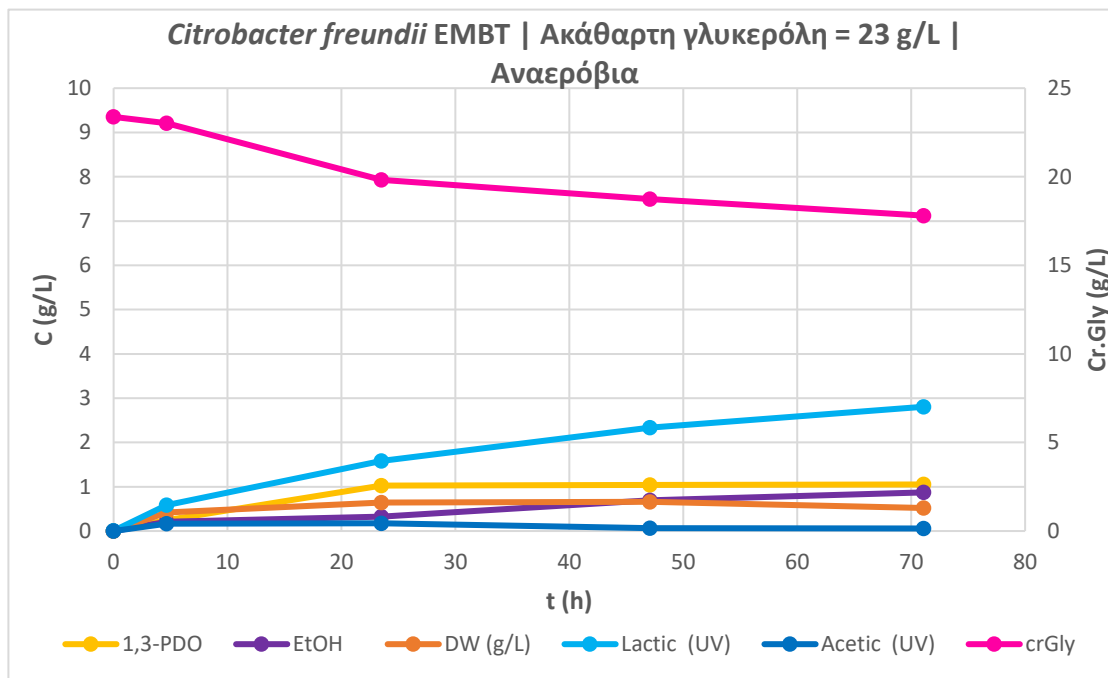
Ο συντελεστής απόδοσης ως προς τη βιομάζα ήταν $Y\left(\frac{X}{S}\right) = 0,48 \frac{\text{g βιομάζας (max)}}{\text{g υποστρώματος}}$ και η παραγωγικότητα βιομάζας ($P_{(X_{\text{max}})}$) ήταν 0,08 g/L/h. Ο ρυθμός κατανάλωσης υποστρώματος ($r_{(S)}$) ήταν 0,19 g/L/h στις πρώτες 4 ώρες ζύμωσης, ενώ ύστερα μειώθηκε. Το pH από αρχική τιμή 7,2 μειώθηκε μετά από 70 ώρες στη τιμή 5,04 (Διαγρ.19).



Διάγραμμα 19: Διακύμανση του pH συγκριτικά με τον χρόνο καλλιέργειας

Συνεπώς, η καλλιέργεια του *Citrobacter freundii* EMBT υπό αερόβιες συνθήκες και σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα ακάθαρτη γλυκερόλη, αντιμετώπισε δυσκολία στην ανάπτυξη και παραγωγή μεταβολιτών, ωστόσο ο ρυθμός αφομοίωσης αν και μικρός, φαίνεται να μπορεί να βελτιωθεί εξαιτίας του ίδιου παράγοντα που εμποδίζει την αύξηση και στις προηγούμενες περιπτώσεις καλλιέργειας του συγκεκριμένου βακτηριακού στελέχους. Το οξικό οξύ και σε αυτή τη περίπτωση αυξάνεται σημαντικά με το pH να μειώνεται ήδη από τις 4 ώρες ζύμωσης και ως συνέπεια να σταματά η καλλιέργεια, ενώ άλλα μεταβολικά προϊόντα εκτός της παρουσίας των οξέων στο θρεπτικό μέσο δεν παρατηρήθηκαν.

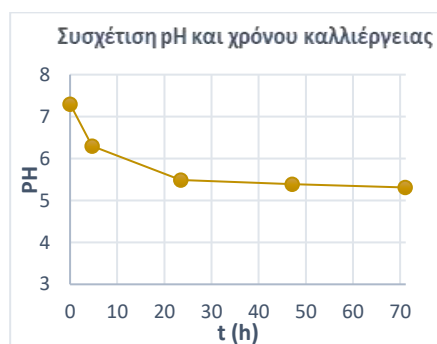
4.2.1.7. Καλλιέργεια του *Citrobacter freundii* EMBT σε υγρό θρεπτικό μέσο Βιομηχανικής γλυκερόλης (Cr.Gly) καθαρότητας $\approx 81\%$, υπό αναερόβιες συνθήκες (Χωρίς ρύθμιση pH)



Διάγραμμα 20: Κινητική ανάπτυξης *C. freundii* EMBT σε αναερόβια καλλιέργεια με θρεπτικό μέσο ακάθαρτης γλυκερόλης 23 g/L

Στη περίπτωση αναερόβιας καλλιέργειας του *Citrobacter freundii* EMBT, η αφομοίωση της ακάθαρτης γλυκερόλης (Cr.Gly) από το βακτηριακό στέλεχος δεν ήταν πλήρης, μέχρι και το διάστημα των 71 ωρών ζύμωσης με $S_{\text{cons}(\text{total})} = 5,57 \text{ g/L}$ (Διαγρ.20). Υπήρξε παραγωγή βιομάζας (DW), με μικρή αύξηση μέχρι στις 71 ώρες καλλιέργειας, όπου απέκτησε τη μέγιστη συγκέντρωσή της $0,66 \text{ g/L}$ με $S_{\text{cons}(X_{\text{max}})} = 4,63 \text{ g/L}$ στις 47 ώρες. Η συγκέντρωση του οξικού δε φάνηκε να μεταβάλλεται σημαντικά με μέγιστη τιμή $0,17 \text{ g/L}$ στις 24 ώρες, από την αρχική τιμή $4,28 \text{ g/L}$. Ακόμη παρατηρήθηκε παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης (1,3-PDO) από τις 4εις ώρες ζύμωσης, με μέγιστη συγκέντρωση $1,05 \text{ g/L}$, στις 24 ώρες. Το γαλακτικό οξύ (lactic) είχε αξιοσημείωτη αύξηση συγκριτικά με τα υπόλοιπα μεταβολικά προϊόντα, καθώς μέχρι και τις 71 ώρες καλλιέργειας η συγκέντρωση απέκτησε τιμή $2,8 \text{ g/L}$. Επίσης διακρίνεται παραγωγή αιθανόλης (ethanol), μυρμηκικού (formic) και ηλεκτρικού (succinic) οξέος, από τις πρώτες 4εις ώρες ζύμωσης μέχρι και τις 71 ώρες, ωστόσο σε αμελητέες συγκεντρώσεις.

Ο συντελεστής απόδοσης ως προς τη βιομάζα ήταν $Y\left(\frac{X}{S}\right) = 0,14 \frac{\text{g βιομάζας (max)}}{\text{g υποστρώματος}}$ και ο συντελεστής απόδοσης ως προς την 1,3-προπανοδιόλη ήταν $Y\left(\frac{PD}{S}\right) = 0,19 \frac{\text{g προϊόντος}}{\text{g υποστρώματος}}$. Η παραγωγικότητα βιομάζας ($P_{(X_{\max})}$) ήταν 0,01 g/L/h, και προϊόντος ($P_{(1,3-PDO)}$) ήταν 0,01 g/L/h. Ο ρυθμός κατανάλωσης υποστρώματος ($r_{(S)}$) ήταν 0,15 g/L/h στις 23 ώρες ζύμωσης, ενώ στη συνέχεια μειώθηκε. Το pH από αρχική τιμή 7,3 μειώθηκε κατακόρυφα στη τιμή 5,49 στις 24 ώρες και μετά από 70 ώρες στη τιμή 5,31 (Διαγρ.21).



Διάγραμμα 21: Διακύμανση του pH συγκριτικά με τον χρόνο καλλιέργειας

Στη περίπτωση αναερόβιας καλλιέργειας του *Citrobacter freundii* EMBT σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα ακάθαρτη γλυκερόλη, ξεκινά σε πρώτο χρόνο να καταναλώνεται η ακάθαρτη γλυκερόλη, ωστόσο ο ρυθμός αφομοίωσης της είναι πολύ αργός σε σημείο να σταματά σχεδόν ολοκληρωτικά ύστερα από τις 24 ώρες. Παρατηρείται και σε αυτή τη περίπτωση πως η συγκέντρωση του παραγόμενου οξικού οξέος δεν αυξάνει συγκριτικά με εκείνη που υπήρχε αρχικά στα συστατικά του θρεπτικού μέσου, αντιθέτως μειώνεται. Στη περίπτωση, λοιπόν της αναεροβίωσης παρατηρείται μεγάλη αύξηση του γαλακτικού, όταν παύει η αφομοίωση της πηγής άνθρακα. Αξίζει να σημειωθεί, πως υπήρξε παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης, σε χαμηλή ωστόσο συγκέντρωση, η οποία παρατηρείται ύστερα από τις 24 ώρες από τον εμβολιασμό, όταν δηλαδή αρχίζει να μειώνεται σε μεγάλο βαθμό ο ρυθμός κατανάλωσης της πηγής άνθρακα και όχι από την αρχή της αύξησης. Συνεπώς, η παραγωγή του γαλακτικού φαίνεται να είναι ένας παράγοντας που επηρεάζει την αφομοίωση της ακάθαρτης γλυκερόλης. Συμπερασματικά οι αναερόβιες συνθήκες φαίνεται να ευνοούν τη παραγωγή των κύριων μεταβολιτών, καθώς στις περιπτώσεις αναεροβίωσης που εξετάστηκε ο *Citrobacter freundii* EMBT με πηγές άνθρακα καθαρής και ακάθαρτης γλυκερόλης σημειώνει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση 1,3-προπανοδιόλης που έχει παρατηρηθεί συγκριτικά με τις αερόβιες καλλιέργειες, όπως επίσης και μεγάλη παραγωγή γαλακτικού.

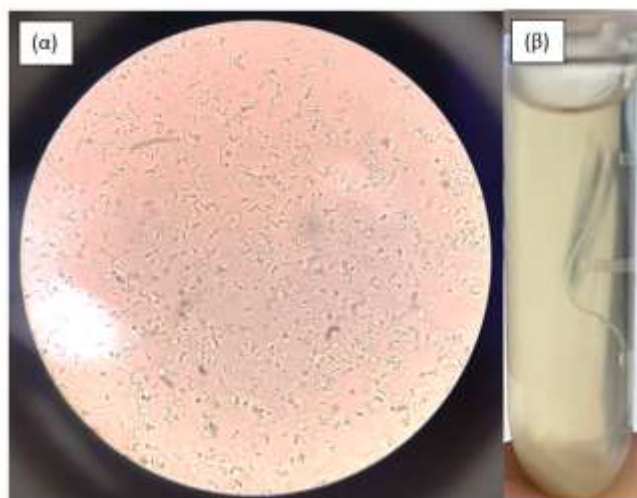
4.2.2. Καλλιέργεια των στελεχών *Bacillus subtilis*

Παρακάτω παρουσιάζονται όλες οι συνθήκες καλλιέργειας που αξιολογήθηκαν για τους *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176 και *Bacillus subtilis* ACA-DC 1225, στα παρακάτω πειράματα συνολικά, αναφέροντας όλων των ειδών τις πηγές άνθρακα που χρησιμοποιήθηκαν, μαζί με τις συγκεντρώσεις τους (Πίν.5).

Πίνακας 5: Συνθήκες καλλιέργειας *B. subtilis* ACA-DC 1176 και *B. subtilis* ACA-DC 1225

<i>Bacillus subtilis</i> ACA-DC 1176 και <i>Bacillus subtilis</i> ACA-DC 1225		
Πηγή Άνθρακα	<ol style="list-style-type: none"> 1. Γλυκόζη (Glu) 2. Γλυκερόλη (Gly) καθαρότητας $\approx 99\%$ 3. Βιομηχανική γλυκερόλη (Cr.Gly) καθαρότητας $\approx 81\%$ 	
Συνθήκες Καλλιέργειας	<ul style="list-style-type: none"> ○ Αερόβιες – Κωνικές φιάλες με 180 rpm (υψηλό O_2) ○ Αναερόβιες – Φιάλες Duran με 100 rpm (χαμηλό O_2) ○ Θερμοκρασία επώασης 30 °C ○ Χωρίς ρύθμιση pH 	
Συγκέντρωση Πηγής Άνθρακα	<ul style="list-style-type: none"> • Γλυκόζη (Glu) • Βιομηχανική γλυκερόλη (Cr.Gly) καθαρότητας $\approx 81\%$ 	20 \pm 3 g/L
	<ul style="list-style-type: none"> • Γλυκερόλη (Gly) καθαρότητας $\approx 99\%$ 	20 \pm 3 g/L , 40 \pm 3 g/L, 70 \pm 3 g/L

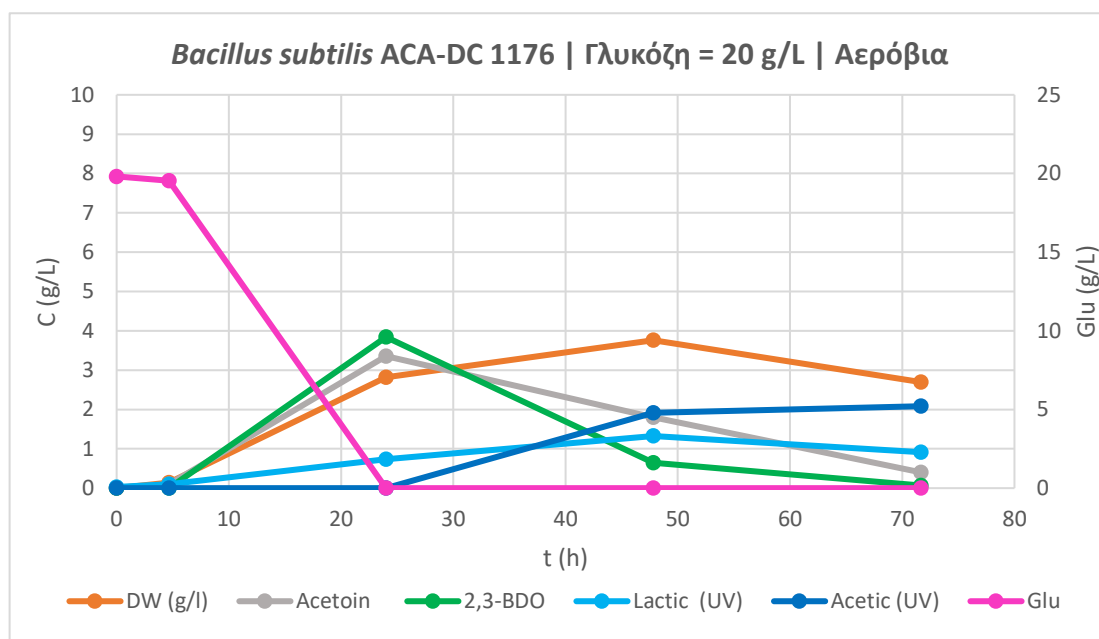
4.2.3. Καλλιέργεια του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176



Εικόνα 17: (α) Μικροσκοπική παρατήρηση κυττάρων του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176 σε οπτικό μικροσκόπιο (μεγέθυνσης x100), (β) Σχηματισμός αιωρούμενης αλυσίδας κυττάρων στο εσωτερικό του υγρού θρεπτικού μέσου προκαλλιέργειας.

Η κωνική φιάλη με το υπόστρωμα της προκαλλιέργειας που περιείχε τον μικροοργανισμό, αφού χρησιμοποιήθηκε ως εμβόλιο (0,5 ml εναιωρήματος) στο κύριο υπόστρωμα της καλλιέργειας, συνέχισε τη ζύμωση για άλλες 24 ώρες. Ύστερα από το διάστημα αυτό συλλέχτηκε δείγμα προς ανάλυση των μεταβολιτών της προκαλλιέργειας, το οποίο οδηγήθηκε προς φυγοκέντριση για να απομακρυνθεί η βιομάζα. Ενώ ήταν φυσικό η βιομάζα να καθιζάνει στο πυθμένα του Eppendorf, σχημάτισε μία εμφανή αιωρούμενη αλυσίδα κυττάρων στο εσωτερικό του υγρού η οποία δεν διαλυόταν ούτε με μηχανική ανάδευση (Vortex) (Εικ.17). Οι αλυσίδες αποτελούν σχηματισμό βιοϋμένιου (Davey ME & O'toole GA, 2000).

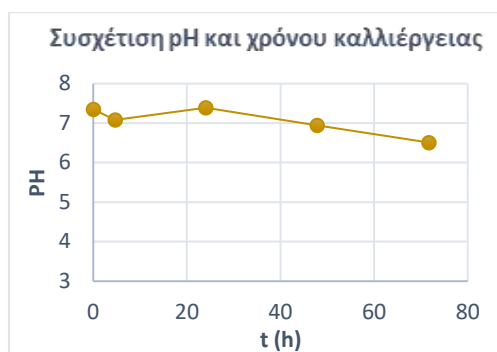
4.2.3.1. Καλλιέργεια του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176 σε υγρό θρεπτικό μέσο γλυκόζης (Glu), υπό αερόβιες συνθήκες



Διάγραμμα 22: Κινητική ανάπτυξης του *B. subtilis* ACA-DC 1176 σε αερόβια καλλιέργεια με θρεπτικό μέσο γλυκόζης 20 g/L

Βάση των αποτελεσμάτων ο *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176, φαίνεται, πως στις αερόβιες συνθήκες, η γλυκόζη αφομοιώθηκε πλήρως πριν τις 24 ώρες (Διαγρ.22). Στις 48 ώρες παρατηρείται η μέγιστη συγκέντρωση της βιομάζας (DW) με 3,76 g/L και $S_{cons(X_{max})} = 19,81$ g/L. Επίσης παρατηρείται από τις 4εις πρώτες ώρες παραγωγή ακετοΐνης (acetoin) με μικρή συγκέντρωση, ενώ αποκτά τη μέγιστη τιμή 3,36 g/L στις 24 ώρες. Αντίστοιχα παρατηρείται για πρώτη φορά 2,3-βουτανοδιόλη (2,3-BDO) με μέγιστη συγκέντρωση 3,84 g/L στις 24 ώρες ανάπτυξης. Επίσης το οξικό οξύ (acetic) αποκτά τη μέγιστη τιμή στις 71 ώρες με 2,08 g/L από την αρχική τιμή 4,5 g/L. Στις 48 ώρες παρατηρήθηκε αύξηση στη συγκέντρωση γαλακτικού (lactic) με 1,33 g/L, όπως και μυρμηκικού οξέος (formic) αμελητέας συγκέντρωσης.

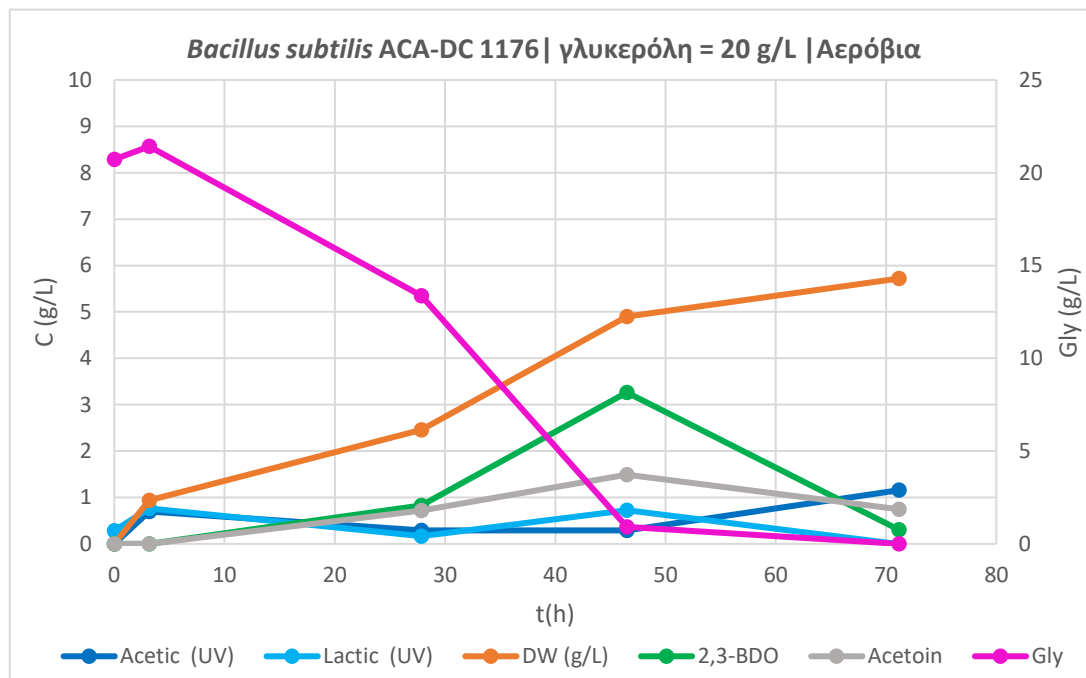
Ο συντελεστής απόδοσης ως προς τη βιομάζα ήταν $Y\left(\frac{X}{S}\right) = 0,19 \frac{g \text{ βιομάζας}(max)}{g \text{ υποστώματος}}$ και ο συντελεστής απόδοσης ως προς τη 2,3-βουτανοδιόλη ήταν $Y\left(\frac{BD}{S}\right) = 0,19 \frac{g \text{ προϊόντος}(max)}{g \text{ υποστώματος}}$. Η παραγωγικότητα βιομάζας ($P_{(X_{max})}$) ήταν 0,08 g/L/h και προϊόντος ($P_{(2,3-BDO)}$) ήταν 0,16 g/L/h. Το pH από την αρχική τιμή 7,35 μειώθηκε στις 4 ώρες στη τιμή 7, και αυξήθηκε ξανά στις 24 στη τιμή 7,4, ενώ μέχρι τις 70 ώρες είχε μειωθεί στη τιμή 6,5 (Διαγρ.23).



Διάγραμμα 23: Διακύμανση του pH συγκριτικά με τον χρόνο καλλιέργειας

Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται πως η ανάπτυξη του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176, σε υπόστρωμα γλυκόζης και υπό αερόβιες συνθήκες έχει αξιόλογη παραγωγή μεταβολιτών, χωρίς να αυξάνει το παραγόμενο οξικό οξύ κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης, με αποτέλεσμα να μην παρεμποδίζεται η καλλιέργεια, όπως γίνεται στη περίπτωση του *Citrobacter freundii* EMBT. Η αύξηση της συγκέντρωσης των οξέων στο θρεπτικό μέσο παρουσιάζεται μετά τη πλήρη αφομοίωση της γλυκόζης, με παράλληλη μείωση των συγκεντρώσεων των προηγούμενων παραχθέντων μεταβολιτών, εκτός της βιομάζας η οποία παρουσιάζει αύξηση μέχρι τις 48 ώρες και ύστερα μειώνεται ξανά. Στη περίπτωση του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176 η επιταχυνόμενη φάση φαίνεται πως ξεκινά από τις 4 ± 2 ώρες, μέχρι τις 10 ± 2 ώρες από τον εμβολιασμό. Με δεδομένο ότι η ακετοΐνη είναι μία ουσία η οποία μετατρέπεται στη συνέχεια σε 2,3-βουτανοδιόλη και αντίστροφα, εντοπίστηκε σε αμελητέα συγκέντρωση στις 4εις ώρες, όπου ξεκίνησε να παράγεται. Όταν στις 24 ώρες εξετάστηκε πάλι είχε αυξηθεί σημαντικά, ωστόσο σε χαμηλότερη συγκέντρωση από τη 2,3-βουτανοδιόλη. Συνεπώς στο διάστημα μεταξύ 10 ± 2 και 30 ± 2 ωρών που μπορεί να χαρακτηριστεί ως διάστημα της εκθετικής φάσης του κύκλου, θα πρέπει να ληφθούν περισσότερες μετρήσεις για να καταγραφεί η μέγιστη συγκέντρωση της ακετοΐνης, αλλά και η ακριβής στιγμή παραγωγής της 2,3-βουτανοδιόλης.

4.2.3.2. Καλλιέργεια του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176 σε υγρό θρεπτικό μέσο γλυκερόλης (Gly) καθαρότητας $\approx 99\%$, υπό αερόβιες συνθήκες (Συγκέντρωση Gly 20 ± 3 g/L)



Διάγραμμα 24: Κινητική ανάπτυξης του *B. subtilis* ACA-DC 1176 σε αερόβια καλλιέργεια με θρεπτικό μέσο γλυκερόλης 20 g/L

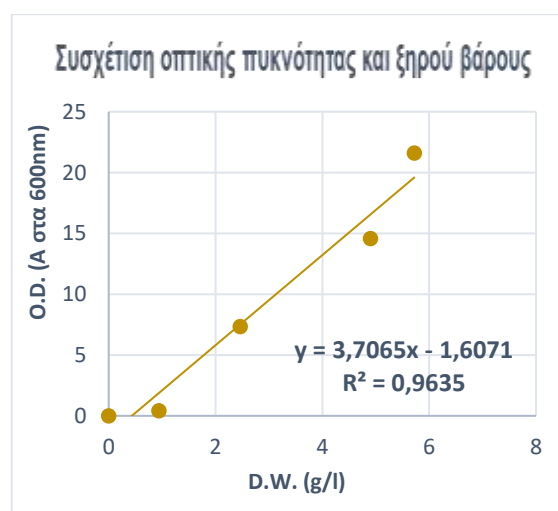
Στην επανακαλλιέργεια του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176 σε γλυκερόλη (Gly), με διαφορετική τεχνική εμβολιασμού της προκαλλιέργειας (εμβολιασμός του υποστρώματος της υγρής προκαλλιέργειας με τον μικροοργανισμό από Cryovial), παρατηρήθηκε πλήρης αφομοίωση της γλυκερόλης πριν τις 47 ώρες ζύμωσης (Διαγρ.24). Παρατηρείται η μέγιστη συγκέντρωση της βιομάζας (DW) με 5,72 g/L και $S_{cons}(X_{max}) = 21,42$ g/L στις 71 ώρες ζύμωσης. Επίσης στις 27 ώρες παρουσιάζεται ακετοΐνη (acetoin) με μέγιστη συγκέντρωση 1,49 g/L στις 47 ώρες και 2,3-βουτανοδιόλη (2,3-BDO) με μέγιστη συγκέντρωση 3,26 g/L στις 47 ώρες ζύμωσης. Το οξικό οξύ (acetic) αυξήθηκε κατά 1,15 g/L στις 70 ώρες, από την αρχική 4,7 g/L. Παράλληλα σημειώθηκαν σε αμελητέες συγκεντρώσεις γαλακτικό οξύ (lactic) και μυρμηκικό οξύ (formic).

Ο συντελεστής απόδοσης ως προς τη βιομάζα ήταν $Y\left(\frac{X}{S}\right) = 0,27 \frac{\text{g βιομάζας (max)}}{\text{g υποστώματος}}$ και ο συντελεστής απόδοσης ως προς το κύριο προϊόν 2,3-βουτανοδιόλη ήταν $Y\left(\frac{BD}{S}\right) = 0,16 \frac{\text{g προϊόντος (max)}}{\text{g υποστώματος}}$. Η παραγωγικότητα βιομάζας ($P_{(X_{\max})}$) ήταν 0,08 g/L/h, ενώ της 2,3-βουτανοδιόλης ήταν $P_{(2,3\text{-BDO})} = 0,07$ g/L/h. Το pH αρχικά από τη τιμή 7,28 αυξήθηκε απότομα στις 46 ώρες σε 7,5, ενώ μετά τις 70 ώρες καλλιέργειας μειώθηκε σε 6,91 (Διαγρ.25).



Διάγραμμα 25: Διακύμανση του pH συγκριτικά με τον χρόνο καλλιέργειας

Τέλος για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της παραγόμενης βιομάζας, προσδιορίστηκε η καμπύλη συσχέτισης της οπτικής πυκνότητας (OD) στα 600 nm του δείγματος, συγκριτικά με τη συγκέντρωση του ξηρού βάρους της βιομάζας (DW) (Διαγρ.26). Η μέγιστη τιμή της οπτικής πυκνότητας (OD) στα 600 nm ήταν 21,6 A στις 70 ώρες καλλιέργειας.



Διάγραμμα 26: Καμπύλη συσχέτισης της οπτικής πυκνότητας και της συγκέντρωσης της βιομάζας

Συνεπώς στη περίπτωση που επανακαλλιιεργήθηκε ο *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176 σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα καθαρή γλυκερόλη, αλλά με διαφορετική τεχνική εμβολιασμού της προκαλλιέργειας, είναι διακριτή η βελτίωση της ανάπτυξης του στο θρεπτικό μέσο, καταναλώνοντας όλη τη γλυκερόλη και παράγοντας κύρια μεταβολικά προϊόντα, όπως 2,3-βουτανοδιόλη σε σημαντική συγκέντρωση. Επίσης φαίνεται πως το pH παρέμεινε σταθερό, με το οξικό οξύ να μη μεταβάλλεται σημαντικά και να μη προκαλεί συνεπώς οξίνιση του μέσου. Είναι γνωστό πως τα βακτήρια αυτά έχουν τη δυνατότητα παράγοντας 2,3-βουτανοδιόλη και ακετοΐνη να αποτρέπουν την ενδοκυτταρική οξίνιση, ρυθμίζοντας έτσι την ισορροπία NADH₂ και NAD⁺, συνεπώς δρουν ως ανταγωνιστές των NADH₂ για τη μετατροπή της γλυκερόλης σε 2,3-βουτανοδιόλη και ακετοΐνη.

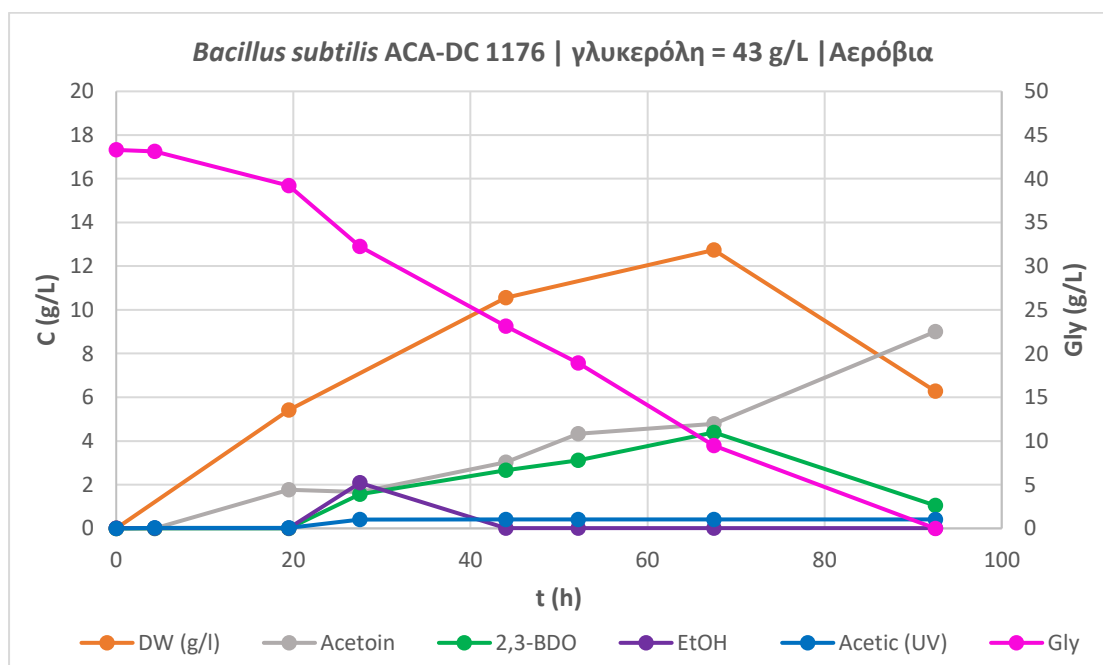
4.2.3.3. Καλλιέργεια του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176 σε υγρό θρεπτικό μέσο γλυκερόλης (Gly) καθαρότητας $\approx 99\%$, υπό αερόβιες συνθήκες (Συγκέντρωση Gly 40 ± 3 g/L)



Εικόνα 18: Μικροσκοπική παρατήρηση κυττάρων του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176 σε οπτικό μικροσκόπιο (μεγέθυνσης x100).

Η επανακαλλιέργεια του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176 στο ίδιο μέσο πηγής άνθρακα και αζώτου, αλλά σε μεγαλύτερη συγκέντρωση 40 ± 3 g/L γλυκερόλης, μελετήθηκε, καθώς ο μικροοργανισμός ανέδειξε καλή ανάπτυξη μεταβολικών προϊόντων και βιομάζας στο μέσο με τη μικρότερη κλίμακα γλυκερόλης. Ο *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176 και αυτή τη φορά στρέφεται προς τη δημιουργία συσσωματωμάτων παρατηρώντας τον στο οπτικό μικροσκόπιο (Εικ.18).

Μεταξύ του διαστήματος 20 και 27 ωρών από τον εμβολιασμό, παρατηρείται αύξηση τόσο του οξικού οξέος, όσο και της ακετοΐνης, η οποία στη συνέχεια θα μετατραπεί σε 2,3-βουτανοδιόλη. Η παραγωγή αυτών των μεταβολικών προϊόντων δηλώνουν με τη σειρά τους ότι ο μικροοργανισμός αντιμετωπίζει μια κατάσταση, την οποία προσπαθεί να ισορροπήσει, ρυθμίζοντας τα NADH και NAD⁺, εξαιτίας της μείωσης του pH στο μέσο της αύξησης. Ο μικροοργανισμός στρέφεται περισσότερο προς τη παραγωγή αιθανόλης και οξικού στο τέλος της επιταχυνόμενης και αρχές της εκθετικής φάσης του αυξητικού κύκλου (25±2 ώρες ζύμωσης), όπου αυξάνεται απότομα η συγκέντρωσή τους. Ωστόσο, στο διάστημα αυτό ξεκινά να παράγεται ταυτόχρονα μικρή ποσότητα ακετοΐνης, με μεγαλύτερες συγκεντρώσεις να παρατηρούνται μετά τις 27 ώρες, όταν οι συγκεντρώσεις των πρώτων αρχίζουν να μειώνονται. Συνεπώς ο μικροοργανισμός στρέφει το μεταβολισμό του προς παραγωγή ακετοΐνης και 2,3-βουτανοδιόλης στο διάστημα της εκθετικής φάσης. Τέλος, παρατηρείται πως μετά τις 67 ώρες που έχουν παραχθεί ακετοΐνη και 2,3-βουτανοδιόλη, η συγκέντρωσή της τελευταίας μειώνεται σημαντικά, ενώ συνεχίζει με μεγαλύτερη συγκέντρωση να παράγεται ακετοΐνη. Αυτό συμβαίνει, καθώς η μετατροπή ακετοΐνης προς 2,3-βουτανοδιόλη είναι αμφίδρομη διαδικασία, συνεπώς στο σημείο αυτό ο μεταβολισμός στρέφεται προς την ακετοΐνη (Διαγρ.27).

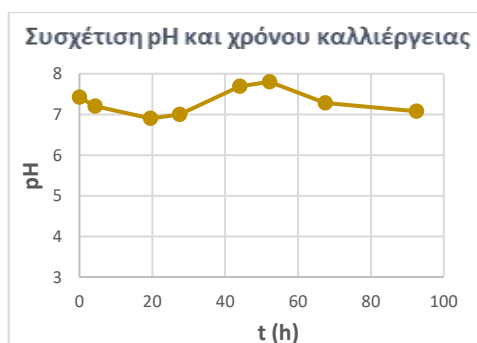


Διάγραμμα 27: Κινητική ανάπτυξης του *B. subtilis* ACA-DC 1176 σε αερόβια καλλιέργεια με θρεπτικό μέσο γλυκερόλης 43 g/L

Στις αερόβιες συνθήκες, όπου επανακαλλιιεργήθηκε ο *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176 με αυξημένη κλίμακα γλυκερόλης στα 40 g/L και σε χρονικό διάστημα 92 ωρών ζύμωσης, υπήρξε πλήρης αφομοίωση της πηγής άνθρακα πριν τις 92 ώρες και μέγιστη παραγωγή βιομάζας (DW) 12,74 g/L και $S_{\text{cons}(X_{\text{max}})} = 33,85$ g/L στις 67 ώρες, ενώ μέχρι τις 90 ώρες μειώθηκε στη τιμή 6,28 g/L. Η συγκέντρωση του οξικού οξέως δεν παρουσίασε σημαντική αύξηση με μέγιστη συγκέντρωση 0,4 g/L στις 27 ώρες, από την αρχική 4,46 g/L. Επίσης στο διάστημα αυτό παρατηρήθηκαν και οι μέγιστες συγκεντρώσεις μεταβολικών προϊόντων 2,3-βουτανοδιόλης (2,3-BDO) με 4,39 g/L στις 67 ώρες και ακετοΐνης (acetoin) με 9 g/L στις 92 ώρες ζύμωσης. Παράλληλα σημειώθηκαν σε μικρότερη συγκέντρωση αιθανόλη (ethanol) με μέγιστη συγκέντρωση 2,1 g/L στις 27 ώρες ζύμωσης, καθώς και αμελητέες συγκεντρώσεις γαλακτικού (lactic) και μυρμηκικού (formic).

Ο συντελεστής απόδοσης ως προς τη βιομάζα ήταν $Y\left(\frac{X}{S}\right) = 0,38 \frac{\text{g βιομάζας(max)}}{\text{g υποστώματος}}$ και ο συντελεστής απόδοσης ως προς το κύριο προϊόν το οποίο ήταν η ακετοΐνη ήταν $Y\left(\frac{ACTN}{S}\right) = 0,21 \frac{\text{g προϊόντος}}{\text{g υποστώματος}}$.

Η παραγωγικότητα βιομάζας ($P_{(X_{\text{max}})}$) ήταν 0,19 g/L/h, ενώ για την ακετοΐνη ήταν $P_{(\text{acetoin})}=0,10$ g/L/h. Η τιμή του pH από την αρχική τιμή 7,42 έπεσε στο 6,9 στις 19 ώρες, ενώ στη συνέχεια αυξήθηκε, με τη τελική του τιμή 7,08 στις 92 ώρες ζύμωσης (Διαγρ.28).



Διάγραμμα 28: Διακύμανση του pH συγκριτικά με τον χρόνο καλλιέργειας

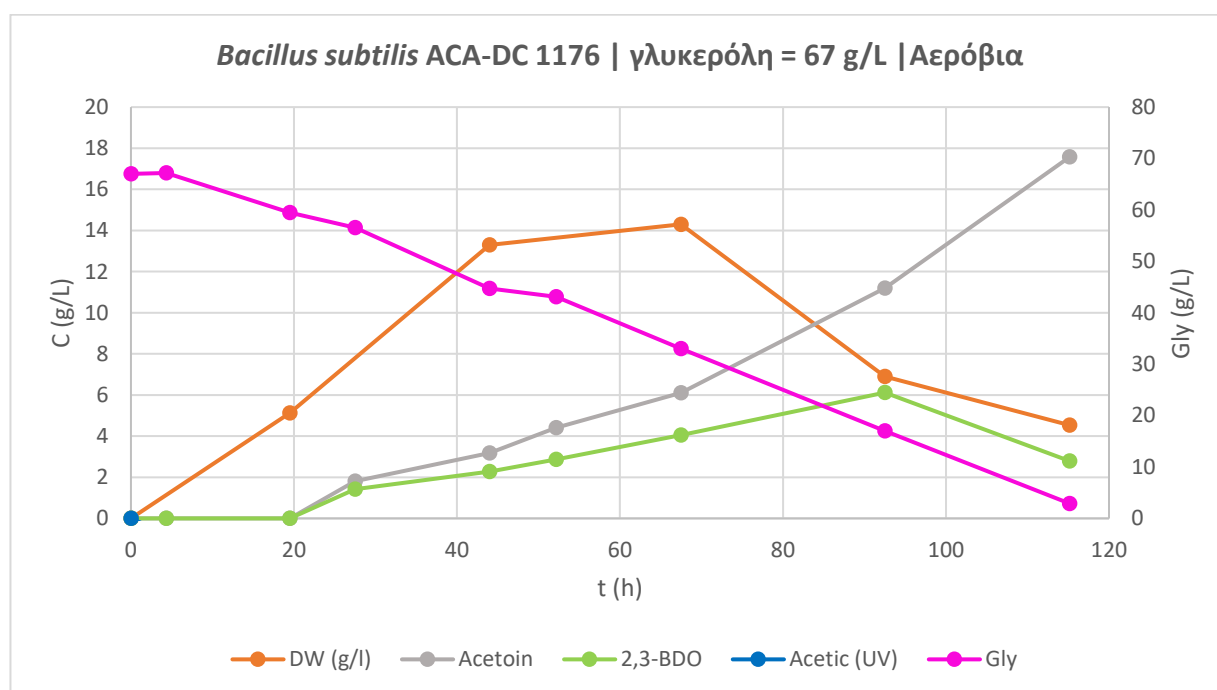
4.2.3.4. Καλλιέργεια του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176 σε υγρό θρεπτικό μέσο γλυκερόλης (Gly) καθαρότητας $\approx 99\%$, υπό αερόβιες συνθήκες (Συγκέντρωση Gly 70 ± 3 g/L)



Εικόνα 19: Μικροσκοπική παρατήρηση κυττάρων του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176 σε οπτικό μικροσκόπιο (μεγέθυνσης $\times 100$).

Η επανακαλλιέργεια του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176 σε μεγαλύτερη συγκέντρωση γλυκερόλης 67 g/L, υπό αερόβιες συνθήκες, μελετήθηκε, καθώς ο μικροοργανισμός ανέδειξε καλή ανάπτυξη μεταβολικών προϊόντων και βιομάζας στο μέσο με τη μικρότερη κλίμακα γλυκερόλης. Στη συγκεκριμένη περίπτωση η διάρκεια της ζύμωσης ήταν 115 ώρες, ώστε να μπορέσει να αφομοιώσει τη γλυκερόλη, την οποία κατανάλωσε σχεδόν ολοκληρωτικά. Στη συνέχεια παρατηρήθηκε η ανάπτυξή του στο οπτικό μικροσκόπιο, στις 6 ώρες από τον εμβολιασμό (Εικ.19). Ο μικροοργανισμός φαίνεται να είχε κάνει καλή ανάπτυξη κυττάρων στο διάστημα από τον εμβολιασμό του μέχρι τις 6 ώρες, παρατηρώντας και εδώ έναν συνδυασμό ελεύθερων κινητών κυττάρων με ακίνητα κύτταρα να έχουν συγκεντρωθεί σε σκόρπιες περιοχές δημιουργώντας συσσωματώματα. Οι συνθήκες που αναπτυσσόταν ο μικροοργανισμός στο σημείο αυτό φαίνεται πως τον επηρέασαν και οδηγήθηκε σε κατάσταση στρες. Εξαιτίας της μεγάλης συγκέντρωσης της πηγής άνθρακα που χρησιμοποιήθηκε για αυτή τη καλλιέργεια, ο *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176 δεν μπόρεσε να προσαρμοστεί με ευκολία, με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η ανάπτυξή του στις πρώτες ώρες. Από τα αποτελέσματα που έδωσε η HPLC και όπως φαίνονται αυτά στο Γράφημα, ύστερα από τις 6 ώρες, δεν παρατηρείται δυσκολία στην αφομοίωση της γλυκερόλης και η βιομάζα του αυξάνεται εκθετικά.

Ο μικροοργανισμός στρέφεται προς τη παραγωγή αιθανόλης και οξικού κυρίως στην εκθετική φάση του αυξητικού κύκλου, όπου η συγκέντρωση τους είναι μεγάλη συγκριτικά με εκείνες των άλλων μεταβολιτών. Ύστερα, όμως από τις 27 ώρες η συγκέντρωση των πρώτων μειώνεται με στροφή προς παραγωγή ακετοΐνης και 2,3-βουτανοδιόλης. Τέλος στο διάστημα μεταξύ 97 και 115 ωρών η συγκέντρωση της ακετοΐνης παρατηρείται πολύ υψηλή, όπως παρατηρήθηκε και στη προηγούμενη διεργασία μελέτης του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176 σε 40 ± 3 g/L γλυκερόλη, αλλά αυτή τη φορά με πολύ μεγαλύτερη συγκέντρωση (Διαγρ.29).



Διάγραμμα 29: Κινητική ανάπτυξης του *B. subtilis* ACA-DC 1176 σε αερόβια καλλιέργεια με θρεπτικό μέσο γλυκερόλης 67 g/L

Στις αερόβιες συνθήκες, όπου επανακαλλιεργήθηκε ο *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176 με αυξημένη κλίμακα γλυκερόλης στα 67 g/L και σε χρονικό διάστημα 115 ωρών, υπήρξε σχεδόν πλήρης αφομοίωση της πηγής άνθρακα με $S_{\text{cons}(\text{total})} = 64,15$ g/L στις 115 ώρες ζύμωσης. Στο διάστημα αυτό φαίνεται η μέγιστη παραγωγή βιομάζας (DW) 14,3 g/L στις 67 ώρες, ενώ μέχρι τις 115 ώρες μειώθηκε στη τιμή 4,54 g/L. Επίσης τα κύρια μεταβολικά προϊόντα ήταν η 2,3-βουτανοδιόλη (2,3-BDO) με 6,12 g/L και $S_{\text{cons}(2,3\text{-BDO})} = 50,02$ g/L στις 92 ώρες και ακετοΐνη (acetoin) 17,6 g/L στις 115 ώρες ζύμωσης. Η συγκέντρωση του οξικού οξέως αντίθετα μειώθηκε, χωρίς να παρατηρείται μεγαλύτερη συγκέντρωση από την αρχική που ήταν 5,6 g/L, συνεπώς δεν παρουσιάζεται στο διάγραμμα (Διαγρ. 29).

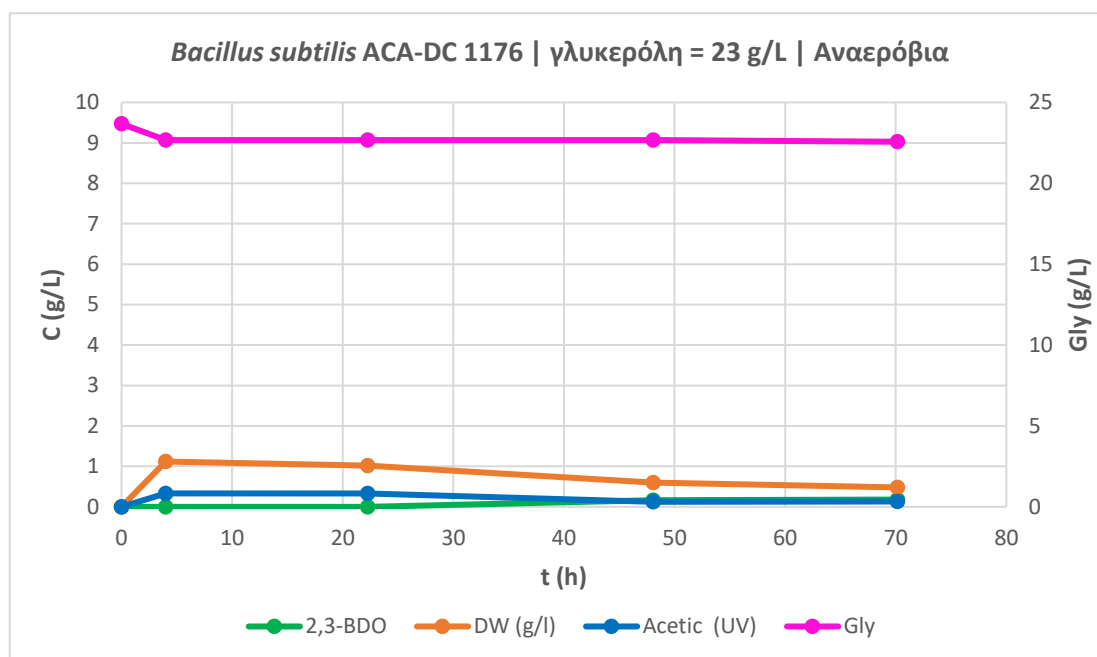
Παράλληλα σημειώθηκαν σε μικρότερη συγκέντρωση αιθανόλη (ethanol) με μέγιστη συγκέντρωση 1,45 g/L στις 27 ώρες, καθώς και αμελητέες συγκεντρώσεις γαλακτικού (lactic) και μυρμηκικού (formic).

Ο συντελεστής απόδοσης ως προς τη βιομάζα ήταν $Y\left(\frac{X}{S}\right) = 0,42 \frac{\text{g βιομάζας(max)}}{\text{g υποστώματος}}$ και ο συντελεστής απόδοσης ως προς το κύριο προϊόν το οποίο ήταν η ακετοΐνη ήταν $Y\left(\frac{ACTN}{S}\right) = 0,27 \frac{\text{g προϊόντος(max)}}{\text{g υποστώματος}}$. Η παραγωγικότητα βιομάζας ($P_{(X_{max})}$) ήταν 0,21 g/L/h, ενώ για την ακετοΐνη ήταν $P_{(acetoin)}=0,15$ g/L/h. Η τιμή του pH από την αρχική τιμή 7,43 μειώθηκε στο 6,7 στις 19 ώρες, ενώ αυξήθηκε ξανά στις επόμενες ώρες, φτάνοντας στο τέλος των 115 ωρών στη τιμή 6,88 (Διαγρ.30).



Διάγραμμα 30: Διακύμανση του pH συγκριτικά με τον χρόνο καλλιέργειας

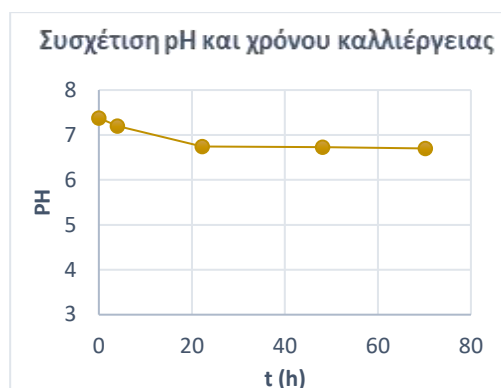
4.2.3.5. Καλλιέργεια του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176 σε υγρό θρεπτικό μέσο γλυκερόλης (Gly) καθαρότητας $\approx 99\%$, υπό αναερόβιες συνθήκες



Διάγραμμα 31: Κινητική ανάπτυξης του *B. subtilis* ACA-DC 1176 σε αναερόβια καλλιέργεια με θρεπτικό μέσο γλυκερόλης 23 g/L

Στη περίπτωση όπου ο *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176 καλλιεργήθηκε υπό αερόβιες συνθήκες, με πηγή άνθρακα καθαρή γλυκερόλη (Gly) $\approx 99\%$, παρατηρήθηκε πολύ χαμηλή αφομοίωση γλυκερόλης (Gly) με $S_{\text{cons}(\text{total})} = 1,11 \text{ g/L}$, έχοντας ως επακόλουθο τη χαμηλή παραγωγή μεταβολικών προϊόντων και βιομάζας (DW) (Διαγρ.31). Η βιομάζα (DW) στις 4 ώρες έλαβε τη μέγιστη τιμή 1,12 g/L με $S_{\text{cons}(X_{\text{max}})} = 1 \text{ g/L}$, ενώ στη συνέχεια μειώθηκε. Το οξικό οξύ (acetic) αυξήθηκε κατά 0,33 g/L στις 4εις ώρες, από την αρχική τιμή 4 g/L, ενώ στη συνέχεια μειώθηκε. Στις 70 ώρες παρατηρήθηκε για πρώτη φορά 2,3-βουτανοδιόλη (2,3-BDO), αλλά σε πολύ μικρή συγκέντρωση με μέγιστη τιμή 0,18 g/L. Παράλληλα σημειώθηκαν σε αμελητέες συγκεντρώσεις γαλακτικό οξύ (lactic) και μυρμηκικό οξύ (formic).

Ο συντελεστής απόδοσης ως προς τη βιομάζα ήταν $Y\left(\frac{X}{S}\right) = 1,12 \frac{\text{g βιομάζας (max)}}{\text{g υποστώματος}}$. Η παραγωγικότητα βιομάζας ($P_{(X_{\text{max}})}$) ήταν 0,28 g/L/h. Το pH αρχικά από τη τιμή 7,38 μειώθηκε στις 22 ώρες στη τιμή 6,74 και μέχρι και τις 70 ώρες δεν μειώθηκε περαιτέρω της τιμής 6,7 (Διαγρ.32).



Διάγραμμα 32: Διακύμανση του pH συγκριτικά με τον χρόνο καλλιέργειας

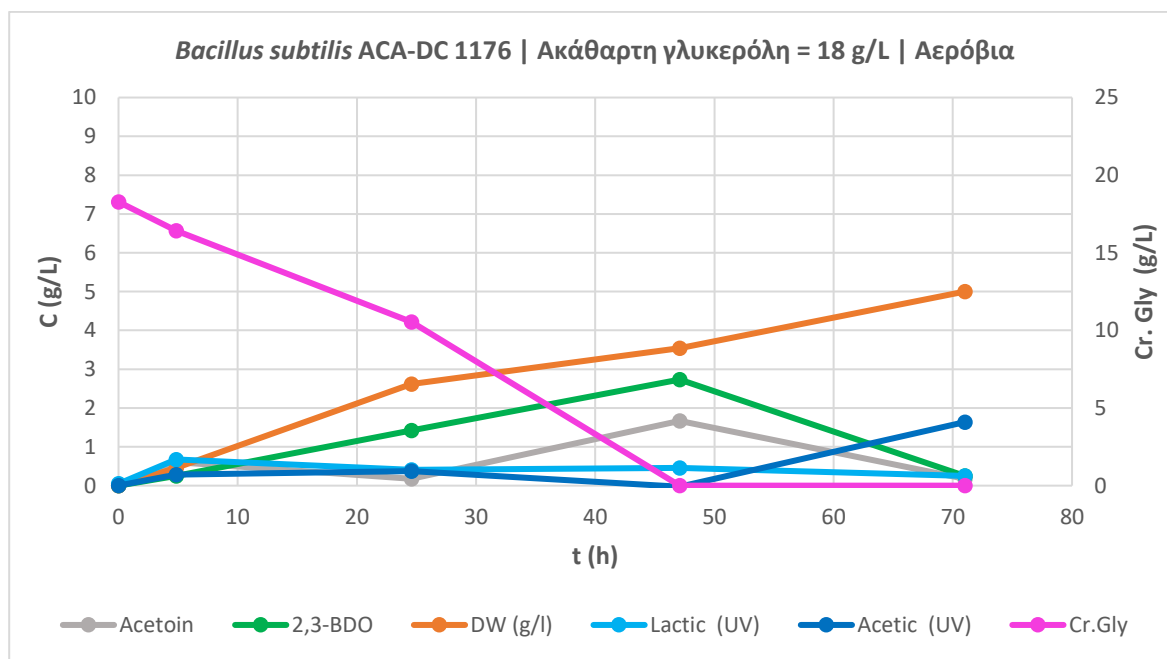
4.2.3.6. Καλλιέργεια του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176 σε υγρό θρεπτικό μέσο Βιομηχανικής γλυκερόλης (Cr.Gly) καθαρότητας $\approx 81\%$, υπό αερόβιες συνθήκες



Εικόνα 20: Μικροσκοπική παρατήρηση κυττάρων του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176 σε οπτικό μικροσκόπιο (μεγέθυνσης x100).

Ο *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176 μέσα σε διάστημα 6 ωρών από τον εμβολιασμό του, φαίνεται να αναπτύχθηκε καλά, ωστόσο στο χρονικό σημείο στο οποίο παρατηρήθηκε με το οπτικό μικροσκόπιο (μεγέθυνσης x100) (Εικ.20), εμφανίζει συσσωματώματα με ακίνητα κύτταρα σε συνδυασμό με άλλα ελεύθερα και κινητά. Συγκριτικά με τη περίπτωση της καθαρής γλυκερόλης στην οποία και εκεί παρατηρήθηκαν συσσωματώματα, αυτή τη φορά με πηγή άνθρακα την Ακάθαρτη γλυκερόλη, ο μικροοργανισμός δημιούργησε πιο μεγάλα και πυκνά συσσωματώματα. Επίσης το pH του μέσου αρχίζει να μειώνεται από τις 4 ώρες μέχρι και τις 24 ώρες που εξετάστηκε, το οποίο μπορεί να παρατηρηθεί και από τα αποτελέσματα της συγκέντρωσης του οξικού οξέος διαγραμματικά, εξηγώντας και τη ταχεία παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης στο υγρό της ζύμωσης.

Είναι γνωστό πως τα βακτήρια έχουν τη δυνατότητα παράγοντας 2,3-βουτανοδιόλη να αποτρέπουν την ενδοκυτταρική οξίνιση, ρυθμίζοντας έτσι την ισορροπία NADH και NAD⁺, συνεπώς ο *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176, αντιμετώπισε δυσμενείς συνθήκες που προκλήθηκαν από την οξίνιση του μέσου και για αυτό κατέφυγε στη δημιουργία συσσωματωμάτων. Ο μικροοργανισμός με πηγή άνθρακα ακάθαρτη γλυκερόλη δεν αντιμετώπισε σημαντική δυσκολία στην αφομοίωσή της, γεγονός που δηλώνει ότι οι προσμίξεις που περιέχονται σε αυτή δεν επηρέασαν την ανάπτυξη του, ενώ παράλληλα παρήγαγε σημαντικά μεταβολικά προϊόντα, σε όλη τη διάρκεια της καλλιέργειάς του (Διαγρ.33). Οι συγκεντρώσεις της ακετοΐνης και της 2,3-βουτανοδιόλης που παρατηρήθηκαν στα ίδια χρονικά σημεία με τη περίπτωση της αερόβιας καλλιέργειας σε καθαρή γλυκερόλη δε διαφέρουν σε σημαντικές συγκεντρώσεις, με την 2,3-βουτανοδιόλη να έχει ελάχιστα μικρότερη παραγωγή στη περίπτωση της ακάθαρτης. Επιπροσθέτως, η ακετοΐνη και το οξικό οξύ παρουσίασαν ελάχιστα μεγαλύτερη συγκέντρωση, συγκριτικά με τη περίπτωση της καθαρής γλυκερόλης σε αερόβια καλλιέργεια. Τέλος, η βιομάζα (DW) δε διέφερε για τις δυο περιπτώσεις, συνεχίζοντας και εδώ την αύξηση και μετά την αφομοίωση της ακάθαρτης γλυκερόλης.

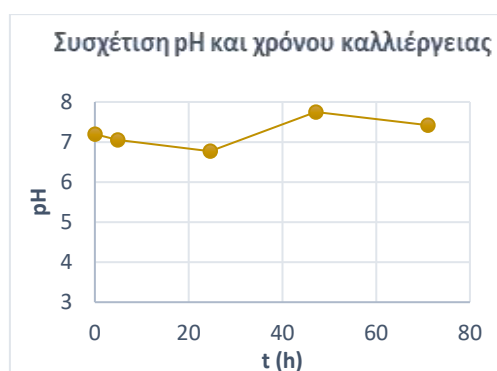


Διάγραμμα 33: Κινητική ανάπτυξης του *B. subtilis* ACA-DC 1176 σε αερόβια καλλιέργεια με θρεπτικό μέσο ακάθαρτης γλυκερόλης 18 g/L

Στη περίπτωση αερόβιας καλλιέργειας του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176 σε υπόστρωμα ακάθαρτης γλυκερόλης (Cr.Gly), παρατηρήθηκε πλήρης αφομοίωση της από το βακτηριακό στέλεχος πριν τις 47 ώρες καλλιέργειας.

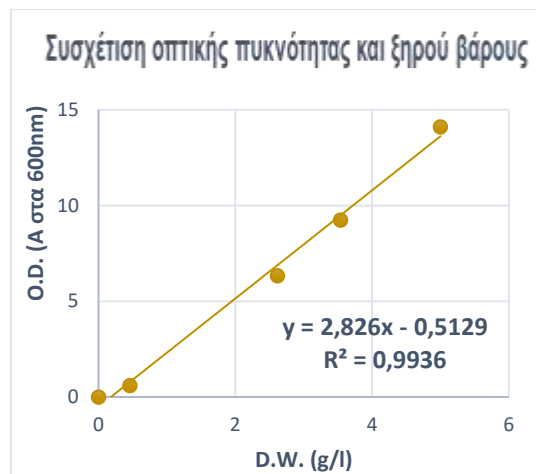
Η βιομάζα (DW) έφτασε τη μέγιστη τιμή της 5 g/L στις 71 ώρες με $S_{\text{cons}(X_{\text{max}})} = 18,28 \text{ g/L}$. Το οξικό οξύ (acetic) παρέμεινε σταθερό μέχρι και τις 47 ώρες, ενώ παρουσίασε αύξηση στις 70 ώρες ζύμωσης, με 1,64 g/L, από την αρχική τιμή 4,25 g/L. Επίσης ξεκινά να παράγεται σε χαμηλή συγκέντρωση στις 4 ώρες ακετοΐνη (acetoïn) και 2,3-βουτανοδιόλη (2,3-BDO), ενώ οι μέγιστες συγκεντρώσεις τους παρατηρήθηκαν στις 47 ώρες με 1,67 g/L και 2,73 g/L αντίστοιχα. Παράλληλα σημειώθηκαν σε αμελητέες συγκεντρώσεις γαλακτικό οξύ (lactic) και μυρμηκικό οξύ (formic).

Ο συντελεστής απόδοσης ως προς τη βιομάζα ήταν $Y\left(\frac{X}{S}\right) = 0,27 \frac{\text{g βιομάζας(max)}}{\text{g υποστώματος}}$ και ο συντελεστής απόδοσης ως προς το κύριο προϊόν 2,3-βουτανοδιόλη ήταν $Y\left(\frac{BD}{S}\right) = 0,15 \frac{\text{g προϊόντος(max)}}{\text{g υποστώματος}}$. Η παραγωγικότητα βιομάζας ($P_{(X_{\text{max}})}$) ήταν 0,07 g/L/h, ενώ για τη 2,3-βουτανοδιόλη $P_{(2,3\text{-BDO})} = 0,06 \text{ g/L/h}$. Το pH από την αρχική τιμή 7,2 μειώθηκε μετά στις 24 ώρες στη τιμή 6,77, ενώ αυξήθηκε εκ νέου στη τιμή 7,42 (Διαγρ.34).



Διάγραμμα 34: Διακύμανση του pH συγκριτικά με τον χρόνο καλλιέργειας

Τέλος για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της παραγόμενης βιομάζας, προσδιορίστηκε η καμπύλη συσχέτισης της οπτικής πυκνότητας (OD) στα 600 nm του δείγματος, συγκριτικά με τη συγκέντρωση του ξηρού βάρους της βιομάζας (DW) (Διαγρ.35). Η μέγιστη τιμή της οπτικής πυκνότητας (OD) στα 600 nm ήταν 14,1 A στις 70 ώρες καλλιέργειας.



Διάγραμμα 35: Καμπύλη συσχέτισης της οπτικής πυκνότητας και της συγκέντρωσης της βιομάζας

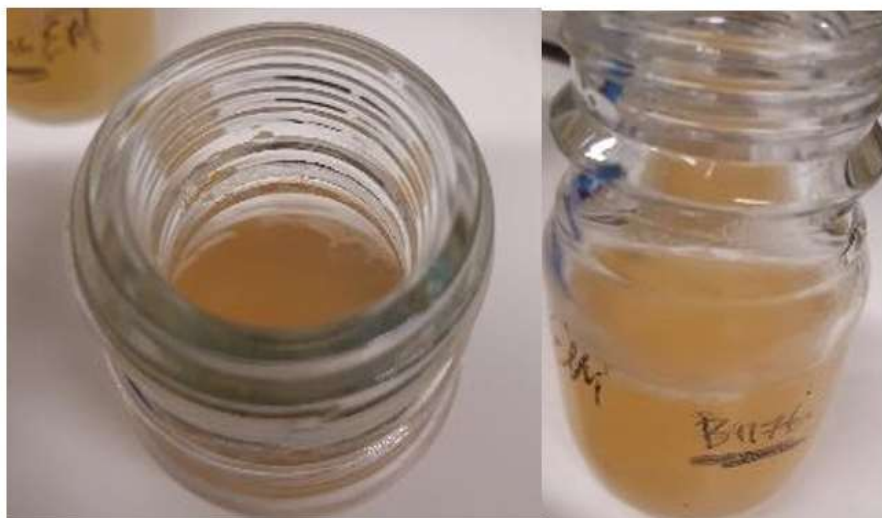
4.2.3.7. Καλλιέργεια του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176 σε υγρό θρεπτικό μέσο Ακάθαρτης Βιομηχανικής γλυκερόλης (Cr.Gly) καθαρότητας $\approx 81\%$, υπό αναερόβιες συνθήκες



Εικόνα 21: Μικροσκοπική παρατήρηση κυττάρων του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176 σε οπτικό μικροσκόπιο (μεγέθυνσης x100).

Ο *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176, είχε καλή ανάπτυξη ύστερα από περίπου έξι (6) ώρες από τον εμβολιασμό του στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας με πηγή άνθρακα την Ακάθαρτη γλυκερόλη, υπό αναερόβιες συνθήκες, ωστόσο δεν κατάφερε να αναπτυχθεί περαιτέρω. Το γεγονός, όμως που λαμβάνει χώρα και αξίζει να σημειωθεί παρατηρώντας την ανάλυση στο οπτικό μικροσκόπιο (Εικ.21), είναι πως τα περισσότερα κύτταρα έχασαν τη κινητικότητά τους και δεν σχημάτισαν απλά συσσωματώματα.

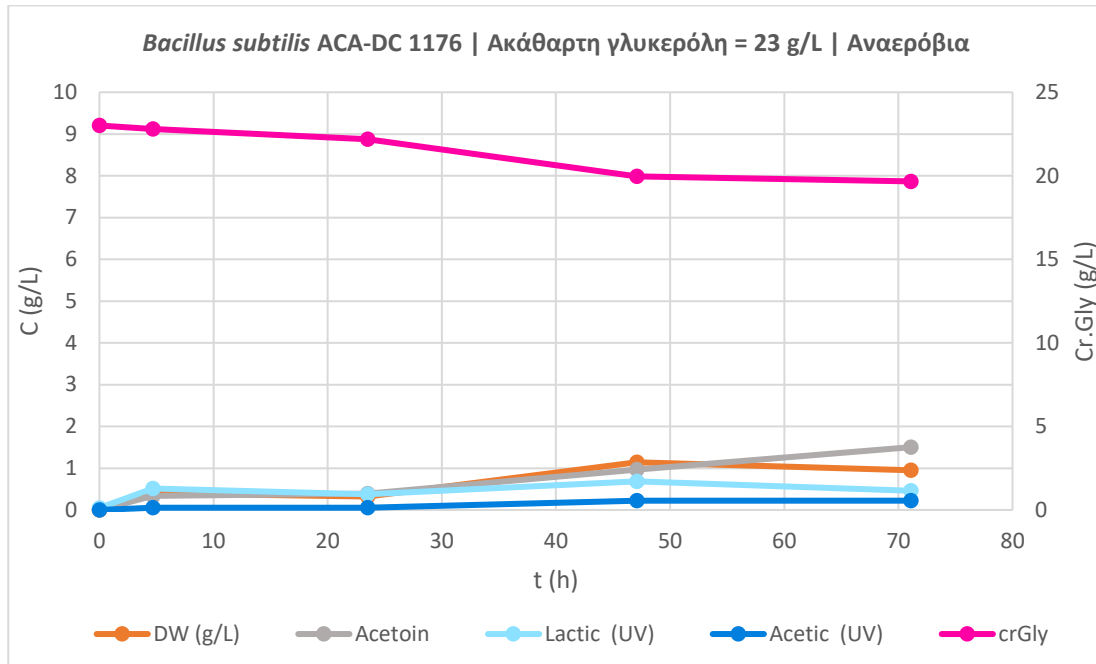
Η μορφή των μεγαλύτερων κυττάρων φαίνεται να είναι συνδεδεμένα κύτταρα μεταξύ τους, τα οποία σχηματίζουν πολλές κυτταρικές αλυσίδες, οι οποίες και εδώ είναι στενά συνδεδεμένες μεταξύ τους. Σύμφωνα με μελέτη που πραγματοποίησαν οι Konács, Á. T., & Dragoš, A., 2019, ύστερα από παρακολούθηση της ανάπτυξης του *Bacillus subtilis*, μέχρι και το τέλος των σαράντα οκτώ (48) ωρών περίπου, ο αριθμός των μεμονωμένων κυττάρων γινόταν όλο και λιγότερο διακριτός, καθώς σχηματίζονταν κυτταρικές αλυσίδες, οι οποίες ενώνονταν μεταξύ τους, μέχρις ότου να παρατηρούνται μονάχα ακίνητα συσσωματώματα. Ύστερα από τις σαράντα οκτώ (48) ώρες μέχρι και το τέλος των εβδομήντα (70) ωρών περίπου που διήρκεσε η πειραματική τους μελέτη, τα συσσωματώματα άρχιζαν να διαλύονται και οι αλυσίδες να διαχωρίζονται, παρατηρώντας εμφανή μεμονωμένα κύτταρα. Επίσης για την περίπτωση του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176, σε αναερόβια καλλιέργεια με πηγή άνθρακα ακάθαρτη γλυκερόλη ($\approx 81\%$), ο μικροοργανισμός είχε σχηματίσει βιοϋμένια στην επιφάνεια του υγρού όταν παρατηρήθηκε στις είκοσι τέσσερις (24) ώρες ζύμωσης, με μικρή ανάπτυξη και τα οποία ήταν προσκολλημένα στα τοιχώματα της φιάλης Duran (Εικ.22). Στις σαράντα οκτώ (48) περίπου ώρες που εξετάστηκε (Εικ.23), το ίζημα είχε αυξηθεί, σχηματίζοντας ένα συμπαγές ρυτιδιασμένο λευκό επίστρωμα στις διεπαφές αέρος-υγρού. Στις επόμενες, ωστόσο, ώρες φάνηκε το βιοϋμένιο να μειώνεται. Από το διάγραμμα μπορεί να φανεί η δυσκολία ανάπτυξης του μικροοργανισμού στις συνθήκες αναεροβίωσης, ωστόσο συγκριτικά με τη περίπτωση αναεροβίωσης σε καλλιέργεια με πηγή άνθρακα καθαρή γλυκερόλη η αφομοίωση της ακάθαρτης γλυκερόλης ήταν εμφανώς μεγαλύτερη κατά 87%, επιτρέποντας τη παραγωγή μεγαλύτερων συγκεντρώσεων μεταβολιτών, μεταξύ των οποίων ήταν η ακετοΐνη. Επίσης παρατηρείται πως η κατανάλωση της ακάθαρτης ξεκινά μετά τις 23 ώρες, όταν στη περίπτωση της καθαρής ο μικροοργανισμός ξεκίνησε την αφομοίωση και τη παραγωγή βιομάζας από τις 4εις ώρες μετά τον εμβολιασμό. Ωστόσο, η αύξηση του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176 είναι πολύ αργή και σταματά μετά τις 47 ώρες.



Εικόνα 22: Σχηματισμός ιζήματος βιομεμβράνης στις διεπαφές αέρος-υγρού σε καλλιέργεια του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176 με πηγή άνθρακα ακάθαρτη γλυκερόλη, υπό αναερόβιες συνθήκες, στις είκοσι τέσσερις (24) ώρες ανάπτυξης.



Εικόνα 23: Σχηματισμός ιζήματος βιομεμβράνης στις διεπαφές αέρος-υγρού σε καλλιέργεια του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176 με πηγή άνθρακα ακάθαρτη γλυκερόλη, υπό αναερόβιες συνθήκες στις σαράντα οκτώ (48) ώρες ανάπτυξης.



Διάγραμμα 36: Κινητική ανάπτυξης του *B. subtilis* ACA-DC 1176 σε αναερόβια καλλιέργεια με θρεπτικό μέσο ακάθαρτης γλυκερόλης 23 g/L

Στη περίπτωση της αναερόβιας ζύμωσης του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176, υπήρξε ελάχιστη αφομοίωση της ακάθαρτης γλυκερόλης (Cr.Gly), με $S_{\text{cons}(\text{total})} = 3,34 \text{ g/L}$, έχοντας ως επακόλουθο τη χαμηλή παραγωγή μεταβολικών προϊόντων και βιομάζας (DW) (Διαγρ.36). Η βιομάζα (DW) στις 47 ώρες έλαβε τη μέγιστη τιμή $1,14 \text{ g/L}$ με $S_{\text{cons}(X_{\text{max}})} = 3,05 \text{ g/L}$, ενώ στη συνέχεια μειώθηκε. Το οξικό οξύ (acetic) αυξήθηκε κατά $0,22 \text{ g/L}$ στις 47 ώρες, από την αρχική τιμή $4,24 \text{ g/L}$ και μέχρι τις 71 ώρες ζύμωσης παρέμεινε σταθερό. Στις 4εις ώρες σημειώθηκε παραγωγή ακετοΐνης (acetoin), και η μέγιστη συγκέντρωση παρατηρήθηκε στις 71 ώρες με $1,5 \text{ g/L}$. Παράλληλα σημειώθηκαν σε αμελητέες συγκεντρώσεις ηλεκτρικό οξύ (succinic), γαλακτικό οξύ (lactic) και μυρμηκικό οξύ (formic).

Ο συντελεστής απόδοσης ως προς τη βιομάζα ήταν $Y\left(\frac{X}{S}\right) = 0,37 \frac{\text{g βιομάζας (max)}}{\text{g υποστώματος}}$ και ο συντελεστής απόδοσης ως προς το κύριο προϊόν ακετοΐνη ήταν $Y\left(\frac{ACTN}{S}\right) = 0,45 \frac{\text{g προϊόντος}}{\text{g υποστώματος}}$. Η παραγωγικότητα βιομάζας ($P_{(X_{\text{max}})}$) ήταν $0,02 \text{ g/L/h}$ και για τη ακετοΐνη ήταν $P_{(\text{acetoin})} = 0,02 \text{ g/L/h}$. Το pH από την αρχική τιμή 7,3, μειώθηκε στις 24εις ώρες στο 6,9, ενώ αυξήθηκε εκ νέου, χωρίς να ξεπερνά την αρχική τιμή, στο 7,03 (Διαγρ.37).

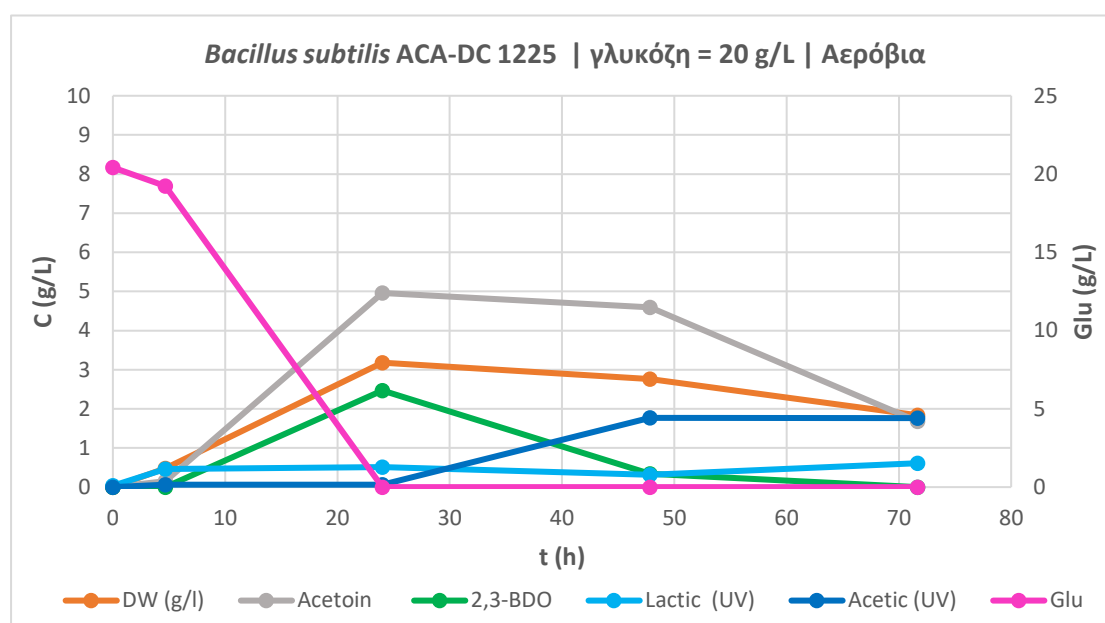


Διάγραμμα 37: Διακύμανση του pH συγκριτικά με τον χρόνο καλλιέργειας

4.2.4. Καλλιέργεια του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1225

Οι συνθήκες καλλιέργειας των στελεχών *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176 που παρουσιάστηκαν (Πίν.5), εξετάστηκαν και για τη περίπτωση των καλλιεργειών του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1225 και αναλύονται παρακάτω.

4.2.4.1. Καλλιέργεια του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1225 σε υγρό θρεπτικό μέσο γλυκόζης (Glu), υπό αερόβιες συνθήκες



Διάγραμμα 38: Κινητική ανάπτυξης του *B. subtilis* ACA-DC 1225 σε αερόβια καλλιέργεια με θρεπτικό μέσο γλυκόζης 20 g/L

Βάση των παραπάνω αποτελεσμάτων για τον *Bacillus subtilis* ACA-DC 1225 (Διαγρ.38), φαίνεται πως η γλυκόζη (Glu) αφομοιώνεται πλήρως πριν τις 24 ώρες ζύμωσης και ακολούθως στις ώρες αυτές παρατηρείται η μέγιστη συγκέντρωση μεταβολικών προϊόντων. Η βιομάζα (DW) έλαβε τη μέγιστη τιμή της 3,18 g/L στις 24 ώρες με $S_{cons(X_{max})} = 20,42$ g/L, ενώ ύστερα από το πέρας των 24^{ωv} ωρών, παραμένει σε μια σταθερή σχετικά συγκέντρωση με πτωτική τάση, μέχρι και τις 70 ώρες. Τα μεταβολικά προϊόντα που παρατηρήθηκαν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης ήταν το οξικό οξύ (acetic) με μέγιστη αύξηση 1,77 g/L μέχρι τις 70 ώρες, από την αρχική τιμή 4,58 g/L, η ακετοΐνη (acetoin), η οποία εμφανίζεται από τις πρώτες 4εις ώρες μέχρι και το τέλος της ζύμωσης, με μέγιστη συγκέντρωση 4,96 g/L στις 24 ώρες, ενώ παράλληλα παράγεται και 2,3-βουτανοδιόλη (2,3-BDO) με μέγιστη συγκέντρωση 2,47 g/L στις 24 ώρες.

Η 2,3-βουτανοδιόλη (2,3-BDO), στο διάστημα από τις 24 ώρες μέχρι και τις 48 ώρες μειώθηκε σημαντικά, ενώ στις 71 ώρες δεν παρατηρείται καθόλου στο μέσο ανάπτυξης. Παράλληλα σημειώθηκαν σε αμελητέα συγκέντρωση γαλακτικό οξύ (lactic) και μυρμηκικό οξύ (formic).

Ο συντελεστής απόδοσης ως προς τη βιομάζα ήταν $Y\left(\frac{X}{S}\right) = 0,16 \frac{g \text{ βιομάζας(max)}}{g \text{ υποστώματος}}$ και ο συντελεστής απόδοσης ως προς το κύριο προϊόν, το οποίο ήταν η ακετοΐνη, ήταν $Y\left(\frac{ACTN}{S}\right) = 0,24 \frac{g \text{ προϊόντος}}{g \text{ υποστώματος}}$.

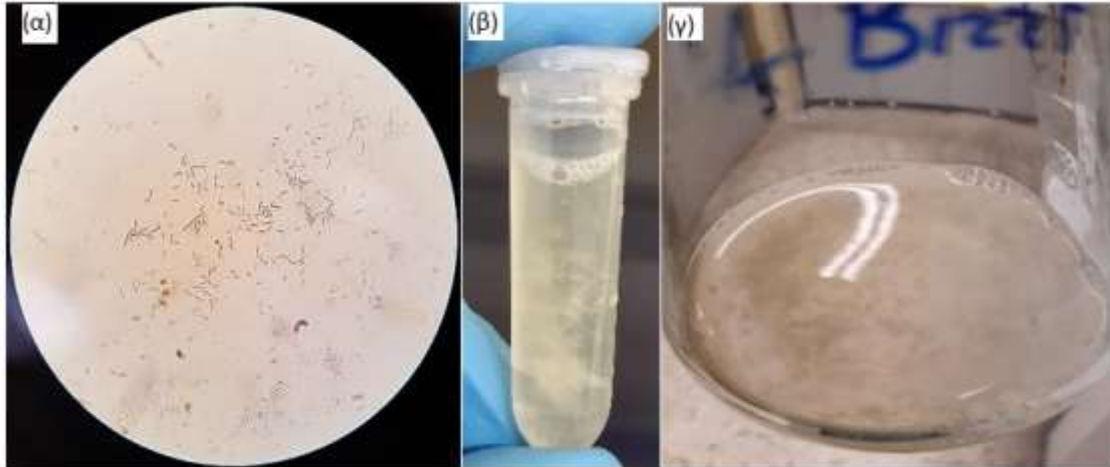
Η παραγωγικότητα βιομάζας ($P_{(X_{max})}$) ήταν 0,13 g/L/h, καθώς και για την ακετοΐνη ($P_{(acetoin)}$) ήταν 0,21 g/L/h. Το pH από την αρχική τιμή 7,35, παρουσίασε μικρή πτώση στις πρώτες 4εις ώρες, ενώ στις επόμενες 24 με 48 ώρες αυξήθηκε ξανά στη τιμή 8,28, μέχρι τη τελική τιμή να είναι στο 6,93, στις 71 ώρες (Διαγρ.39).



Διάγραμμα 39: Διακύμανση του pH συγκριτικά με τον χρόνο καλλιέργειας

Συνεπώς η εκθετική φάση του αυξητικού κύκλου του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1225 σε υπόστρωμα γλυκόζης 20 g/L και υπό αερόβιες συνθήκες, φαίνεται να συμβαίνει μεταξύ 10 και 24^{ωv} ωρών ανάπτυξης από τη στιγμή του εμβολιασμού του στο υπόστρωμα της κύριας υγρής καλλιέργειας, όπως παρατηρήθηκε και για το προηγούμενο στέλεχος του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176. Στο διάστημα αυτό παράγονται ακετοΐνη και 2,3-βουτανοδιόλη σε σημαντικές ποσότητες, οι οποίες καταγράφονται στις 24 ώρες ενώ στη συνέχεια μειώνονται. Αυτό σημαίνει πως στο διάστημα μεταξύ 4 και 24 ώρες παράγονται τα μεταβολικά αυτά προϊόντα, συνεπώς για να προσδιοριστούν με μεγαλύτερη ακρίβεια η επιταχυνόμενη και η εκθετική φάση αύξησης με τα αντίστοιχα μεταβολικά προϊόντα και βιομάζα, αλλά και το ακριβές χρονικό σημείο στο οποίο αφομοιώνεται πλήρως η πηγή άνθρακα, θα πρέπει από το σημείο t=0 μέχρι και τις 24 ώρες να ληφθούν περισσότερα σημεία.

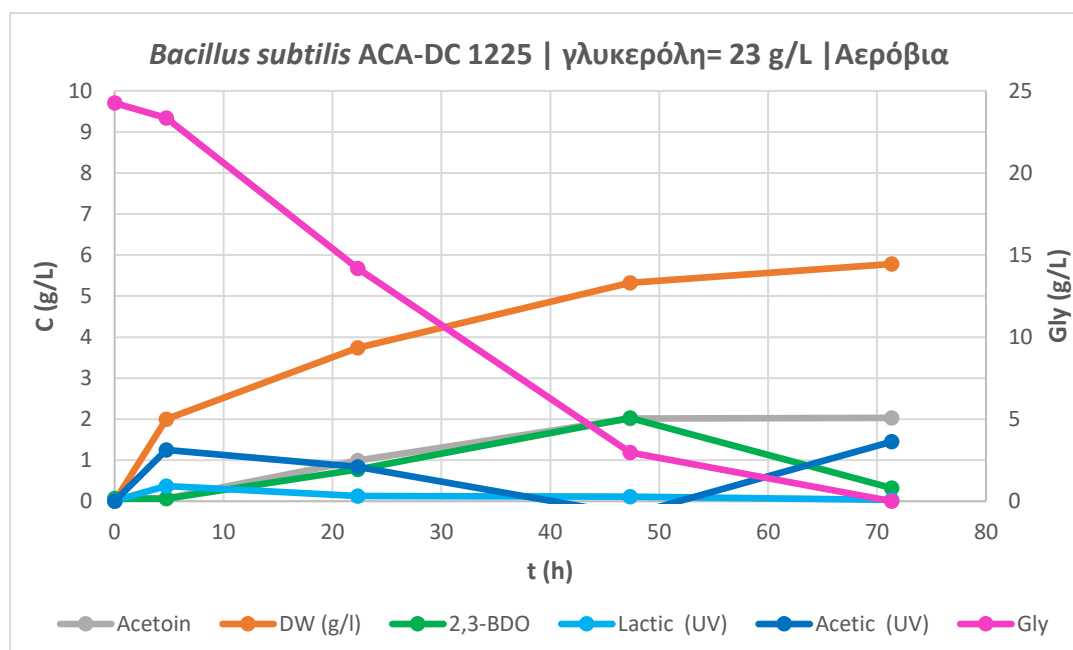
4.2.4.2. Καλλιέργεια του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1225 σε υγρό θρεπτικό μέσο γλυκερόλης (Gly) καθαρότητας $\approx 99\%$, υπό αερόβιες συνθήκες (Συγκέντρωση Gly 20 ± 3 g/L)



Εικόνα 24: (α) Μικροσκοπική παρατήρηση κυττάρων του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1225 σε οπτικό μικροσκόπιο (μεγέθυνσης $\times 100$). (β) Σχηματισμός συσσωματώματος με εμφανή αιωρούμενα βιοϋμένια στο υγρό μέσο της αύξησης, ύστερα από ανάδευση σε δείγμα 24^{ωv} ωρών από τον εμβολιασμό, όταν αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου. (γ) Φιάλη με συσσωματώματα κυττάρων του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1225, βυθισμένα στον πυθμένα, όταν αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου, χωρίς ανάδευση.

Όπως φαίνεται από την ανάπτυξη του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1225 (Εικ.24), η ανάπτυξη των κυττάρων του στο θρεπτικό μέσο με πηγή άνθρακα γλυκερόλη, υπό αερόβιες συνθήκες, ήταν καλή, παρατηρώντας κύτταρα σε όλο σχεδόν το δείγμα που λήφθηκε σε διάστημα έξι (6) ωρών της ζύμωσης. Τα κύτταρα ήταν κινητά σε μεγάλο ποσοστό, με ορισμένα ακίνητα να έχουν συγκεντρωθεί σε μικρά ακόμη συσσωματώματα. Όπως φαίνεται στο διάγραμμα συγκεντρώσεων των μεταβολικών προϊόντων του μικροοργανισμού, στο διάστημα μεταξύ τεσσάρων (4) και είκοσι δύο (22) ωρών, είχε ήδη αυξηθεί η συγκέντρωση του οξικού οξέος, μειώνοντας έτσι και το pH στο μέσο της καλλιέργειας, ενώ στις είκοσι δύο (22) ώρες, παρατηρείται για πρώτη φορά ανάπτυξη ακετοΐνης με ταυτόχρονη παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης. Τα μεταβολικά αυτά προϊόντα, όπως προαναφέρθηκε σηματοδοτούν την αντίδραση του μικροοργανισμού στην αλλαγή του pH στο μέσο αύξησης, ισορροπώντας την κατάσταση του μεταβολισμού του ενδοκυτταρικά. Επίσης από τη δειγματοληψία στις είκοσι τέσσερις (24) περίπου ώρες από τον εμβολιασμό της καλλιέργειας, μπορούν να διακριθούν, με γυμνό οφθαλμό, κύτταρα σε μορφή συμπαγούς μάζας, σχηματίζοντας αιωρούμενα βιοϋμένια στο υγρό μέσο της αύξησης.

Τα κύτταρα αυτά σχηματίστηκαν λίγα λεπτά αφού λήφθηκε το δείγμα από τις κωνικές φιάλες και μεταφέρθηκε σε Eppendorf των 2 ml, όταν αρχικά είχαν καταβυθιστεί στον πυθμένα του Eppendorf και με μηχανική ανάδευση (Vortex) διαλύθηκαν παίρνοντας τη μορφή που παρουσιάζεται μέσα στο υγρό.

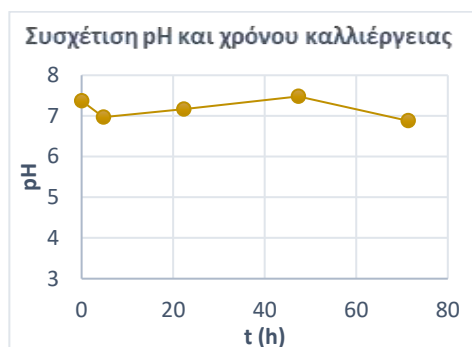


Διάγραμμα 40: Κινητική ανάπτυξης του *B. subtilis* ACA-DC 1225 σε αερόβια καλλιέργεια με θρεπτικό μέσο γλυκερόλης 23 g/L

Στις αερόβιες συνθήκες, όπου καλλιεργήθηκε ο *Bacillus subtilis* ACA-DC 1225 με πηγή άνθρακα καθαρή γλυκερόλη, στις 70 ώρες ζύμωσης, υπήρξε πλήρης αφομοίωση της γλυκερόλης (Gly), (Διαγρ.40). Η βιομάζα (DW) από τις 4 πρώτες ώρες παρουσίασε σημαντική αύξηση, φτάνοντας τη μέγιστη τιμή 5,78 g/L στις 70 ώρες, όπου και η γλυκερόλη (Gly) καταναλώθηκε πλήρως. Το οξικό οξύ (acetic) αυξήθηκε κατά 1,44 g/L στις 70 ώρες, από την αρχική τιμή 3,26 g/L. Η ακετοΐνη (acetoin) έλαβε τη μέγιστη συγκέντρωση 2,03 g/L στις 70 ώρες και η 2,3-βουτανودیολη (2,3-BDO) με 2,03 g/L μέγιστη συγκέντρωση στις 48 ώρες με $S_{cons(2,3-BDO)} = 21,29$ g/L. Παράλληλα σε αμελητέα συγκέντρωση παρατηρούνται ηλεκτρικό οξύ (succinic), γαλακτικό οξύ (lactic) και μυρμηκικό οξύ (formic).

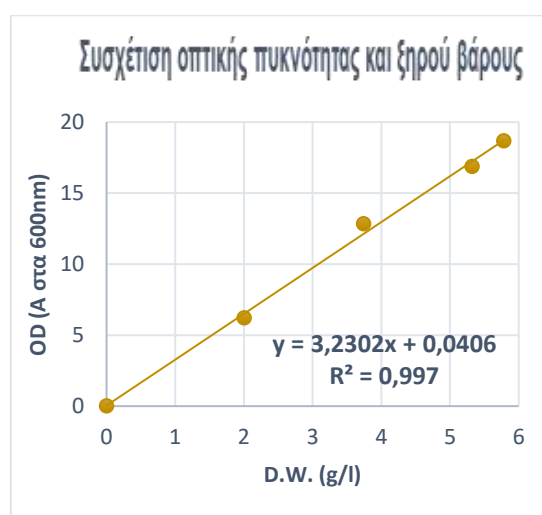
Ο συντελεστής απόδοσης ως προς τη βιομάζα ήταν $Y\left(\frac{X}{S}\right) = 0,24 \frac{\text{g βιομάζας (max)}}{\text{g υποστώματος}}$. Ο συντελεστής απόδοσης ως προς τη 2,3-βουτανودیολη ήταν $Y\left(\frac{BD}{S}\right) = 0,10 \frac{\text{g προϊόντος}}{\text{g υποστώματος}}$ και της ακετοΐνης $Y\left(\frac{ACTN}{S}\right) = 0,08 \frac{\text{g προϊόντος(max)}}{\text{g υποστώματος}}$.

Η παραγωγικότητα βιομάζας ($P_{(X_{max})}$) ήταν 0,08 g/L/h, της 2,3-βουτανοδιόλης ($P_{(2,3-BDO)}$) ήταν 0,04 g/L/h και της ακετοΐνης ($P_{(ACTN)}$) ήταν 0,03 g/L/h. Το pH από την αρχική τιμή 7,37 μειώθηκε στη τιμή 6,97 στις 4εις πρώτες ώρες ζύμωσης, αυξήθηκε εκ νέου μέχρι τη τιμή 7,48 στις 47 ώρες, ενώ μέχρι τις 71 ώρες ζύμωσης έφτασε τη τιμή 6,88 (Διαγρ.41).



Διάγραμμα 41: Διακύμανση του pH συγκριτικά με τον χρόνο καλλιέργειας

Τέλος για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της παραγόμενης βιομάζας, προσδιορίστηκε η καμπύλη συσχέτισης της οπτικής πυκνότητας (OD) στα 600 nm του δείγματος, συγκριτικά με τη συγκέντρωση του ξηρού βάρους της βιομάζας (DW) (Διαγρ.42). Η μέγιστη τιμή της οπτικής πυκνότητας (OD) στα 600 nm ήταν 18,68 A στις 70 ώρες καλλιέργειας.



Διάγραμμα 42: Καμπύλη συσχέτισης της οπτικής πυκνότητας και της συγκέντρωσης της βιομάζας

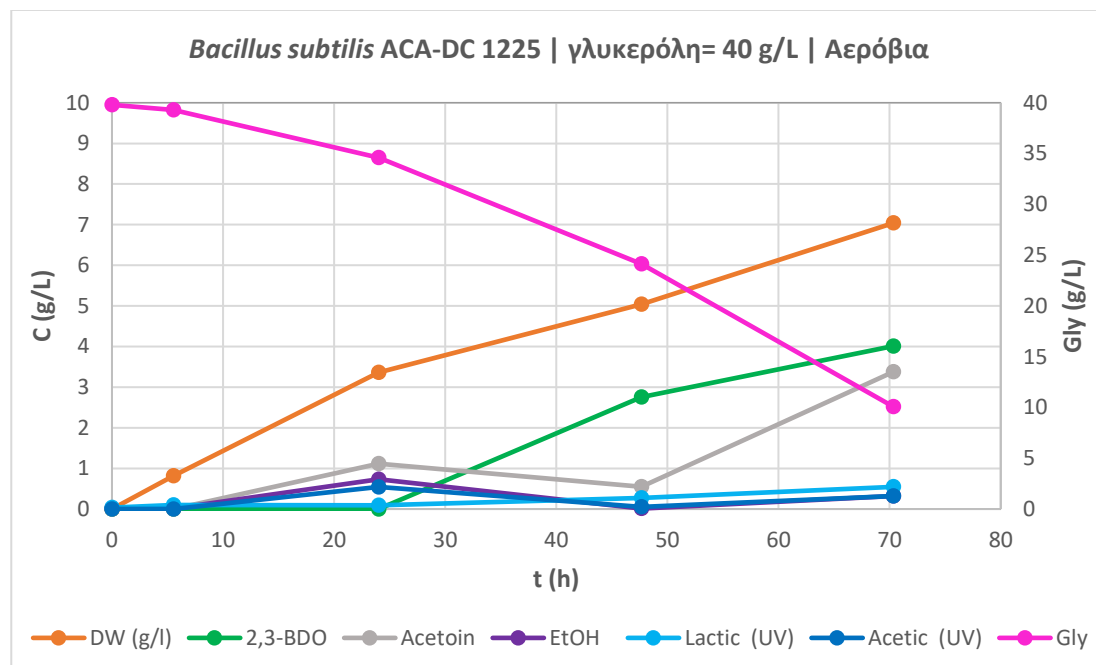
4.2.4.3. Καλλιέργεια του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1225 σε υγρό θρεπτικό μέσο γλυκερόλης (Gly) καθαρότητας $\approx 99\%$, υπό αερόβιες συνθήκες (Συγκέντρωση Gly 40 ± 3 g/L)



Εικόνα 25: Μικροσκοπική παρατήρηση κυττάρων του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1225 σε οπτικό μικροσκόπιο (μεγέθυνσης $\times 100$).

Η επανακαλλιέργεια του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1225 σε θρεπτικό μέσο, με πηγή άνθρακα τη γλυκερόλη εξετάστηκε σε αυξημένη κλίμακα των 40 g/L, καθώς ο μικροοργανισμός παρουσίασε ενδιαφέροντα μεταβολικά προϊόντα στη μικρότερη κλίμακα των 23 g/L. Παρατηρώντας, λοιπόν την αύξηση του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1225 (Εικ.25), φαίνεται πως η ανάπτυξή του επηρεάστηκε, ήδη από τις πρώτες 6 ώρες που εξετάστηκε δείγμα στο οπτικό μικροσκόπιο (μεγέθυνσης $\times 100$), σχηματίζοντας κυτταρικές αλυσίδες οι οποίες ήταν συγκεντρωμένες σε ακίνητη κατάσταση δημιουργώντας συστάδες. Η κατάσταση στην οποία μετέβη ο μικροοργανισμός δείχνει την αδυναμία του να μεταβολίσει με ευκολία τη μεγάλη συγκέντρωση γλυκερόλης, με αποτέλεσμα να την αφομοιώνει με καθυστέρηση. Επίσης στις 24 ώρες παρατηρείται αύξηση του οξικού και αιθανόλης, ενώ για πρώτη φορά ύστερα από τις 24 ώρες παράγεται ακετοΐνη, η οποία με τη σειρά της θα μετατραπεί σε 2,3-βουτανοδιόλη. Συνεπώς η αλλαγή του pH στο μέσο είναι ένας ακόμη σημαντικός παράγοντας για τη δημιουργία των κυτταρικών αλυσίδων. Η απότομη πτώση της συγκέντρωσης της ακετοΐνης στις 48 ώρες πιθανόν να οφείλεται στην ολοκληρωτική μετατροπή της σε 2,3-βουτανοδιόλη, δεδομένου ότι στο σημείο αυτό η 2,3-βουτανοδιόλη αυξήθηκε σημαντικά, ενώ στις επόμενες ώρες έγινε στροφή του μεταβολισμού από 2,3-βουτανοδιόλη σε ακετοΐνη, καθώς είναι γνωστό πως η αντίδραση αυτή συμβαίνει αμφίδρομα.

Τέλος η καλλιέργεια του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1225 δεν κατάφερε να αναδείξει πλήρως τα μεταβολικά προϊόντα που θα μπορούσαν να παραχθούν, καθώς οι 70 ώρες δεν ήταν αρκετές για τη πλήρη αφομοίωση της γλυκερόλης (Διαγρ.43).

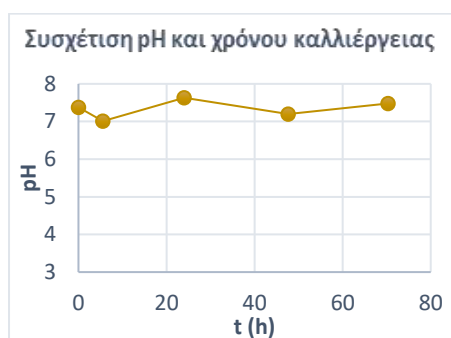


Διάγραμμα 43: Κινητική ανάπτυξης του *B. subtilis* ACA-DC 1225 σε αερόβια καλλιέργεια με θρεπτικό μέσο γλυκερόλης 40 g/L

Στις αερόβιες συνθήκες, όπου επανακαλλιεργήθηκε ο *Bacillus subtilis* ACA-DC 1225 με συγκέντρωση πηγής άνθρακα 40 g/L και σε χρονικό διάστημα 70 ωρών, το βακτήριο δε πρόλαβε να καταναλώσει όλη τη ποσότητα της γλυκερόλης (Gly), με $S_{\text{cons}(\text{total})} = 29,72$ g/L. Η ζύμωση του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1225 σε μεγαλύτερης κλίμακας πηγής άνθρακα συγκριτικά με προηγούμενη πειραματική μελέτη σε συγκέντρωση γλυκερόλης (Gly) 20 g/L, φαίνεται να παράγει κοινά προϊόντα με σχετικά παρόμοιες συγκεντρώσεις. Πιο συγκεκριμένα υπήρξε παραγωγή βιομάζας (DW) με μέγιστη συγκέντρωση 7,04 g/L στις 70 ώρες. Το οξικό οξύ (acetic) δεν παρουσίασε σημαντική μεταβολή στη συγκέντρωσή του καθ' όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας, με μέγιστη αύξηση 0,32 g/L στις 24 ώρες, από αρχική συγκέντρωση 4,13 g/L. Η ακετοΐνη (acetoin) εμφανίζεται για πρώτη φορά στις 24 ώρες ζύμωσης, η οποία σχεδόν μηδενίζεται στις επόμενες 48 ώρες, ωστόσο στο τέλος της καλλιέργειας των 70 ωρών παρουσιάζει σημαντική αύξηση με συγκέντρωση 3,37 g/L.

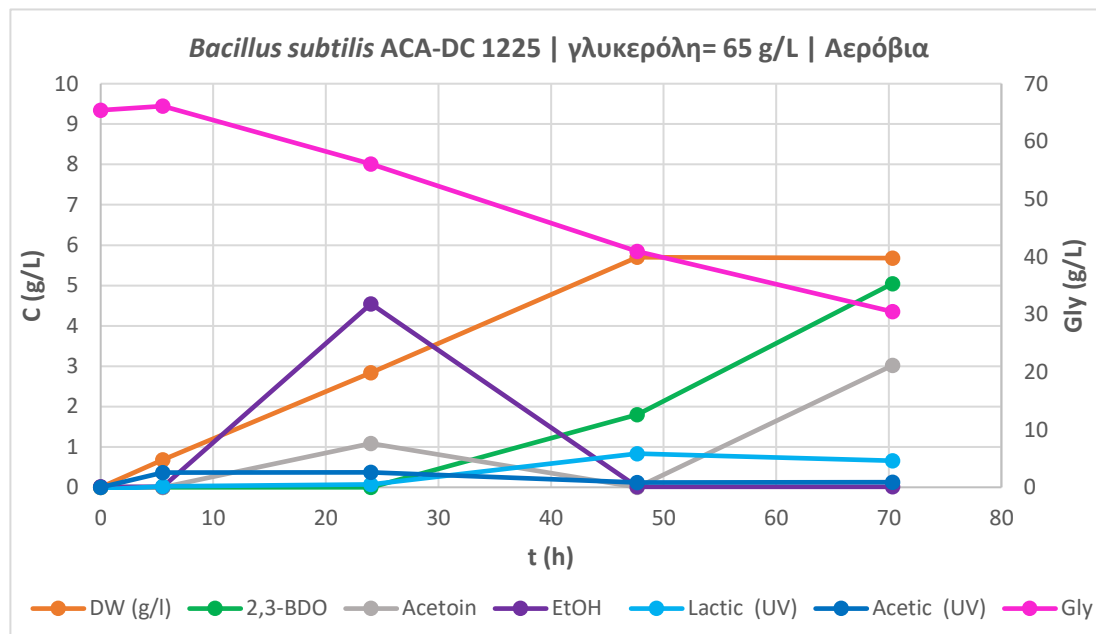
Στο χρονικό διάστημα μεταξύ των 24 και 47 ωρών ζύμωσης, φαίνεται να παράγεται για πρώτη φορά 2,3-βουτανοδιόλη (2,3-BDO) μέχρι και το τέλος της καλλιέργειας, με μέγιστη συγκέντρωση 4 g/L στις 70 ώρες ζύμωσης. Παράλληλα σε αμελητέα συγκέντρωση παρατηρούνται αιθανόλη (ethanol), γαλακτικό οξύ (lactic) και μυρμηκικό οξύ (formic).

Ο συντελεστής απόδοσης ως προς τη βιομάζα ήταν $Y\left(\frac{X}{S}\right) = 0,24 \frac{\text{g βιομάζας (max)}}{\text{g υποστώματος}}$ και ο συντελεστής απόδοσης ως προς το κύριο προϊόν 2,3-βουτανοδιόλη ήταν $Y\left(\frac{BD}{S}\right) = 0,13 \frac{\text{g προϊόντος(max)}}{\text{g υποστώματος}}$. Η παραγωγικότητα βιομάζας ($P_{(X_{\max})}$) ήταν 0,10 g/L/h και για τη 2,3-βουτανοδιόλη ($P_{2,3\text{-BDO}}$) ήταν 0,06 g/L/h. Το pH από την αρχική τιμή 7,38 δεν παρουσίασε σημαντική μεταβολή μέχρι και τις 70 ώρες, όπου παρέμεινε σχετικά σταθερό με τιμή 7,48 (Διαγρ.44).



Διάγραμμα 44: Διακύμανση του pH συγκριτικά με τον χρόνο καλλιέργειας

4.2.4.4. Καλλιέργεια του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1225 σε υγρό θρεπτικό μέσο γλυκερόλης (Gly) καθαρότητας $\approx 99\%$, υπό αερόβιες συνθήκες (Συγκέντρωση Gly 70 ± 3 g/L)



Διάγραμμα 45: Κινητική ανάπτυξης του *B. subtilis* ACA-DC 1225 σε αερόβια καλλιέργεια με θρεπτικό μέσο γλυκερόλης 65 g/L

Στις αερόβιες συνθήκες, όπου επανακαλλιεργήθηκε ο *Bacillus subtilis* ACA-DC 1225 με μεγαλύτερη συγκέντρωση πηγής άνθρακα 65 g/L και σε χρονικό διάστημα 70 ωρών ζύμωσης, το βακτήριο δε πρόλαβε να καταναλώσει όλη τη ποσότητα της γλυκερόλης (Gly), με $S_{\text{cons}(\text{total})} = 34,93$ g/L μέχρι το διάστημα αυτό (Διαγρ.45). Η βιομάζα (DW) παρουσιάζει αύξηση μέχρι το διάστημα των 48 ωρών, όπου λαμβάνει και τη μέγιστη τιμή της 5,70 g.L με $S_{\text{cons}(X_{\text{max}})} = 24,47$ g/L, ενώ από το σημείο αυτό και μέχρι τις 70 ώρες παρέμεινε σταθερή. Όπως και στις περιπτώσεις όπου εξετάστηκε το συγκεκριμένο βακτηριακό στέλεχος σε μικρότερη κλίμακα γλυκερόλης, και αυτή τη φορά τα μεταβολικά προϊόντα ήταν το οξικό οξύ (acetic) με μέγιστη αύξηση 0,36 g/L στις 6 ώρες, από την αρχική τιμή 4,41 g/L, η ακετοΐνη (acetoin) που παρατηρήθηκε από τις 24 μέχρι και τις 70 ώρες, με μέγιστη τιμή 3,02 g/L, καθώς και 2,3-βουτανοδιόλη (2,3-BDO) με μέγιστη συγκέντρωση 5,05 g/L στις 70 ώρες. Η αιθανόλη (ethanol) παρουσιάζεται για μοναδική φορά στο μέσο της καλλιέργειας στο διάστημα των 24^{ωv} ωρών με συγκέντρωση 4,5 g/L, ενώ στην υπόλοιπη πορεία της ζύμωσης δεν ανιχνεύεται ξανά. Παράλληλα σε αμελητέα συγκέντρωση παρατηρούνται γαλακτικό οξύ (lactic) και μυρμηκικό οξύ (formic).

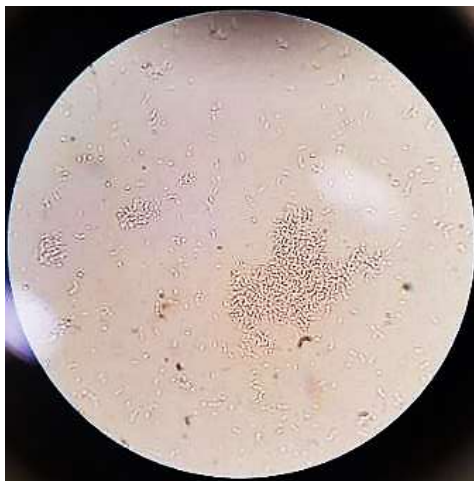
Ο συντελεστής απόδοσης ως προς τη βιομάζα ήταν $Y\left(\frac{X}{S}\right) = 0,23 \frac{\text{g βιομάζας(max)}}{\text{g υποστώματος}}$ και ο συντελεστής απόδοσης ως προς το κύριο προϊόν 2,3-βουτανοδιόλη ήταν $Y\left(\frac{BD}{S}\right) = 0,14 \frac{\text{g προϊόντος(max)}}{\text{g υποστώματος}}$. Η παραγωγικότητα βιομάζας ($P_{(X_{\max})}$) ήταν 0,12 g/L/h και για τη 2,3-βουτανοδιόλη ($P_{(2,3\text{-BDO})}$) ήταν 0,07 g/L/h. Το pH από την αρχική τιμή 7,37 δεν παρουσίασε σημαντική μεταβολή μέχρι και τις 70 ώρες ζύμωσης, όπου παρέμεινε σχετικά σταθερό με τιμή 7,36 (Διαγρ.46).



Διάγραμμα 46: Διακύμανση του pH συγκριτικά με τον χρόνο καλλιέργειας

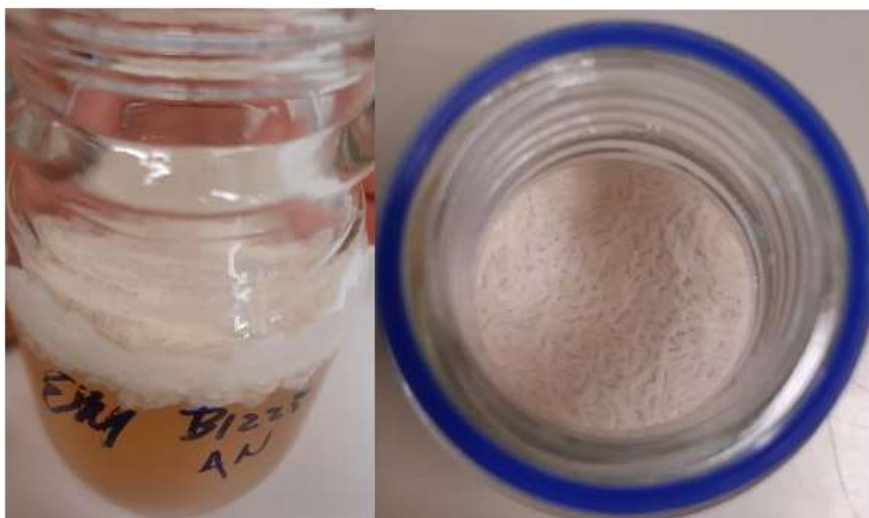
Σύμφωνα με τις παραπάνω κινητικές ανάπτυξης του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1225 σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα καθαρή γλυκερόλη, σε συγκεντρώσεις 40 και 70 g/L μπορεί να διαπιστωθεί μεγαλύτερη καθυστέρηση της αφομοίωσης της γλυκερόλης στη περίπτωση ανάπτυξης του μικροοργανισμού στο μέσο με τα 40 g/L γλυκερόλη. Συνεπώς, η αύξηση της συγκέντρωσης της πηγής άνθρακα παρουσίασε καλύτερα αποτελέσματα για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Επίσης στη κινητική ανάπτυξης των 70 g/L γλυκερόλης, φαίνεται μια μικρή αύξηση στη συγκέντρωση της γλυκερόλης και του οξικού μεταξύ του διαστήματος από το χρονικό σημείο $t=0$ h, όπου έγινε ο εμβολιασμός, μέχρι και τις έξι (6) ώρες ζύμωσης. Το αποτέλεσμα αυτό ενδέχεται να οφείλεται σε πειραματικό σφάλμα, όταν στις φιάλες που απομονώθηκε το δείγμα προς ανάλυση στα χρονικά σημεία $t=0$ h και $t=6$ h, οι συγκεντρώσεις των συστατικών να διέφεραν. Τέλος, τόσο στη καλλιέργεια με 40 g/L γλυκερόλη, όσο και στα 70 g/L, στις 24 ώρες παρατηρήθηκε αύξηση του pH και παραγωγή ακετοΐνης, η οποία μετατράπηκε σε 2,3-βουτανοδιόλη στις επόμενες 48 ώρες, συμβάλλοντας στην επαναφορά ισορροπίας NADH και NAD⁺ ενδοκυτταρικά.

4.2.4.5. Καλλιέργεια του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1225 σε υγρό θρεπτικό μέσο γλυκερόλης (Gly) καθαρότητας $\approx 99\%$, υπό αναερόβιες συνθήκες



Εικόνα 26: Μικροσκοπική παρατήρηση κυττάρων του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1225 σε οπτικό μικροσκόπιο (μεγέθυνσης x100).

Ο *Bacillus subtilis* ACA-DC 1225, σε αναερόβια καλλιέργεια και πηγή άνθρακα γλυκερόλη μέσα σε διάστημα 6 ωρών από τον εμβολιασμό του, φαίνεται να έχει αναπτυχθεί καλά, ωστόσο στο χρονικό σημείο στο οποίο παρατηρήθηκε με το οπτικό μικροσκόπιο (Εικ.26), εμφανίζει συσσωματώματα με κυρίως ακίνητα κύτταρα σε συνδυασμό με άλλα λιγότερο κινητά. Η δυσκολία ανάπτυξης που φαίνεται να αντιμετωπίζει ο μικροοργανισμός αποτυπώνεται και στη διαγραμματική απεικόνιση των συγκεντρώσεων των μεταβολικών του προϊόντων, καθώς για αρχή η γλυκερόλη καθυστέρησε να καταναλωθεί μέχρι και τις είκοσι δύο (22) ώρες από τον εμβολιασμό του μικροοργανισμού, καθώς και στη μείωση που φαίνεται να έχει το pH μεταξύ των τεσσάρων (4) και είκοσι δύο (22) ωρών. Επίσης η βιομάζα παρέμεινε σταθερή για το διάστημα μεταξύ των τεσσάρων (4) και είκοσι δύο (22) ωρών που σημαίνει ότι ο μικροοργανισμός έχει αναστείλει την ανάπτυξή του. Ύστερα από τις είκοσι δύο (22) ώρες μέχρι και τις σαράντα οκτώ (48) η βιομάζα (DW) αυξήθηκε σημαντικά, με βασικό παράγοντα να είναι η ανάπτυξη βιοϋμένιου στην επιφάνεια του υγρού. Οι παρακάτω εικόνες φαίνεται να παρουσιάζουν το αποτέλεσμα της αναστολής ανάπτυξης του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1225, καθώς στις σαράντα οκτώ (48) ώρες που παρατηρήθηκε, είχε αναπτύξει εμφανώς ένα παχύρευστο λευκό στρώμα βιομεμβράνης, με μορφή ρυτιδωμένου πολτού, η οποία κάλυπτε ολόκληρη την επιφάνεια του υγρού της ζύμωσης (Εικ.27). Στις επόμενες ώρες που παρατηρήθηκε το ίζημα βιομεμβράνης ήταν πολύ πιο παχύρευστο, με μεγάλο μέρος αυτού να έχει καταβυθιστεί στον πυθμένα της φιάλης Duran (Εικ.28).



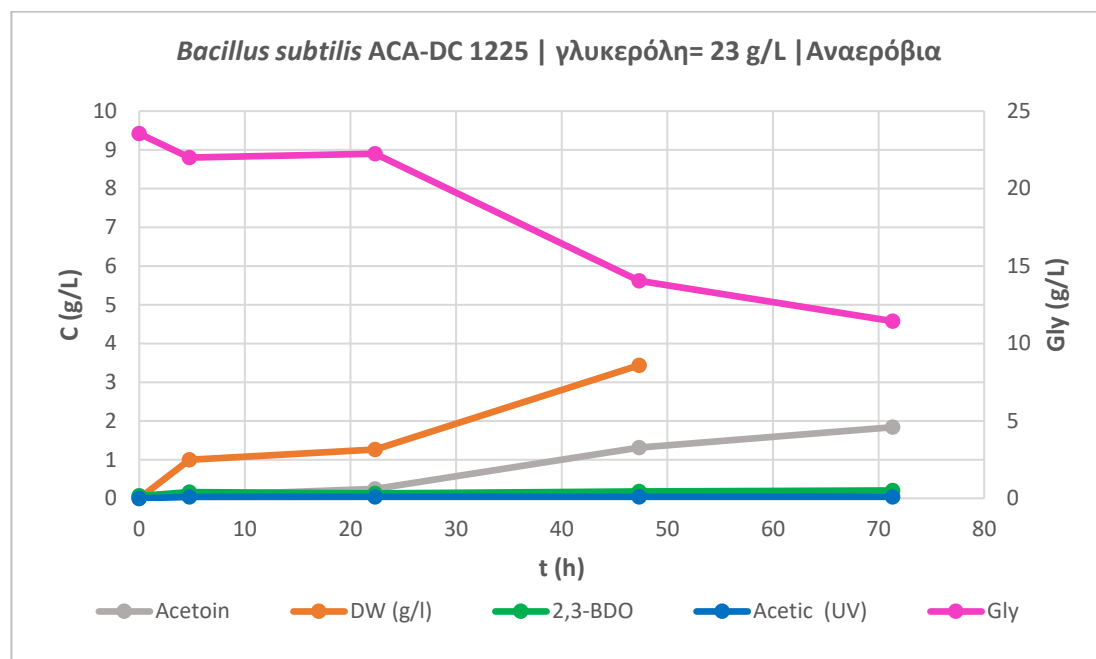
Εικόνα 27: Σχηματισμός ιζήματος βιομεμβράνης στις διεπαφές αέρος-υγρού σε καλλιέργεια του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1225 με πηγή άνθρακα καθαρή γλυκερόλη, υπό αναερόβιες συνθήκες στις σαράντα οκτώ (48) ώρες καλλιέργειας.



Εικόνα 28: Σχηματισμός πιο πυκνού ιζήματος βιομεμβράνης στις διεπαφές αέρος-υγρού σε καλλιέργεια του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1225 με πηγή άνθρακα καθαρή γλυκερόλη, υπό αναερόβιες συνθήκες στις εβδομήντα (70) ώρες καλλιέργειας.

Μετά από αρκετές φυγοκεντρίσεις σε διαφορετικές θερμοκρασίες (4 °C, 3 °C), αλλά και διαφορετικό χρόνο που έμεινε το κάθε δείγμα για να φυγοκεντρηθεί (10 λεπτά, 15 λεπτά και 20 λεπτά) κατάφερε να επιτευχθεί η διαδικασία διαχωρισμού του από το υγρό και καταβύθισης του μαζί με τα υπόλοιπα κύτταρα, σε ικανοποιητικό βαθμό, ώστε να ακολουθήσει η διαδικασία ξήρασης και υπολογισμού της βιομάζας.

Συνεπώς για να διαχωριστεί με επιτυχία το υπερκείμενο ίζημα και τα υπόλοιπα κύτταρα από το υγρό της ζύμωσης θα πρέπει να αντικατασταθεί με διαφορετικές μεθόδους, οι οποίες σύμφωνα με μελέτες που πραγματοποιήθηκαν για διαφορετικά στελέχη βακίλου, αναφέρουν τη χρήση πολλαπλών γύρων/επαναλήψεων υπερήχων (Κονάς ΑΤ & Dragoš A, 2019) ή τη χρήση οξικού οξέος μαζί με θέρμανση στους 80 ή 90 °C για περίπου 3εις ώρες ώστε να διασπαστεί το ίζημα (Rajitha K *et al.*, 2020).

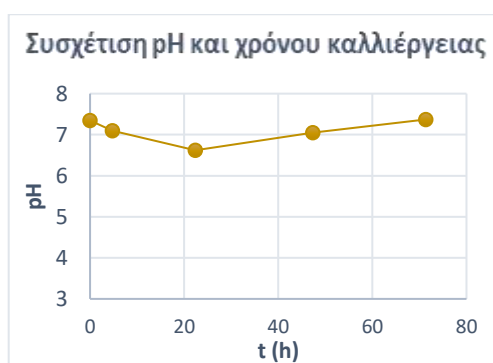


Διάγραμμα 47: Κινητική ανάπτυξης του *B. subtilis* ACA-DC 1225 σε αναερόβια καλλιέργεια με θρεπτικό μέσο γλυκερόλης 23 g/L

Στη περίπτωση της αναερόβιας καλλιέργειας του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1225, σε υπόστρωμα γλυκερόλης (Gly) καθαρότητας $\approx 99\%$, η γλυκερόλη (Gly) δεν αφομοιώθηκε πλήρως μέσα στο διάστημα των 71 ωρών ζύμωσης που εξετάστηκε, ωστόσο φαίνεται να μειώνεται, αν και με αργό ρυθμό, με $S_{\text{cons}(\text{total})} = 12,1 \text{ g/L}$ (Διαγρ.47). Η συγκέντρωση της βιομάζας (DW) απέκτησε μέγιστη τιμή 3,44 g/L στις 47 ώρες με $S_{\text{cons}(X_{\text{max}})} = 9,50 \text{ g/L}$. Επίσης στις 47 ώρες παρατηρήθηκε ανάπτυξη ιζήματος βιομεμβράνης στις διεπαφές αέρος-υγρού της ζύμωσης, το οποίο παρέμεινε μέχρι και τις 71 ώρες ζύμωσης. Η συγκέντρωση του οξικού οξέος (acetic) από τις 4εις ώρες μέχρι και τις 71 ώρες ζύμωσης μειώθηκε σημαντικά στη τιμή 2,25 g/L, από την αρχική συγκέντρωση 4,15 g/L. Από τις 22 ώρες παρατηρείται παραγωγή ακετοΐνης (acetoin) με μέγιστη συγκέντρωση 1,84 g/L στις 71 ώρες, καθώς στο διάστημα αυτό παράγεται και 2,3-βουτανοδιόλη (2,3-BDO) με αμελητέα συγκέντρωση μέχρι και τις 71 ώρες, λαμβάνοντας τη μέγιστη τιμή 0,20 g/L.

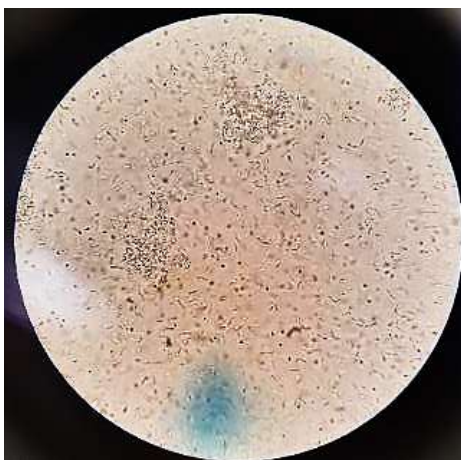
Παράλληλα σε αμελητέα συγκέντρωση παρατηρούνται γαλακτικό οξύ (lactic) και μυρμηκικό οξύ (formic).

Ο συντελεστής απόδοσης ως προς τη βιομάζα ήταν $Y\left(\frac{X}{S}\right) = 0,36 \frac{\text{g βιομάζας(max)}}{\text{g υποστώματος}}$ και ο συντελεστής απόδοσης ως προς το κύριο προϊόν ακετοΐνη ήταν $Y\left(\frac{ACTN}{S}\right) = 0,15 \frac{\text{g προϊόντος}}{\text{g υποστώματος}}$. Η παραγωγικότητα βιομάζας ($P_{(X_{max})}$) ήταν 0,07 g/L/h και της ακετοΐνης $P_{(acetoin)} = 0,03$ g/L/h.. Το pH από την αρχική τιμή 7,35 μειώθηκε ξαφνικά στις 22 ώρες ζύμωσης στη τιμή 6,62, ενώ αυξήθηκε εκ νέου κοντά στην αρχική του τιμή 7,37 στις 71 ώρες (Διαγρ.48).



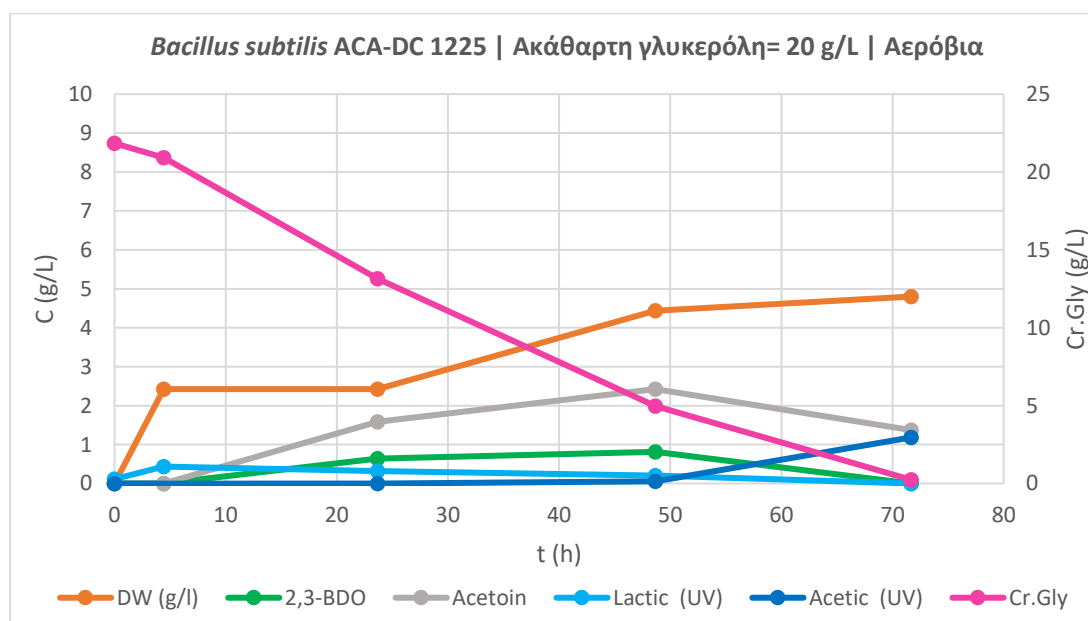
Διάγραμμα 48: Διακύμανση του pH συγκριτικά με τον χρόνο καλλιέργειας

4.2.4.6. Καλλιέργεια του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1225 σε υγρό θρεπτικό μέσο Βιομηχανικής γλυκερόλης (Cr.Gly) καθαρότητας $\approx 81\%$, υπό αερόβιες συνθήκες



Εικόνα 29: Μικροσκοπική παρατήρηση κυττάρων του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1225 σε οπτικό μικροσκόπιο (μεγέθυνσης x100).

Η ανάπτυξη των κυττάρων του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1225, στο θρεπτικό μέσο με πηγή άνθρακα, ακάθαρτη γλυκερόλη, φάνηκε πως στις έξι (6) ώρες από τον εμβολιασμό (Εικ.29), οι συνθήκες του μέσου καλλιέργειας επηρέασαν την ανάπτυξή του με αποτέλεσμα και εδώ να δημιουργηθούν συσσωματώματα κυττάρων. Η αντίδραση αυτή του μικροοργανισμού πιθανόν να προκαλείται από την οξίνιση του μέσου ανάπτυξης. Εξαιτίας της αυξημένης συγκέντρωσης του οξικού νατρίου (CH_3COONa) στα συστατικά που απαρτίζουν το θρεπτικό υπόστρωμα της καλλιέργειας, οι συνθήκες μετατρέπονται απευθείας σε όξινες και πιθανόν ο μικροοργανισμός να αντιμετώπισε δυσκολία στη προσαρμογή του με αποτέλεσμα να μεταβεί στη παραπάνω κατάσταση. Σύμφωνα με το διάγραμμα στο οποίο παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των μεταβολικών προϊόντων του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1225, η αφομοίωση της ακάθαρτης γλυκερόλης είναι γρήγορη και ενώ παρατηρούνται στο μέσο της αύξησης ορισμένα σημαντικά μεταβολικά προϊόντα, παραμένουν σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Συνεπώς ο μικροοργανισμός ενώ ανέπτυξε βιομάζα και αφομοίωσε την ακάθαρτη γλυκερόλη, δεν είχε καλή παραγωγή προϊόντων.

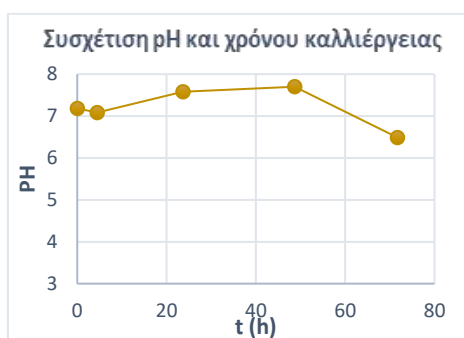


Διάγραμμα 49: Κινητική ανάπτυξης του *B. subtilis* ACA-DC 1225 σε αερόβια καλλιέργεια με θρεπτικό μέσο ακάθαρτης γλυκερόλης 20 g/L

Στην αερόβια καλλιέργεια του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1225, η ακάθαρτη γλυκερόλη (Cr.Gly) αφομοιώθηκε σχεδόν πλήρως μέχρι 71 ώρες με $S_{\text{cons}(\text{total})} = 21,6 \text{ g/L}$, συνεπώς υπήρξε μέγιστη παραγωγή βιομάζας (DW), της οποίας η συγκέντρωση αυξήθηκε εκθετικά και παρουσίασε τη μέγιστη τιμή της 4,80 g/L στις 71 ώρες (Διαγρ.49). Στις 23 ώρες σημειώθηκε για πρώτη φορά παραγωγή ακετοΐνης (acetoin), με μέγιστη τιμή 2,42 g/L στις 48 ώρες και $S_{\text{cons}(\text{ACTN})} = 16,87 \text{ g/L}$.

Επίσης παρατηρήθηκε στις 23 ώρες για πρώτη φορά 2,3-βουτανودیολη (2,3-BDO), μέχρι και τις 48 ώρες, όπου έλαβε τη μέγιστη συγκέντρωση 0,81 g/L. Το οξικό οξύ (acetic) αυξήθηκε κατά 1,18 g/L στις 71 ώρες, έναντι της αρχικής 4,42 g/L. Παράλληλα σε αμελητέα συγκέντρωση παρατηρούνται γαλακτικό οξύ (lactic) και μυρμηκικό οξύ (formic).

Ο συντελεστής απόδοσης ως προς τη βιομάζα ήταν $Y\left(\frac{X}{S}\right) = 0,22 \frac{\text{g βιομάζας(max)}}{\text{g υποστώματος}}$ και ο συντελεστής απόδοσης ως προς το κύριο προϊόν την ακετοΐνη ήταν $Y\left(\frac{ACTN}{S}\right) = 0,14 \frac{\text{g προϊόντος(max)}}{\text{g υποστώματος}}$. Η παραγωγικότητα βιομάζας ($P_{(X_{\max})}$) ήταν 0,07 g/L/h και για τη ακετοΐνη ($P_{(\text{acetoin})}$) ήταν 0,05 g/L/h. Το pH από την αρχική τιμή 7,18, σημείωσε αυξομείωση στη τιμή του με μέγιστη 7,7 στις 48 ώρες, ενώ μειώθηκε στο 6,49 στις 70 ώρες (Διαγρ.50).

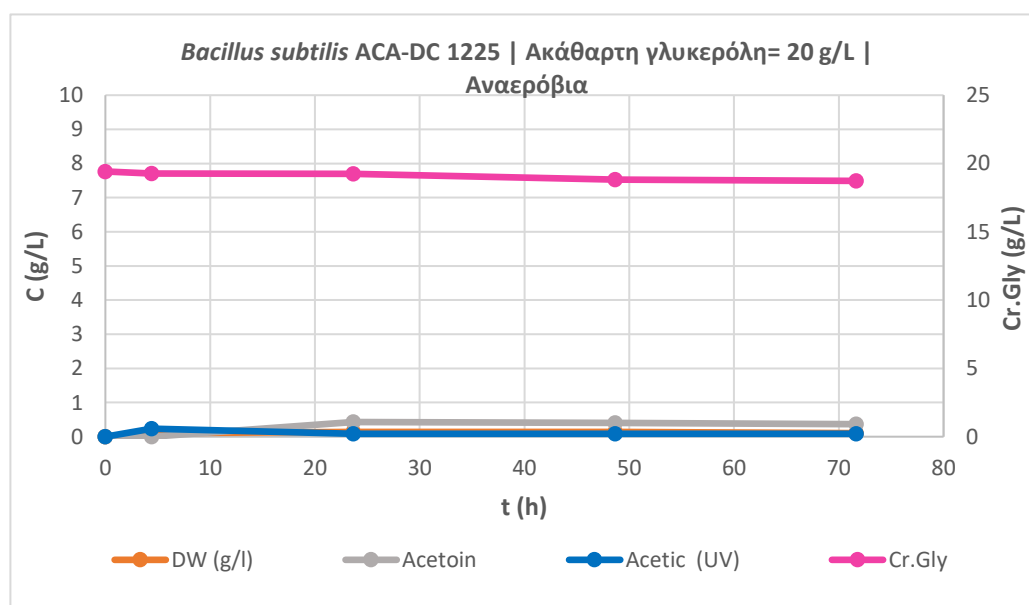


Διάγραμμα 50: Διακύμανση του pH συγκριτικά με τον χρόνο καλλιέργειας

Συμπερασματικά, συγκρίνοντας τις κινητικές ανάπτυξης του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1225 σε καλλιέργεια τόσο με καθαρή, όσο και με ακάθαρτη γλυκερόλη, συγκέντρωσης 20 g/L, υπό αερόβιες συνθήκες, φαίνεται να μην υπάρχουν σημαντικές διαφορές, ως προς την ανάπτυξη του μικροοργανισμού και την αφομοίωση της γλυκερόλης, με ελάχιστα καλύτερη αφομοίωση να παρατηρείται στη περίπτωση της καθαρής γλυκερόλης σε ποσοστό 11%. Η αύξηση της βιομάζας (DW) στη περίπτωση της καθαρής γλυκερόλης είχε καλύτερα αποτελέσματα συγκριτικά με τη χρήση της ακάθαρτης γλυκερόλης, σε ποσοστό 17%. Επίσης τα μεταβολικά προϊόντα παρουσίασαν καλύτερη αύξηση στη περίπτωση της καθαρής γλυκερόλης, με κύριο μεταβολίτη στη περίπτωση αυτή να είναι η 2,3-βουτανودیολη, ενώ παρατηρήθηκε αύξηση και άλλων μεταβολιτών, όπως το ηλεκτρικό οξύ. Στη περίπτωση χρήσης ακάθαρτης γλυκερόλης, η ακετοΐνη παρουσίασε καλύτερη αύξηση, με συγκέντρωση 2,42 g/L, συγκριτικά με τη χρήση της καθαρής γλυκερόλης, που είχε συγκέντρωση 2,03 g/L, ξεπερνώντας τη τιμή της 2,3-βουτανودیολης.

4.2.4.7. Καλλιέργεια του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1225 σε υγρό θρεπτικό μέσο Βιομηχανικής γλυκερόλης (Cr.Gly) καθαρότητας $\approx 81\%$, υπό αναερόβιες συνθήκες

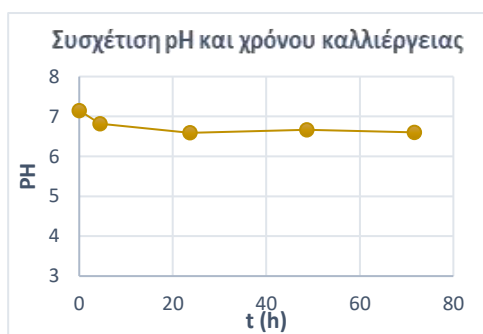
Στις αναερόβιες συνθήκες με πηγή άνθρακα την ακάθαρτη γλυκερόλη, ο *Bacillus subtilis* ACA-DC 1225, παρατηρώντας την κατάσταση των κυττάρων του σε δείγμα που λήφθηκε από την καλλιέργεια, δεν κατάφερε να αναπτυχθεί. Παρατηρήθηκαν ορισμένα μικρά διάσπαρτα συσσωματώματα στο δείγμα, ενώ και από τη διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων που παρουσιάζονται (Διαγρ.51), οι τιμές των μεταβολικών προϊόντων ήταν αμελητέας συγκέντρωσης. Ωστόσο, όπως παρατηρήθηκε στη περίπτωση της ακάθαρτης γλυκερόλης σε αερόβιες συνθήκες, δε φάνηκε να παρεμποδίζεται η αφομοίωσή της από το μικροοργανισμό, άρα οι προσμίξεις που περιέχονται δεν αποτελούν ανασταλτικό παράγοντα ανάπτυξης. Επίσης συγκριτικά με τη περίπτωση της αναερόβιας καλλιέργειας σε καθαρή γλυκερόλη, οι συνθήκες αναεροβίωσης, φάνηκαν να δυσκολεύουν τον μικροοργανισμό, ως προς την αφομοίωση της πηγής άνθρακα, αλλά και σε αυτή τη περίπτωση υπήρξε καλή παραγωγή βιομάζας (DW) και μερική αφομοίωση της γλυκερόλης. Συνεπώς, στη καλλιέργεια του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1225, υπό αναερόβιες συνθήκες και με πηγή άνθρακα ακάθαρτη γλυκερόλη, που εξετάστηκε, πιθανόν να προέκυψε πειραματικό σφάλμα, με αιτία να αποτελεί ο λανθασμένος εμβολιασμός της καλλιέργειας, με αποτέλεσμα να μην αναπτυχθεί ο μικροοργανισμός και να μην αφομοιώσει τη πηγή άνθρακα.



Διάγραμμα 51: Κινητική ανάπτυξης του *B. subtilis* ACA-DC 1225 σε αναερόβια καλλιέργεια με θρεπτικό μέσο ακάθαρτης γλυκερόλης 20 g/L

Στην αναερόβια καλλιέργεια, φαίνεται πως ο *Bacillus subtilis* ACA-DC 1225, δεν μπόρεσε να αφομοιώσει την ακάθαρτη γλυκερόλη (Cr.Gly) με $S_{\text{cons}(\text{total})} = 0,69 \text{ g/L}$, με αποτέλεσμα να παρατηρηθούν χαμηλές συγκεντρώσεις μεταβολικών προϊόντων και βιομάζας (DW) (Διαγρ.51). Από τις πρώτες 4εις ώρες, μέχρι και τις 71 ώρες που διήρκεσε η καλλιέργεια του βακτηρίου, σημειώθηκε αμελητέα παραγωγή βιομάζας (DW) με μέγιστη συγκέντρωση $0,14 \text{ g/L}$ στις 48 ώρες με $S_{\text{cons}(X_{\text{max}})} = 0,60 \text{ g/L}$, ενώ στη πορεία μειώθηκε περαιτέρω. Επίσης παρατηρείται αμελητέα αύξηση του οξικού οξέος (acetic) με μέγιστη συγκέντρωση $0,24 \text{ g/L}$ στις 4 ώρες, ξεκινώντας από αρχική συγκέντρωση $4,04 \text{ g/L}$ ($t=0$). Παράλληλα χαμηλές συγκεντρώσεις παρατηρούνται για το ηλεκτρικό οξύ (succinic), την ακετοΐνη (acetoin), το γαλακτικό οξύ (lactic) και το μυρμηκικό οξύ (formic).

Ο συντελεστής απόδοσης ως προς τη βιομάζα ήταν $Y\left(\frac{X}{S}\right) = 0,23 \frac{\text{g βιομάζας(max)}}{\text{g υποστώματος}}$. Το pH από την αρχική τιμή 7,15 δεν παρουσίασε σημαντική μεταβολή μέχρι και τις 71 ώρες ζύμωσης, όπου παρέμεινε σχετικά σταθερό με τιμή να μειώνεται ελάχιστα στο 6,6 (Διαγρ.52).



Διάγραμμα 52: Διακύμανση του pH συγκριτικά με τον χρόνο καλλιέργειας

4.2.5. Καλλιέργεια του *Lactobacillus brevis* ACA-DC 1716

Παρακάτω παρουσιάζονται όλες οι συνθήκες καλλιέργειας που αξιολογήθηκαν για τον *Lactobacillus brevis* ACA-DC 1716, στα παρακάτω πειράματα συνολικά, αναφέροντας όλων των ειδών τις πηγές άνθρακα που χρησιμοποιήθηκαν, μαζί με τις συγκεντρώσεις τους (Πίν.6).

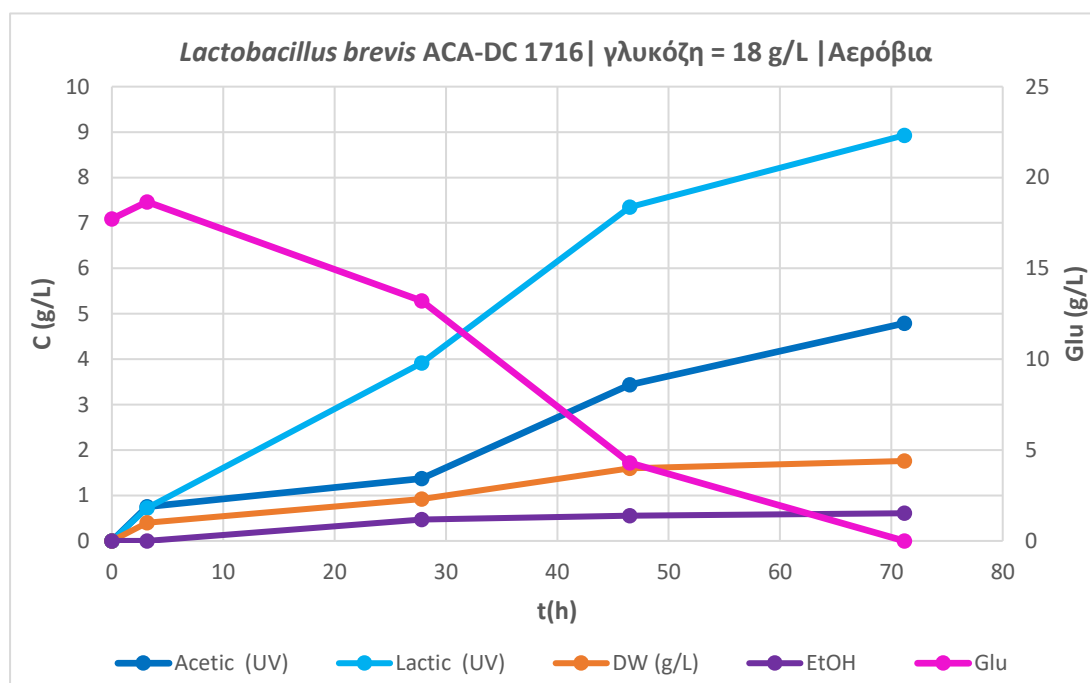
Πίνακας 6: Συνθήκες καλλιέργειας *Lactobacillus brevis* ACA-DC 1716

<i>Lactobacillus brevis</i> ACA-DC 1716		
Πηγή Άνθρακα	<ol style="list-style-type: none"> 1. Γλυκόζη (Glu) 2. Γλυκερόλη (Gly) καθαρότητας $\approx 99\%$ 3. Συν-υπόστρωμα γλυκόζης (Glu) + γλυκερόλης (Gly), 1:2 4. Βιομηχανική γλυκερόλη (Cr.Gly) καθαρότητας $\approx 81\%$ 	
Συνθήκες Καλλιέργειας	<ul style="list-style-type: none"> ○ Αερόβιες – Κωνικές φιάλες με 180 rpm (υψηλό O₂) ○ Αναερόβιες – Φιάλες Duran με 100 rpm (χαμηλό O₂) ○ Θερμοκρασία επώασης 30 °C ○ Χωρίς ρύθμιση pH 	
Συγκέντρωση Πηγής Άνθρακα	<ul style="list-style-type: none"> • Γλυκόζη (Glu) • Γλυκερόλη (Gly) • Βιομηχανική γλυκερόλη (Cr.Gly) 	20±3 g/L
	<ul style="list-style-type: none"> • Συν-υπόστρωμα γλυκόζης (Glu) + γλυκερόλης (Gly) 	20±3 g/L (1:2)

4.2.5.1. Καλλιέργεια του *Lactobacillus brevis* ACA-DC 1716 σε υγρό θρεπτικό μέσο γλυκόζης (Glu), υπό αερόβιες συνθήκες



Εικόνα 30: Μικροσκοπική παρατήρηση κυττάρων του *Lactobacillus brevis* ACA-DC 1716 σε οπτικό μικροσκόπιο (μεγέθυνσης x100)

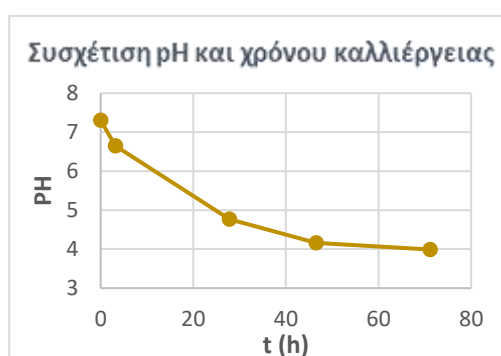


Διάγραμμα 53: Κινητική ανάπτυξης του *L. brevis* ACA-DC 1716 σε αερόβια καλλιέργεια με θρεπτικό μέσο γλυκόζης 18 g/L

Στη περίπτωση της αερόβιας καλλιέργειας του *Lactobacillus brevis* ACA-DC 1716 σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα γλυκόζη (Glu), φαίνεται πως την αφομοιώνει πλήρως πριν τις 71 ώρες που ολοκληρώνεται η ζύμωση και ακολούθως στο διάστημα αυτό παρατηρείται η μέγιστη συγκέντρωση μεταβολικών προϊόντων αλλά και βιομάζας (DW) (Διαγρ.53).

Η βιομάζα (DW) παρουσίασε μικρή αύξηση στη συγκέντρωσή της, με μέγιστη τιμή 1,76 g/L στις 71 ώρες. Από τις πρώτες 3εις ώρες ζύμωσης παρατηρήθηκε αύξηση στη συγκέντρωση οξικού (acetic) με 4,8 g/L, από την αρχική τιμή 4,05 g/L και γαλακτικού οξέος (lactic) με μέγιστη συγκέντρωση 8,93 g/L στις 71 ώρες ζύμωσης. Παράλληλα σημειώθηκαν σε αμελητέες συγκεντρώσεις αιθανόλη (ethanol) και μυρμηκικό οξύ (formic).

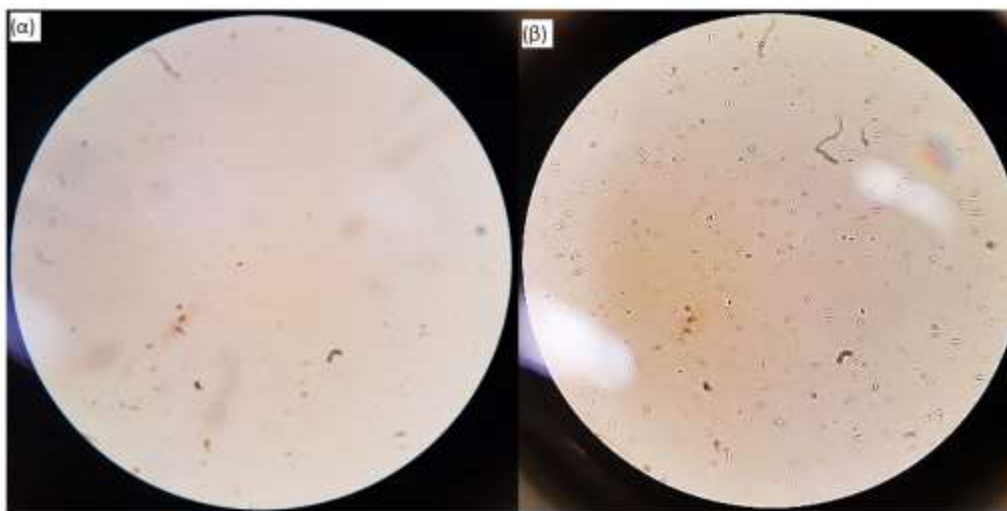
Ο συντελεστής απόδοσης ως προς τη βιομάζα ήταν $Y\left(\frac{X}{S}\right) = 0,09 \frac{\text{g βιομάζας(max)}}{\text{g υποστώματος}}$ και η παραγωγικότητα βιομάζας ($P_{(X_{\max})}$) ήταν 0,02 g/L/h. Το pH από την αρχική τιμή 7,3 μειώθηκε μετά από 71 ώρες στο 3,9 (Διαγρ.54).



Διάγραμμα 54: Διακύμανση του pH συγκριτικά με τον χρόνο καλλιέργειας

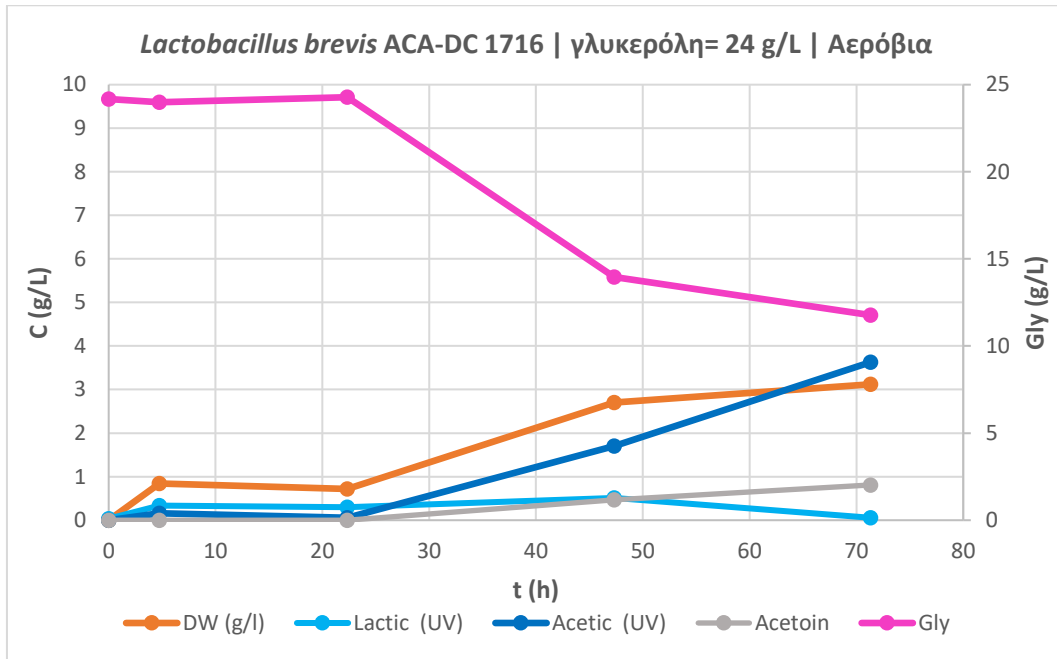
Συμπερασματικά ο *Lactobacillus brevis* ACA-DC 1716 χρειάστηκε 24 ώρες επιπλέον να επωαστεί στο υπόστρωμα της προκαλλιέργειας, ώστε να φτάσει σε εκθετική φάση, συγκριτικά με τα υπόλοιπα βακτηριακά στελέχη πριν εμβολιαστεί στο υπόστρωμα της καλλιέργειας με πηγή άνθρακα γλυκόζη. Ο μικροοργανισμός, ενώ αφομοίωσε πλήρως τη γλυκόζη σε συνθήκες αεροβίωσης, δε φάνηκε να έχει σημαντική αύξηση στις συγκεντρώσεις των υπόλοιπων μεταβολιτών. Αξιοσημείωτη, ωστόσο, χαρακτηρίζεται η μεγάλη συγκέντρωση του γαλακτικού που είναι ο κύριος μεταβολίτης όλων των γαλακτικών βακτηρίων. Ειδικότερα, η παραγωγή μείγματος μεταβολιτών όπως γαλακτικό οξύ, αιθανόλη, οξικό οξύ που παρατηρήθηκαν μαζί με τη παραγωγή CO₂, είναι χαρακτηριστικά μεταβολικά προϊόντα κατά τη ζύμωση εξοζών, ταξινομώντας τον *Lactobacillus brevis* ως ετεροζυμωτικό γαλακτικό βακτήριο.

4.2.5.2. Καλλιέργεια του *Lactobacillus brevis* ACA-DC 1716 σε υγρό θρεπτικό μέσο γλυκερόλης (Gly) καθαρότητας $\approx 99\%$, υπό αερόβιες συνθήκες



Εικόνα 31: (α) Μικροσκοπική παρατήρηση κυττάρων του *Lactobacillus brevis* ACA-DC 1716 σε οπτικό μικροσκόπιο (μεγέθυνσης x100) στις έξι (6) ώρες από τον εμβολιασμό της καλλιέργειας. (β) Μικροσκοπική παρατήρηση κυττάρων του *Lactobacillus brevis* ACA-DC 1716 σε οπτικό μικροσκόπιο (μεγέθυνσης x100) στις είκοσι τέσσερις (24) ώρες από τον εμβολιασμό της καλλιέργειας.

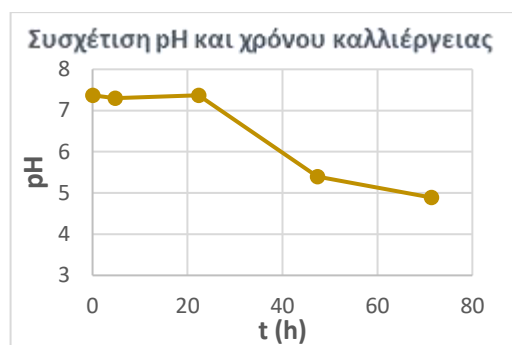
Ο *Lactobacillus brevis* ACA-DC 1716 φαίνεται να καθυστερεί να αναπτυχθεί στις έξι (6) ώρες από τον εμβολιασμό του σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα καθαρή γλυκερόλη και υπό αερόβιες συνθήκες, ενώ ύστερα από 24 ώρες ανάπτυξης παρατηρείται αύξηση των κυττάρων του (Εικ.31). Το συγκεκριμένο βακτηριακό στέλεχος παρουσιάζει αργή ανάπτυξη, γεγονός που φανερώνεται και από τη διάρκεια επώασής του στη προκαλλιέργεια για να φτάσει σε εκθετική φάση (αντί για 24 ώρες χρειάστηκε 48 ώρες επώασης), αλλά και από τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από την HPLC ως προς την αφομοίωση της πηγής άνθρακα και την αύξηση μεταβολιτών και βιομάζας.



Διάγραμμα 5: Κινητική ανάπτυξης του *L. brevis* ACA-DC 1716 σε αερόβια καλλιέργεια με θρεπτικό μέσο γλυκερόλης 24 g/L

Στη περίπτωση της αερόβιας καλλιέργειας του *Lactobacillus brevis* ACA-DC 1716 σε υπόστρωμα καθαρής γλυκερόλης (Gly), εκείνη δεν καταναλώθηκε πλήρως, ξεκινώντας να αφομοιώνεται από το βακτήριο στις 22 ώρες ζύμωσης αποκτώντας $S_{\text{cons}(\text{total})} = 12,4 \text{ g/L}$ στις 71 ώρες ζύμωσης (Διαγρ.55). Η βιομάζα (DW) στις 47 ώρες, όπου παρατηρείται ταχύτερη αφομοίωση της γλυκερόλης (Gly), παρουσιάζει αύξηση, με τη μέγιστη τιμή της να είναι 3,12 g/L, στις 71 ώρες και $S_{\text{cons}(X_{\text{max}})} = 10,22 \text{ g/L}$. Το οξικό (acetic) παρουσιάζει αύξηση στις 47 ώρες, και συνεχίζει να αυξάνεται εκθετικά μέχρι και τις 71 ώρες ζύμωσης, με μέγιστη συγκέντρωση 3,63 g/L από την αρχική τιμή 4,17 g/L. Επίσης φαίνεται να σχηματίζεται για πρώτη φορά στις 47 ώρες, ακετοΐνη (acetoin), με πολύ χαμηλή συγκέντρωση, όπου και η γλυκερόλη (Gly) ξεκινά να αφομοιώνεται ταχύτερα, αποκτώντας τη μέγιστη τιμή 0,81 g/L στις 71 ώρες. Παράλληλα σημειώθηκαν σε αμελητέες συγκεντρώσεις γαλακτικό οξύ (lactic) και μυρμηκικό οξύ (formic).

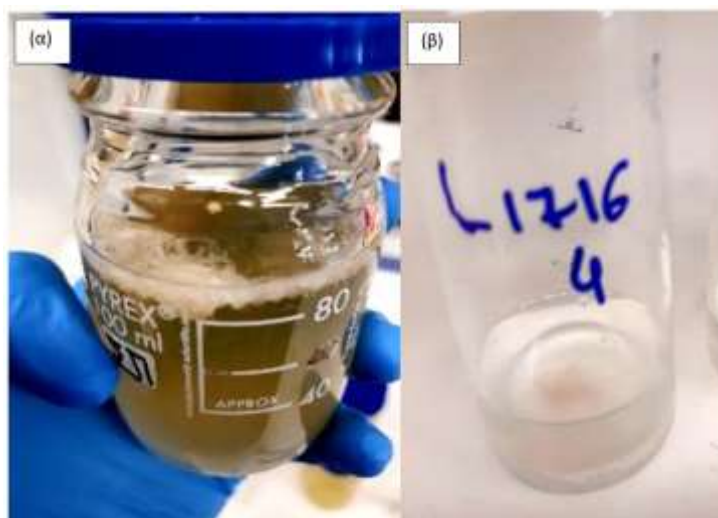
Ο συντελεστής απόδοσης ως προς τη βιομάζα ήταν $Y\left(\frac{X}{S}\right) = 0,25 \frac{\text{g βιομάζας}(\text{max})}{\text{g υποστώματος}}$ και η παραγωγικότητα βιομάζας ($P_{(X_{\text{max}})}$) ήταν 0,04 g/L/h. Το pH από την αρχική τιμή 7,37 παρέμεινε σταθερό μέχρι και τις 22 ώρες, ενώ μειώθηκε στο 4,89 μετά από 70 ώρες (Διαγρ.56).



Διάγραμμα 6: Διακύμανση του pH συγκριτικά με τον χρόνο καλλιέργειας

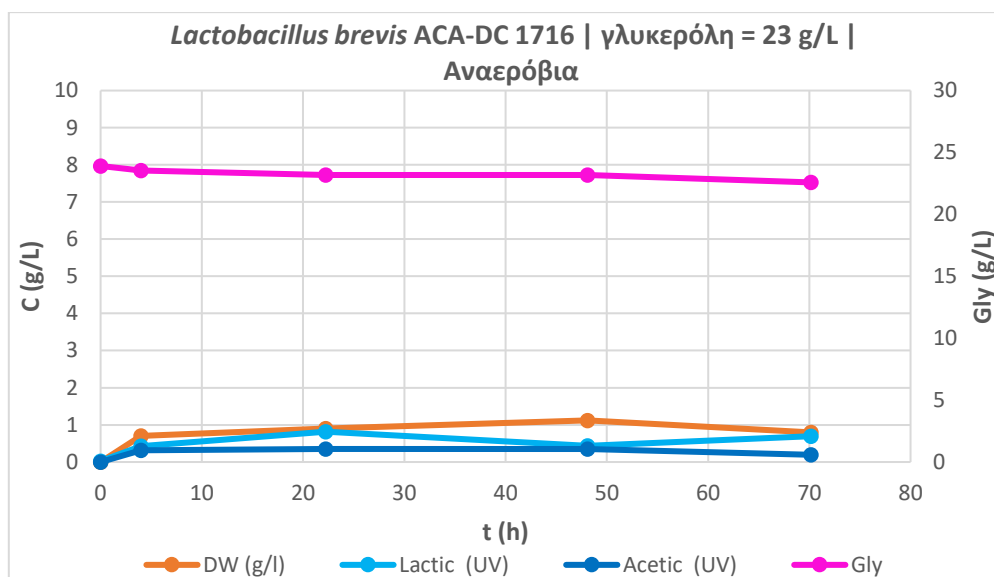
Συμπερασματικά, παρατηρώντας την κινητική ανάπτυξης του *Lactobacillus brevis* ACA-DC 1716 σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα καθαρή γλυκερόλη, φαίνεται πως ο ρυθμός αφομοίωσης της γλυκερόλης μειώθηκε σε ποσοστό 19% από τις 47 μέχρι τις 70 ώρες ζύμωσης. Στο διάστημα μεταξύ 20 και 47 ωρών σημειώνεται απότομη μείωση του pH από τη τιμή 7,37 στη τιμή 5,4, ενώ μειώνεται περαιτέρω στη τιμή 4,8 μέχρι τις 70 ώρες, γεγονός που μπορεί να προκαλεί και τη μείωση του ρυθμού αφομοίωσης της πηγής άνθρακα. Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί πως στη περίπτωση της καλλιέργειας του μικροοργανισμού σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα γλυκόζη, η μείωση του pH, η οποία έφτασε μέχρι τη τιμή 3,9, δε φάνηκε να επηρεάζει το ρυθμό αφομοίωσής της, το οποίο μπορεί να οφείλεται τόσο στην ίδια τη πηγή άνθρακα, όσο στη σταδιακή μείωση του pH, η οποία ξεκίνησε από τις πρώτες 4 με 5 ώρες ζύμωσης. Η σταδιακή αυτή μείωση, ενδεχομένως να βοήθησε το μικροοργανισμό να προσαρμοστεί στην αλλαγή των συνθηκών του μέσου αύξησης, εν αντιθέσει με τη περίπτωση χρήσης της καθαρής γλυκερόλης.

4.2.5.3. Καλλιέργεια του *Lactobacillus brevis* ACA-DC 1716 σε υγρό θρεπτικό μέσο γλυκερόλης (Gly) καθαρότητας $\approx 99\%$, υπό αναερόβιες συνθήκες



Εικόνα 32: (α) Ανάπτυξη ιζήματος βιομεμβράνης στα τοιχώματα του δοχείου Duran όταν εξετάστηκε στις σαράντα οκτώ (48) ώρες. (β) McCartney που περιέχει τη βιομάζα ύστερα από φυγοκέντριση του δείγματος, όπου το ίζημα που είχε σχηματιστεί δεν κατάφερε να διασπαστεί, με αποτέλεσμα να προκύπτει ένα ανομοιογενές υγρό.

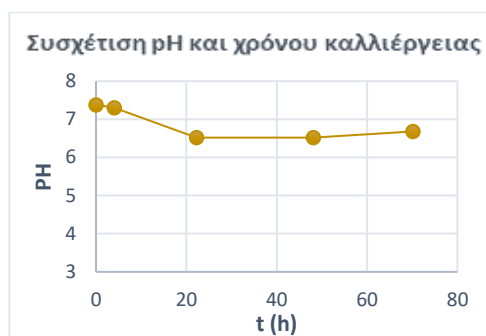
Συγκριτικά με τη περίπτωση της Αερόβιας καλλιέργειας στο ίδιο θρεπτικό υπόστρωμα, οι συνθήκες αναεροβίωσης δεν ευνόησαν τον μικροοργανισμό να αναπτυχθεί. Ύστερα από σαράντα οκτώ (48) περίπου ώρες ο μικροοργανισμός ανέπτυξε στη διεπιφάνεια αέρος-υγρού ένα λευκό συμπαγές ίζημα βιομεμβράνης (Εικ.32(α)). Όταν χρειάστηκε να ληφθεί δείγμα για μέτρηση βιομάζας, το περιεχόμενο του δοχείου Duran διαχωρίστηκε ισόποσα σε δύο Falcons των 100 ml και οδηγήθηκε προς φυγοκέντριση. Το ίζημα διαχωρίστηκε ικανοποιητικά, ύστερα από δύο φυγοκεντρίσεις, από το υπερκείμενο υγρό, οδηγώντας τα Falcons για τρίτη φυγοκέντριση, ώστε να ξεπλυθεί η βιομάζα που είχε μείνει στον πυθμένα και να μεταφερθεί σε προ-ζυγισμένο McCartney (Εικ.32(β)). Από το διάγραμμα παρατηρείται αδυναμία του μικροοργανισμού να καταναλώσει υπό αναερόβιες συνθήκες τη γλυκερόλη, και ως συνέπεια δεν παρήγαγε ικανοποιητικές συγκεντρώσεις μεταβολικών προϊόντων.



Διάγραμμα 57: Κινητική ανάπτυξης του *L. brevis* ACA-DC 1716 σε αναερόβια καλλιέργεια με θρεπτικό μέσο γλυκερόλης 23 g/L

Ο *Lactobacillus brevis* ACA-DC 1716 στην αναερόβια καλλιέργεια των 70 ωρών και σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα γλυκερόλη (Gly), δεν αναπτύχθηκε ικανοποιητικά, καθώς η πηγή άνθρακα δεν αφομοιώθηκε πλήρως, με $S_{\text{cons}(\text{total})} = 1,33 \text{ g/L}$ (Διαγρ.57). Η βιομάζα (DW) δε φάνηκε να είχε ιδιαίτερη αύξηση, με τη μέγιστη τιμή της να είναι $1,12 \text{ g/L}$ στις 48 ώρες και $S_{\text{cons}(X_{\text{max}})} = 0,74 \text{ g/L}$, ενώ από τη στιγμή εκείνη και μέχρι τις 70 ώρες μειώθηκε. Αμελητέα αύξηση παρουσιάστηκε στο οξικό οξύ (acetic) στις 22 ώρες αποκτώντας μέγιστη συγκέντρωση $0,35 \text{ g/L}$ από την αρχική τιμή 4 g/L και στη συνέχεια μειώθηκε μέχρι τις 70 ώρες με μικρή αυξομείωση στη τιμή του. Παράλληλα σημειώθηκαν σε αμελητέες συγκεντρώσεις γαλακτικό οξύ (lactic) και μυρμηκικό οξύ (formic).

Ο συντελεστής απόδοσης ως προς τη βιομάζα ήταν $Y\left(\frac{X}{S}\right) = 1,51 \frac{\text{g βιομάζας}(\text{max})}{\text{g υποστρώματος}}$ και η παραγωγικότητα βιομάζας ($P_{(X_{\text{max}})}$) ήταν $0,02 \text{ g/L/h}$. Το pH από την αρχική τιμή $7,38$ μειώθηκε στη τιμή $6,52$ στις 22 ώρες, όπου και παρέμεινε μέχρι και τις 48 ώρες, ενώ μια μικρή αύξηση με τιμή $6,68$ παρουσίασε στις 70 ώρες (Διαγρ.58).



Διάγραμμα 58: Διακύμανση του pH συγκριτικά με τον χρόνο καλλιέργειας

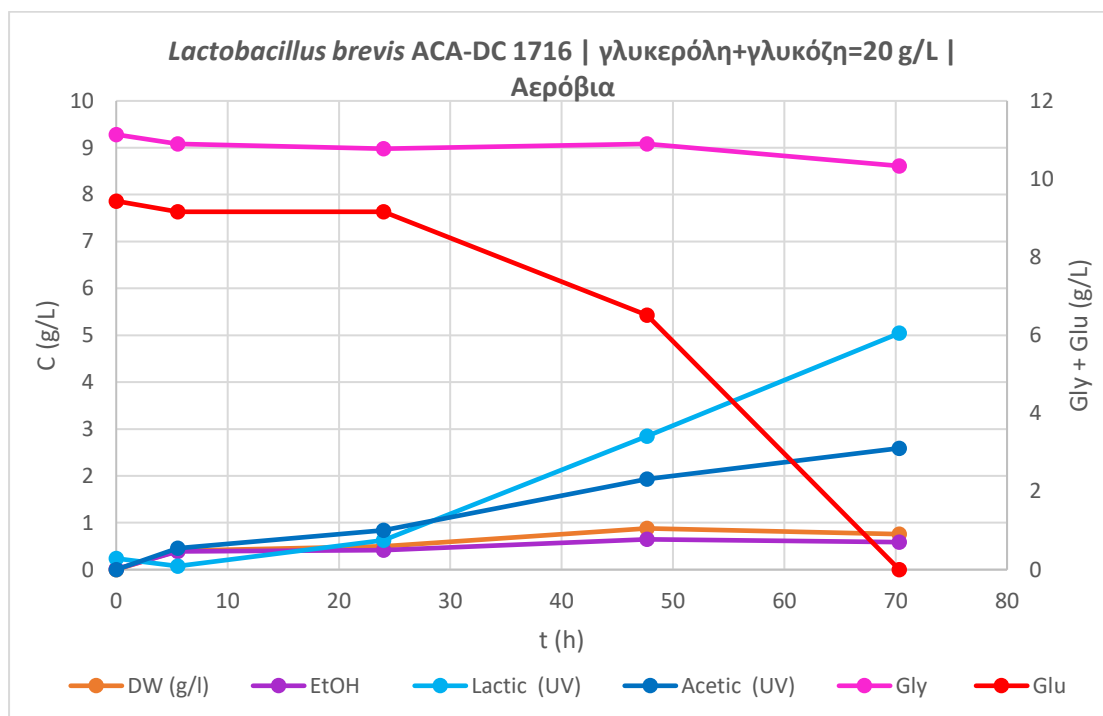
4.2.5.4. Καλλιέργεια του *Lactobacillus brevis* ACA-DC 1716 σε υγρό θρεπτικό συν-υπόστρωμα γλυκόζης (Glu) και γλυκερόλης (Gly)-καθαρότητας $\approx 99\%$, συνολικής συγκέντρωσης 20 ± 3 g/L (1/2), υπό αερόβιες συνθήκες



Εικόνα 33: Μικροσκοπική παρατήρηση κυττάρων του *Lactobacillus brevis* ACA-DC 1716 σε οπτικό μικροσκόπιο (μεγέθυνσης x100)

Η καλλιέργεια του *Lactobacillus brevis* ACA-DC 1716 στις είκοσι τέσσερις (24) ώρες περίπου της ζύμωσης, φαίνεται να μην έχει αναπτυχθεί όπως αναμενόταν, σχηματίζοντας μικρού μεγέθους συσσωματώματα κυττάρων (Εικ.33). Η δημιουργία συσσωματωμάτων, δεν είχε παρατηρηθεί ξανά για τον *Lactobacillus brevis* ACA-DC 1716 σε αερόβιες συνθήκες ανάπτυξης και η μετάβαση στη συγκεκριμένη κατάσταση πιθανόν να οφείλεται στη συνύπαρξη των δύο πηγών άνθρακα στο ίδιο θρεπτικό μέσο, με αποτέλεσμα να δρουν παρεμποδιστικά στην ανάπτυξή του. Ο μικροοργανισμός καθυστερεί να αφομοιώσει τη γλυκόζη, και σε όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας δεν αναπτύχθηκε ικανοποιητικά (Διαγρ.59).

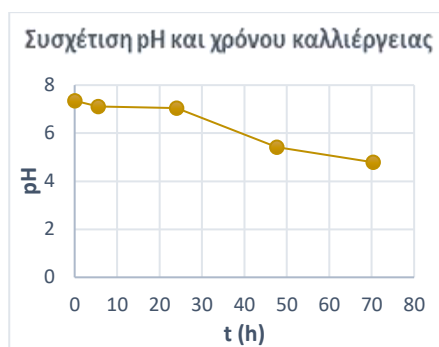
Συνεπώς η κατάσταση που παρατηρείται στο μικροσκόπιο συνάδει με τη γενικότερη εικόνα ανάπτυξης του μικροοργανισμού στο μέσο με συν-υπόστρωμα γλυκερόλης και γλυκόζης.



Διάγραμμα 59: Κινητική ανάπτυξης του *L. brevis* ACA-DC 1716 σε αερόβια καλλιέργεια με θρεπτικό μέσο γλυκερόλης και γλυκόζης 20 g/L (1/2)

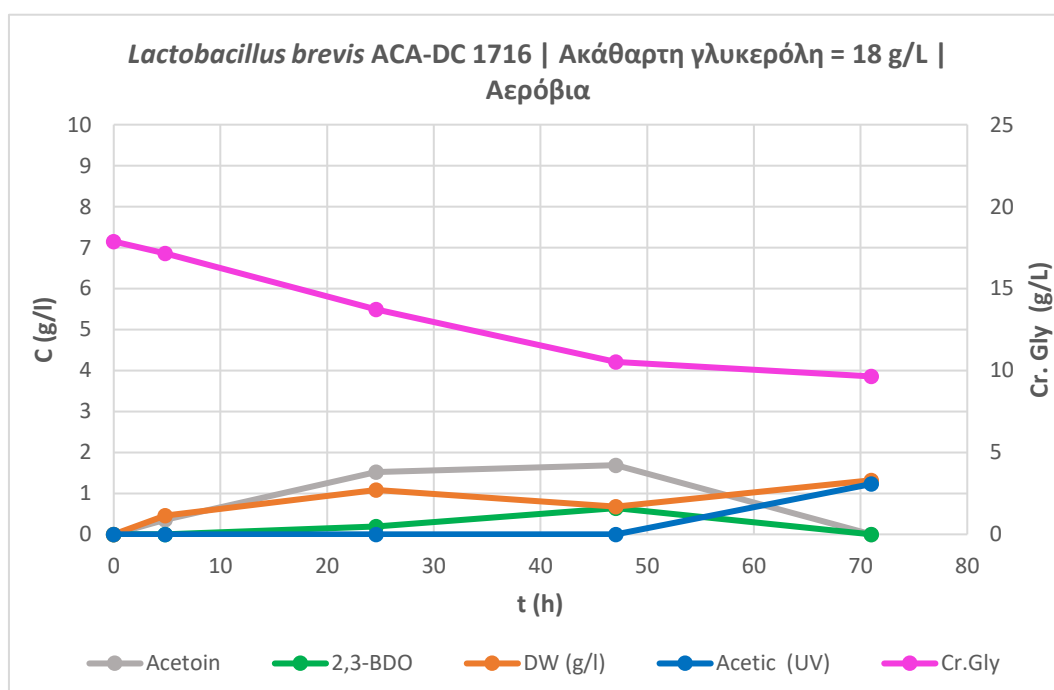
Στις αερόβιες συνθήκες, όπου επανακαλλιεργήθηκε ο *Lactobacillus brevis* ACA-DC 1716, σε συν-υπόστρωμα γλυκερόλης (Gly) 10 ± 1 g/L και γλυκόζης (Glu) 10 ± 1 g/L και σε χρονικό διάστημα 70 ωρών ζύμωσης, υπήρξε πλήρης αφομοίωση της γλυκόζης πριν τις 70 ώρες ζύμωσης, ενώ η γλυκερόλη δεν αφομοιώθηκε με $S_{\text{cons}(\text{total})} = 0,8$ g/L στις 70 ώρες ζύμωσης. Στο διάστημα αυτό η μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας (DW) ήταν 0,88 g/L στις 47 ώρες με $S_{\text{cons}(X_{\text{max}})} = 2,92$ g/L γλυκόζης. Παράλληλα σημειώνονται παραγωγή γαλακτικού οξέος (lactic) με μέγιστη συγκέντρωση 5,04 g/L στις 70 ώρες και οξικού οξέος (acetic) με μέγιστη αύξηση 2,59 g/L στις 70 ώρες, από την αρχική 4 g/L. Τέλος παρατηρήθηκαν σε αμελητέες συγκεντρώσεις αιθανόλη (ethanol) και μυρμηκικό οξύ (formic).

Ο συντελεστής απόδοσης της βιομάζας, ως προς τη κατανάλωση της γλυκόζης ήταν $Y \left(\frac{X}{S} \right) = 0,30 \frac{\text{g βιομάζας}(\text{max})}{\text{g υποστώματος}}$ και η παραγωγικότητα βιομάζας ($P_{(X_{\text{max}})}$) ήταν 0,02 g/L/h. Η τιμή του pH από την αρχική τιμή 7,35 μειώθηκε φτάνοντας τη τιμή 4,79 στις 70 ώρες καλλιέργειας (Διαγρ.60).



Διάγραμμα 60: Διακύμανση του pH συγκριτικά με τον χρόνο καλλιέργειας

4.2.5.5. Καλλιέργεια του *Lactobacillus brevis* ACA-DC 1716 σε υγρό θρεπτικό μέσο Βιομηχανικής γλυκερόλης (Cr.Gly) καθαρότητας $\approx 81\%$, υπό αερόβιες συνθήκες



Διάγραμμα 61: Κινητική ανάπτυξης του *L. brevis* ACA-DC 1716 σε αερόβια καλλιέργεια με θρεπτικό μέσο ακάθαρτης γλυκερόλης 18 g/L

Στη περίπτωση αερόβιας ανάπτυξης του *Lactobacillus brevis* ACA-DC 1716 σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα ακάθαρτη γλυκερόλη (Cr.Gly), δεν αφομοιώθηκε πλήρως η πηγή άνθρακα μέχρι και το τέλος των 71 ωρών ζύμωσης με $S_{\text{cons}(\text{total})} = 8,23 \text{ g/L}$ (Διαγρ.61). Στο διάστημα αυτό φαίνεται η μέγιστη παραγωγή βιομάζας (DW) 1,32 g/L στις 71 ώρες.

Επίσης παρατηρούνται παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης (2,3-BDO) μέγιστης συγκέντρωσης 0,64 g/L με $S_{\text{cons}(2,3\text{-BDO})} = 7,35$ g/L στις 47 ώρες και μέγιστη συγκέντρωση ακετοΐνης (acetoin) 1,69 g/L στις 47 ώρες ζύμωσης. Το οξικό οξύ (acetic) αυξήθηκε κατά 1,22 g/L στις 71 ώρες από την αρχική του τιμή 4,16 g/L. Παράλληλα σημειώθηκαν σε αμελητέα συγκέντρωση αιθανόλη (ethanol), γαλακτικό οξύ (lactic) και μυρμηκικό οξύ (formic).

Ο συντελεστής απόδοσης ως προς τη βιομάζα ήταν $Y\left(\frac{X}{S}\right) = 0,16 \frac{\text{g βιομάζας(max)}}{\text{g υποστώματος}}$ και ο συντελεστής απόδοσης ως προς το κύριο προϊόν ακετοΐνη ήταν $Y\left(\frac{ACTN}{S}\right) = 0,23 \frac{\text{g προϊόντος(max)}}{\text{g υποστώματος}}$. Η παραγωγικότητα βιομάζας ($P_{(X_{\text{max}})}$) ήταν 0,02 g/L/h και για την ακετοΐνη ($P_{(\text{acetoin})}$) ήταν 0,04 g/L/h. Το pH από την αρχική τιμή 7,2 έμεινε σχετικά σταθερό μέχρι και τις 47 ώρες, ενώ μειώθηκε ξαφνικά στη τιμή 5,44 στις 70 ώρες καλλιέργειας (Διαγρ.62).



Διάγραμμα 62: Διακύμανση του pH συγκριτικά με τον χρόνο καλλιέργειας

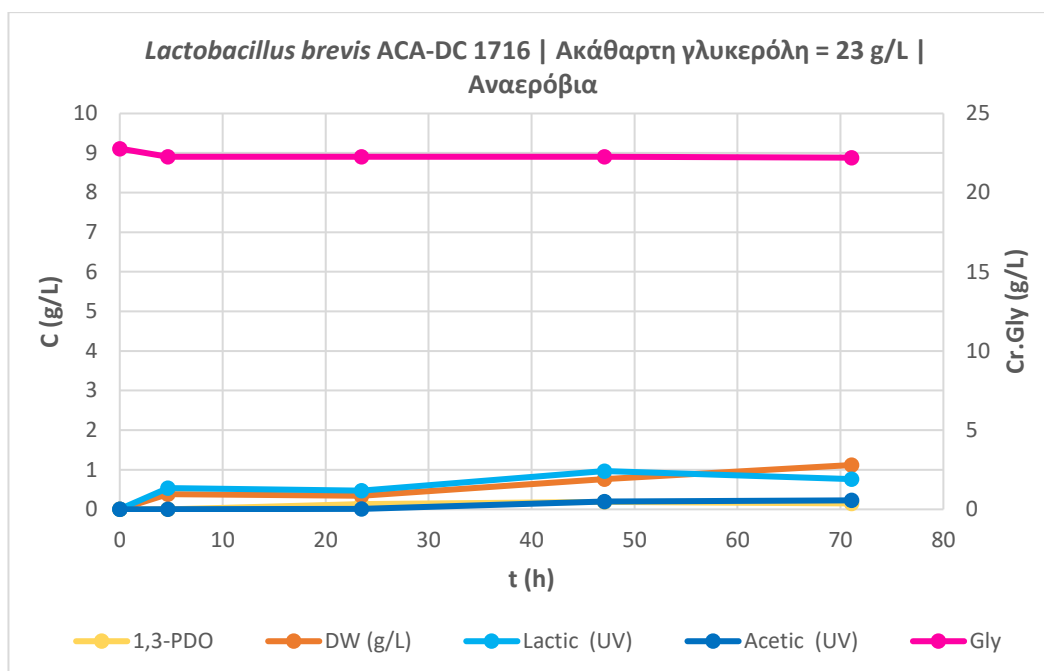
Συμπερασματικά, η ανάπτυξη του *Lactobacillus brevis* ACA-DC 1716 σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα ακάθαρτη γλυκερόλη και υπό αερόβιες συνθήκες, η αφομοίωση της ακάθαρτης γλυκερόλης ξεκίνησε ήδη από τις 5 ώρες από τον εμβολιασμό της καλλιέργειας και συνεχίστηκε μέχρι και τις 70 ώρες με σταδιακή μείωση. Συγκριτικά με τη περίπτωση αερόβιας καλλιέργειας με πηγή άνθρακα καθαρή γλυκερόλη η αφομοίωση της ακάθαρτης διαφοροποιήθηκε σε ποσοστό 34%. Τα μεταβολικά προϊόντα της ανάπτυξης του *Lactobacillus brevis* ACA-DC 1716 στη περίπτωση της ακάθαρτης γλυκερόλης, αυξήθηκαν ποιοτικά και ποσοτικά συγκριτικά με τη περίπτωση της καθαρής γλυκερόλης, καθώς στο μέσο παρουσιάστηκε παραγωγή ακετοΐνης σε μεγαλύτερη συγκέντρωση που μέρος της μετατράπηκε από τις 24 μέχρι και 48 ώρες σε 2,3-βουτανοδιόλη. Επίσης παρατηρήθηκε και παραγωγή αιθανόλης. Σε μικρότερες, ωστόσο, συγκεντρώσεις καταγράφηκε η τιμή του οξικού και της βιομάζας.

4.2.5.6. Καλλιέργεια του *Lactobacillus brevis* ACA-DC 1716 σε υγρό θρεπτικό μέσο Βιομηχανικής γλυκερόλης (Cr.Gly) καθαρότητας $\approx 81\%$, υπό αναερόβιες συνθήκες



Εικόνα 34: Ανάπτυξη ιζήματος βιομεμβράνης στα τοιχώματα της φιάλης Duran όταν εξετάστηκε στις είκοσι τέσσερις (24) ώρες από τον εμβολιασμό.

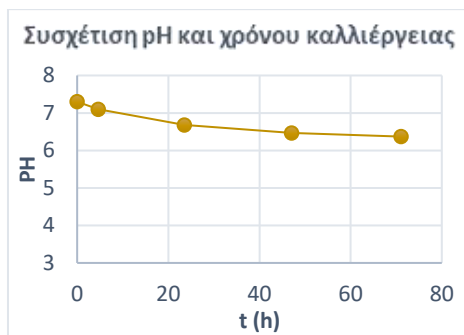
Το συγκεκριμένο στέλεχος, εξετάστηκε υπό αναερόβιες συνθήκες, σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα ακάθαρτη γλυκερόλη ($\approx 81\%$), όπου σε αυτή τη περίπτωση δυσκολεύτηκε να αναπτυχθεί. Ύστερα από παρατήρησή του στο οπτικό μικροσκόπιο στις έξι (6) ώρες από τον εμβολιασμό δεν είχε παρουσιάσει καλή ανάπτυξη, ενώ στις είκοσι τέσσερις (24) ώρες, φάνηκε να δημιουργεί, ένα, όχι τόσο διακριτό, λευκό σύννεφο στην επιφάνεια του υγρού, προσκολλημένο στα τοιχώματα της φιάλης Duran (Εικ.34). Από τα αποτελέσματα της ανάλυσης της HPLC που καταγράφονται στο διάγραμμα, δεν παρατηρήθηκε αφομοίωση της ακάθαρτης γλυκερόλης, ενώ η μείωσή της στο χρονικό σημείο των 24^{ωv} ωρών πιθανόν να οφείλεται σε σφάλμα μέτρησης της HPLC. Επίσης οι τιμές των μεταβολικών προϊόντων αλλά και η παραγωγή βιομάζας ήταν αμελητέας συγκέντρωσης.



Διάγραμμα 63: Κινητική ανάπτυξης του *L. brevis* ACA-DC 1716 σε αναερόβια καλλιέργεια με θρεπτικό μέσο ακάθαρτης γλυκερόλης 23 g/L

Στη περίπτωση αναερόβιας ανάπτυξης του *Lactobacillus brevis* ACA-DC 1716 σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα ακάθαρτη γλυκερόλη (Cr.Gly), δεν αφομοιώθηκε πλήρως η πηγή άνθρακα μέχρι και το τέλος των 71 ωρών ζύμωσης με $S_{\text{cons}(\text{total})} = 0,57 \text{ g/L}$ (Διαγρ.63). Στο διάστημα αυτό φαίνεται η μέγιστη παραγωγή βιομάζας (DW) 1,12 g/L στις 71 ώρες, καθώς και του γαλακτικού οξέος (lactic) με 1 g/L στις 47 ώρες από τον εμβολιασμό. Επίσης παρατηρήθηκε παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης (1,3-PDO) σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, από τις 24 ώρες μέχρι και το τέλος των 70 ωρών που παρέμεινε σταθερή, με μέγιστη συγκέντρωση 0,19 g/L στις 24 ώρες με $S_{\text{cons}(1,3\text{-PDO})} = 0,51 \text{ g/L}$. Επίσης το οξικό οξύ (acetic) αυξήθηκε ελάχιστα, αποκτώντας μέγιστη συγκέντρωση 0,22 g/L στις 71 ώρες από την αρχική τιμή 4,22 g/L. Παράλληλα σημειώθηκε σε αμελητέα συγκέντρωση μυρμηκικό οξύ (formic).

Ο συντελεστής απόδοσης ως προς τη βιομάζα ήταν $Y\left(\frac{X}{S}\right) = 1,97 \frac{\text{g βιομάζας}(\text{max})}{\text{g υποστώματος}}$ και η παραγωγικότητα βιομάζας ($P_{(X_{\text{max}})}$) ήταν 0,02 g/L/h. Το pH από την αρχική τιμή 7,3 μειώθηκε στη τιμή 6,37 στις 71 ώρες ζύμωσης (Διαγρ.64).



Διάγραμμα 64: Διακύμανση του pH συγκριτικά με τον χρόνο καλλιέργειας

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στις μέρες μας υπάρχει ενδιαφέρον για τα προϊόντα βιο-οικονομίας, όπως η 1,3-προπανοδιόλη και 2,3-βουτανοδιόλη, ως υποκατάστατα των πετροχημικών, με τη μικροβιακή παραγωγή τους να αντικαθιστά τις παραδοσιακές τεχνολογίες που χρησιμοποιούνται για τη λήψη αυτών των ενώσεων. Η 1,3-προπανοδιόλη και η 2,3-βουτανοδιόλη χρησιμοποιούνται ως πρώτες ύλες για ποικίλες εφαρμογές στο βιομηχανικό τομέα. Μερικές από αυτές τις εφαρμογές είναι η κατασκευή πολυμερών, τροφίμων, λιπαντικών, καλλυντικών και φαρμάκων. Οι ενώσεις αυτές, μέχρι σήμερα παράγονται κυρίως με χημική σύνθεση, ωστόσο τα τελευταία χρόνια γίνονται προσπάθειες για τη μικροβιακή παραγωγή τους μέσω βιοτεχνολογικών μεθόδων, από απόβλητα βιομάζας, όπως η ακατέργαστη γλυκερόλη, που παραλαμβάνεται κατά τη παραγωγή βιοντίζελ. Η βιοτεχνολογική αυτή μέθοδος φαίνεται να αποτελεί μια ελκυστική εναλλακτική λύση στη παραδοσιακή χημική παραγωγή, ωστόσο, οι κύριοι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται για τη παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης είναι κυρίως παθογόνοι. Συνεπώς, καθήκον της ερευνητικής κοινότητας είναι η εύρεση αποτελεσματικών, μη παθογόνων μικροοργανισμών, ικανών να παράγουν 1,3-προπανοδιόλη και 2,3-βουτανοδιόλη από γλυκερόλη, καθώς και άλλων χρήσιμων μεταβολιτών όπως η ακετοΐνη, η αιθανόλη, το γαλακτικό οξύ, το οξικό οξύ κ.α.. Επίσης στόχος της εναλλακτικής αυτής παραγωγής είναι να μπορεί να ανταγωνιστεί τις συγκεντρώσεις των παραγόμενων με χημικές μεθόδους ενώσεων αυτών, σε βιομηχανική κλίμακα. Παρακάτω παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα από την αξιολόγηση των βακτηριακών στελεχών *Citrobacter freundii* EMBT, *Bacillus subtilis* spp. και *Lactobacillus brevis* sp., που αναλύθηκαν στη παρούσα πειραματική μελέτη, ως προς την ικανότητά τους να μεταβολίσουν τη γλυκερόλη στη καθαρή και ακάθαρτη μορφή της (Πίν.7).

Πίνακας 7: Σύγκριση των συντελεστών απόδοσης και παραγωγικότητας παραχθείσας βιομάζας, 1,3-προπανοδιόλης, 2,3-βουτανοδιόλης και ακετοΐνης ανά αναλωθείσα καθαρή ή ακάθαρτη γλυκερόλη και γλυκόζη από τα βακτηριακά στελέχη της παρούσας πειραματικής μελέτης. *pH_ρ: ρυθμιζόμενο pH, *pH_{χρ}: μη ρυθμιζόμενο pH, GLY: αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης, GLY_c: ολική καταναλωθείσα γλυκερόλη, GLU: αρχική συγκέντρωση γλυκόζης, GLU_c: ολική καταναλωθείσα γλυκόζη, A:αερόβια καλλιέργεια, AN: αναερόβια καλλιέργεια, t: χρονική διάρκεια καλλιέργειας.

Υπόστρωμα καλλιέργειας																	
Γλυκερόλη καθαρότητας ≈99%																	
Στέλεχος	t (h)	Συνθήκες καλλιέργειας		GLY (g/L)	GLY _c (g/L)	Βιομάζα (max)** (g/L)	$Y\left(\frac{X}{S}\right)$ (max)** (g/g)	P _(X) (max)** (g/L/h)	1,3-PDO (max)**			2,3-BDO (max)**			Acetoin (max)**		
		A/ AN	pH						(g/L)	$Y\left(\frac{PD}{S}\right)$ (g/g)	P _(PD) (g/L/h)	(g/L)	$Y\left(\frac{BD}{S}\right)$ (g/g)	P _(BD) (g/L/h)	(g/L)	$Y\left(\frac{ACTN}{S}\right)$ (g/g)	P _(ACTN) (g/L/h)
<i>C. freundii</i> EMBT	≈70	A	7,28-5,01 (pH _{χρ})*	21,76	5,00	1,54	0,33	0,06	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	≈70	A	7,44-8,54 (pH _ρ)*	20,46	20,46	4,24	0,21	0,06	0,42	0,04	0,01	-	-	-	-	-	-
	≈70	AN	7,38-5,17 (pH _{χρ})*	22,95	5,93	1,00	0,19	0,04	1,95	0,33	0,03	-	-	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i> ACA-DC 1176	≈70	A	7,28-6,91	21,42	21,42	5,72	0,27	0,08	-	-	-	3,26	0,16	0,07	1,49	0,07	0,03
	≈70	AN	7,38-6,70	23,68	1,11	1,12	1,12	0,28	-	-	-	0,18	0,16	0,003	-	-	-
	≈90	A	7,42-7,08	43,30	43,30	12,74	0,38	0,19	-	-	-	4,39	0,13	0,07	9,00	0,21	0,10
	≈115	A	7,42-6,88	67,05	64,15	14,30	0,42	0,21	-	-	-	6,12	0,12	0,07	17,58	0,27	0,15
<i>B. subtilis</i> ACA-DC 1225	≈70	A	7,37-6,88	24,26	24,26	5,78	0,24	0,08	-	-	-	2,03	0,10	0,04	2,03	0,08	0,03
	≈70	AN	7,35-7,37	23,54	12,10	3,44	0,36	0,07	-	-	-	0,20	0,02	0,00	1,84	0,15	0,03

	≈70	A	7,38-7,48	39,80	29,72	7,04	0,24	0,10	-	-	-	4,01	0,13	0,06	3,38	0,11	0,05
	≈70	A	7,37-7,36	65,39	34,93	5,70	0,23	0,12	-	-	-	5,05	0,14	0,07	3,02	0,10	0,04
<i>L.brevis</i> ACA-DC 1716	≈70	A	7,37-4,89	24,17	12,40	3,12	0,25	0,04	-	-	-	-	-	-	0,81	0,07	0,01
	≈70	AN	7,38-6,68	23,91	1,33	1,12	1,51	0,02	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	≈70	A	7,35-4,79	11,14	0,80	0,88	0,30	0,02	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			+GLU: 9,44	+GLU: 9,44													

Υπόστρωμα καλλιέργειας

Βιομηχανική γλυκερόλη καθαρότητας ≈81%

Στέλεχος	t (h)	Συνθήκες καλλιέργειας		GLY (g/L)	GLYc (g/L)	Βιομάζα (max)** (g/L)	$Y\left(\frac{X}{S}\right)$ (max)** (g/g)	$P_{(X)}$ (max)** (g/L/h)	1,3-PDO (max)**			2,3-BDO (max)**			Acetoin (max)**		
		A/ AN	pH						(g/L)	$Y\left(\frac{PD}{S}\right)$ (g/g)	$P_{(PD)}$ (g/L/h)	(g/L)	$Y\left(\frac{BD}{S}\right)$ (g/g)	$P_{(BD)}$ (g/L/h)	(g/L)	$Y\left(\frac{ACTN}{S}\right)$ (g/g)	$P_{(ACTN)}$ (g/L/h)
		<i>C. freundii</i> EMBT	≈70						A	7,20-5,04 (pH _{χρ})*	17,91	5,15	1,94	0,48	0,08	-	-
	≈70	AN	7,30-5,31 (pH _{χρ})*	23,38	5,57	0,66	0,14	0,01	1,05	0,19	0,01	-	-	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i> ACA-DC 1176	≈70	A	7,20-7,42	18,28	18,28	5,00	0,27	0,07	-	-	-	2,73	0,15	0,06	1,67	0,09	0,04
	≈70	AN	7,30-7,03	23,01	3,34	1,14	0,37	0,02	-	-	-	-	-	-	1,50	0,45	0,02
<i>B. subtilis</i> ACA-DC 1225	≈70	A	7,18-6,49	21,84	21,60	4,80	0,22	0,07	-	-	-	0,81	0,05	0,02	2,42	0,14	0,05
	≈70	AN	7,15-6,60	19,42	0,69	0,14	0,23	0,00	-	-	-	-	-	-	0,43	2,61	0,02
<i>L.brevis</i> ACA-DC 1716	≈70	A	7,20-5,44	17,87	8,23	1,32	0,16	0,02	-	-	-	0,64	0,09	0,01	1,69	0,23	0,04
	≈70	AN	7,30-6,37	22,78	0,57	1,12	1,97	0,01	0,19	0,36	0,00	-	-	-	-	-	-

Υπόστρωμα καλλιέργειας

Στέλεχος	t (h)	Συνθήκες καλλιέργειας		Γλυκόζη													
		A/ AN	pH	GLU (g/L)	GLUc (g/L)	Βιομάζα (max)** (g/L)	$Y\left(\frac{X}{S}\right)$ (max)** (g/g)	$P_{(X)}$ (max)** (g/L/h)	1,3-PDO (max)**			2,3-BDO (max)**			Acetoin (max)**		
									(g/L)	$Y\left(\frac{PD}{S}\right)$ (g/g)	$P_{(PD)}$ (g/L/h)	(g/L)	$Y\left(\frac{BD}{S}\right)$ (g/g)	$P_{(BD)}$ (g/L/h)	(g/L)	$Y\left(\frac{ACTN}{S}\right)$ (g/g)	$P_{(ACTN)}$ (g/L/h)
<i>C. freundii</i> EMBT	≈50	A	7,31-5,10 (pH _{χρ})*	19,32	6,68	1,66	0,48	0,07	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	≈50	A	7,35-5,49 (pH _ρ)*	19,93	12,47	1,50	0,12	0,03	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i> ACA-DC 1176	≈70	A	7,35-6,51	19,81	19,81	3,76	0,19	0,08	-	-	-	3,84	0,19	0,16	3,36	0,17	0,14
<i>B. subtilis</i> ACA-DC 1225	≈70	A	7,35-6,93	20,42	20,42	3,18	0,16	0,13	-	-	-	2,47	0,12	0,10	4,96	0,24	0,21
<i>L.brevis</i> ACA-DC 1716	≈70	A	7,30-3,99	18,66	18,66	1,76	0,09	0,02	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Σημειώνεται πως η συγκεντρώσεις που παρουσιάζονται ως βιομάζα (max), 1,3-PDO (max), 2,3-BDO (max) και Acetoin (max), αναφέρονται στις μέγιστες συγκεντρώσεις που παρήγαγε το κάθε στέλεχος για τη κάθε μια καλλιέργεια, συνεπώς οι συντελεστές απόδοσης $Y\left(\frac{X}{S}\right)$ (max), $Y\left(\frac{PD}{S}\right)$ (max), $Y\left(\frac{BD}{S}\right)$ (max) και $Y\left(\frac{ACTN}{S}\right)$ (max), όπως και η παραγωγικότητα $P_{(X)}$, $P_{(PD)}$, $P_{(BD)}$ και $P_{(ACTN)}$ αναφέρονται στο χρονικό σημείο που παρατηρήθηκαν οι μέγιστες συγκεντρώσεις των παραπάνω και δεν σχετίζονται με την ολική καταναλωθείσα πηγή άνθρακα που παρουσιάζεται στον παραπάνω πίνακα (Πιν.7)

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι μικροοργανισμοί καταφεύγουν στη παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης όταν στο μέσο υπάρχει ως πηγή άνθρακα γλυκερόλη, για την αναγέννηση αναγωγικών ισοδύναμων NADH_2 . Αντίθετα όπως προαναφέρθηκε, η εναλλακτική οδός παραγωγής οξικού οξέος συμβαίνει για να αποκατασταθεί η ανάγκη του κυττάρου για ενέργεια συνθέτοντας μόρια ΑΤΡ.

Ο *Citrobacter freundii* EMBT παρήγαγε 1,3-προπανοδιόλη και στην αερόβια, αλλά και στην αναερόβια καλλιέργειά του, σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα καθαρή γλυκερόλη, όπως και στη περίπτωση της αναεροβίωσης με πηγή άνθρακα ακάθαρτη γλυκερόλη (Πίν.7). Να σημειωθεί πως η παραγωγή μικρής συγκέντρωσης 1,3-προπανοδιόλης στη περίπτωση που ο μικροοργανισμός καλλιεργήθηκε υπό αερόβιες συνθήκες, παρουσιάστηκε μόνο όταν οι συνθήκες του pH ρυθμιζόνταν καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης. Στην περίπτωση αεροβίωσης, όπου ο *Citrobacter freundii* EMBT δεν ρυθμιζόταν, δεν παρήγαγε τη διόλη. Κατά συνέπεια, είναι φανερό η αύξηση που παρουσιάστηκε στη συγκέντρωση της διόλης, όταν ο μικροοργανισμός καλλιεργήθηκε υπό αναερόβιες συνθήκες ακόμη και χωρίς να ρυθμίζονται οι συνθήκες, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο *Citrobacter freundii* EMBT αναπτύσσεται καλύτερα υπό αναερόβιες συνθήκες. Η συγκέντρωση της 1,3-προπανοδιόλης στη περίπτωση αναεροβίωσης, όπου χρησιμοποιήθηκε καθαρή γλυκερόλη ήταν 1,95 g/L, που αντιστοιχεί σε συντελεστή απόδοσης παραχθείσας 1,3-προπανοδιόλης ανά καταναλωθείσα γλυκερόλη $Y\left(\frac{PD}{S}\right) = 0,33 \frac{g}{g}$. Στη περίπτωση της ακάθαρτης βιομηχανικής γλυκερόλης, υπό αναερόβιες συνθήκες, παρήγαγε 1,05 g/L, που αντιστοιχεί σε συντελεστή απόδοσης παραχθείσας 1,3-προπανοδιόλης ανά καταναλωθείσα γλυκερόλη $Y\left(\frac{PD}{S}\right) = 0,19 \frac{g}{g}$, όταν στην αερόβια καλλιέργεια με πηγή άνθρακα καθαρή γλυκερόλη παρήγαγε μόλις 0,42 g/L, που αντιστοιχεί σε συντελεστή απόδοσης παραχθείσας 1,3-προπανοδιόλης ανά καταναλωθείσα γλυκερόλη $Y\left(\frac{PD}{S}\right) = 0,04 \frac{g}{g}$, έχοντας παραγάγει και αιθανόλη στο μέσο της αύξησης, γεγονός που μειώνει το συντελεστή απόδοσης παραχθείσας 1,3-προπανοδιόλης.

Όπως αναφέρθηκε, τα στελέχη που έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν τη γλυκερόλη και να παράγουν 1,3-προπανοδιόλη, υπό αναερόβιες κυρίως συνθήκες, είναι τα είδη *Klebsiella* sp., *Citrobacter* sp., *Clostridium* sp. και *Lactobacillus* sp.

Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, χρησιμοποιώντας τη καθαρή γλυκερόλη ως πηγή άνθρακα στο υπόστρωμα της καλλιέργειας, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις 1,3-προπανοδιόλης που έχουν καταγραφεί από φυσικά και γενετικά τροποποιημένα στελέχη είναι από 70 g/L, όπως το *Clostridium butyricum* CNCM 12111, φυσικό στέλεχος, σε ασυνεχείς καλλιέργειες (Himmi EH *et al.*, 1999) μέχρι 100 g/L, όπως το *Klebsiella pneumoniae* LDH 56, γενετικά τροποποιημένο, σε ημι-συνεχείς καλλιέργειες (Xu X *et al.*, 2009). Από την ακάθαρτη βιομηχανική γλυκερόλη ως πηγή άνθρακα στο υπόστρωμα της καλλιέργειας, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις 1,3-προπανοδιόλης που έχουν καταγραφεί από φυσικά στελέχη είναι από 58 g/L, όπως το *Clostridium butyricum* VPI 1718, φυσικό στέλεχος, σε ημι-συνεχείς καλλιέργειες (Chatzifragkou A *et al.*, 2011) μέχρι 80 g/L, όπως το *Klebsiella pneumoniae* DSM 4799, φυσικό στέλεχος, σε ημι-συνεχείς καλλιέργειες, με ακινητοποιημένα κύτταρα (Jun S-A *et al.*, 2009). Επίσης έχει αναφερθεί πως μεταξύ των φυσικών παραγωγών γαλακτικών βακτηριών της 1,3-προπανοδιόλης, ο *Lactobacillus reuteri* είναι ο καλύτερος μέχρι στιγμής (Mozzi F, 2016). Σε υποθετικό σενάριο, όπου το μοναδικό μεταβολικό προϊόν εκτός της 1,3-προπανοδιόλης, είναι το οξικό οξύ και χωρίς τη παραγωγή της βιομάζας, ο μέγιστος θεωρητικός συντελεστής απόδοσης θα είχε τιμή $Y \left(\frac{PD}{S} \right) = 0,55 \frac{g}{g}$, ενώ με τη βιομάζα θα είχε τιμή $Y \left(\frac{PD}{S} \right) = 0,53 \frac{g}{g}$. Ο μέγιστος θεωρητικός συντελεστής απόδοσης της 1,3-προπανοδιόλης θα μειωθεί περισσότερο όταν στα μεταβολικά προϊόντα προστεθεί και η αιθανόλη (Zeng A-P *et al.*, 1993).

Σύμφωνα με τα παραπάνω (Πίν.7), παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης παρουσίασε και ο *Lactobacillus brevis* ACA-DC 1716, στην αναερόβια καλλιέργειά του, σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα ακάθαρτη βιομηχανική γλυκερόλη. Η παραγωγή της διόλης και συγκεκριμένα σε πηγή άνθρακα ακάθαρτη γλυκερόλη, που εξαιτίας των προσμίξεων θα αναμενόταν να αποτελεί παρεμποδιστικό παράγοντα για την αύξηση, φάνηκε να αποτελεί το ακριβώς αντίθετο αποτέλεσμα. Ωστόσο, η παρουσία της διόλης από τον συγκεκριμένο μικροοργανισμό παρουσιάστηκε σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, λόγω της γενικότερης εικόνας αύξησής του, καθώς αδυνατούσε, στις περισσότερες συνθήκες καλλιέργειας, να αφομοιώσει τη πηγή άνθρακα. Συνεπώς και η συγκέντρωση της 1,3-προπανοδιόλης που ανέπτυξε ήταν αμελητέα, με μέγιστη τιμή 0,19 g/L, όταν στις συνθήκες αναερόβιωσης με καθαρή γλυκερόλη δεν ανέπτυξε τη διόλη, αλλά ούτε και στις αερόβιες συνθήκες.

Τα στελέχη του *Bacillus subtilis* δε παρουσίασαν παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης, όπως και αναμενόταν, καθώς σύμφωνα με την υφιστάμενη βιβλιογραφία δεν έχει μέχρι στιγμής αναφερθεί κάποιο στέλεχος του βακίλου να παράγει 1,3-προπανοδιόλη. Αντίθετα με τον *Citrobacter freundii* EMBT και *Lactobacillus brevis*, τα στελέχη του *Bacillus subtilis* παρήγαγαν ακετοΐνη και 2,3-βουτανοδιόλη σε αξιοσημείωτες συγκεντρώσεις.

Όπως είναι γνωστό τόσο στη περίπτωση της 1,3-προπανοδιόλης, όσο και της 2,3-βουτανοδιόλης, που αποτελούν ενώσεις πολλά υποσχόμενες για την ανάπτυξη της οικονομίας βασισμένη σε χαμηλές εκπομπές άνθρακα, η τιμή κατά την βιοτεχνολογική τους παραγωγή διαφοροποιείται ανάλογα με τη τιμή της πρώτης ύλης που θα επιλεγεί. Το υψηλό κόστος των σακχαρούχων υποστρωμάτων, όπως η χρήση της γλυκόζης, αποτελεί έναν βασικό ανασταλτικό παράγοντα βιωσιμότητας της διεργασίας παραγωγής τους. Τα εργοστάσια επεξεργασίας λιπών και σαπώνων και κατά συνέπεια της παραγωγής βιοντίζελ, όπως έχει αναφερθεί, ύστερα από τη διεργασία παραλαβής του βιοντίζελ, διαχωρίζουν την εναπομένουσα ακάθαρτη βιομηχανική γλυκερόλη, που αποτελεί απόβλητο σχεδόν μηδενικής αξίας. Σύμφωνα με μελέτες η βιομηχανική γλυκερόλη έχει χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα για τη μικροβιακή παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης, τόσο στην ακάθαρτη μορφή της, που είναι λιγότερο διαδεδομένη, όσο και στη ραφιναρισμένη της μορφή.

Στη συγκεκριμένη μελέτη έγινε χρήση αρχικά της γλυκόζης, καθώς αποτελεί ένα από τα ευρέως χρησιμοποιούμενα υποστρώματα για τη παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης, για να παρατηρηθεί η ικανότητα των βακτηριακών στελεχών να παραγάγουν τη διόλη αυτή. Όταν τα δύο στελέχη του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176 και ACA-DC 1225 καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα γλυκόζη, παρήγαγαν αξιοσημείωτη συγκέντρωση 2,3-βουτανοδιόλης με τιμή 3,84 g/L και 2,47 g/L αντίστοιχα, που ισοδυναμεί σε συντελεστή απόδοσης παραχθείσας 2,3-βουτανοδιόλης ανά καταναλωθείσα γλυκόζη $Y\left(\frac{BD}{S}\right) = 0,19 \frac{g}{g}$ και $Y\left(\frac{BD}{S}\right) = 0,12 \frac{g}{g}$ αντίστοιχα. Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί πως, σύμφωνα με την υφιστάμενη βιβλιογραφία ο μέγιστος θεωρητικός συντελεστής απόδοσης παραχθείσας 2,3-βουτανοδιόλης ανά καταναλωθείσα γλυκόζη είναι $Y\left(\frac{BD}{S}\right) = 0,5 \frac{g}{g}$ (Nilegaonkar S *et al.*, 1992). Σε ερευνητικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας τη γλυκόζη ως πηγή άνθρακα για τη παραγωγή της διόλης έχουν αναφερθεί συντελεστές απόδοσης παραχθείσας 2,3-βουτανοδιόλης ανά καταναλωθείσα γλυκόζη για τη περίπτωση του *Bacillus subtilis* σε κλειστή καλλιέργεια $Y\left(\frac{BD}{S}\right) = 0,38 \frac{g}{g}$ με 2,5 g/L παραχθείσας 2,3-βουτανοδιόλης (Ji X-J *et al.*, 2011).

Για τη καθαρή γλυκερόλη ως πηγή άνθρακα προς παραγωγή της διόλης, έχουν αναφερθεί συντελεστές απόδοσης παραχθείσας 2,3-βουτανοδιόλης ανά καταναλωθείσα καθαρή γλυκερόλη, $Y\left(\frac{BD}{S}\right) = 0,36 \frac{g}{g}$ για το στέλεχος *Klebsiella pneumoniae* σε ημι-συνεχή καλλιέργεια, με 49,2 g/L παραχθείσας 2,3-βουτανοδιόλης. Για τα στελέχη *Bacillus amyloliquefaciens* σε ημι-συνεχείς καλλιέργειες, με χρήση ακάθαρτης γλυκερόλης, η 2,3-βουτανοδιόλη ήταν 43,1 g/L και $Y\left(\frac{BD}{S}\right) = 0,38 \frac{g}{g}$ (Cho S *et al.*, 2015). Αντίστοιχα για το στέλεχος *Bacillus amyloliquefaciens* B10-127, σε φιάλες, υπό ασυνεχείς καλλιέργειες και με πηγή άνθρακα καθαρή γλυκερόλη (40 g/L) αναφέρεται συγκέντρωση 2,3-βουτανοδιόλης 11,9 g/L και $Y\left(\frac{BD}{S}\right) = 0,30 \frac{g}{g}$, ενώ το ίδιο στέλεχος, στις ίδιες συνθήκες καλλιέργειας αλλά με πηγή άνθρακα ακάθαρτη γλυκερόλη (60 g/L) παράγαγε 12,9 g/L 2,3-Βουτανοδιόλη και $Y\left(\frac{BD}{S}\right) = 0,32 \frac{g}{g}$ (Yang T-W *et al.*, 2013).

Από τα θετικά αποτελέσματα της μελέτης των στελεχών του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176 και ACA-DC 1225 σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα γλυκόζη, αξιολογήθηκε στη συνέχεια η ικανότητά τους να μεταβολίσουν τη καθαρή και ακάθαρτη γλυκερόλη. Αρχικά η συγκέντρωση της καθαρής γλυκερόλης που χρησιμοποιήθηκε ήταν 20 ± 3 g/L και λόγω της ικανοποιητικής ανάπτυξης των στελεχών στην αερόβια καλλιέργεια, έγινε επανακαλλιέργεια με συγκέντρωση καθαρής γλυκερόλης 40 ± 3 και 70 ± 3 g/L. Στη περίπτωση, όπου καλλιεργήθηκαν σε καθαρή γλυκερόλη με 20 ± 3 g/L, και τα δύο στελέχη αναπτύχθηκαν ικανοποιητικά, παράγοντας 2,3-βουτανοδιόλη, τόσο σε αερόβιες όσο και σε αναερόβιες συνθήκες. Σημειώνεται, ωστόσο μεγάλη μείωση στη τιμή της συγκέντρωσης της διόλης στις αναερόβιες συνθήκες, καθώς στις αερόβιες και για τα δύο στελέχη *B. subtilis* η συγκέντρωση ήταν 3,26 g/L και 2,03 g/L, που αντιστοιχεί σε συντελεστή απόδοσης παραχθείσας 2,3-βουτανοδιόλης ανά καταναλωθείσα γλυκερόλη $Y\left(\frac{BD}{S}\right) = 0,16 \frac{g}{g}$ και $Y\left(\frac{BD}{S}\right) = 0,10 \frac{g}{g}$ για τα 20 ± 3 g/L, ενώ στις αναερόβιες ήταν σχεδόν μηδενική με συγκέντρωση 0,18 g/L και 0,20 g/L που αντιστοιχούν σε συντελεστές απόδοσης παραχθείσας 2,3-βουτανοδιόλης ανά καταναλωθείσα γλυκερόλη $Y\left(\frac{BD}{S}\right) = 0,16 \frac{g}{g}$ και $Y\left(\frac{BD}{S}\right) = 0,02 \frac{g}{g}$, αντίστοιχα για τα 20 ± 3 g/L. Φαίνεται, λοιπόν η δυσκολία των στελεχών του *Bacillus subtilis* να αναπτυχθούν σε αναερόβιες συνθήκες, παρά το γεγονός ότι είναι ένα προαιρετικά αερόβιο βακτήριο. Πιο εμφανές έγινε το γεγονός της αδυναμίας ανάπτυξης των συγκεκριμένων στελεχών σε αναερόβιο περιβάλλον, όταν χρησιμοποιήθηκε ως πηγή άνθρακα, ακάθαρτη γλυκερόλη, την οποία δεν κατόρθωσαν να αφομοιώσουν.

Στη περίπτωση της αερόβιας καλλιέργειας φάνηκε πως τα βακτηριακά στελέχη του *Bacillus subtilis* διαφοροποιήθηκαν ως προς τη συγκέντρωση της παραγόμενης 2,3-βουτανοδιόλης, καθώς και τα δύο αφομοίωσαν πλήρως την ακάθαρτη γλυκερόλη και παρήγαγαν τη διόλη, ωστόσο διπλάσια συγκέντρωση παρήγαγε ο *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176 με διαφορά από τον *Bacillus subtilis* ACA-DC 1225, όταν ο πρώτος παρήγαγε 2,73 g/L, που αντιστοιχεί σε συντελεστή απόδοσης παραχθείσας 2,3-βουτανοδιόλης ανά καταναλωθείσα ακάθαρτη γλυκερόλη $Y\left(\frac{BD}{S}\right) = 0,15 \frac{g}{g}$ για τα 20 ± 3 g/L και ο δεύτερος 0,81 g/L, που αντιστοιχεί σε συντελεστή απόδοσης παραχθείσας 2,3-βουτανοδιόλης ανά καταναλωθείσα ακάθαρτη γλυκερόλη $Y\left(\frac{BD}{S}\right) = 0,05 \frac{g}{g}$ για τα 20 ± 3 g/L. Όπως προαναφέρθηκε τα δύο στελέχη του *Bacillus subtilis*, εξαιτίας της ικανοποιητικής τους ανάπτυξης σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα καθαρή γλυκερόλη, συγκέντρωσης 20 ± 3 g/L, αξιολογήθηκαν και σε αυξημένης κλίμακας καθαρή γλυκερόλη 40 ± 3 g/L και 70 ± 3 g/L, υπό αερόβιες συνθήκες.

Κατά την επανακαλλιέργειά τους υπήρξε παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης, και από τα δύο στελέχη. Αρχικά εξετάστηκε ο *Bacillus subtilis* ACA-DC 1225, σε καλλιέργειες που τερματίστηκαν στις 70 ώρες και για τις δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις πηγής άνθρακα (40 ± 3 g/L και 70 ± 3 g/L), γεγονός που σταμάτησε τον μικροοργανισμό στη μέση του αυξητικού κύκλου, χωρίς να προλάβει να αφομοιώσει εξολοκλήρου τη γλυκερόλη. Συνεπώς η μέγιστη συγκέντρωση της παραχθείσας 2,3-βουτανοδιόλης ήταν στις 70 ώρες, όπου δε ξεπέρασε τα 4,01 g/L, που αντιστοιχεί σε συντελεστή απόδοσης παραχθείσας 2,3-βουτανοδιόλης ανά καταναλωθείσα γλυκερόλη $Y\left(\frac{BD}{S}\right) = 0,13 \frac{g}{g}$, όταν καλλιεργήθηκε σε 40 ± 3 g/L, έχοντας φτάσει σχεδόν στο τέλος της εκθετικής του αύξησης και στην αρχή της στατικής. Αντίστοιχα αποτελέσματα παρουσίασε το ίδιο στέλεχος σε αυξημένη συγκέντρωση 70 ± 3 g/L γλυκερόλη, με 5,05 g/L, που αντιστοιχεί σε συντελεστή απόδοσης παραχθείσας 2,3-βουτανοδιόλης ανά καταναλωθείσα γλυκερόλη $Y\left(\frac{BD}{S}\right) = 0,14 \frac{g}{g}$, έχοντας φτάσει στις 70 ώρες στη στατική του φάση, πολύ νωρίτερα, παρατηρώντας μεγαλύτερη καθυστέρηση στην αφομοίωση. Στη δεύτερη περίπτωση όπου καλλιεργήθηκε το στέλεχος *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176, έμεινε στο θρεπτικό μέσο για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, δεδομένου της καθυστέρησης αφομοίωσης της μεγαλύτερης συγκέντρωσης της γλυκερόλης.

Η αύξηση στις 90 και 115 ώρες καλλιέργειας, για τη περίπτωση των 40 ± 3 g/L και 70 ± 3 g/L γλυκερόλης αντίστοιχα, είχε επιτυχία στη πλήρη αφομοίωσή της από το μικροοργανισμό, ενώ οι συγκεντρώσεις της παραχθείσας 2,3-βουτανοδιόλης διαφοροποιήθηκαν από εκείνες του προηγούμενου στελέχους, αποκτώντας μέγιστη συγκέντρωση 4,39 g/L, που αντιστοιχεί σε συντελεστή απόδοσης παραχθείσας 2,3-βουτανοδιόλης ανά καταναλωθείσα γλυκερόλη $Y\left(\frac{BD}{S}\right) = 0,13 \frac{g}{g}$ για τα 40 ± 3 g/L και μέγιστη 6,12 g/L, που αντιστοιχεί σε συντελεστή απόδοσης παραχθείσας 2,3-βουτανοδιόλης ανά καταναλωθείσα γλυκερόλη $Y\left(\frac{BD}{S}\right) = 0,12 \frac{g}{g}$ για τα 70 ± 3 g/L γλυκερόλης αντίστοιχα.

Συμπεραίνοντας, λοιπόν, από τα παραπάνω, τα στελέχη του *Bacillus subtilis* στη παρούσα πειραματική μελέτη παρήγαγαν ικανοποιητική συγκέντρωση διόλης, με τη γλυκόζη ως πηγή άνθρακα, ενώ ο συντελεστής απόδοσης παραχθείσας 2,3-βουτανοδιόλης ανά καταναλωθείσα γλυκόζη παρέμεινε μικρός, συγκριτικά με αναφορές που έχουν γίνει στη βιβλιογραφία. Αντίθετα για τις περιπτώσεις όπου έγινε χρήση καθαρής ή ακάθαρτης γλυκερόλης με μέγιστη παραγωγή 6,12 g/L διόλης και $Y\left(\frac{BD}{S}\right) = 0,12 \frac{g}{g}$, οι συγκεντρώσεις είναι μικρές συγκριτικά με τη παραγωγή των στελεχών *Klebsiella pneumoniae* και *Bacillus amyloliquefaciens*, όπως προαναφέρθηκε από βιβλιογραφική ανασκόπηση. Δεδομένου όμως των ασυνεχών καλλιιεργειών που αξιολογούνται στη παρούσα πειραματική μελέτη και όχι ημι-συνεχών, η συγκέντρωση των 6,12 g/L που παρήγαγε ο *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176 με 70 ± 3 g/L καθαρή γλυκερόλη δημιουργεί ελπιδοφόρες προοπτικές για υψηλότερη παραγωγή του μεταβολίτη.

Επιπροσθέτως από τα αποτελέσματα (Πίν.7) τα στελέχη του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176 και *Bacillus subtilis* ACA-DC 1225, παρήγαγαν αξιοσημείωτες συγκεντρώσεις ακετοΐνης, η οποία ξεκίνησε να παράγεται περίπου σε διάστημα 20 με 24 ώρες καλλιέργειας και για τα δύο στελέχη, που καλλιεργήθηκαν σε 20 ± 3 g/L, 40 ± 3 g/L και 70 ± 3 g/L γλυκερόλη. Η μοναδική περίπτωση στην οποία δεν καταγράφηκε η ένωση ήταν στη καλλιέργεια του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176, υπό αναερόβιες συνθήκες, στις οποίες η γενικότερη εικόνα ανάπτυξης του δεν ήταν καλή, καθώς σταμάτησε τόσο την αφομοίωση της καθαρής γλυκερόλης από τις πρώτες 20 ώρες, όπως και την ανάπτυξή του στο χρονικό αυτό σημείο. Η αδυναμία ανάπτυξης του στελέχους αυτού στις αναερόβιες συνθήκες, πιθανόν να οφείλεται σε πειραματικό σφάλμα κατά τη διαδικασία του εμβολιασμού, καθώς το ίδιο στέλεχος σε αναερόβιες συνθήκες, με πηγή άνθρακα ακάθαρτη γλυκερόλη, αναπτύχθηκε σχετικά καλύτερα και παρήγαγε ακετοΐνη.

Πιο συγκεκριμένα, σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα καθαρή γλυκερόλη (20 g/L), υπό αερόβιες συνθήκες, το στέλεχος *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176 ξεκίνησε να παράγει σε χαμηλή συγκέντρωση ακετοΐνη και 2,3-βουτανοδιόλη, χωρίς σημαντική διαφορά, στο διάστημα μεταξύ 4 και 27 ώρες, δηλαδή μεταξύ της επιταχυνόμενης και εκθετικής φάσης του αυξητικού κύκλου. Στο τέλος της εκθετικής και αρχές τις στατικής φάσης, η πηγή άνθρακα καταναλώθηκε πλήρως και παρουσίασε μικρή αύξηση ακετοΐνης, μέχρι τη τιμή 1,49 g/L στο διάστημα από τις 27 μέχρι τις 46 ώρες, ενώ μέχρι και τις 70 ώρες που σταμάτησε η καλλιέργεια, άρχισε να μειώνεται. Αντίθετα, η 2,3-βουτανοδιόλη στο διάστημα μεταξύ 27 και 46 ώρες αυξήθηκε με διαφορά, αποκτώντας τη μέγιστη τιμή της 3,26 g/L, ενώ από τις 46 ώρες μέχρι και τις 70 δεν εντοπίστηκε ξανά στο υγρό θρεπτικό μέσο. Αρχικά η ακετοΐνη φαίνεται πως χρησιμοποιήθηκε για τη μετατροπή της σε 2,3-βουτανοδιόλη για το διάστημα από τις 20 μέχρι τις 47 ώρες, ενώ μετά τις 47 ώρες που έχει καταναλωθεί και η γλυκερόλη, η παραχθείσα ακετοΐνη, σταματά να μετατρέπεται σε 2,3-βουτανοδιόλη και ξεκινά η κατανάλωσή της από τον μικροοργανισμό. Το αντίστοιχο στέλεχος *Bacillus subtilis* ACA-DC 1225, παρουσίασε καλύτερα αποτελέσματα, ωστόσο χωρίς μεγάλη απόκλιση από το προηγούμενο, καταναλώνοντας με μεγαλύτερο ρυθμό τη πηγή άνθρακα. Η ακετοΐνη και η 2,3-βουτανοδιόλη καταγράφηκαν στις ίδιες συγκεντρώσεις με 1 g/L στις 22 ώρες, γεγονός που υποδηλώνει ότι η παραγωγή τους είχε ξεκινήσει πολύ νωρίτερα, μεταξύ του διαστήματος από τις 5 μέχρι και τις 22 ώρες. Σε επόμενο διάστημα από τις 22 μέχρι και τις 47 ώρες οι συγκεντρώσεις και των δύο ενώσεων, απέκτησαν τη μέγιστη τιμή των 2,03 g/L, κατανοώντας πως στο μεσοδιάστημα αυτό η 2,3-βουτανοδιόλη πιθανόν να είχε αποκτήσει μεγαλύτερη τιμή από τα 2,03 g/L που καταγράφηκαν στις 47 ώρες. Τέλος, μετά τις 47 ώρες ζύμωσης η γλυκερόλη καταναλώθηκε και η ακετοΐνη μέχρι τις 70 ώρες παρέμεινε στάσιμη ενώ η 2,3-βουτανοδιόλη καταναλώθηκε πλήρως.

Σημαντική αύξηση στη συγκέντρωση ακετοΐνης παρουσίασε ο *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176, όταν επανακαλλιεργήθηκε σε υπόστρωμα με συγκεντρώσεις γλυκερόλης μεγαλύτερες από 20 ± 3 g/L. Οι μέγιστες συγκεντρώσεις ήταν 9 g/L και 17,6 g/L ακετοΐνης, όταν η συγκέντρωσή της πηγής άνθρακα εξετάστηκε σε 40 ± 3 g/L και 70 ± 3 g/L αντίστοιχα. Για τη πρώτη περίπτωση στην οποία ο μικροοργανισμός καλλιεργήθηκε σε 40 ± 3 g/L γλυκερόλη, η ακετοΐνη παρουσιάστηκε για πρώτη φορά στις 20 ώρες καλλιέργειας με χαμηλή συγκέντρωση, ενώ μεταξύ 20 και 27 ωρών μετατρέπεται σε 2,3-βουτανοδιόλη, γεγονός που φάνηκε στη μικρή μείωση της συγκέντρωσής της ακετοΐνης στο σημείο αυτό.

Στη πορεία μεταξύ 27 και 44 ώρες στις οποίες ο μικροοργανισμός βρίσκεται στα μέσα της εκθετικής του φάσης, μέχρι και τις 67 ώρες ζύμωσης, όπου έχει φτάσει στο τέλος της εκθετικής και αρχές της στατικής φάσης, η ακετοΐνη συνεχίζει να παράγεται και να βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση από την αντίστοιχα παραγόμενη 2,3-βουτανودیολη. Η 2,3-βουτανودیολη στις 67 ώρες εντοπίζεται για τελευταία φορά στο υγρό θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας, με μέγιστη συγκέντρωση 4,4 g/L, καθώς επίσης και η γλυκερόλη μετά από το σημείο αυτό και σε σύντομο χρονικό διάστημα, καταναλώθηκε πλήρως. Μετά τη πλήρη αφομοίωση της πηγής άνθρακα, που παρατηρήθηκε στο τέλος της στατικής φάσης του αυξητικού κύκλου, φαίνεται να καταναλώνεται η 2,3-βουτανودیολη και να στρέφεται και πάλι η αντίδραση προς παραγωγή ακετοΐνης, με αξιοσημείωτη συγκέντρωση να καταγράφεται στις 92 ώρες με 9 g/L, που αντιστοιχεί σε συντελεστή απόδοσης παραχθείσας ακετοΐνης ανά καταναλωθείσα γλυκερόλη $Y \left(\frac{ACTN}{S} \right) = 0,21 \frac{g}{g}$. Αντίστοιχη ανάπτυξη παρουσίασε και με γλυκερόλη 70 ± 3 g/L, με τη διαφορά πως η πηγή άνθρακα καταναλώθηκε με μικρότερο ρυθμό αφομοίωσης, καθώς και η ακετοΐνη αυξήθηκε ακόμη περισσότερο, ύστερα από τη πλήρη κατανάλωση της γλυκερόλης, αποκτώντας 17,6 g/L συγκέντρωση, στις 115 ώρες ζύμωσης, που αντιστοιχεί σε συντελεστή απόδοσης παραχθείσας ακετοΐνης ανά καταναλωθείσα γλυκερόλη $Y \left(\frac{ACTN}{S} \right) = 0,27 \frac{g}{g}$. Σύμφωνα με τους Qin J *et al.*, (2006) ο θεωρητικός συντελεστής απόδοσης της ακετοΐνης από γλυκόζη είναι $Y \left(\frac{ACTN}{S} \right) = 0,48 \frac{g}{g}$. Επίσης, σε αναφορές που γίνονται στην υφιστάμενη βιβλιογραφία (Xiao ZJ *et al.*, 2006) η συγκέντρωση της ακετοΐνης απέκτησε τη μέγιστη τιμή 20 g/L όταν φυσικά στελέχη του *Bacillus subtilis* CICC 10025 καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα Μελάσα ή Σακχαρόζη, σε συγκεντρώσεις 125,5 και 126 g/L αντίστοιχα. Αξιολογώντας, λοιπόν, τα αποτελέσματα αυτά με εκείνα της παρούσας πειραματικής μελέτης, φαίνεται πως ο *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176, απέδωσε υψηλή συγκέντρωση ακετοΐνης με χρήση μικρότερης συγκέντρωσης πηγής άνθρακα (καθαρή γλυκερόλη 70 ± 3 g/L) συγκριτικά με τη χρήση Μελάσας ή Σακχαρόζης που εξετάστηκαν, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία.

Ακόμη, όπως είναι γνωστό τα γαλακτικά βακτήρια μεταβολίζουν τη γλυκερόλη αερόβια ή αναερόβια, μέσω των συμπλεγμάτων GLP και DHA αντίστοιχα, παράγουν Πυροσταφυλικό, το οποίο στη συνέχεια θα μεταβολιστεί είτε προς Διακετύλιο και στη συνέχεια σε ακετοΐνη, είτε απευθείας σε ακετοΐνη και στη συνέχεια η τελευταία θα μετατραπεί σε 2,3-βουτανودیολη.

Σύμφωνα με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας, μπορεί να λεχθεί ότι ο *Lactobacillus brevis* ACA-DC 1716 είναι ικανός να παράγει 2,3-βουτανοδιόλη και ακετοΐνη καθώς αυτές σημειώθηκαν υπό αερόβιες συνθήκες, όταν καλλιεργήθηκε σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα ακάθαρτη γλυκερόλη (Πίν.7). Πρέπει, ωστόσο, να σημειωθεί πως τη πηγή άνθρακα δεν κατάφερε να τη μεταβολίσει πλήρως και αυτό είχε ως συνέπεια τη παραγωγή χαμηλής συγκέντρωσης ακετοΐνης με τιμή 1,69 g/L και αμελητέας συγκέντρωσης 2,3-βουτανοδιόλης με τιμή 0,64 g/L.

Παρακάτω παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα από τις αερόβιες καλλιέργειες του *Citrobacter freundii* EMBT, σε διαφορετικά υποστρώματα, με γλυκόζη ή καθαρή γλυκερόλη, στις οποίες εξετάστηκε για την ικανότητα αφομοίωσης της πηγής άνθρακα, χωρίς ρύθμιση αλλά και με ρύθμιση pH.

Πίνακας 8: Σύγκριση τιμής pH, κατανάλωσης και ρυθμού κατανάλωσης υποστρώματος σε αερόβιες καλλιέργειες με πηγή άνθρακα γλυκόζη ή καθαρή γλυκερόλη του *Citrobacter freundii* EMBT, με ρυθμιζόμενο και μη pH. (pHr: ρυθμιζόμενο pH, pHχρ: μη ρυθμιζόμενο pH)

Αερόβιες Συνθήκες	Υπόστρωμα											
	Γλυκόζη		Γλυκερόλη ≈99%		Γλυκόζη		Γλυκερόλη ≈99%		Γλυκόζη		Γλυκερόλη ≈99%	
	Τιμή pH				Καταναλωθέν υπόστρωμα (g/L)				Ρυθμός κατανάλωσης (g/L/h)			
Χρόνος καλλιέργειας (h)	pHr	pHχρ	pHr	pHχρ	pHr	pHχρ	pHr	pHχρ	pHr	pHχρ	pHr	pHχρ
0	7,35	7,31	7,44	7,28	0	0	0	0	0	0	0	0
4	6,62	6,59	7,00	7,03	0,93	0,07	0,58	0,53	0,20	0,02	0,13	0,17
28	5,86	5,30	5,53	5,11	7,07	3,44	11,83	4,68	0,25	0,14	0,42	0,17
48	5,49	5,10	6,47	5,01	12,47	6,68	20,46	4,54	0,26	0,14	0,43	0,10
71	-	-	8,54	5,01	-	-	20,46	5,00	-	-	0,00	0,07

Με βάση τα παραπάνω διακρίνεται πως από τις πρώτες 4εις μέχρι και τις 28 ώρες καλλιέργειας του *Citrobacter freundii* EMBT σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα είτε γλυκόζη, είτε γλυκερόλη, υπό αερόβιες συνθήκες, χωρίς να ρυθμίζεται το pH, αυτό μειώνεται σημαντικά (Πίν.8).

Στις 28 ώρες είχε κατέλθει στη τιμή 5,3 και 5,1 για τη περίπτωση της γλυκόζης και της γλυκερόλης αντίστοιχα, με αποτέλεσμα να σταματά η αφομοίωση της πηγής άνθρακα, λόγω των όξινων συνθηκών του μέσου και ο μικροοργανισμός δεν μπόρεσε να αναπτυχθεί περαιτέρω. Στην αντίστοιχη περίπτωση καλλιέργειας του *Citrobacter freundii* EMBT, όπου το pH ρυθμιζόταν κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, στη τιμή 7,4, είχε ως αποτέλεσμα να αυξηθεί σημαντικά η αφομοίωση της πηγής άνθρακα στη περίπτωση της γλυκόζης, ενώ στη περίπτωση της γλυκερόλης υπήρξε πλήρης αφομοίωσή της από τον μικροοργανισμό, καθώς και ο ρυθμός κατανάλωσης του υποστρώματος αυξήθηκε σημαντικά.

Πίνακας 9: Σύγκριση συγκεντρώσεων ξηρής βιομάζας, οπτικής πυκνότητας και παραγωγικότητας βιομάζας του *Citrobacter freundii* EMBT σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα γλυκόζη ή γλυκερόλη (99%), σε καλλιέργεια με ρύθμιση και χωρίς ρύθμιση του pH. (pHρ: ρυθμιζόμενο pH, pHχρ: μη ρυθμιζόμενο pH)

Υπόστρωμα με πηγή άνθρακα γλυκόζη (Glu), Αερόβιες συνθήκες

Χρόνος καλλιέργειας (h)	OD				DW	
	Συγκέντρωση (g/L)		Συγκέντρωση (g/L)		Παραγωγικότητα (g/L/h)	
	pHρ	pHχρ	pHρ	pHχρ	pHρ	pHχρ
4	1,84	1,35	0,68	0,84	0,15	0,20
28	4,05	3,52	1,32	1,66	0,05	0,07
48	5,23	3,34	1,50	1,38	0,03	0,03

Υπόστρωμα με πηγή άνθρακα γλυκερόλη (Gly) ≈99%, Αερόβιες συνθήκες

Χρόνος καλλιέργειας (h)	OD				DW	
	Συγκέντρωση (g/L)		Συγκέντρωση (g/L)		Παραγωγικότητα (g/L/h)	
	pHρ	pHχρ	pHρ	pHχρ	pHρ	pHχρ
4	-	0,79	0,62	0,54	0,14	0,17
28	4,91	2,78	1,62	1,54	0,05	0,05
48	8,56	2,90	2,51	1,44	0,06	0,03
71	10,28	3,03	4,24	1,30	0,05	0,01

Σύμφωνα με τις συγκεντρώσεις της ξηρής βιομάζας και της οπτικής πυκνότητας που παρουσιάζονται, όταν ο *Citrobacter freundii* EMBT καλλιεργήθηκε σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα γλυκόζη, στο οποίο δεν ρυθμιζόταν το pH, δεν αναπτύχθηκε καλά με αποτέλεσμα η βιομάζα να βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις (Πίν.9). Το ίδιο συνέβη και στη περίπτωση όπου το pH ρυθμιζόταν, γεγονός που δηλώνει ότι η ρύθμιση του pH στις καλλιέργειες αυτές δεν βελτίωσε σημαντικά την αύξηση της βιομάζας. Το αντίθετο παρατηρήθηκε στη περίπτωση που ο *Citrobacter freundii* EMBT καλλιεργήθηκε σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα γλυκερόλη.

Στη περίπτωση αυτή η ρύθμιση του pH είχε θετικά αποτελέσματα, καθώς η συγκέντρωση της ξηρής βιομάζας, όπως και της οπτικής πυκνότητας φαίνεται να έχουν αυξηθεί, συγκριτικά με τη περίπτωση που το pH δεν ρυθμιζόταν. Ωστόσο, και στη περίπτωση καλλιέργειας σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα γλυκόζη και στη περίπτωση με γλυκερόλη, είτε ρυθμίστηκε το pH, είτε όχι, η παραγωγικότητα της βιομάζας δεν επηρεάστηκε, παραμένοντας σε χαμηλά επίπεδα.

Πίνακας 10: Σύγκριση μεταβολικών προϊόντων του *Citrobacter freundii* EMBT σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα γλυκόζη, σε καλλιέργεια με ρύθμιση και χωρίς ρύθμιση του pH. *pHρ: ρυθμιζόμενο pH, *pHχρ: μη ρυθμιζόμενο pH

Υπόστρωμα με πηγή άνθρακα γλυκόζη (Glu), Αερόβιες συνθήκες						
Χρόνος καλλιέργειας (h)	Συγκέντρωση (g/L)					
	Lactic		Acetic		Formic	
	pHρ	pHχρ	pHρ	pHχρ	pHρ	pHχρ
0	0	0	4,51	4,08	0	0
4	0,21	0,44	4,17	4,62	0,07	0,31
28	0,14	0,37	6,89	6,49	0,02	0,34
48	0,47	0,05	10,76	6,53	0,35	0,06

Πίνακας 11: Σύγκριση μεταβολικών προϊόντων του *Citrobacter freundii* EMBT σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα γλυκερόλη (~99%), σε καλλιέργεια με ρύθμιση και χωρίς ρύθμιση του pH. *pHρ: ρυθμιζόμενο pH, *pHχρ: μη ρυθμιζόμενο pH

Υπόστρωμα με πηγή άνθρακα γλυκερόλη ~99%, Αερόβιες Συνθήκες												
Χρόνος καλλιέργειας (h)	Συγκέντρωση (g/L)											
	1,3-PDO		EtOH		Lactic		Acetic		Formic		Succinic	
	pHρ	pHχρ	pHρ	pHχρ	pHρ	pHχρ	pHρ	pHχρ	pHρ	pHχρ	pHρ	pHχρ
0	0	0	0	0	0	0	3,84	4,18	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0,70	4,30	4,75	0,16	0,98	0	0
28	0,42	0	0,84	0	1	0,09	8,15	6,35	0,59	0,35	0,12	0
48	0,15	0	1,39	0	0,55	0,07	13,24	6,99	0,32	0,27	0,17	0
71	0	0	1,65	0	0,34	0,11	9,29	7,20	0,07	0,18	0	0

Από τα δεδομένα που παρουσιάζονται φαίνεται πως τα παραγόμενα οξέα, στη περίπτωση της καλλιέργειας του *Citrobacter freundii* EMBT σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα είτε γλυκόζη (Πίν.10), είτε γλυκερόλη (Πίν.11), χωρίς να ρυθμίζεται το pH, έχουν μεγαλύτερη συγκέντρωση τις πρώτες 4εις ώρες της καλλιέργειας, ενώ στη περίπτωση που ρυθμιζόταν το pH, τα παραγόμενα οξέα είχαν χαμηλότερη συγκέντρωση αρχικά και ύστερα από τις 28 ώρες άρχιζαν να παράγονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Συνεπώς, γίνεται αντιληπτό πως με τη ρύθμιση του pH περιοριζόταν η μεγάλη παραγωγή των οξέων, με αποτέλεσμα στη περίπτωση της καλλιέργειας του *Citrobacter freundii* EMBT σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα καθαρή γλυκερόλη, υπό αερόβιες συνθήκες, να παρατηρηθεί παραγωγή αιθανόλης και 1,3-προπανοδιόλης.

Πίνακας 12: Σύγκριση μέγιστων συγκεντρώσεων πρωτογενών και δευτερογενών μεταβολικών προϊόντων του *Lactobacillus brevis* ACA-DC 1716, σε καλλιέργειες 70 ωρών, σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες και με διαφορετική πηγή άνθρακα. Ασυνεχείς καλλιέργειες, 30 °C, συνεχής ανάδευση. *S₀: Αρχική συγκέντρωση υποστρώματος, *S_c: Καταναλωθέν υπόστρωμα, *Gly: γλυκερόλη, *Glu: γλυκόζη

Πηγή Άνθρακα	Συνθήκες Καλλιέργειας	S ₀ * (g/L)	S _c * (g/L)	Συγκέντρωση (g/L)			
				Γαλακτικό	Οξικό	Ακετοΐνη	Αιθανόλη
Γλυκόζη	Αερόβιες	18,66	18,66	8,93	4,79	-	0,61
Γλυκερόλη ≈99%	Αερόβιες	24,17	12,40	0,51	3,63	0,81	-
Γλυκερόλη ≈99%	Αναερόβιες	23,91	1,33	0,82	0,35	-	-
Γλυκερόλη ≈99% + Γλυκόζη	Αερόβιες	Gly*: 11,14 Glu*: 9,44	Gly: 0,80 Glu: 9,44	5,04	2,59	-	0,65
Βιομηχανική Γλυκερόλη	Αερόβιες	17,87	8,23	0,67	1,23	1,69	0,62
Βιομηχανική Γλυκερόλη	Αναερόβιες	22,78	0,57	0,97	0,23	-	-

Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται (Πίν.12), η καλλιέργεια του *Lactobacillus brevis* ACA-DC 1716 σε υπόστρωμα με μοναδική πηγή άνθρακα καθαρή γλυκερόλη, υπό αερόβιες συνθήκες, δεν απέδωσε σημαντικά μεταβολικά προϊόντα. Η αφομοίωση και ανάπτυξη του μικροοργανισμού ξεκίνησε μετά τις 22 ώρες και δεν ολοκληρώθηκε μέχρι τις 70 ώρες που σταμάτησε η καλλιέργεια, ωστόσο φαίνεται πως η αφομοίωση θα μπορούσε να συνεχιστεί και μετά το πέρας των 70 ωρών, αφού η βιομάζα (DW) αυξάνεται σταδιακά μέχρι και τις 70 ώρες. Το μοναδικό προϊόν που παρήγαγε σε αξιοσημείωτη συγκέντρωση ήταν το οξικό με 3,63 g/L, ενώ το γαλακτικό οξύ που αναμενόταν να αυξηθεί σημείωσε μόνο 0,51 g/L. Η αύξηση στο οξικό προκάλεσε μείωση στη τιμή του pH φτάνοντας στη τιμή 5,4 στις 48 περίπου ώρες, ενώ συνέχισε να μειώνεται μέχρι και το τέλος της καλλιέργειας. Ως εκ τούτου παρουσιάστηκε στο σημείο αυτό ακετοΐνη, η οποία συνέχισε να παράγεται μέχρι και τις 70 ώρες ζύμωσης με μέγιστη συγκέντρωση 0,81 g/L.

Όπως είναι γνωστό η σύνθεσή της διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στη κυτταρική ανάπτυξη, συνεπώς η παρουσία της στο μέσο σηματοδοτεί την αποφυγή της ενδοκυτταρικής οξίνισης, αλλά και της ισορροπίας μεταξύ NADH και NAD.

Επίσης στο διάστημα μέχρι και τις 70 ώρες φαίνεται να έχει φτάσει στη στατική φάση ανάπτυξής του. Όπως προαναφέρθηκε, στις 70 ώρες η καθαρή γλυκερόλη δεν είχε αφομοιωθεί πλήρως, ενώ η ακετοΐνη μέχρι και το τέλος της καλλιέργειας σημείωσε αύξηση, γεγονός που δείχνει ότι μπορεί να είχε μετατραπεί στις επόμενες ώρες σε 2,3-βουτανودیολη μέχρι να αφομοιώσει πλήρως τη πηγή άνθρακα.

Σύμφωνα με έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί στο παρελθόν για την ικανότητα ανάπτυξης του *Lactobacillus brevis* σε υπόστρωμα με μοναδική πηγή άνθρακα γλυκερόλη, έχουν καταδείξει την αδυναμία του να αναπτυχθεί στο μέσο αυτό, και ως εκ τούτου εξετάστηκε εναλλακτικά η προσθήκη συν-υποστρώματος που να αποτελείται από πηγή άνθρακα γλυκερόλη και γλυκόζη, όπως στις έρευνες που πραγματοποίησαν οι Ju JH *et al.*, (2020) και Veiga da Cunha M & Foster MA, (1992). Τα αποτελέσματα της καλλιέργειας σε συν-υπόστρωμα είχαν φανερώσει βελτίωση στο ρυθμό αύξησης του εξεταζόμενου *Lactobacillus* και για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε επανακαλλιέργειά της συγκεκριμένης πειραματικής μελέτης για να διαπιστωθεί η δυνατότητα του *Lactobacillus brevis* ACA-DC 1716, να αναπτύσσεται σε συν-υπόστρωμα γλυκερόλης και γλυκόζης.

Συγκριτικά με τη περίπτωση της πειραματικής μελέτης του *Lactobacillus brevis* ACA-DC 1716 σε αερόβιες συνθήκες και μοναδική πηγή άνθρακα τη γλυκόζη, η αφομοίωσή της ξεκίνησε ύστερα από το πρώτο διάστημα των τεσσάρων (4) ωρών, καθώς και οι συγκεντρώσεις των αντίστοιχων μεταβολικών προϊόντων ήταν σχεδόν διπλάσιες. Στη περίπτωση με μοναδική πηγή άνθρακα τη γλυκόζη στο μέσο, παρήγαγε οξικό 4,79 g/L, γαλακτικό οξύ 8,93 g/L και αιθανόλη 0,61 g/L, όταν στη περίπτωση του συν-υποστρώματος το οξικό απέκτησε τιμή 2,59 g/L, το γαλακτικό οξύ 5,04 g/L, ενώ η αιθανόλη ήταν το μοναδικό προϊόν που αυξήθηκε με τιμή 0,65 g/L. Σε καμία, ωστόσο από τις δύο αυτές περιπτώσεις δεν παρατηρήθηκε παραγωγή ακετοΐνης. Συνεπώς, από την ανάπτυξη του μικροοργανισμού στο μέσο με το συν-υπόστρωμα φαίνεται ότι παρεμποδίζεται η αφομοίωση της γλυκόζης όταν υπάρχει και η γλυκερόλη ως δεύτερη πηγή άνθρακα, αλλά προτιμάται συγκριτικά με τη γλυκερόλη, καθώς η αφομοίωση της γλυκόζης ξεκίνησε ύστερα από 24 ώρες, ενώ αφού την αφομοίωσε πλήρως, φαίνεται μια μικρή μείωση στη συγκέντρωση της γλυκερόλης στις 70 ώρες.

Αυτή η καθυστέρηση θα πρέπει να ληφθεί υπόψη για την καλλιέργεια του συγκεκριμένου μικροοργανισμού αυξάνοντας τον χρόνο ζύμωσης, ώστε να διαπιστωθεί εάν μετά τις 70 ώρες συνεχίζει να αφομοιώνει τη γλυκερόλη και αν η προηγουμένως αφομοίωση της γλυκόζης βοήθησε στο ρυθμό ανάπτυξης του βακτηρίου.

Τέλος στις περιπτώσεις των αναερόβιων καλλιεργειών δεν παρατηρήθηκε καλή αφομοίωση, ούτε ανάπτυξη του μικροοργανισμού και αυτό είχε σαν αποτέλεσμα να παραχθούν ελάχιστα δευτερογενή μεταβολικά προϊόντα, σε χαμηλές συγκεντρώσεις.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα των μελετών με τη χρήση του *Lactobacillus brevis* ACA-DC 1716 δεν δίνουν ικανοποιητικά αποτελέσματα ως προς τη παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης ή 2,3-βουτανοδιόλης με την επιλογή της καθαρής ή ακάθαρτης γλυκερόλης ως πηγή άνθρακα. Αντίθετα με τα παραπάνω μεταβολικά προϊόντα, παρατηρήθηκε στις περιπτώσεις καλλιέργειας του *Lactobacillus brevis* ACA-DC 1716 με πηγή άνθρακα γλυκόζη και συν-υπόστρωμα γλυκόζης-γλυκερόλης, παραγωγή γαλακτικού, 8,95 g/L και 5 g/L αντίστοιχα. Στη πλειοψηφία, ωστόσο, των περιπτώσεων καλλιέργειας του μικροοργανισμού με πηγή άνθρακα καθαρή και ακάθαρτη γλυκερόλη, οι συγκεντρώσεις ήταν μικρότερες από 1 g/L. Επίσης με τη χρήση ακάθαρτης γλυκερόλης σε αερόβιες συνθήκες παρατηρήθηκε αυξημένη συγκριτικά με τις άλλες συνθήκες, ακετοΐνη και μικρή παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης. Συνεπώς, δε μπορεί ο μικροοργανισμός αυτός, με τις παρούσες συνθήκες καλλιέργειας που εξετάστηκε και με τις συγκεντρώσεις των μεταβολικών προϊόντων που καταγράφηκαν, να εφαρμοστεί σε βιοδιεργασίες βιομηχανικού επιπέδου, καθώς αν και η γλυκερόλη αποτελεί χαμηλού κόστους υπόστρωμα, θα είναι οικονομικά ασύμφορη διεργασία. Η χρήση, ωστόσο, της βιομηχανικής γλυκερόλης για τη παραγωγή κύριων και δευτερογενών μεταβολιτών φαίνεται πολλά υποσχόμενη.

Παρακάτω παρουσιάζεται η βιβλιογραφική ανασκόπηση για τη παραγωγή μικροβιακής 1,3-προπανοδιόλης, 2,3-βουτανοδιόλης και ακετοΐνης με χρήση διαφορετικών ειδών βακτηρίων, πηγών άνθρακα και μεθόδων καλλιέργειας (Πίν.13 και Πιν.14).

Πίνακας 13: Βιβλιογραφική ανασκόπηση βακτηριακών στελεχών που εξετάστηκαν για τη παραγωγή 1,3-PDO και 2,3-BDO σε διαφορετικές πηγές άνθρακα και συνθήκες καλλιέργειας.*Δ.α.: δεν αναφέρεται στη βιβλιογραφία, S₀: Αρχική συγκέντρωση υποστρώματος, S_c: Καταναλωθέν υπόστρωμα,*Gly:γλυκερόλη, Glu:γλυκόζη

Στέλεχος	Υπόστρωμα	Μέθοδος Καλλιέργειας	Υπόστρωμα		1,3-PDO			2,3-BDO			Αναφορά
			S ₀ (g/L)	S _c (g/L)	(g/L)	$Y \left(\frac{PD}{S} \right)$ (g/g)	P _(PD) (g/L/h)	(g/L)	$Y \left(\frac{BD}{S} \right)$ (g/g)	P _(BD) (g/L/h)	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> G31	Καθαρή Γλυκερόλη	Ημι-συνεχής		138,3	11,6	Δ.α.	Δ.α.	49,2	0,36	0,18	Cho S <i>et al.</i> , 2015; Petrov K & Petrova P, 2009
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> B10-127	Ακάθαρτη Γλυκερόλη	Ημι-συνεχής		113,3	-	-	-	43,1	0,38	0,45	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> B10-127	Καθαρή Γλυκερόλη	Ασυνεχείς φιάλες	40	38,5	-	-	-	11,9	0,30	0,37	Yang T-W <i>et al.</i> , 2013
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> B10-127	Ακάθαρτη Γλυκερόλη	Ασυνεχείς φιάλες	60	38,3	-	-	-	12,9	0,32	0,36	

ΕΛΕΝΗ Σ. ΜΩΡΑΪΤΗ			Γ.Π.Α., ΑΘΗΝΑ 2022								
<i>Bacillus subtilis</i> AJ1992	Γλυκόζη	Ασυνεχείς (Με ρύθμιση O ₂)	20	Δ.α.	-	-	-	2,5	0,33	0,38	Moes J <i>et al.</i> , 1985
<i>Bacillus subtilis</i> 35	Γλυκερόλη	Ασυνεχείς φιάλες	Δ.α.	Δ.α.	-	-	-	11,1	0,27	0,12	Petrov K, Penka P, 2021
<i>C. freundii</i> sp.	Ακάθαρτη Γλυκερόλη (αφαίρεση προσμίξεων)	Ασυνεχείς φιάλες (Αναερόβια με έγχυση CO ₂)	50	41,48	25,63	0,51	Δ.α.	-	-	-	Anand P & Saxena RK, 2012
<i>C. freundii</i> sp.	Καθαρή Γλυκερόλη	Ασυνεχείς φιάλες (Αναερόβια με έγχυση CO ₂)	50	37,66	25,36	0,51	Δ.α.	-	-	-	Anand P & Saxena RK, 2012
<i>Lactobacillus</i> <i>reuteri</i> CH53	Γλυκόζη + Ακάθαρτη Γλυκερόλη	Ασυνεχείς (Αερόβια)	Glu: 20 Cr. Gly: 25	Glu: 20 Cr. Gly: 7,62	1,51	0,55	0,15	-	-	-	Ju JH <i>et al.</i> , 2020
<i>Lactobacillus</i> <i>reuteri</i> CH53	Γλυκόζη + Ακάθαρτη Γλυκερόλη	Ασυνεχείς (Αναερόβια με έγχυση N ₂)	Glu: 20 Cr. Gly: 25	Glu: 20 Cr. Gly: 24,73	11,88	0,60	1,19	-	-	-	

Πίνακας 14: Βιβλιογραφική ανασκόπηση βακτηριακών στελεχών που εξετάστηκαν για τη παραγωγή ακετοΐνης (acetoin) σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα γλυκόζη και ασυνεχείς καλλιέργειες.*Δ.α.: δεν αναφέρεται στη βιβλιογραφία, S_0 : Αρχική συγκέντρωση υποστρώματος, S_c : Καταναλωθέν υπόστρωμα

Στέλεχος	Υπόστρωμα	Μέθοδος Καλλιέργειας	Υπόστρωμα		Acetoin			Αναφορά
			S_0 (g/L)	S_c (g/L)	(g/L)	$Y\left(\frac{ACTN}{S}\right)$ (g/g)	$P_{(ACTN)}$ (g/L/h)	
<i>Bacillus subtilis</i> JNA 3-10	Γλυκόζη	Ασυνεχείς φιάλες	150	150	42,2	0,28	Δ.α.	Zhang X <i>et al.</i> , 2011
<i>Bacillus subtilis</i> SFA-3	Γλυκόζη	Ασυνεχείς	150	Δ.α.	48,9	0,39	0,56	Tian Y <i>et al.</i> , 2016

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα της πειραματικής μελέτης καταλήγουν στα εξής συμπεράσματα:

- Τα στελέχη του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176 και ACA-DC 1225, καθώς και *Citrobacter freundii* EMBT μπορούν να αφομοιώσουν εξίσου καλά τη καθαρή, όσο και την ακάθαρτη γλυκερόλη και να παραγάγουν σημαντικά μεταβολικά προϊόντα, ενώ το στέλεχος του *Lactobacillus brevis* ACA-DC 1716 παρουσίασε δυσκολία στην ανάπτυξή του στο υπόστρωμα της καθαρής και ακάθαρτης γλυκερόλης.
- Οι συνθήκες που μπόρεσαν τα στελέχη του *Bacillus subtilis* και *Lactobacillus brevis* να αναπτυχθούν και να μεταβολίσουν τη πηγή άνθρακα, ήταν μονάχα στη περίπτωση των αερόβιων καλλιιεργειών. Σε αναερόβιες συνθήκες και τα δύο στελέχη του *Bacillus subtilis* αλλά και το στέλεχος του *Lactobacillus brevis* δεν αναπτύχθηκαν ικανοποιητικά, καθώς επίσης δημιούργησαν εμφανή ιζήματα βιοϋμένιου στις διεπαφές αέρος-υγρού. Το ίζημα αυτό που σχημάτισε ο *Bacillus subtilis*, όπως και ο *Lactobacillus brevis*, φάνηκε να είναι εξαιρετικά ανθεκτικό, καθώς δεν μπορούσε να διασπαστεί και να διαχωριστεί από το υγρό της ζύμωσης, παραμένοντας σε μορφή συμπαγούς μάζας, αιωρούμενο στο υγρό.
- Το *Citrobacter freundii* EMBT παρουσίασε καλύτερη ανάπτυξη στις αναερόβιες συνθήκες. Η παραγωγή, ωστόσο, των μεταβολιτών που καταγράφηκαν δεν ήταν σε σημαντικές συγκεντρώσεις, καθώς το pH του μέσου ανάπτυξης μειωνόταν εξαιρετικά γρήγορα τόσο στις αερόβιες, όσο και στις αναερόβιες συνθήκες καλλιέργειας και ο μικροοργανισμός σταματούσε την αφομοίωση της πηγής άνθρακα. Στη συγκεκριμένη πειραματική μελέτη εξετάστηκε η διαφορά στην αφομοίωση της πηγής άνθρακα με ρύθμιση του pH του μέσου στις αερόβιες συνθήκες και φάνηκε πως είχε μεγάλη επίδραση η οξίνιση του μέσου που προκαλείται από το οξικό οξύ που παράγει ο ίδιος ο μικροοργανισμός. Τα αποτελέσματα των μεταβολικών προϊόντων δεν παρουσίασαν σημαντική βελτίωση, ωστόσο παρατηρήθηκαν νέοι μεταβολίτες, που στη περίπτωση χωρίς ρύθμιση, δεν κατάφεραν να αναπτυχθούν. Η κατανάλωση όμως της πηγής άνθρακα για τη περίπτωση της γλυκερόλης, όταν ρυθμίστηκε, είχε σημαντική βελτίωση, καθώς αφομοιώθηκε πλήρως στις 48 ώρες καλλιέργειας. Στη περίπτωση της γλυκόζης, όταν και εκεί το pH ρυθμίστηκε, ο ρυθμός κατανάλωσης αυξήθηκε, χωρίς να καταναλωθεί πλήρως στο διάστημα των 48 ωρών και αυτό οφείλεται σε εσφαλμένη ρύθμιση του pH, καθώς δεν ρυθμίστηκε πριν τις 24 ώρες και πρόλαβε να μειωθεί στο 5,4 οπότε και να σταματήσει η ανάπτυξη.

- Τη μεγαλύτερη παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης από τα τέσσερα στελέχη που εξετάστηκαν παρουσίασε ο *Citrobacter freundii* EMBT, ενώ τα στελέχη του *Bacillus subtilis* δεν τη παρήγαγαν. Η συγκέντρωση ήταν 1,94 g/L, υπό αναερόβιες συνθήκες, σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα καθαρή γλυκερόλη 20 g/L. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Πίν.13), η συγκέντρωση αυτή φαίνεται να είναι χαμηλή συγκριτικά με άλλες που έχουν καταγραφεί για το ίδιο βακτήριο. Πιο συγκεκριμένα σύμφωνα με τους Anand P & Saxena RK, (2012) η συγκέντρωση που κατέγραψαν ήταν 25,36 g/L με χρήση καθαρής γλυκερόλης, αρχικής συγκέντρωσης 50 g/L, υπό αναερόβιες συνθήκες καλλιέργειας, με έγχυση CO₂. Η συγκεκριμένη καλλιέργεια που αξιολογήθηκε στη παρούσα πειραματική μελέτη, ωστόσο, παρουσιάζει ελπιδοφόρες προοπτικές βελτίωσης, καθώς με τη κατάλληλη ρύθμιση pH και συνθήκες αερισμού, ο μικροοργανισμός θα μπορέσει να αναπτυχθεί και να παραγάγει μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μεταβολικών προϊόντων.
- Τόσο το στέλεχος του *Citrobacter freundii* EMBT, όσο και το στέλεχος *Lactobacillus brevis* ACA-DC 1716, παρήγαγαν αξιοσημείωτες συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος, με τη μέγιστη συγκέντρωση να παρατηρείται από το πρώτο στέλεχος στη τιμή 3,03 g/L με χρήση καθαρής γλυκερόλης, υπό αναερόβιες συνθήκες. Στη πρώτη περίπτωση καλλιέργειας του *Citrobacter freundii* EMBT εάν εφαρμοστεί ρύθμιση pH, όπως πραγματοποιήθηκε για τις αερόβιες καλλιέργειες, οι οποίες παρουσίασαν βελτίωση, υπάρχουν σημαντικές προοπτικές βελτίωσης και για τη συγκεκριμένη περίπτωση. Ο *Lactobacillus brevis* ACA-DC 1716, ενώ παρήγαγε σημαντικές συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος, αυτές καταγράφονται μονάχα στις περιπτώσεις χρήσης γλυκόζης, ως πηγή άνθρακα, στο υπόστρωμα της καλλιέργειας, με τη μέγιστη τιμή να είναι 8,93 g/L.
- Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία ο *Bacillus subtilis* sp., χρησιμοποιείται πολύ συχνά στον εργαστηριακό τομέα, καθώς το γονιδίωμά του μπορεί να τροποποιηθεί εύκολα γενετικά, όπως επίσης, και για το λόγο ότι παράγει σημαντικά μεταβολικά προϊόντα, χρήσιμα για τις βιομηχανίες, όπως η παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης και της ακετοΐνης. Στις ασυνεχείς καλλιέργειες με αναδευόμενες φιάλες που εξετάστηκαν τα δύο στελέχη της παρούσας μελέτης, *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176 και ACA-DC 1225, παρουσίασαν αξιοσημείωτες συγκεντρώσεις, ωστόσο χαμηλές σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία (Πίν.13).

- Τη μεγαλύτερη παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης από τα τέσσερα στελέχη που εξετάστηκαν παρουσίασε το στέλεχος του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176, ενώ ο *Citrobacter freundii* EMBT δεν τη παρήγαγε. Η μέγιστη συγκέντρωση της διόλης καταγράφηκε στη καλλιέργεια με συγκέντρωση 70 ± 3 g/L γλυκερόλης, με τη τιμή 6,12 g/L, υπό αερόβιες συνθήκες.
- Το στέλεχος του *Lactobacillus brevis* ACA-DC 1716, ανέπτυξε και τις δύο διόλες σε υπόστρωμα ακάθαρτης γλυκερόλης, ωστόσο σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Η παραγωγή της 1,3-προπανοδιόλης έγινε σε αναερόβια καλλιέργεια, ενώ η παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης έγινε σε αερόβια καλλιέργεια.
- Τα στελέχη του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176 και *Bacillus subtilis* ACA-DC 1225, παρήγαγαν αξιοσημείωτες συγκεντρώσεις ακετοΐνης, η οποία ξεκίνησε να παράγεται πριν τις 24 ώρες καλλιέργειας και για τα δύο στελέχη, που καλλιεργήθηκαν σε 20 ± 3 g/L, 40 ± 3 g/L και 70 ± 3 g/L γλυκερόλη, ενώ η μέγιστη τιμή της καταγράφηκε κυρίως στο διάστημα της εκθετικής και τέλος της στάσιμης φάσης του αυξητικού κύκλου. Σημαντική αύξηση στη συγκέντρωση ακετοΐνης παρουσίασε ο *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176, όταν επανακαλλιεργήθηκε σε υπόστρωμα με συγκεντρώσεις γλυκερόλης μεγαλύτερες από 20 ± 3 g/L. Οι μέγιστες συγκεντρώσεις ήταν 9 g/L και 17,6 g/L ακετοΐνης, όταν η συγκέντρωσή της πηγής άνθρακα εξετάστηκε σε 40 ± 3 g/L και 70 ± 3 g/L αντίστοιχα. Συνεπώς η συγκέντρωση της πηγής άνθρακα φαίνεται να σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με τη μετατροπή της ακετοΐνης σε 2,3-βουτανοδιόλη και αντίστροφα. Επίσης, όταν η πηγή άνθρακα στο μέσο της καλλιέργειας καταναλώθηκε πλήρως, ο λόγος που η συγκέντρωση της ακετοΐνης εμφάνισε περαιτέρω ενίσχυση σε μεγάλο βαθμό, οφειλόταν στον αναστρέψιμο μετασχηματισμό της 2,3-βουτανοδιόλης. Σε αυτή τη διαδικασία, ένα μόριο NADH θα αναγεννηθεί μέσω της αφυδρογονάσης της 2,3-βουτανοδιόλης (BDH) για τη διατήρηση της κυτταρικής ανάπτυξης.
- Το στέλεχος του *Lactobacillus brevis* ACA-DC 1716, παρήγαγε ακετοΐνη όταν καλλιεργήθηκε σε αερόβιες συνθήκες, με καθαρή και ακάθαρτη γλυκερόλη ως πηγές άνθρακα, σημειώνοντας τη μέγιστη τιμή 1,68 g/L με χρήση ακάθαρτης γλυκερόλης. Η τιμή της από την αρχή μέχρι και το τέλος της ζύμωσης υπερτερούσε εκείνης της 2,3-βουτανοδιόλης, η οποία παρέμεινε σε συγκέντρωση <1 g/L καθ' όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας.

- Η ακάθαρτη γλυκερόλη στις αερόβιες συνθήκες, δε φάνηκε να αποτελεί παράγοντα παρεμπόδισης της αύξησης, των υπό μελέτη βακτηριακών στελεχών, καθώς η ανάπτυξη των μεταβολιτών ήταν παρόμοια με εκείνη όταν χρησιμοποιήθηκε ως πηγή άνθρακα η καθαρή γλυκερόλη. Μικρή διαφορά παρουσιάστηκε στο ρυθμό αφομοίωσή της ακάθαρτης γλυκερόλης από το στέλεχος *Bacillus subtilis* ACA-DC 1225, το οποίο την αφομοίωσε πλήρως ύστερα από τις 60 ώρες ζύμωσης, όταν η καθαρή γλυκερόλη είχε καταναλωθεί περίπου στις 55 ώρες. Στη γενικότερη εικόνα τα στελέχη του *Bacillus subtilis* φάνηκαν ικανά να αφομοιώνουν πλήρως όλων των ειδών τις πηγές άνθρακα που χρησιμοποιήθηκαν για τις περιπτώσεις των αερόβιων συνθηκών.

Οι τιμές των συγκεντρώσεων 1,3-προπανοδιόλης και 2,3-βουτανοδιόλης, καθώς και των υπόλοιπων δευτερογενών μεταβολιτών, που ελήφθησαν από τα εξεταζόμενα στελέχη βακτηρίων, είναι αρκετά χαμηλότερες από εκείνες που παρουσιάζονται στη διεθνή βιβλιογραφία. Κρίνονται, ωστόσο ελπιδοφόρες, καθώς συγκριτικά με τις αντίστοιχες τιμές που παρουσιάστηκαν από τις καλλιέργειες με πηγή άνθρακα γλυκόζη και καθαρή γλυκερόλη, η επιλογή της ακάθαρτης γλυκερόλης είχε κοινά αποτελέσματα. Στις περιπτώσεις που καταναλώθηκε πλήρως η γλυκόζη και η γλυκερόλη, όταν χρησιμοποιήθηκαν ως πηγές άνθρακα στο μέσο της καλλιέργειας, αντίστοιχα καταναλώθηκε πλήρως και η ακάθαρτη γλυκερόλη. Επίσης η 1,3-προπανοδιόλη, η 2,3-βουτανοδιόλη, αλλά και η ακετοΐνη, φανερώθηκαν στο μέσο της αύξησης, με χρήση ακάθαρτης γλυκερόλης, τόσο σε αερόβιες όσο και σε αναερόβιες συνθήκες. Ενθαρρυντικό, επίσης, παρουσιάζεται το αποτέλεσμα που σημειώθηκε για τη συγκέντρωση της ακετοΐνης. Μεταξύ των εξεταζόμενων στελεχών του *Bacillus subtilis*, εκείνο που ξεχώρισε για τη μεγάλη παραγωγή ακετοΐνης στο μέσο της αύξησης ήταν το ACA-DC 1176, το οποίο καλλιεργήθηκε για διάστημα 115 ωρών σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα καθαρή γλυκερόλη, συγκέντρωσης 70 ± 3 g/L, την οποία και κατανάλωσε πλήρως. Η μέγιστη ποσότητα ακετοΐνης που καταγράφηκε για το στέλεχος αυτό ήταν 17,6 g/L, ενώ η 2,3-βουτανοδιόλη συγκέντρωσε μόλις 6,12 g/L. Η συγκέντρωση αυτή που καταγράφηκε στη παρούσα πειραματική μελέτη, μπορεί να συγκριθεί με τη βιβλιογραφία, στην οποία καταγράφονται, για αντίστοιχα στελέχη του *Bacillus subtilis*, συγκεντρώσεις μέχρι και 20 g/L καταναλώνοντας Μελάσα ή Σακχαρόζη ως πηγή άνθρακα (Xiao ZJ *et al.*, 2006), ωστόσο οι συγκεντρώσεις αυτές δεν μπορούν να εφαρμοστούν σε βιομηχανική κλίμακα. Για τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ακετοΐνης που έχουν αναφερθεί (42,2 g/L) (Zhang X *et al.*, 2011), ο παράγοντας της επιτυχούς αύξησης ήταν η μεγαλύτερη συγκέντρωση της πηγής άνθρακα (150 g/L), η επιλογή της γλυκόζης ως πηγή άνθρακα, καθώς και οι συνθήκες ανάδευσης του μέσου (160 rpm).

Συνεπώς, η ανάπτυξη του στελεχούς *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176, μπορεί να ανταγωνιστεί με στελέχη που έχουν καταγραφεί σε βιβλιογραφικές αναφορές, καθώς παρήγαγε αντίστοιχη συγκέντρωση ακετοΐνης με μικρότερη συγκέντρωση πηγής άνθρακα. Δυστυχώς, όμως, η ακετοΐνη που συγκεντρώθηκε εξακολουθεί να αποτελεί ένα δευτερεύον παραπροϊόν της παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης και η συσσώρευσή της δε μπορεί να ανταγωνιστεί τις ποσότητες που παράγονται με χρήση πετροχημικών πρώτων υλών. Συμπερασματικά μπορεί να λεχθεί ότι η αξιοποίηση, της χαμηλού κόστους, ακάθαρτης γλυκερόλης βοήθησε στη μικροβιακή μετατροπή της σε 1,3-προπανοδιόλη και 2,3-βουτανοδιόλη, για τις περιπτώσεις και των τεσσάρων βακτηριακών στελεχών, ωστόσο εξαιτίας των χαμηλών συγκεντρώσεων που παρήγαγαν δεν μπορούν να αποτελέσουν μια οικονομικά βιώσιμη επιλογή για μεγαλύτερης κλίμακας βιομηχανική βιοδιεργασία. Αντίθετα, η παραγωγή της ακετοΐνης που καταγράφηκε για το βακτηριακό στέλεχος *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176 με χρήση καθαρής γλυκερόλης (70 ± 3 g/L), υπό αερόβιες συνθήκες, φαίνεται να μπορεί να συγκριθεί με τις πειραματικές αναφορές που έχουν γίνει στο παρελθόν, καθώς ο συντελεστής απόδοσης που καταγράφηκε στη παρούσα πειραματική μελέτη ήταν 0,27 g/g, όταν στη μελέτη που πραγματοποίησαν οι Zhang X *et al.*, (2011), ο συντελεστής απόδοσης ήταν 0,28 g/g χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα γλυκόζη. Συνεπώς, θα μπορούσε να γίνει εκμετάλλευσή της σε βιομηχανική κλίμακα, με κατάλληλες μετατροπές των συνθηκών καλλιέργειας, τόσο της πηγής άνθρακα και αζώτου, όσο και των συνθηκών αερισμού, ανάδευσης και ρύθμισης του pH, καθώς οι διαφοροποιήσεις αυτές έχουν καταγραφεί σε βιβλιογραφικές αναφορές, δίνοντας σημαντικές συγκεντρώσεις της ένωσης. Προκειμένου, ωστόσο να μειωθεί το κόστος της παραγωγής θα πρέπει να ληφθεί υπόψη το είδος των πρώτων υλών, όπως σε αυτή τη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε η ακάθαρτη βιομηχανική γλυκερόλη, αντικαθιστώντας τις υψηλού κόστους πρώτες ύλες, όπως η γλυκόζη.

7. ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Ολοκληρώνοντας την πειραματική μελέτη και σύμφωνα με τα αποτελέσματα που συζητήθηκαν, προέκυψαν οι παρακάτω προοπτικές:

- Αξιολόγηση σε μεγαλύτερη συγκέντρωση πηγής άνθρακα και διαφορετικές στροφές ανάδευσης, για την ικανότητα ζύμωσης των φυσικών στελεχών *Bacillus subtilis* spp. σε υπόστρωμα γλυκερόλης, ώστε να διαπιστωθεί η δυνατότητα επιτυχούς παραγωγής υψηλής συγκέντρωσης ακετοΐνης, σύμφωνα με δεδομένα που έχουν καταγραφεί σε βιβλιογραφικές αναφορές.
- Τροποποίηση της πηγής αζώτου, με μείωση της συγκέντρωσης του Εκχυλίσματος Ζύμης και της Βακτηριακής Πεπτόνης που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα πειραματική μελέτη, για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, με το χαμηλότερου κόστους Υδρόλυμα Σογιάλευρου (SMH, soybean meal hydrolysate), ώστε να διαπιστωθεί η δυνατότητα παραγωγής υψηλής συγκέντρωσης ακετοΐνης του *Bacillus subtilis* ACA-DC 1176, όπως παρουσιάστηκε σε αντίστοιχη μελέτη των Xiao ZJ *et al.*, (2006).
- Εξέταση του παραγόμενου ιζήματος βιομεμβράνης για τη σύστασή του σε πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες, λιπίδια και νουκλεϊκά οξέα, καθώς και τη περαιτέρω ενδεχόμενη αξιοποίησή του.
- Διενέργεια καλλιεργειών του *Citrobacter freundii* EMBT, υπό αναερόβιες και με ρυθμιζόμενο pH συνθήκες, δεδομένου ότι ο παράγοντας παρεμπόδισης φαίνεται να είναι η αυξημένη συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος.

8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξένη Βιβλιογραφία

- Anand P & Saxena RK (2012) A comparative study of solvent-assisted pretreatment of biodiesel derived crude glycerol on growth and 1,3-propanediol production from *Citrobacter freundii*. *New Biotechnology*, 29(2), 199–205. doi:10.1016/j.nbt.2011.05.010
- Arnaouteli S, Bamford NC, Stanley-Wall NR, Kovács ÁT (2021) *Bacillus subtilis* biofilm formation and social interactions. *Nature Reviews. Microbiology*, 19(9), 600–614. doi:10.1038/s41579-021-00540-9
- Baek HS, Woo BY, Yoo SJ, Joo YH, Shin SS, Oh MH, Lee JH, Kim SY (2016) Composition containing meso-2,3-butanediol. EUROPEAN PATENT APPLICATION. Date of publication: 26.07.2017 Bulletin 2017/30. Application number: 15853159.0. International application number: PCT/KR2015/011120
- Batt C & Tortorello M (2014) *LACTOBACILLUS* / *Lactobacillus brevis*. *Encyclopedia of Food Microbiology*, Academic Press, 2, 418–424. doi:10.1016/b978-0-12-384730-0.00178-6
- Borenshtein D & Schauer DB (2006). The Genus *Citrobacter*. *The Prokaryotes*, 335(6), 90–98. doi:10.1007/0-387-30746-x_5
- Celińska E & Grajek W (2009) Biotechnological production of 2,3-butanediol--current state and prospects. *Biotechnology Advances*, 27(6), 715–725. doi:10.1016/j.biotechadv.2009.05.002
- Chatzifragkou A, Papanikolaou S, Dietz D, Doulgeraki AI, Nychas G-J E, Zeng A-P (2011) Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* growing on biodiesel-derived crude glycerol through a non-sterilized fermentation process. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(1), 101–112. doi:10.1007/s00253-011-3247-x
- Cho S, Kim T, Woo HM, Kim Y, Lee J, Um Y (2015) High production of 2,3-butanediol from biodiesel-derived crude glycerol by metabolically engineered *Klebsiella oxytoca* M1. *Biotechnol Biofuels*, 8(1),146-147. doi:10.1186/s13068-015-0336-6
- Ciriminna R, Pina CD, Rossi M, Pagliaro M (2014) Understanding the glycerol market. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116(10), 1432–1439. doi:10.1002/ejlt.201400229

- Davey ME & O'toole GA (2000) Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4), 847–867. doi:10.1128/MMBR.64.4.847-867.2000
- Doi Y (2019) glycerol metabolism and its regulation in lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(1), 5079–5093. doi:10.1007/s00253-019-09830-y
- Drożdżyńska A, Leja K & Czaczyk K (2011) RESEARCH PAPER Biotechnological production of 1,3-propanediol from crude glycerol. *BioTechnologia*, 92(1), 92-100. doi:10.5114/bta.2011.46521
- Drożdżyńska A, Pawlicka J, Kubiak P, Kośmider A, Pranke D, Olejnik-Schmidt A, Czaczyk K (2014) Conversion of glycerol to 1,3-propanediol by *Citrobacter freundii* and *Hafnia alvei* – newly isolated strains from the *Enterobacteriaceae*. *New Biotechnology*, 31(5), 402–410. doi:10.1016/j.nbt.2014.04.002
- Du C & Webb C (2011) Cellular Systems. *Comprehensive Biotechnology*, 5320(2), 11–23. doi:10.1016/b978-0-08-088504-9.00080-5
- Eriksen DT, Li S, Zhao H (2013) Pathway Engineering as an Enabling Synthetic Biology Tool. *Synthetic Biology*, 352(1), 43–61. doi:10.1016/b978-0-12-394430-6.00003-0
- Future Market Insights (2019) Acetoin Natural Market by Raw Material, Form, End Use & Region - Forecast 2022 – 2032. <https://www.futuremarketinsights.com/reports/acetoin-natural-market>. Date of publication: 09.2022. Publication number: REP-GB-9381
- Gänzle MG (2015) lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science*, 2(47), 106–117. doi:10.1016/j.cofs.2015.03.001
- Gao N, Xia M, Dai J, Yu D, An W, Li S, Qiu D (2018) Both widespread PEP-CTERM proteins and exopolysaccharides are required for floc formation of *Zoogloea resiniphila* and other activated sludge bacteria. *Environmental Microbiology*, 20(5), 1677–1692. doi:10.1111/1462-2920.14080
- Ge Y, Li K, Li L, Gao C, Zhang L, Ma C, Xu P (2016) Contracted but effective: production of enantiopure 2,3-butanediol by thermophilic and GRAS *Bacillus licheniformis*. *Green Chem* 18(17), 4693–4703. doi:10.1039/C6GC01023G

- Gräfe H, Körnig W, Weitz H-M, Reiß W, Steffan G, Diehl H, Pinkos R (2019) Butanediols, Butenediol, and Butynediol. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 7, 1–12. doi:10.1002/14356007.a04_455.pub2
- Haveren J, Scott EL, Sanders J (2008) Bulk chemicals from biomass. Biofuels Bioprod Biorefin, 2(1), 41–57. doi:10.1002/bbb.43
- Himmi EH, Bories A, Barbirato F (1999) Nutrient requirements for glycerol conversion to 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. Bioresource Technology, 67(2), 123–128. doi:10.1016/s0960-8524(98)00109-6
- Hirooka K (2014) Transcriptional response machineries of *Bacillus subtilis* conducive to plant growth promotion. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 78(9), 1471–1484. doi:10.1080/09168451.2014.943689
- IEA(a) (2021) Bioenergy section in Market and Industry chapter. Based on national biofuels data as referenced below; biofuels supplemented by data from IEA, Oil 2021, <https://www.iea.org/reports/oil-2021>.
- IEA(b) (2021) Renewables 2021 Global Status Report REN21. Secretariat, Paris <https://www.iea.org/reports/renewables-2021REN21>
- Ji X-J, Huang H, Du J, Zhu J-G, Ren L-J, Hu N, Li S (2009) Enhanced 2,3-butanediol production by *Klebsiella oxytoca* using a two-stage agitation speed control strategy. Bioresource Technology, 100(13), 3410–3414. doi:10.1016/j.biortech.2009.02.031
- 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. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.01.007
- Jolly J, Hitzmann B, Ramalingam S, Ramachandran KB (2014) Biosynthesis of 1,3-propanediol from glycerol with *Lactobacillus reuteri*: effect of operating variables. Journal of Bioscience and Bioengineering, 118(2), 188–194. doi:10.1016/j.jbiosc.2014.01.003
- Ju J-H, Heo S-Y, Choi S-W, Kim Y-M, Kim M-S, Kim C-H, Oh B-R (2021) Effective bioconversion of 1,3-propanediol from biodiesel-derived crude glycerol using organic acid resistance-enhanced *Lactobacillus reuteri* JH83, Bioresource Technology, 13-17(337), 1-33. doi:10.1016/j.biortech.2021.125361.

- Ju JH, Wang D, Heo SY, Kim MS, Seo JW, Kim YM, Kim DH, Kang SA, Kim CH, Oh BR (2020) Enhancement of 1,3-propanediol production from industrial by-product by *Lactobacillus reuteri* CH53. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 6. doi:10.1186/s12934-019-1275-x
- Jun S-A, Moon C, Kang C-H, Kong SW, Sang B-I, Um Y (2009) Microbial Fed-batch Production of 1,3-Propanediol Using Raw Glycerol with Suspended and Immobilized *Klebsiella pneumoniae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 161(8), 491–501. doi:10.1007/s12010-009-8839-x
- Kaur G, Srivastava AK, Chand S (2012) Advances in biotechnological production of 1,3-propanediol. *Biochem. Eng. J.*, 64(1), 106–118. doi:10.1016/j.bej.2012.03.002
- Kong HG, Shin TS, Kim TH, Ryu CM (2018) Stereoisomers of the bacterial volatile compound 2,3-butanediol differently elicit systemic defense responses of pepper against multiple viruses in the field. *Front Plant Sci*, 9(9), 1-13. doi:10.3389/fpls.2018.00090
- Kovács ÁT & Dragoš A (2019) Evolved Biofilm: Review on the Experimental Evolution Studies of *Bacillus subtilis* Pellicles. *Journal of Molecular Biology*, 4(3), 1-11. doi:10.1016/j.jmb.2019.02.005
- Kraus GA (2008) Synthetic Methods for the Preparation of 1,3-Propanediol. *CLEAN - Soil, Air, Water*, 36(8), 648–651. doi:10.1002/clen.200800084
- Kumar N, Mohapatra S, Ragit S, Kundu K, Karmakar R (2017) Optimization of safflower oil transesterification using the Taguchi approach. *Petroleum Science*, 14(4), 798-805. doi:10.1007/s12182-017-0183-0.
- Levinson HS & Mahler I (1998) Phosphatase activity and lead resistance in *Citrobacter freundii* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters*, 161(1), 135–138. doi:10.1111/j.1574-6968.1998.tb12939.x
- Li ZJ, Ji XJ, Kan SL, Qiao HQ, Jiang M, Lu DQ (2010) Past, present, and future industrial biotechnology in China. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 122, 1-42. doi:10.1007/10_2010_76
- Liu X, Fabos V, Taylor S, Knight DW, Whiston K, Hutchings GJ (2016) One-step production of 1,3-butadiene from 2,3-butanediol dehydration. *Chem Eur J*, 22(35), 12290–12294. doi:10.1002/chem.201602390

- Maddox IS (1996). Microbial Production of 2,3-Butanediol. *Biotechnology*, 6, 269–291. doi:10.1002/9783527620883.ch7
- Maervoet VE, De Maeseneire SL, Avci FG, Beauprez J, Soetaert WK, De Mey M (2014) 1,3-propanediol production with *Citrobacter werkmanii* DSM17579: effect of a dhaD knock-out. *Microbial Cell Factories*, 70(1), 1-11. doi:10.1186/1475-2859-13-70
- Magee RJ & Kosaric N (1987) The Microbial Production of 2,3-Butanediol. *Advances in Applied Microbiology*, 32, 89–161. doi:10.1016/s0065-2164(08)70079-0
- Market Research Report (2020) 1,3-Propanediol (PDO) Market - Global Forecast to 2025. REPORT CODE: CH 3091, <https://www.marketsandmarkets.com/>
- Mata TM, Martins AA, Caetano NS (2010) Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1), 217–232. doi:10.1016/j.rser.2009.07.020
- Maximize Market Research (2022) Global 2,3-Butanediol Market-Industry Analysis and Forecast (2020-2027)- By Type, Application, and Region. MAXIMIZE MARKET RESEARCH PVT. LTD., Report ID: 65350, Published Date: June 2020. www.maximizemarketresearch.com
- Mazur P, Leibo SP, Chu EHY (1972) A two-factor hypothesis of freezing injury: Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. *Experimental Cell Research*, 71(2), 345-355. doi:10.1016/0014-4827(72)90303-5
- Moes J, Griot M, Keller J, Heinzle E, Dunn IJ, Bourne JR (1985) A microbial culture with oxygen-sensitive product distribution as a potential tool for characterizing bioreactor oxygen transport. *Biotechnology and Bioengineering*, 27(4), 482–489. doi:10.1002/bit.260270413
- Mozzi F (2016) lactic Acid Bacteria. *Encyclopedia of Food and Health*, 1, 501–508. doi:10.1016/b978-0-12-384947-2.00414-1
- National Center for Biotechnology Information (2022) (c) 2,3-Butanediol. PubChem Compound Summary for CID 262, Retrieved: March 29, 2022, from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2_3-Butanediol.

- National Center for Biotechnology Information (2022) (d) Acetoin. PubChem Compound Summary for CID 179, Retrieved: May 15, 2022, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acetoin>.
- National Center for Biotechnology Information. (2022) (a) Glycerol. PubChem Compound Summary for CID 753, Retrieved: March 29, 2022, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glycerol>.
- National Center for Biotechnology Information. (2022) (b) 1,3-Propanediol. PubChem Compound Summary for CID 10442, Retrieved: March 29, 2022, from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1_3-Propanediol.
- Nilegaonkar S, Bhosale SB, Kshirsagar DC, Kapadi AH (1992) Production of 2,3-butanediol from glucose by *Bacillus licheniformis*. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 8(4), 378–381. doi:10.1007/BF01198748
- Oh BR, Lee SM, Heo S (2018) Efficient production of 1,3-propanediol from crude glycerol by repeated fed-batch fermentation strategy of a lactate and 2,3-butanediol deficient mutant of *Klebsiella pneumoniae*. Microb Cell Fact, 17(1), 1-9. doi:10.1186/s12934-018-0921-z
- Osman E (2021) Practice 3 - Aseptic techniques. Laboratory Practices in Microbiology, Academic Press, London, 1, 25-40 doi:10.1016/B978-0-323-91017-0.00011-1.
- Papanikolaou S (2009) Microbial conversion of glycerol into 1,3-propanediol: Glycerol assimilation, biochemical events related with 1,3-propanediol biosynthesis and biochemical engineering of the process. Microbial Conversions of Raw Glycerol. Nova Science Publishers, Inc. 137-168. ISBN 978-1-60692-392-4. United States
- Papanikolaou S, Fick M, Aggelis G (2004) The effect of raw glycerol concentration on the production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 79(11), 1189–1196. doi:10.1002/jctb.1103
- Park JM, Song H, Lee HJ, Seung D (2013) Genome-scale reconstruction and in silico analysis of *Klebsiella oxytoca* for 2,3-butanediol production. Microb Cell Factories, 12(1), 10-20. doi:10.1186/1475-2859-12-20

- Pedersen MB, Gaudu P, Lechardeur D, Petit M-A, Gruss A (2012) Aerobic Respiration Metabolism in lactic Acid Bacteria and Uses in Biotechnology. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3(1), 37–58. doi:10.1146/annurev-food-022811-101255
- Petrov K & Penka P (2021) Current Advances in Microbial Production of Acetoin and 2,3-Butanediol by *Bacillus spp.* MSPI. MULTIDISCIPLINARY DIGITAL PUBLISHING INSTITUTE, 7(4), 300-307. doi:10.3390/fermentation7040307
- Petrov K & Petrova P (2009) High production of 2,3-butanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* G31. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(4), 659–665. doi:10.1007/s00253-009-2004-x
- Piggot PJ (2009) *Bacillus Subtilis*. *Encyclopedia of Microbiology*, Amsterdam, 3, 45–56. doi:10.1016/b978-012373944-5.00036-5
- Qin J, Xiao Z, Ma C, Xie N, Liu P, Xu P (2006) Production of 2,3-Butanediol by *Klebsiella Pneumoniae* using Glucose and Ammonium Phosphate. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 14(1), 132–136. doi:10.1016/s1004-9541(06)60050-5
- Rajitha K, Nancharaiyah YV, Venugopalan VP (2020) Acid soluble extracellular matrix confers structural stability to marine *Bacillus haynesii* pellicle biofilms. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 111160(194), 1-8. doi:10.1016/j.colsurfb.2020.111160
- REN21 (2021) *Renewables 2021 Global Status Report*. Paris: REN21 Secretariat, 18(8), 228-236, ISBN 978-3-948393-03-8
- Rouhany M & Montgomery H (2018) Global biodiesel Production: The State of the Art and Impact on Climate Change. *biodiesel*, 8, 1–14. doi:10.1007/978-3-030-00985-4_1
- Serra CR, Earl AM, Barbosa TM, Kolter R, Henriques AO (2014) Sporulation during growth in a gut isolate of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 196(23), 4184–4196. doi:10.1128/JB.01993-14
- Shepard EM, Broderick JB (2010) S-Adenosylmethionine and Iron–Sulfur Clusters in Biological Radical Reactions: The Radical SAM Superfamily. *Comprehensive Natural Products II*, 8(17), 625–661. doi:10.1016/b978-008045382-8.00176-3

- Simione F (1992) Key issues relating to the genetic stability and preservation of cells and cell banks. *Journal of Parenteral Science and Technology: A Publication of the Parenteral Drug Association*, 46(6), 226-32. PMID: 1474434
- Song CW, Park JM, Chung SC, Lee SY, Song H (2019) Microbial production of 2,3-butanediol for industrial applications. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 46(11), 1583–1601. doi:10.1007/s10295-019-02231-0
- Tan HW, Abdul Aziz AR, Aroua MK (2013) Glycerol production and its applications as a raw material: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27(1), 118–127. doi:10.1016/j.rser.2013.06.035
- Tian Y, Fan Y, Liu J, Zhao X, Chen W (2016) Effect of nitrogen, carbon sources and agitation speed on acetoin production of *Bacillus subtilis* SF4-3. *Electronic Journal of Biotechnology*, 19, 41–49. doi:10.1016/j.ejbt.2015.11.005
- Tsau JL, Guffanti AA, Montville TJ (1992) Conversion of pyruvate to acetoin helps to maintain pH homeostasis in *Lactobacillus plantarum*. *Appl Environ Microbiol*. 58(3), 891–894. doi:10.1128/aem.58.3.891-894.1992
- Van Gerpen J (2019) Commercial and Large-Scale biodiesel Production Systems. USDA National Institute of Food and Agriculture, <https://farm-energy.extension.org/commercial-and-large-scale-biodiesel-production-systems/>. Date accessed: 17.12.2021, New Technologies for Agriculture Extension grant no. 2020-41595-30123
- Veiga da Cunha M & Foster MA (1992) Sugar-glycerol cofermentations in *Lactobacilli*: the fate of lactate. *Journal of Bacteriology*, 174(3), 1013–1019. doi:10.1128/jb.174.3.1013-1019.1992
- Wang Y, Wu J, Lv M, Shao Z, Hungwe M, Wang J, Bai X, Xie J, Wang Y, Geng W (2021) Metabolism Characteristics of lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 612285(9), 1-19. doi:10.3389/fbioe.2021.612285
- Wolfe AJ (2015) Glycolysis for Microbiome Generation. *Microbiol Spectrum* 3(3), 1-12. doi:10.1128/microbiolspec.MBP-0014-2014.
- Xiao Z & Xu P (2007) Acetoin metabolism in bacteria. *Crit Rev Microbiol*, 33(2),127–140. doi:10.1080/10408410701364604

- Xiao ZJ, Liu PH, Qin JY, Xu P (2006) Statistical optimization of medium components for enhanced acetoin production from molasses and soybean meal hydrolysate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(1), 61–68. doi:10.1007/s00253-006-0646-5
- Xu X, Zhang G, Wang L, Ma B, Li C (2009) Quantitative analysis on inactivation and reactivation of recombinant glycerol dehydratase from *Klebsiella pneumoniae* XJPD-Li. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 56(2-3), 108–114. doi:10.1016/j.molcatb.2008.03.002
- 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. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(17), 7651–7658. doi:10.1007/s00253-013-5048-x
- Zeng A-P, Biebl H, Schlieker H, Deckwer W-D (1993) Pathway analysis of glycerol fermentation by *Klebsiella pneumoniae*: Regulation of reducing equivalent balance and product formation. *Enzyme and Microbial Technology*, 15(9), 770–779. doi:10.1016/0141-0229(93)90008-p
- Zhang L, Yang Y, Sun J, Shen Y, Wei D, Zhu J, Chu J (2010) Microbial production of 2,3-butanediol by a mutagenized strain of *Serratia marcescens* H30. *Bioresource Technology*, 101(6), 1961–1967. doi:10.1016/j.biortech.2009.10.052
- Zhang X, Yang T, Lin Q, Xu M, Xia H, Xu Z, Rao Z (2011) Isolation and identification of an acetoin high production bacterium that can reverse transform 2,3-butanediol to acetoin at the decline phase of fermentation. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 27(12), 2785–2790. doi:10.1007/s11274-011-0754-y

Ελληνική Βιβλιογραφία

- Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο (2015) Κυκλική οικονομία: χρησιμοποιήσέ το ξανά.
<https://www.europarl.europa.eu/news/el/headlines/economy/20151201STO05603/kukliki-oikonomia-chrisimoroiise-to-xana>. Προβολή: 10.01.2022
- Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο (2021) Κυκλική οικονομία: αυστηρότεροι κανόνες κατανάλωσης και ανακύκλωσης στην ΕΕ.
https://www.europarl.europa.eu/pdfs/news/expert/2015/12/story/20151201STO05603/20151201STO05603_el.pdf. Προβολή: 10.01.2022
- ΥΠΕΝ (2021) βιοκαύσιμα. Υπουργείο Περιβάλλοντος Και Ενέργειας,
<https://ypen.gov.gr/energeia/prasines-metafores/viokafsima/>. Προβολή: 12.01.2022