



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

Τομέας IV: Τομέας Σύνθεσης και Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διαδικασιών

Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας

**Μελέτη συνθηκών ανάπτυξης και παραγόντων αποθείωσης
του στελέχους *Rhodococcus erythropolis IGTS8***

Συγγραφέας

Χατζηλάμπρος Ορέστης

Επιβλέπων Καθηγητής

Δημήτρης Κέκος

Αθήνα, 2020

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία είναι αποτέλεσμα πολύμηνης εργασίας στο εργαστήριο βιοτεχνολογίας της σχολής Χημικών Μηχανικών υπό την επίβλεψη του καθηγητή Δ. Κέκου.

Ολοκληρώνοντας λοιπόν την διπλωματική μου εργασία και μαζί με αυτήν τον κύκλο των προπτυχιακών μου σπουδών αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω θερμά τους ανθρώπους εκείνους που στάθηκαν πλάι μου στην εκπόνηση του δύσκολου για μένα έργου.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Δημήτρη Κέκο για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου για την ανάθεση ενός πολύ ενδιαφέρον θέματος. Οι προτροπές και οι κατευθυντήριες γραμμές που μου έδινε ήταν πολύ σημαντικές για την παραγωγή ενός σωστού αποτελέσματος.

Έπειτα, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην επίκουρο καθηγήτρια κ. Διομή Μαμμά για την πλήρη καθοδήγηση που μου έδινε σε όλες τις δυσκολίες που προέκυψαν, τις πολύτιμες συμβουλές της, την αμέριστη υπομονή της και την διάθεση της να στέκεται στο πλάι ενός διπλωματικού παρά το φορτωμένο πρόγραμμα της. Δεν θα μπορούσα να μην εκτιμήσω την πολύ σημαντική συνεισφορά του υποψήφιου Διδάκτορα Κωνσταντίνου Δήμου. Εκτιμώ βαθύτατα τον χρόνο που αφιέρωσε μαζί μου στην διεξαγωγή πολύωρων και απαιτητικών πειραμάτων, την διάθεση του στο να μου εξηγήσει και να με συμβουλέψει πάντοτε όταν υπήρχε ή δεν υπήρχε ανάγκη αλλά και για το όλο φιλικό κλίμα που δημιούργησε η συνεργασίας μας καθώς έκανε ευχάριστη την εκπόνηση της εργασίας. Ομοίως θα ήθελα να ευχαριστήσω και τον ερευνητή Γιώργο Πρασούλα για την συνολική επιστημονική προσφορά του, το χρόνο και τις πολύ εύστοχες απαντήσεις του στις απορίες μου.

Θα ήταν αχαριστία να μην ευχαριστήσω το σύνολο των μελών του εργαστηρίου που ανιδιοτελώς προσφέραν την βοήθεια τους στις υλικοτεχνικές ανάγκες των πειραμάτων. Μεγάλη και θερμή είναι η προσφορά συμφοιτητών και φίλων που με στήριξαν με λόγια και έργα όποτε εγώ είχα ανάγκη.

Προσωπικά, θα ήταν αδύνατο να φέρω εις πέρας ένα τόσο δύσκολο έργο αν δεν είχα την παντοτινή στήριξη, αγάπη και φροντίδα της οικογένειας μου. Οφείλω σε αυτούς τόσα πολλά που μου είναι δύσκολο να τα περιγράψω σε λίγες γραμμές. Τους ευγνωμονώ για την αμέριστη υπομονή και βοήθεια τους προς όλες τις κατευθύνσεις όλα αυτά τα χρόνια των σπουδών μου.

Τέλος, θα ήθελα να κλείσω με το άτομο που με στήριξε προσωπικά με μοναδικό κριτήριο το καλό μου και την πρόοδο μου στην επιστήμη που έχω επιλέξει. Έδειξε πολύ υπομονή, μου έδινε κουράγιο και πάντοτε με στήριζε στις αποφάσεις μου. Ο λόγος για την Σταυρούλα Πολλάτου στην οποία θέλω να αφιερώσω την παρούσα εργασία...

Χατζηλάμπρος Ορέστης,
Αθήνα, Φεβρουάριος 2020

Περίληψη

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη των παραγόντων που επιδρούν στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Rhodococcus erythropolis IGTS8*, ο οποίος έχει την ικανότητα να μεταβολίζει το διβενζοθειοφαινίλιο (DBT) σε 2-υδρόξυδιφαινύλιο (2-HBP), απομακρύνοντας το θείο από κλάσματα πετρελαιοειδών. Για τον σκοπό αυτό, μελετήθηκαν συνθήκες που αφορούν την πηγή θείου (S) και την πηγή άνθρακα (C) αλλά και τις επιμέρους συγκεντρώσεις αυτών στην ανάπτυξη. Σε επόμενο στάδιο, εφόσον ορίστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες του μέσου, με εφαρμογή αυτών, εξετάστηκε η ανάπτυξη του στελέχους σε συνθήκες διαλείποντος έργου και η ικανότητα αποθείωσης του σε διαφασικό σύστημα.

Από τη διεξαγωγή των πειραμάτων βρέθηκε ότι οι καλύτερες συνθήκες για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού, περιλαμβάνουν την χρήση του διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO) ως πηγή S ανάμεσα σε πηγές όπως το DBT, το θειοφαινίλιο και το $MgSO_4$. Η ανάπτυξη παρουσία DMSO συνδυάζει ικανοποιητικό ρυθμό ανάπτυξης ($\mu = 0,121 \text{ h}^{-1}$) με υψηλή αποθειωτική δράση των κυττάρων. Παράλληλα, η επίδραση της συγκέντρωσης του DMSO έδειξε την τάση για παρεμπόδιση της ανάπτυξης από το υπόστρωμα σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αυτού. Ως καλύτερη συγκέντρωση DMSO βρέθηκαν τα 1,3mM στα οποία επιτυγχάνεται βιομάζα 3,19 g/L. Ως προς την επίδραση της πηγής C εξετάστηκε η ανάπτυξη του στελέχους παρουσία σακχαρόζης, γλυκόζης και γλυκερόλης. Τα αποτελέσματα έδειξαν την ανικανότητα του μικροοργανισμού να αναπτυχθεί σε σακχαρόζη. Η χρήση της γλυκόζης φανέρωσε την τάση του μικροοργανισμού να παρεμποδίζεται στην ανάπτυξη από υψηλές συγκεντρώσεις αυτής. Αποδοτικότερη συνθήκη από άποψη παραγωγής βιομάζας και κατανάλωσης υποστρώματος βρέθηκαν τα 20 g/L γλυκόζης με μέγιστη κυτταρική συγκέντρωση τα 3,19 g/L. Η ανάπτυξη σε γλυκερόλη είναι εξίσου υψηλή για τη συνθήκη των 30 g/L και των 20 g/L γλυκερόλης με μέγιστη παραγωγή βιομάζας 3,98 g dcw/L και 3,42 g dcw/L αντίστοιχα. Για λόγους οικονομικής προσιτότητας και διαθεσιμότητας προτιμήθηκε η γλυκερόλη ως καλύτερη πηγή C στην ανάπτυξη. Εν τέλει, από το σύνολο των συνθηκών που εξετάστηκαν ως βέλτιστες συνθήκες προτείνονται: Πηγή C: Γλυκερόλη 20 g/L και πηγή S: DMSO 1,3mM.

Αξιοποιώντας τη βέλτιστη σύσταση του μέσου που βρέθηκε παραπάνω, μελετήθηκε η αποθειωτική δράση των κυττάρων σε αντιδραστήρα διαλείποντος έργου. Στο διαλείπον έργο η αποθειωτική δράση των κυττάρων αυξάνεται αγγίζοντας την βέλτιστη τιμή των 31 U/mg DCW στην αρχή της εκθετικής φάσης ακολουθώντας μετά πτωτική πορεία. Ακολούθως, σε προσπάθεια ανάπτυξης του μικροοργανισμού σε αντιδραστήρα διαλείποντος έργου με διαδοχικές αλλαγές μέσου διαπιστώθηκε η ικανότητα του μικροοργανισμού να αναπτύσσεται με μεγαλύτερους ρυθμούς από αλλαγή σε αλλαγή, μειώνοντας την λανθάνουσα φάση και παράγοντας περισσότερη βιομάζα. Τέλος, έγινε μελέτη του ποσοστού αποθείωσης του στελέχους σε διαφασικό σύστημα, με παράμετρο την παροχή αερισμού στις δύο φάσεις. Τα αποτελέσματα έδειξαν ρυθμό κατανάλωσης του DBT μεγαλύτερο από τον αντίστοιχο ρυθμό παραγωγής του 2-HBP ανεξάρτητα από την παροχή του αέρα, κάτι που ερμηνεύεται από τον εγκλωβισμό του 2-HBP εντός του κυττάρου. Μεγαλύτερος αρχικός ρυθμός κατανάλωσης του DBT βρέθηκε για παροχή αέρα 43 L/h με τιμή 0,0227 mmol DBT/g dcw/h. Επιπλέον, η σύγκριση ως προς την αποθείωση των DBT και 4,6 DM-DBT για παροχή αέρα 4 L/h έδειξε αρχικό ρυθμό κατανάλωσης 0,165 mmol/g DCW/h για το μη υποκατεστημένο έναντι 0,0060 mmol/g DCW/h του υποκατεστημένου μορίου.

Abstract

The purpose of this diploma thesis is to examine the influence of media composition in the growth of *Rhodococcus erythropolis IGTS8*, capable of converting dibenzothiophene to hydroxybiphenyl, removing this way organosulfur compounds from petroleum products. With this view, conditions concerning the carbon and sulphur source and various concentrations of them in the medium are tested. Once the optimum growth conditions were determined, they were applied in batch cultures of the strain. Furthermore, the desulfurization activity of the biocatalyst in biphasic system was studied.

Experimental results showed the use of Dimethylsulfoxide (DMSO) as the optimum sulphur source among Debenzothiophene, Thiophene and MgSO_4 . In the presence of DMSO, cells are grown with a satisfying specific rate ($\mu = 0,121 \text{ h}^{-1}$) while developing good desulfurization activity. In addition, the effect of DMSO concentration in cell growth showed a reduction in biomass production when higher DMSO concentrations are applied. This is considered to be due to inhibition from the substrate. Maximum biomass (3,19 g/L) was achieved by using 1,3 mM DMSO. Regarding the effect of carbon source three molecules were examined: sucrose, glucose and glycerol. When sucrose is applied, cells showed not significant grown. Moreover glucose application showed inhibition in growth by substrate at higher glucose concentrations. The optimum concentration of glucose observed is 20 g/L, reaching a biomass concentration of 3,19 g/L. The presence of glycerol revealed equally high growth in both 30 and 20 g/L of glycerol achieving 3,98 g DCW/L και 3,42 g DCW/L of biomass respectively. For reasons of availability and cost in large scale units glycerol was chosen over glucose, despite their both equally satisfying results. In conclusion, the following media composition is suggested: Carbon source: 20 g/L Glycerol and Sulphur source: 1.3mM DMSO.

The above mentioned optimum media composition was applied for a cell growth and desulfurization activity study in a batch reactor. Results showed that desulfurization activity increases with the cell growth up to a point in which it reaches the maximum activity of 31 U/mg, followed by a decline. Moreover, the behaviour of *R.erythropolis IGTS8* in batch reactor with consecutives medium replacements was studied. Experimental results showed that after each replacement the specific growth rate is higher, the lag phase of cells is decreased and higher biomass concentrations are achieved. Apart from the above, the desulfurization capability of cells in function with air flow rate in biphasic system was examined. A higher consumption rate of DBT than the respective production rate of 2-HBP occurred. This is attributed to the occlusion part of the produced 2-HBP within the cells. Additionally, the highest initial consumption rate of DBT for the first 6 hours was found for volumetric flow 43 L/h in the price of 0,0227 mmol DBT/g DCW/h. Comparison of 4,6 DM-DBT and DBT substrates in respect of desulphurisation rate at 4L/h air flow showed a higher initial consumption rate of the non-substituted molecule (0,165 mmol/g DCW/h) than that of the substituted one (0,0060 mmol/g DCW/h).

Πίνακας Περιεχομένων

Ευχαριστίες.....	i
Περίληψη.....	ii
Abstract.....	iii
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	3
1. Εισαγωγή.....	3
2. Σύσταση του αργού πετρελαίου.....	3
3. Το Θείο στο αργό πετρέλαιο.....	4
4. Περιβαλλοντικό αποτύπωμα ορυκτών καυσίμων.....	6
5. Νομοθετικές Διατάξεις.....	7
6. Μέθοδοι Αποθείωσης.....	9
6.1 Υδρογονοαποθείωση.....	9
6.2 Οξειδωτική αποθείωση.....	11
6.3 Αποθείωση με προσρόφηση.....	12
6.4 Βιολογική Αποθείωση.....	13
7. Μεταβολικά μονοπάτια.....	14
7.1 Αναερόβια αποθείωση.....	14
7.2 Αερόβια αποθείωση.....	14
8. Γενετική της Αποθείωσης του DBT.....	19
9. Παράγοντες που επηρεάζουν την Βιοαποθείωση.....	21
9.1 Χρόνος επώασης του βιοκαταλύτη.....	21
9.2 Θερμοκρασία και pH.....	22
9.3 Συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου.....	22
9.4 Αρχική συγκέντρωση του βιοκαταλύτη.....	23
9.5 Επίδραση υποκατεστημένων υποστρωμάτων στην αποθειωτική ικανότητα...24	
9.6 Επίδραση της μεταφοράς μάζας.....	24
9.7 Επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης του Θείου στην ανάπτυξη.....	25
9.8 Επίδραση του οργανικού διαλύτη και του λόγου οργανικής/υδατικής φάσης..25	
10. Πιλοτική Μονάδα Βιοαποθείωσης.....	26
10.1 Επιλογή Βιοκαταλύτη και Παραγωγή του.....	28
10.2 Επιλογή Βιοαντιδραστήρα.....	29
10.3 Διαχωρισμός του διφασικού μίγματος.....	31
11. Σύζευξη της Βιοαποθείωσης με άλλες τεχνικές.....	32
12. Μειονεκτήματα της Βιομηχανικής Εφαρμογής της Βιοαποθείωσης.....	33
13. Μελλοντικές προκλήσεις της Βιοαποθείωσης.....	34

ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ	36
14. Υλικά.....	36
14.1 Όργανα και Συσκευές.....	36
14.2 Μικροοργανισμοί.....	36
14.3 Θρεπτικά μέσα	37
15. Μέθοδοι.....	38
15.1 Ανάπτυξη μικροοργανισμού σε στερεή καλλιέργεια	38
15.2 Ανάπτυξη μικροοργανισμού σε υγρή καλλιέργεια	38
15.3 Προσδιορισμός αποθειωτικής ικανότητας κυττάρων (Dsz-test) σε υδατικό σύστημα.....	39
15.4 Ανάπτυξη μικροοργανισμού σε Βιοαντιδραστήρα με αλλαγή θρεπτικού μέσου	40
15.5 Αποθείωση σε διφασικό σύστημα	42
15.6 Μέθοδοι ανάλυσης	43
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	48
16.1 Επίδραση Πηγής θείου	48
16.2 Έλεγχος αποθειωτικής δράσης για διαφορετικές πηγές S.....	51
16.3 Επίδραση της συγκέντρωσης του DMSO στην κυτταρική ανάπτυξη.....	51
16.3.1 Υψηλές συγκεντρώσεις DMSO.....	52
16.3.2 Χαμηλές συγκεντρώσεις DMSO.....	53
16.4 Επίδραση της πηγής άνθρακα.....	56
16.4.1 Η Γλυκόζη ως πηγή άνθρακα	56
16.4.2 Η Σακχαρόζη ως πηγή άνθρακα.....	58
16.4.3 Η Γλυκερόλη ως πηγή άνθρακα.....	59
16.5 Ανάπτυξη σε Βιοαντιδραστήρα Διαλείποντος έργου.....	61
16.6 Ανάπτυξη σε βιοαντιδραστήρα με αλλαγές θρεπτικού μέσου	62
16.7 Ανάπτυξη σε Βιοαντιδραστήρα και αποθείωση σε διφασικό σύστημα για διαφορετικές παροχές αέρα.....	66
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ	75
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	78

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Εισαγωγή

Η παραγωγή ενέργειας στην σύγχρονη εποχή, αποτελεί πεδίο υψηλών προκλήσεων δεδομένης της επερχόμενης κλιματικής αλλαγής και των σοβαρών περιβαλλοντικών προβλημάτων που μαστιίζουν τον πλανήτη. Η δε κατανάλωση ενέργειας είναι συνυφασμένη με την οποιαδήποτε οικονομική δραστηριότητα και το βιοτικό επίπεδο της κάθε χώρας. Τα ορυκτά καύσιμα (προϊόντα διύλισης αργού πετρελαίου, φυσικό αέριο, άνθρακας) παίζουν το σημαντικότερο ρόλο στην δομή της ενεργειακής πυραμίδας καθώς είναι η κύρια πηγή αξιοποίησης για την παραγωγή ενέργειας [1]. Αν και τα αποθέματα ορυκτών καυσίμων συνεχώς εξαντλούνται, μελέτες δείχνουν πως θα παραμένουν για πολλές δεκαετίες ακόμη στο προσκήνιο.

Η καύση των ορυκτών καυσίμων απελευθερώνει στο περιβάλλον ρύπους όπως διοξείδιο του άνθρακα, διοξείδιο του θείου, νιτρικά και ανθρακικά οξέα κ.α. οδηγώντας σε πολλές μορφές ατμοσφαιρικής ρύπανσης. Οι εκπομπές διοξειδίου του θείου προς την ατμόσφαιρα, παραμένουν εδώ και δεκαετίες ένα ακανθώδες ζήτημα που εγείρει έντονες περιβαλλοντικές ανησυχίες. Άλλωστε τα οξείδια του θείου είναι από τους κυριότερους ρύπους-συντελεστές στην δημιουργία της όξινης βροχής και συνεπώς η μείωση τους αποτελεί άμεση προτεραιότητα διεθνών οργανισμών. Είναι φανερό πως για να μπορέσουν τα υγρά καύσιμα να ανταπεξέλθουν στις νέες περιβαλλοντικές απαιτήσεις θα πρέπει να συμβιβαστούν με τις εκάστοτε νομοθετικές διατάξεις περί της περιεκτικότητας τους σε εν δυνάμει ρύπους και δει στην προκειμένη περίπτωση του θείου.

Στην προσπάθεια μείωσης της περιεκτικότητας των καυσίμων σε θείο νέες αλλά και προϋπάρχουσες τεχνικές εφαρμόζονται. Η Υδρογονοαποθείωση (HDS) αποτελεί την επικρατέστερη εφαρμοζόμενη τεχνική παγκοσμίως. Ωστόσο η ανάγκη για παραγωγή καυσίμων πολύ χαμηλού θείου σε συνδυασμό με το υψηλό κόστος της μεθόδου, ωθούν στην αναζήτηση συμπληρωματικών τεχνικών. Η μικροβιακή αποθείωση των πετρελαιοειδών (BDS) είναι μία νέα προσέγγιση με ικανοποιητικά αποτελέσματα. Η έρευνα για βελτιστοποίηση της BDS βρίσκεται σε εξέλιξη, έχοντας φτάσει μέχρι σήμερα στην δημιουργία πιλοτικής μονάδας Βιοαποθείωσης. Ο συνδυασμός των δυο τεχνικών προβλέπεται μελλοντικά το πιθανότερο σενάριο από την πετροχημική βιομηχανία παρέχοντας μια αποδοτική και φιλική προς το περιβάλλον διεργασία αποθείωσης.

2. Σύσταση του αργού πετρελαίου

Από τα ορυκτά καύσιμα το αργό πετρέλαιο χρησιμοποιείται περισσότερο από κάθε άλλη πηγή ενέργειας παγκοσμίως. Σχηματίζεται από ένα σύνθετο μείγμα υδρογονανθράκων διαφόρων μοριακών μεγεθών και άλλα υγρά οργανικά συστατικά που βρίσκονται σε γεωλογικούς σχηματισμούς κάτω από την επιφάνεια της γης. Η χημική σύνθεση του αργού πετρελαίου διαφέρει από περιοχή σε περιοχή εξόρυξης. Έχει παρατηρηθεί ότι ακόμα και σε διαφορετικά σημεία εξόρυξης εντός του ίδιου κοιτάσματος η σύσταση του μπορεί να διαφέρει σημαντικά. Γενικότερα, παράμετροι που επηρεάζουν τη σύσταση του αποτελούν η τοποθεσία του πεδίου εξόρυξης, η ηλικία των σχηματισμών και το βάθος του πηγαδιού.

Οι υδρογονάνθρακες που περιέχονται στο αργό πετρέλαιο είναι οι παραφινικοί, κανονικοί και ισοπαραφινικοί, κυκλοπαραφινικοί ή ναφθενικοί όπως επίσης και αρωματικοί τόσο μονοπυρηνικοί όσο και πολυπυρηνικοί. Ακόρεστοι υδρογονάνθρακες (ολεφίνες) προκύπτουν σε επόμενα στάδια όταν το αργό πετρέλαιο υφίστανται διάφορες διεργασίες για την παραλαβή των κλασμάτων του. Το μοριακό βάρος των υδρογονανθράκων μπορεί να κυμαίνεται από το απλούστερο του μεθανίου έως και βαριά μόρια που περιέχουν 80 άτομα άνθρακα. Παράλληλα περιέχονται και οργανικές ενώσεις του θείου, του αζώτου, του οξυγόνου και σε ελάχιστες ποσότητες κάποια μέταλλα (Fe, V, Ni). Η στοιχειακή ανάλυση ενός τυπικού αργού πετρελαίου φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 1. Τυπική στοιχειακή ανάλυση αργού πετρελαίου [2]

Στοιχείο	Περιεκτικότητα (% wt.)
Άνθρακας	83.0% - 87.0%
Υδρογόνο	10.0% -14.0%
Άζωτο	0.1%- 2.0%
Οξυγόνο	0.05% - 1.5 %
Θείο	0.05 - 6.0 %
Μέταλλα	<1000 ppm

3. Το Θείο στο αργό πετρέλαιο

Το περιεχόμενο του αργού πετρελαίου σε Θείο κυμαίνεται από 0.05% έως 6% κατά βάρος ανάλογα με την πηγή εξόρυξης και τον τύπο του αργού πετρελαίου. Μάλιστα, κατατάσσεται με βάση την περιεκτικότητα σε θείο ως πετρέλαιο χαμηλού θείου (sweet crude oil) όταν αυτή είναι μικρότερη του 0,5% κατά βάρος και σε πετρέλαιο υψηλού θείου (sour crude oil) για μεγαλύτερη του 0,5%. Η περιεκτικότητα του σε S είναι εξαιρετικά σημαντική παράμετρος καθότι αυτή δίνει την απάντηση στη σκοπιμότητα της εξόρυξης και καθορίζει στο μεγαλύτερο βαθμό την τιμή του μαζί με την πυκνότητα του πετρελαίου κατά API. Κατά API, το αργό πετρελαίου ταξινομείται βάσει πυκνότητας ως ελαφρύ (35-60° API), ως μέσο (26-35 °API) και ελαφρύ (10-26 °API) [3]. Στον πίνακα 2 παρατίθεται η ταξινόμηση με βάση τις παραπάνω ιδιότητες γνωστών τύπων αργού πετρελαίου.

Πίνακας 2. Πυκνότητα κατά API και περιεκτικότητα σε S ορισμένων σημαντικών τύπων αργού πετρελαίου [3]

Ονομασία αργού πετρελαίου	Χώρα προέλευσης	Ταξινόμηση αργού πετρελαίου	Ιδιότητες	
			Πυκνότητα/ API	Θείο/wt %
Brent	ΗΠΑ	Ελαφρύ χαμηλού S	40,0	0,5
West Texas	ΗΠΑ	Ελαφρύ χαμηλού S	39,8	0,3
Forcados Export	Νιγηρία	Μέσου βάρους υψηλού S	29,5	0,2
Arabian Light Export	Σαουδική Αραβία	Μέσου βάρους υψηλού S	34,0	1,9
Kuwait Export Blend	Κουβέιτ	Μέσου βάρους υψηλού S	30,9	2,5
Maya Heavy Export	Μεξικό	Βαρύ υψηλού S	21,3	3,4

Ασφαλώς, πετρελαιοπηγές με μικρότερη περιεκτικότητα σε S είναι και οι πιο ανταγωνιστικές και προσοδοφόρες. Η περιεκτικότητα σε S προσδιορίζεται με φθορισμό ακτίνων X, με τη μέθοδο ASTM D-4294 (κατά ISO 20847).

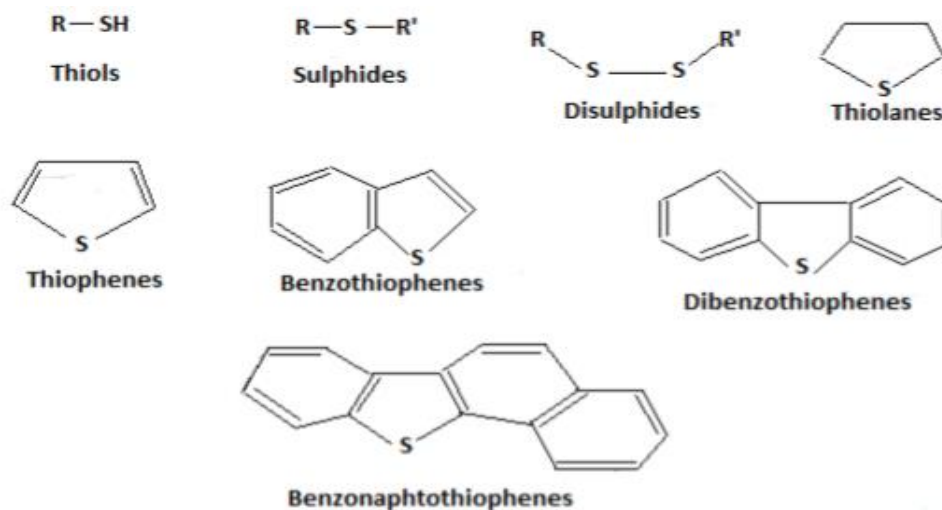
Στο αργό πετρέλαιο, το θείο είναι παρόν με την μορφή διαλυτών οργανικών ενώσεων. Έως τώρα έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερες από 200 θειούχες οργανικές ενώσεις. Ως προς την ταξινόμηση τους τρεις είναι οι κύριες ομάδες ενώσεων, παράγωγα των οποίων εντοπίζονται στο πετρέλαιο:

1. Αλειφατικές και αρωματικές θειόλες και τα παράγωγα οξείδωσής τους (δισουλφίδια-σουλφίδια).
2. Αλειφατικοί ή αρωματικοί θειοεστέρες.
3. Ετεροκυκλικές ενώσεις βασιζόμενες στον δακτύλιο του θειοφαινίου: Θειοφαινίο, Βενζοθειοφαινίο (BT), διβενζοθειοφαινίο (DBT) και όλα τα αλκυλο-υποκατεστημένα παράγωγα τους.

Από τις τρεις κατηγορίες, τα θειοφαινικά παράγωγα βρίσκονται στην συντριπτικά μεγαλύτερη πλειοψηφία στο αργό πετρέλαιο. Ενώσεις του θειοφαινίου αποτελούν το 50-95% του θείου στο αργό πετρέλαιο, με τα υποκατεστημένα διβενζοθειοφαινία να είναι η πιο κοινή ένωση στο αργό πετρέλαιο που προορίζεται για την παραγωγή diesel [4]. Αν θέλουμε να διακρίνουμε τις ενώσεις του θείου διαφορετικά με έναν πιο εύκολο τρόπο θα τις χωρίζαμε σε:

- Ετεροκυκλικές: Όλες οι αρωματικές, πολυαρωματικές ενώσεις και τα υποκατεστημένα παράγωγα τους (κυρίως του θειοφαινίου).
- Μη-Ετεροκυκλικές: Θειόλες, σουλφίδια, δισουλφίδια.

Η χημική δομή των κυριότερων οργανοθειικών ενώσεων στο αργό πετρέλαιο φαίνεται στο σχήμα που ακολουθεί.



Σχήμα 1. Οι κυριότερες οργανικές ενώσεις του S στο αργό πετρέλαιο [5]

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί πως η το περιεχόμενο σε θείο των κλασμάτων πετρελαίου διαφέρει όπως αποτυπώνεται στον παρακάτω πίνακα κατά τους Wauquier et al. [6]

Πίνακας 3. Είδη κλασμάτων πετρελαίου και τυπικές τιμές του περιεχομένου τους σε θείο [6]

Είδος κλάσματος	Συνολικό θείο (% wt)
Αργό πετρέλαιο	1,8
Βουτάνιο	0,0228
Ελαφριά βενζίνη	0.0240
Βαριά βενζίνη	0,026
Νάφθα	0,059
Κηροζίνη	0,17
Γκαζόιλ	1,40
Μαζούτ	3,17

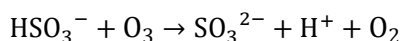
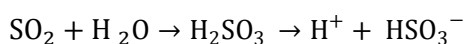
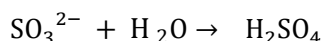
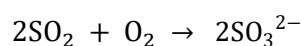
4. Περιβαλλοντικό αποτύπωμα ορυκτών καυσίμων

Αναμφίβολά, η παγκόσμια πολιτική που έχουν υιοθετήσει διεθνείς φορείς γύρω από τις εκπομπές αέριων ρύπων στηρίζεται πρωτίστως στην άμβλυση των παραγόντων που συντελούν στην επιδείνωση των περιβαλλοντικών προβλημάτων. Ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα ρύπανσης του περιβάλλοντος που σχετίζεται άμεσα με την καύση ορυκτών καυσίμων αποτελεί η όξινη βροχή. Ο όρος «όξινη» χρησιμοποιείται για να περιγράψει τον όξινο χαρακτήρα της βροχής λόγω των διαλυμένων σε αυτή όξινων συστατικών. Στην πραγματικότητα το pH της βροχής είναι εκ φύσεως όξινο λόγω τις διάλυσης στο νερό του διοξειδίου του άνθρακα προς σχηματισμό ανθρακικού οξέος. Η φυσιολογική βροχή έχει pH γύρω στην τιμή 5,6.

Η όξυνση της βροχής σε τιμές μικρότερες των φυσιολογικών, οφείλεται στην παρουσία θεικών και νιτρικών οξέων που σχηματίζονται στην ατμόσφαιρα αυξάνοντας της οξύτητα της φυσιολογικής βροχής. Η προέλευση των παραπάνω ρύπων που σχηματίζουν την όξινη βροχή είναι κυρίως ανθρωπογενής και οφείλεται στην καύση ορυκτών καυσίμων (πετρελαιοειδή, φυσικό αέριο, άνθρακας).

Κατά την καύση ορυκτών καυσίμων εκπέμπονται διοξείδιο του θείου (SO₂), οξειδία του αζώτου (NO_x) και αιωρούμενα σωματίδια. Τα αέρια παρασύρονται από τους επικρατούντες ανέμους όπου αλληλοεπιδρούν με στοιχεία της ατμοσφαιρας (O₂, H₂O), σχηματίζουν αντίστοιχα θειικό και νιτρικό οξύ. Τα οξέα παραμένουν στην αέρια φάση παρουσία υψηλών θερμοκρασιών, μεταφερόμενα με τη διεύθυνση των ανέμων. Με τη μείωση της θερμοκρασίας συμπυκνώνονται στη μορφή σταγόνων αερολυμάτων και κατόπιν τα διαβρωτικά οξέα, κατακρημνίζονται στο έδαφος ως όξινη εναπόθεση σε υγρή ή στερεή μορφή.

Ορισμένες από τις αντιδράσεις του SO₂ που γίνονται στην ατμόσφαιρα περιλαμβάνουν [7]:



Αξίζει να τονιστεί πως τα επίπεδα διοξειδίου του θείου στην ατμόσφαιρα είναι υψηλότερα συγκριτικά με αυτά του NO_x, επομένως και η συνεισφορά του στην οξύτητα της ατμόσφαιρας είναι ισχυρότερη [7].

Η όξινη βροχή ως απόρροια της εντατικής εκμετάλλευσης των ορυκτών καυσίμων έχει έντονες επιπτώσεις τόσο στο φυσικό περιβάλλον όσο και στην ανθρώπινη υγεία. Η μείωση του pH στα επιφανειακά ύδατα οδηγεί σε καταστροφή της φυσικής μικροχλωρίδας (πλακτόν) και προβλήματα επιβίωσης σε μικρότερα-ευαίσθητα στην οξύτητα- είδη υδρόβιας ζωής. Πολλοί από τους υδρόβιους και αμφίβιους οργανισμούς έχουν ένα κρίσιμο pH πέρα από το οποίο δεν μπορούν να επιβιώσουν, επηρεάζοντας και την διατήρηση άλλων ειδών της τροφικής αλυσίδας. Έχει διαπιστωθεί σε ορισμένα είδη λόγω της όξινης εναπόθεσης, αύξηση του ρυθμού θνησιμότητας, αδυναμία αναπαραγωγής, σκελετικές δυσμορφίες και μεγαλύτερη πρόσληψη βαρέων μετάλλων [8]. Στα δάση, η επίδραση της όξινης ομίχλης μαζί με την όξινη βροχή προσβάλλει το φύλλωμα των δέντρων και τις ρίζες (όξυνση του εδάφους) οδηγεί σε τραυματισμούς, και τελικά σε ολική καταστροφή των δένδρων. Επιπλέον αφαιρεί από το έδαφος μέταλλα και θρεπτικά χρήσιμα για τα φυτά. Τέλος, όξινες αποθέσεις πάνω σε μαρμάρινες κατασκευές (ιστορικά μνημεία κ.α.) οδηγούν στην γυψοποίηση και στον θρυμματισμό τους. Στην ανθρώπινη υγεία οι επιδράσεις είναι έμμεσες και σχετίζονται με την αλληλεπίδραση του ανθρώπου με την τροφική αλυσίδα και τα αποθέματα νερού. Μία έμμεση επίδραση της όξινης βροχής στην υγεία αφορά τοξικά βαρέα μέταλλα που απελευθερώνονται από το έδαφος όταν το τελευταίο γίνεται πιο όξινο [9]. Κατά την μεταφορά τους στον υδροφόρο ορίζοντα και την πόση από τον άνθρωπο, πιθανή συσσώρευση τους οδηγεί σε προβλήματα όπως άσμα, ξηρό βήχα, ερεθισμό στη μύτη, τα μάτια και το λαιμό.

Πέραν της όξινης βροχής, το θείο συνιστά αιτία κλειδί για την παραγωγή αιωρούμενων σωματιδίων (Particulate Matter, PM). Η συνολική εκπομπή σωματιδίων έχει αποδειχθεί ανάλογη της περιεκτικότητας των καυσίμων σε θείο. Σύμφωνα με την Υπηρεσία Περιβαλλοντικής Προστασίας των ΗΠΑ (US EPA) το 2% του θείου που περιέχεται στο ντίζελ μετατρέπεται απευθείας σε αιωρούμενα σωματίδια κατά την καύση. Πλήθος ερευνών συνδέουν την ατμοσφαιρική ρύπανση εξαιτίας των αιωρούμενων σωματιδίων με επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία περιλαμβάνοντας πρόωρους θανάτους σε ανθρώπους με καρδιακά και αναπνευστικά προβλήματα, καρκινογένεση στους πνεύμονες, ερεθισμό των αναπνευστικών οδών, βήχα ή δυσκολία στην αναπνοή. Ακόμη, έρευνες έχουν δείξει πώς αυξημένες συγκεντρώσεις SO₂ μπορούν να προκαλέσουν βρογχικό ερεθισμό και κρίση άσθματος σε άτομα με προδιάθεση [10].

Για την αντιμετώπιση της όξινης βροχής και εν γένει των γενεσιουργών προβλημάτων του θείου καθίσταται αναγκαίος ο περιορισμός εκπομπών του διοξειδίου του θείου. Τα σημαντικότερα μέτρα προς την κατεύθυνση αυτή περιλαμβάνουν την αποθείωση των ορυκτών καυσίμων και τη χρήση φίλτρων ή καταλυτών καυσαερίων όπου εντοπίζονται εκπομπές.

5. Νομοθετικές Διατάξεις

Λαμβάνοντας υπόψιν τις παραπάνω οικολογικές και μη επιπτώσεις η περιβαλλοντική νομοθεσία σε παγκόσμια κλίμακα θεσμοθετεί νόμους για να περιορίσει τα επίπεδα θείου στις μεταφορές με απώτερο σκοπό να μειώσει τις εκπομπές SO_x στο περιβάλλον.

Ήδη από το 1979 ανεπτυγμένες χώρες όπως οι ΗΠΑ, ο Καναδάς, η Ιαπωνία και τα Ευρωπαϊκά έθνη υπέγραψαν πολλές συμφωνίες με σκοπό να ρυθμίσουν και να μειώσουν τις εκπομπές SO₂. Οι περισσότερες από τις συμφωνίες στόχευαν στα καύσιμα μεταφοράς καθότι αυτά αποτελούν την κυριότερη πηγή ρύπων. Το 2006 η υπηρεσία περιβαλλοντικής προστασίας των ΗΠΑ (US EPA) επέβαλλε μέγιστη περιεκτικότητα σε S

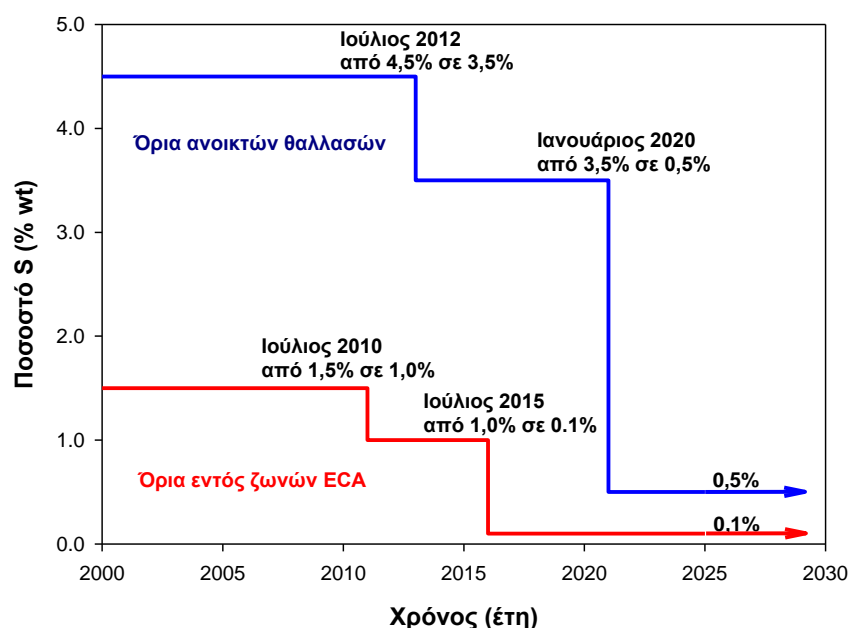
τα 15ppm στο diesel (Ultra Low Sulfur Diesel, ULSD) και 30 ppm για την βενζίνη. Ο κανονισμός αφορούσε όλα τα οχήματα καθώς και οχήματα και εξοπλισμό «εκτός δρόμου». Το συμβούλιο της Ευρώπης (CEN) από το 1993 έθεσε με μία σειρά κανονισμών στα επίπεδα του θείου στα καύσιμα με τον ονομασία EURO 1,2,3,4,5, όπως φαίνονται στο πίνακα 4. Τα όρια αναφέρονται σε επιβατηγά και επαγγελματικά οχήματα ελαφρού τύπου. Για βαρέα οχήματα υπάρχουν οι αντίστοιχοι περιορισμοί.

Πίνακας 4. Ευρωπαϊκά πρότυπα εκπομπών ως προς τα επίπεδα θείου στα καύσιμα οχημάτων ελαφρού τύπου

Ονομασία	Ευρωπαϊκός κανονισμός	Εφαρμογή από	Περιεκτικότητα σε S (ppm)
Euro 1	EN 590:1993 (d)	Οκτώβριος 1994	2000 (diesel)
	EN 228:1993 (g)		1000 (diesel)
Euro 2	-	Οκτώβριος 1996	500 (diesel, βενζίνη)
Euro 3	EN 590:1999 (d)	Ιανουάριος 2000	350 (diesel)
	EN 228:1999 (g)		150 (βενζίνη)
Euro 4	EN 590:2004 (d)	Ιανουάριος 2005	50 (diesel, βενζίνη)
	EN 228:2004 (g)		
Euro 5	EN 590:2009	Ιανουάριος 2009	10 (diesel, βενζίνη)

Το 2015 τέθηκε σε ισχύ η οδηγία Euro 6 του ευρωπαϊκού κανονισμού, η οποία ως προς τα επίπεδα του S δεν προβλέπει διαφορά με την οδηγία Euro 5. Η ισχύουσα νομοθεσία σήμερα ορίζει η περιεκτικότητα των καυσίμων μεταφοράς σε θείο να είναι μικρότερη των 10ppm. Επιπλέον, από το 2008 θεσπίστηκε και η ποσότητα του θείου στο πετρέλαιο θέρμανσης από τα 2000ppm στα 1000ppm. Στην Ελλάδα ως κράτος μέλος της ευρωπαϊκής ένωσης ισχύουν οι ίδιες νομοθετικές διατάξεις. Η πιο πρόσφατη νομοθετική πράξη ήταν τη 9^η Δεκεμβρίου 2016 όπου η Ελλάδα προχώρησε σε εναρμόνιση της Ελληνικής Νομοθεσίας με την (ΕΕ) οδηγία 2016/802 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου (Αρ. ΦΕΚ 3958, Τεύχος Β' 9/12/16).

Το Σεπτέμβριο του 2012 το ευρωπαϊκό κοινοβούλιο ενέκρινε μια πρόταση που προέβλεπε νέα όρια θείου στα καύσιμα ναυτιλίας από το 2020. Οι νέοι κανονισμοί έφεραν την ευρωπαϊκή νομοθεσία σε συμφωνία με τα όρια που έχουν καθοριστεί από τον Διεθνή οργανισμό ναυτιλίας (IMO). Οι διατάξεις αυτές προβλέπουν ότι τα γενικά επίπεδα θείου στις ευρωπαϊκές θάλασσες θα πρέπει να μειωθούν από το 3.5% κατά βάρος που είναι σήμερα στο 0.5% έως τον Ιανουάριο του 2020. Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στις περιοχές ελεγχόμενων εκπομπών ρύπων (Emission Control Areas, ECA) όπου περιλαμβάνονται κλειστές θάλασσες και πορθμοί. Ως ECA στα όρια της ευρωπαϊκής ένωσης ορίζονται η βαλτική θάλασσα, η βόρεια θάλασσα και τα στενά της Μάγχης. Λόγω του ιδιαίτερου κλίματος και γεωγραφικής θέσης αυτών των θαλασσών από τον Ιούλιο του 2015 έχουν τεθεί αυστηρότερα όρια εκπομπών που θέτουν την περιεκτικότητα των καυσίμων σε θείο μικρότερη του 0.1% εντός των ECA.



Διάγραμμα 1. Ποσοστά θείου στα καύσιμα ναυτιλίας όπως ορίζονται από τις νομοθετικές διατάξεις

6. Μέθοδοι Αποθείωσης

Γενικότερα με τον όρο αποθείωση αναφερόμαστε στην αφαίρεση ή μείωση της περιεκτικότητας σε S κλασμάτων πετρελαιοειδών ούτως ώστε να βρίσκονται εντός των προκαθορισμένων ορίων. Πλήθος τεχνικών έχουν κατά καιρούς προταθεί προς τον σκοπό αυτό με κυριότερες τις παρακάτω [11]:

- Υδρογονοαποθείωση (Hydrodesulfurization, HDS)
- Οξειδωτική αποθείωση (Oxidative Desulfurization, ODS)
- Προσροφητική αποθείωση (Adsorptive Desulfurization)
- Βιολογική Αποθείωση (Biodesulfurization, BDS)

Από τις παραπάνω η υδρογονοαποθείωση έχει ευρεία εφαρμογή σε μονάδες διύλισης ανά τον κόσμο ενώ η βιοαποθείωση αν και σε πιλοτικό στάδιο ακόμη, κερδίζει συνεχώς έδαφος ως εναλλακτική μέθοδος, ιδιαίτερα ύστερα από τις νέες περιβαλλοντικές διατάξεις που αφορούν τις εκπομπές SO₂ στην ατμόσφαιρα.

6.1 Υδρογονοαποθείωση

Σε ένα διυλιστήριο πάσης φύσεως υδρογονοκατεργασία αφορά την υδρογόνωση ακόρεστων υδρογονανθράκων με στόχο την απομάκρυνση S, O και N από τον οργανικό κορμό της ένωσης. Η υδρογονοαποθείωση είναι μια καταλυτική διαδικασία που μετατρέπει το οργανικό θείο που περιέχεται στις ενώσεις των πετρελαιοειδών σε αέριο υδρόθειο H₂S, έπειτα από την αντίδραση των πετρελαιοειδών με το υδρογόνο παρουσία ενός αποδοτικού καταλύτη. Συνηθέστερα χρησιμοποιείται συνδυασμένος καταλύτης μετάλλων που περιέχει κοβάλτιο (Co) και μολυβδένιο (Mo) σε φορέα αλούμινα [12]. Κατόπιν το παραγόμενο H₂S μετατρέπεται σε στοιχειακό S, σύμφωνα με την μέθοδο Claus. Η καταλυτική αντίδραση περιλαμβάνει αρχικά το σπάσιμο του δεσμού C-X όπου X το S (ή N,O) και το σχηματισμό των C-H και H-X. Τυπικές αντιδράσεις υδρογονοαποθείωσης κλασμάτων πετρελαίου φαίνονται παρακάτω.

ανεπιθύμητη οσμή και χρώμα. Τέλος, μέσα από την HDS βελτιώνονται τα χαρακτηριστικά πυρόλυσης των ενώσεων [15].

Μολαταύτα η HDS, παρά την καθολική χρήση της διαθέτει σημαντικά μειονεκτήματα, αρκετά ώστε οι βαριές βιομηχανίες του πετρελαίου να στρέφονται σε εναλλακτικές μεθόδους. Ανάμεσα σε αυτά επισημαίνουμε την καταστροφική δράση του παραγόμενου H_2S στις μεταλλικές επιφάνειες του μηχανολογικού εξοπλισμού, όπου υφίστανται **διάβρωση**, φαινόμενο που επιδεινώνεται παρουσία υγρασίας. Επιπλέον, οι συνθήκες λειτουργίας, λόγω των υψηλών θερμοκρασιών και πιέσεων που λαμβάνουν χώρα αυξάνουν κατά πολύ το **λειτουργικό κόστος** της μονάδας. Στο συνολικό κόστος προστίθεται και το αρκετά υψηλό **κόστος εγκατάστασης** της μονάδας.

Ως προς τις συνθήκες λειτουργίας έχει διαπιστωθεί ότι η έκθεση των κλασμάτων στις υψηλές θερμοκρασίες ανώτερες των $360^\circ C$ υποβιβάζουν την **θερμική αξία** των επεξεργασμένων προϊόντων [15]. Ακόμη, το ατμοσφαιρικό υδρογόνο της μεθόδου προκαλεί την υδρογόνωση των ολεφινικών συστατικών, μειώνοντας επιπλέον την **θερμογόνο δύναμη** του καυσίμου [16].

Αξίζει να σημειωθεί πως η μέθοδος της υδρογονοαποθείωσης δεν είναι ικανή να απομακρύνει το θείο από **θειοφαινικά συστατικά** όπως τα διβενζοθειοφαινία (DBTs) και τα βενζοθειοφαινία (BTs) πολύ δε περισσότερο από τα ανθεκτικότερα **υποκαταστημένα παράγωγα** τους που αποτελούν και τις επικρατέστερες μορφές θείου στο αργό πετρέλαιο [17].

Συμπερασματικά, λαμβάνοντας υπόψιν τα μειονεκτήματα της μεθόδου και τις αδυναμίες στην εφαρμογή της, η παγκόσμια έρευνα, υπό την πίεση των περιβαλλοντικών μέτρων ωθείται στην αναζήτηση οικονομικότερων και αποδοτικότερων εναλλακτικών.

6.2 Οξειδωτική αποθείωση

Βασική λειτουργία αυτής της μεθόδου είναι η οξείδωση των θειούχων συστατικών στα αντίστοιχα σουλφοξείδια (1-οξείδια) και σουλφόνες (1,1 διοξείδια). Ουσιαστικά περιλαμβάνει την προσθήκη ενός ή δύο ατόμων οξυγόνου σε βαριά σουλφίδια, χρησιμοποιώντας κατάλληλα οξειδωτικά μέσα, χωρίς να καταστρέφεται ο δεσμός άνθρακα-θείου, δίνοντας σουλφοξείδια και σουλφόνες αντίστοιχα. Ως οξειδωτικά μέσα χρησιμοποιούνται το υπεροξείδιο του υδρογόνου ως φιλικότερο προς το περιβάλλον αλλά και οργανικά υπερόξυ-οξέα (φορμικό, ακετικό, κλπ.), ακόμη και μοριακό οξυγόνο. Προς επιτάχυνση της οξείδωσης γίνεται χρήση μεγάλης ποικιλίας καταλυτών.

Τα οξειδωμένα συστατικά μπορούν να διαχωριστούν με εκχύλιση, απόσταξη ή απορρόφηση. Ο διαχωρισμός τους στηρίζεται στην μεγαλύτερη πολικότητα που αποκοτούν μετά την οξείδωση τα σουλφοξείδια και οι σουλφόνες σε σχέση με τους υπόλοιπους υδρογονάνθρακες. Οι βιομηχανίες πετρελαίου συνήθως εφαρμόζουν εκχύλιση με διαλύτη για να αφαιρέσουν τα συστατικά του θείου από το ελαφρύ αργό. Ο διαλύτης ανακτάται μέσω απόσταξης και επαναχρησιμοποιείται [18]. Παρά ταύτα η διαφορά στην πολικότητα που αποκτούν οι οξειδωμένες ενώσεις του θείου συγκριτικά με άλλους αρωματικούς υδρογονάνθρακες είναι συχνά μικρή. Τούτο ενέχει τον κίνδυνο κατά την εκχύλιση με διαλύτη να απωλεσθούν χρήσιμοι υδρογονάνθρακες για την αξία του καυσίμου. Προς αποφυγή αυτού εφαρμόζεται η προσέγγιση της εκλεκτικής οξείδωσης των θειούχων ενώσεων που συνοδεύεται από την απομάκρυνση τους μέσω εκλεκτικής εκχέλισης με διαλύτη.

Συγκριτικά με την υδρογονοαποθείωση, η ODS διεξάγεται σε ήπιες συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης γεγονός που δεν αυξάνει σημαντικά το κόστος ενώ δεν υπάρχει

ανάγκη για χρήση του ακριβού H_2 . Αντιθέτως, περιλαμβάνει χρήση μεγάλων ποσοτήτων οξειδωτικού μέσου και την διαδικασία ανάκτησης του καταλύτη.

Επιπλέον έχει παρατηρηθεί ότι η επίδραση της ακτινοβολίας στις οργανοθειικές ενώσεις παρουσία αέρα που περιέχει όζον είναι ικανή να προκαλέσει οξειδωτική αποθείωση. Κατά αυτόν τον τρόπο οι πιο ελαφριές ενώσεις του θείου, όπως οι θειόλες μπορούν να οξειδωθούν σε σουλφοξείδια και σουλφόνες [19]. Εναλλακτικές μελέτες απέδειξαν ότι η οξειδωτική αποθείωση υποβοηθάτε σημαντικά από υπερήχους. Τέλος, έχει παρατηρηθεί η δυνατότητα φωτοχημικής αποθείωσης του DBT όπου οι οργανικές ενώσεις υπόκεινται σε υπεριώδες φως, πραγματοποιούνται φώτο-οξειδωτικές αντιδράσεις και το S αφαιρείται με την μορφή SO_4^{2-} στην υδατική φάση. Ωστόσο, να τονίσουμε ότι για τις παραπάνω τεχνικές της οξειδωτικής αποθείωσης δεν υπάρχει τάση προς βιομηχανική εφαρμογή τους.

6.3 Αποθείωση με προσρόφηση

Αποθείωση με προσρόφηση αναφέρεται στην διαδικασία όπου ένα στερεό ροφητικό μέσο χρησιμοποιείται για να απομακρύνει μια θειούχα ένωση με φυσικό τρόπο. Ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην επιλογή του ροφητικού μέσου παίζουν δύο παράγοντες: Η επαρκή εκλεκτικότητα του στην ρόφηση μόνο των οργανοθειικών ενώσεων από ένα μίγμα άλλων πολυαρωματικών ενώσεων και συστατικά που περιέχουν οξυγόνο και άζωτο, καθώς και η ικανότητα του να αναγεννάται. Η απομάκρυνση του DBT και άλλων θειούχων συστατικών έχει μελετηθεί με αρκετά ροφητικά μέσα με κυριότερα τον ζεόλιθο, τον ενεργό άνθρακα, το Al_2O_3 , τις αργυροπυριτικές ενώσεις, το οξείδιο του ψευδαργύρου και άλλα. Εντούτοις, ορισμένα μόνο καταδεικνύουν εκλεκτικότητα στην αποθείωση των ανθεκτικών (στην HDS) οργανικών ενώσεων όπως το 4,6-DMDBT.

Ο ενεργός άνθρακας είναι ευρέως χρησιμοποιούμενος λόγω του μεγάλου πορώδους και της σημαντικής ειδικής επιφάνειας που διαθέτει. Μάλιστα έχει αποδειχθεί ότι εμφανίζει καλή ροφητική ικανότητα σε ενώσεις όπως θειοφαινία, σουλφίδια και μερκαπτάνες [20]. Τροποποιήσεις στην επιφάνεια του άνθρακα με την προσθήκη μετάλλων έχουν θετική επίδραση στην προσρόφηση του DBT. Ακριβέστερα η προσθήκη μετάλλων όπως ο χαλκός και ο άνθρακας αυξάνει την χωρητικότητα και την εκλεκτικότητα της προσρόφησης καθώς και την απόδοση των καταλυτικών μετατροπών στην επιφάνεια [21]. Πιο πρόσφατα, μελετήθηκαν τα αποκαλούμενα μεταλλικά οργανικά πλαίσια (MOFs) που αποτελούνται από μεταλλικά κατιόντα συνδεδεμένα από οργανικούς συνδέσμους πολλών χαρακτηριστικών ομάδων. Τα MOFs δείχνουν σημαντική ροφητική ικανότητα ως προς τα μόρια θειοφαινίου ακόμη και παρουσία άλλων αρωματικών ουσιών. Συνηθέστερα η μέθοδος των MOFs εφαρμόζεται σε αντιδραστήρες καταλυτικής κλίνης.

Εναλλακτική μέθοδος αποτελεί η προσροφητική αποθείωση με χημική αντίδραση (Reactive Adsorption Desulfurization, RADS). Η τεχνική RADS συνδυάζει τα πλεονεκτήματα της καταλυτικής αντίδρασης όπως στην HDS και τα οφέλη της αποθείωσης με προσρόφηση. Στην RADS, οι οργανικές ενώσεις του θείου αντιδρούν με το στερεό ροφητικό μέσο μεταλλικής φύσεως παρουσία υδρογόνου. Ωστόσο, η μέθοδος απαιτεί υψηλές θερμοκρασίες γεγονός που αυξάνει το λειτουργικό κόστος.

Συγκεντρωτικά, η μέθοδος της προσρόφησης είναι ιδιαίτερα ελκυστική από οικονομικής άποψης έναντι της HDS λόγω των απλών συνθηκών λειτουργίας και της διαθεσιμότητας μη δαπανηρών και επαναχρησιμοποιήσιμων ροφητικών μέσων. Αν και σαν μέθοδος έχει αποδειχθεί ικανή να μειώσει αρκετά τα ποσοστά θείου διαθέτει σημαντικά μειονεκτήματα. Σπουδαιότερο μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί η ανταγωνιστική

δράση στην προσρόφηση των αρωματικών και ολεφινικών συστατικών, μειώνοντας έτσι την ικανότητα ρόφησης θειούχων ενώσεων των μέσων [22]. Η αναζήτηση του κατάλληλου ροφητικού μέσου πρέπει να γίνεται με παραμέτρους την υψηλή εκλεκτικότητα παρουσία πολλών αρωματικών ενώσεων, την μεγάλη χωρητικότητα και την εύκολη αναγέννηση του.

6.4 Βιολογική Αποθείωση

Στα πλαίσια της έρευνας εναλλακτικών τεχνικών αποθείωσης αλλά και εντοπίζοντας τις αδυναμίες της καθιερωμένης HDS, η βιολογική αποθείωση προβάλλει ως η εν δυνάμει επικρατέστερη καινοτόμα τεχνική. Επιδιώκει να συνδυάσει την μοριακή βιολογία με πεδία της βιοχημικής και μεταβολικής μηχανικής με σκοπό την ανάπτυξη εφαρμοσμένης τεχνικής για να ενσωματωθεί συμπληρωματικά στα σύγχρονα διυλιστήρια. Η Βιοαποθείωση περιλαμβάνει την χρήση μικροοργανισμών (κυρίως βακτήρια αλλά και ορισμένων μυκήτων) που αφαιρούν το S από θειούχες οργανικές ενώσεις κλασμάτων πετρελαιοειδών μετατρέποντας αυτές σε μη θειούχα συστατικά, χωρίς ωστόσο να καταστρέφουν τον οργανικό κορμό των μορίων.

Η περισσότερη ερευνά γύρω από τον μεταβολισμό του S έχει εστιάσει σε στελέχη του γένους *Rhodococcus* για τον οποίο έχει επιβεβαιωθεί ικανοποιητική αποθεωτική ικανότητα. Ιδιαίτερα ο *Rhodococcus* κρίνεται αρκετά κατάλληλος για μεταβολισμό υδρογονανθράκων. Παράλληλα έχουν μελετηθεί και πλήθος άλλων μικροοργανισμών όπως αυτοί που συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 5. Γένος και παραδείγματα μικροοργανισμών που έχουν μελετηθεί ως προς την αποθεωτική τους δράση [23]

<i>Gordonia</i>	<i>Gordonia alkanivorans</i> RIPI90A <i>Gordonia alkanivorans</i> strain1B
<i>Mycobacterium</i>	<i>Mycobacterium</i> sp. ZD-19 <i>Mycobacterium</i> sp. X7B <i>Mycobacterium goodii</i> X7B
<i>Rhodococcus</i>	<i>Rhodococcus erythropolis</i> IGTS8 <i>Rhodococcus</i> sp. strainP32C1 <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC 53968
<i>Microbacterium</i> strain ZD-M2	<i>Microbacterium</i> strain ZD-M2
<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i> UP-1 <i>Pseudomonas delafieldii</i> R-8
<i>Sphingomonas</i>	<i>Sphingomonas subarctica</i>

Να τονίσουμε πως η επιλογή του μικροοργανισμού σε μια μονάδα Βιοαποθείωσης είναι συνάρτηση πολλών παραγόντων με βασικότερους τον ρυθμό ανάπτυξη του και την αποθεωτική του ικανότητα. Επιπλέον παράμετροι είναι το είδος των οργανικών ενώσεων του S που πρόκειται να μεταβολισμού και η συγκέντρωσή τους, η τεχνική που χρησιμοποιείται για την αποθείωση των κυττάρων (growing/resting cells), ύπαρξη αερισμού, η θερμοκρασία κ.α. Από το είδος του μικροοργανισμού εξαρτάται και το μεταβολικό μονοπάτι που θα ακολουθήσει η αποθείωση.

7. Μεταβολικά μονοπάτια

Στην αναζήτηση των μηχανισμών αποθείωσης, το DBT καθότι αποτελεί το συνηθέστερο θειούχο οργανικό μόριο στο αργό πετρέλαιο, έχει καθιερωθεί ως συστατικό πρότυπο για την περαιτέρω μελέτη της βιοαποθείωσης.

7.1 Αναερόβια αποθείωση

Αρκετά αναερόβια στελέχη γνωστά ως θειοαναγωγικά βακτήρια (SRB) έχουν δείξει την ικανότητα να απομακρύνουν ενώσεις του S από ορυκτά καύσιμα εφαρμόζοντας αναγωγική σχάση των δεσμών C-S. Τα μεταβολικά μονοπάτια που ακολουθούν τους δίνουν το συγκριτικό πλεονέκτημα μετατροπής του DBT απευθείας σε H₂S παρουσία ενός αναγωγικού παράγοντα. Ακόμη, κάτω από αναερόβιες συνθήκες, η οξειδωση των υδρογονανθράκων προς ανεπιθύμητες ενώσεις αποφεύγεται.

Παράδειγμα αναερόβιου μικροοργανισμού αποτελεί ο *Desulfuvibrio desulfuricans M6* με την δυνατότητα να ανάγει το DBT σε διφαινύλιο και H₂S [24]. Επιπλέον μικροοργανισμοί που δρουν κάτω από αναερόβιες συνθήκες έχουν αναφερθεί οι *Desulfomicrobium scambium* και *Desulfonivibrio longreachii* με μικρή όμως ικανότητα αποδόμησης του DBT. Το ίδιο μικρή παρατηρήθηκε και η ικανότητα μείωσης του θείου από ελεγχόμενη αναερόβια καλλιέργεια SRB σε δείγματα ασφάλτου και gasoil κενού [25]. Συμπερασματικά, όπως πολλές αναφορές αποδεικνύουν, η αποθείωση κάτω από αναερόβιες συνθήκες αν και αποφεύγει κόστη που σχετίζονται με τον αερισμό και παρέχει το πλεονέκτημα απευθείας απελευθέρωσης του S ως αέριο, δεν μπορεί να αναπτυχθεί σε βιομηχανική εφαρμογή εξαιτίας του χαμηλού βαθμού αποθειωτικής ικανότητας.

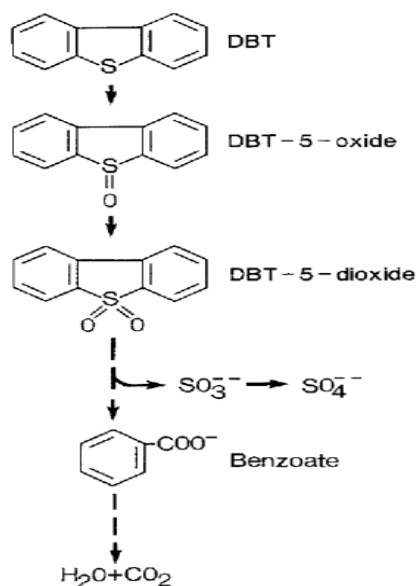
7.2 Αερόβια αποθείωση

Πολλά αερόβια βακτήρια μετατρέπουν τις θειούχες ενώσεις με τους εξής μηχανισμούς: διάσπαση δεσμών C-S (αναγωγική δράση), διάσπαση δεσμών C-C (οξειδωτική δράση), διάσπαση δεσμών C-S (οξειδωτική δράση). Διακρίνουμε δυο κύρια είδη αερόβιων μεταβολικών μονοπατιών: Το μονοπάτι Kodama και το μεταβολικό μονοπάτι 4S. Το μεν πρώτο πρόκειται για ένα μονοπάτι καταστροφής οργανικού δακτυλίου ενώ το δεύτερο αφήνει τον οργανικό σκελετό του μορίου άθικτο.

7.2.1 Μονοπάτι Kodama - Μηχανισμός Καταστροφής Δακτυλίου

Ο μηχανισμός Kodama (kodama pathway) προτάθηκε το 1973 και είναι το αντιπροσωπευτικότερο παράδειγμα μηχανισμού καταστροφής οργανικού δακτυλίου [26]. Σύμφωνα με αυτόν, στο μόριο του DBT προσβάλλονται αρχικά τα άτομα του άνθρακα που βρίσκονται στο περιφερειακό δακτύλιο του βενζολίου ακολουθούμενη από διάσπαση του δακτυλίου. Διακρίνεται σε 3 στάδια: υδροξυλίωση, σχάση του δακτυλίου και υδρόλυση. Μετά από διαδοχικές οξειδώσεις σχηματίζεται τελικό προϊόν το 3-υδρόξυ-2-φόρμυλο-βενζοθειοφάνιο (HFBT) που είναι διαλυτό στο νερό. Ωστόσο με τον μηχανισμό αυτό στο τελικό προϊόν παραμένει το S στον οργανικό κορμό με τη διαφορά ότι καθίσταται υδατοδιαλυτός. Αναφορές αποδεικνύουν ότι το μεταβολικό μονοπάτι Kodama χρησιμοποιείται από τους *Pseudomonas* [27], *Beijerinckia* [28] και *Rhizobium* [29]. Ένα δεύτερο μεταβολικό μονοπάτι καταστροφής του δακτυλίου προτάθηκε αργότερα από τους van Afferden et al [30] χρησιμοποιώντας το στέλεχος *Brevibacterium sp. Strain DO* που έχει την ικανότητα να χρησιμοποιεί το DBT ως την μοναδική πηγή S, C και ενέργειας. Το αρχικό DBT μεταβολίζεται προς σχηματισμό σουλφοξειδίου (DBTO), σουλφόνης (DBTO₂) και βενζοϊκού ιόντος ως τελικό προϊόν. Παράλληλα απελευθερώνεται και το S στοιχειομετρικά υπό την μορφή θειώδους ανιόντος (SO₃²⁻), το

οποίο ευκολά οξειδώνεται προς θειικό ιόν (SO_4^{2-}). Στο *σχήμα 3* περιγράφεται το μεταβολικό μονοπάτι των van Afferden et al.



Σχήμα 3. Μηχανισμός Καταστροφής δακτυλίου όπως προτάθηκε από τους Afferden et al, 1990 [30]

Παρά την βιολογική αποικοδόμηση του DBT που προσφέρει ένας μηχανισμός διάσπασης του δακτυλίου, δεν θα μπορούσε να εφαρμοστεί εμπορικά καθότι προσβάλλει και καταστρέφει τον οργανικό σκελετό των μορίων, μειώνοντας έτσι την θερμογόνο δύναμη του καυσίμου.

7.2.2 Μονοπάτι 4S

Ο σημαντικότερος μηχανισμός απευθείας προσβολής του S σε αερόβιες συνθήκες αποτελεί το μεταβολικό μονοπάτι 4S ("4S" pathway) που μεταβολίζει το DBT αφήνοντας ανέγγιχτο τον οργανικό σκελετό και συνεπώς δεν επηρεάζεται η θερμική αξία των πετρελαιοειδών. Καλείται «4S» λόγω των 4 ενδιάμεσων που σχηματίζονται (DBTO-σουλφοξείδιο, DBT-σουλφόνη, HBPS, SO_3^{2-}) και περιέχουν S. Η προσβολή γίνεται στο άτομο του S με οξειδωτική σχάση του δεσμού C-S (οξειδωτική βιοαποθείωση). Κατά τους Oldfield et al [31] ο μηχανισμός διακρίνεται σε 3 στάδια: I. Ενεργοποίηση του θειοφαινικού δακτυλίου με σκοπό τη διάσπαση με οξείδωση του θειούχου τμήματος II. Διάσπαση του θειοφαινικού δακτυλίου για να δώσει μία αρωματική σουλφινική ένωση III. Απομάκρυνση της σουλφινικής ομάδας

Εφόσον τα μόρια του DBT εισέλθουν στο κύτταρο, υφίστανται μια σειρά από διαδοχικές οξειδώσεις όπου το DBT οξειδώνεται προς σουλφοξείδιο (DBTO), σουλφόνη (DBTO₂), HBPS και τελικό προϊόν το υδρόξυ-διφαινύλιο (HBP) που δεν περιέχει S. Το S απελευθερώνεται στη μορφή θειώδους ιόντος (SO_3^{2-}).

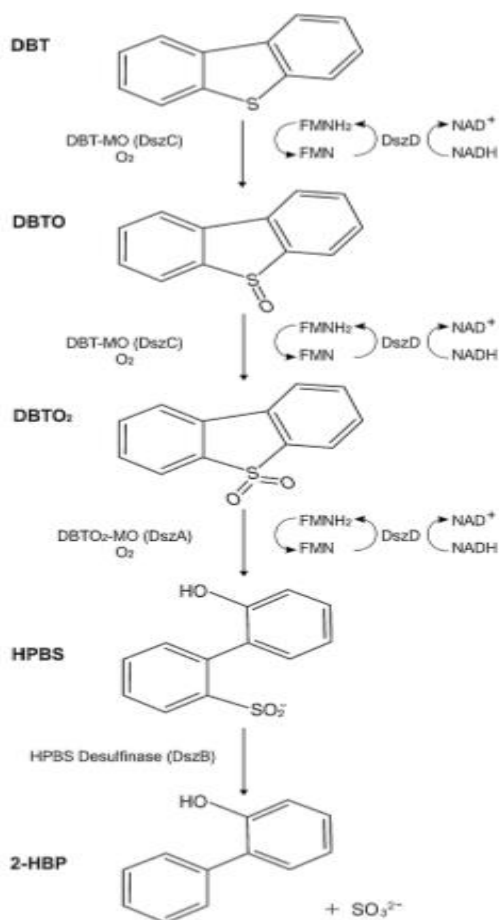


Συνολικά τέσσερα ένζυμα κλειδιά συμμετέχουν στο μηχανισμό: Δύο μονο-οξυγενάσες, μία αποθειονάση, και μία NADH: FMN οξειδωαναγωγάση. Και τα τέσσερα ένζυμα βρίσκονται πιθανότατα στο κυτταρόπλασμα των βακτηρίων.

Οι πρώτες δύο οξειδώσεις (DBT → DBTO και DBTO → DBTO₂) καταλύονται από το ίδιο ένζυμο την μονο-οξυγενάση του DBT (DBT-MO ή DszC) η οποία κωδικοποιείται από το αποθειωτικό γονίδιο DszC. Το ένζυμο για να δράσει απαιτεί ένα ανηγμένο μονονουκλεοτίδιο φλαβίνης, το οποίο και εξασφαλίζει το κύτταρο από την δράση της

NADH:FMN οξειδωαναγωγάσης (καλείται και DszD) που με την σειρά της κωδικοποιείται από το γονίδιο DszD. Η Dsz είναι το ένζυμο συνδέει την οξείδωση του NADH με την προσθήκη οξυγόνου στο θειούχο υπόστρωμα από τα DszC και αργότερα το DszA. Το άτομο του οξυγόνου που ενσωματώνεται στις δύο πρώτες οξειδώσεις προέρχεται από το διαλυμένο μοριακό οξυγόνο. Στην επόμενη οξείδωση $DBTO_2 \rightarrow HBPS$ δραστηριοποιείται η μονο-οξυγενάση του $DBTO_2$, η οποία κωδικοποιείται από το αποθειωτικό ένζυμο DszA (το ένζυμο καλείται και $DBTO_2$ -MO ή DszA). Καταλύει την αντίδραση όπως ακριβώς και η DBT-MO αξιοποιώντας ένα ανηγμένο νουκλεοτίδιο φλαβίνης $FMNH_2$ ως συνυπόστρωμα με ρυθμό όμως 5-10 φορές μεγαλύτερο από της DBT-MO. Τέλος, πάνω στο σχηματισθέν HBPS δρα η αποθειωνάση του HBPS (καλείται και DszB) που κωδικοποιείται από το γονίδιο DszB. Πρόκειται για μία αρωματική υδρολάση σουλφινικού οξέος που ενεργεί προσβάλλοντας πυρινόφιλα την θειική ομάδα και αποδίδει ένα αρωματικό υδρόφοβο μόριο, το 2-υδρόξυδιφαινύλιο (2-HBP) ενώ απελευθερώνει το οργανικό S υπό μορφή θειώδους ιόντων. Η τελευταία αντίδραση είναι και το περιοριστικό στάδιο για το ρυθμό της συνολικής μεταβολικής πορείας.

Το HBP που παράγεται είναι διαλυτό στο πετρέλαιο και μη διαλυτό στο νερό. Κατά συνέπεια οδηγείται εύκολα έξω από το κύτταρο στο κλάσμα του πετρελαίου χωρίς να έχει υποστεί αλλοίωση στην θερμική του αξία. Επιπρόσθετα, το θειώδες ιόν μπορεί να οξειδωθεί σε θειικό και έπειτα να αφομοιωθεί από το κυτταρικό τοίχωμα είτε να απομακρυνθεί στην μορφή υδατικού απόβλητου. Κλείνοντας αξίζει να τονιστεί πως η βιοαποθείωση κρίνεται συνολικά ως μία ενεργοβόρα διαδικασία με την χρήση περίπου 4mol NADH για κάθε mol DBT που αποθειώνεται, κυρίως από τη δράση του ενζύμου DszD. Στο σχήμα 4 φαίνεται η πορεία του μηχανισμού 4S.



Σχήμα 4. Το μεταβολικό μονοπάτι «4S» αποθειώσεως του DBT. Πηγή: [16]

Ενώσεις

DBT: Dibenzothiophene

DBTO: Dibenzothiophene sulfoxide,

DBTO₂: Dibenzothiophene sulfone,

HPBS: Hydroxyphenylbenzene sulfonate,

2-HBP: 2-Hydroxybiphenyl.

Τα ένζυμα

DBT-MO ή DszC: Dibenzothiophene monooxygenase, κωδικοποιείται από το γονίδιο dszC.

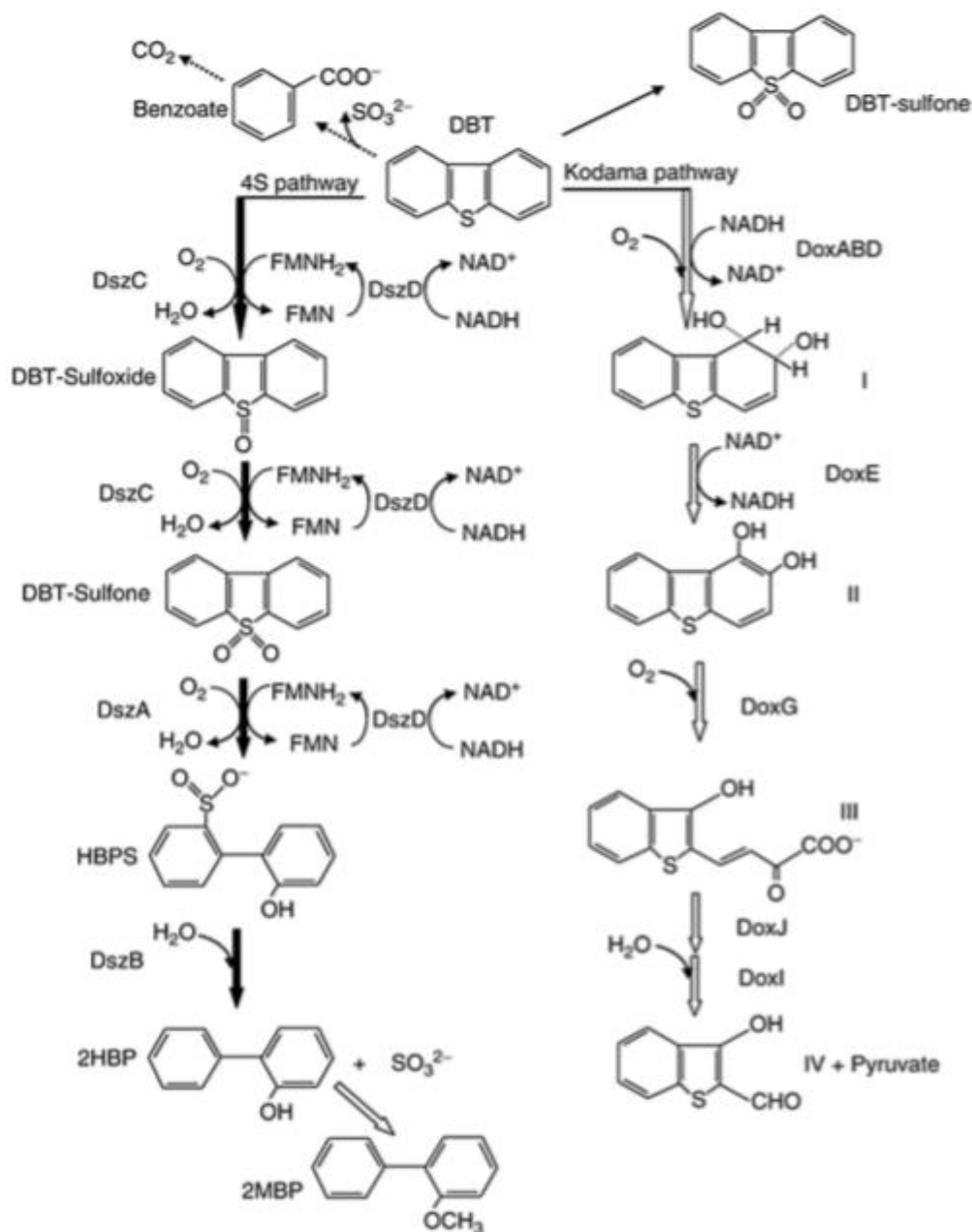
DBTO₂-MO ή DszA: Dibenzothiophene sulfone monooxygenase, κωδικοποιείται από το γονίδιο dszA.

HPBS desulfinase: κωδικοποιείται από το γονίδιο dszB.

NADH/FMN oxidoreductase: κωδικοποιείται από το γονίδιο dszD.

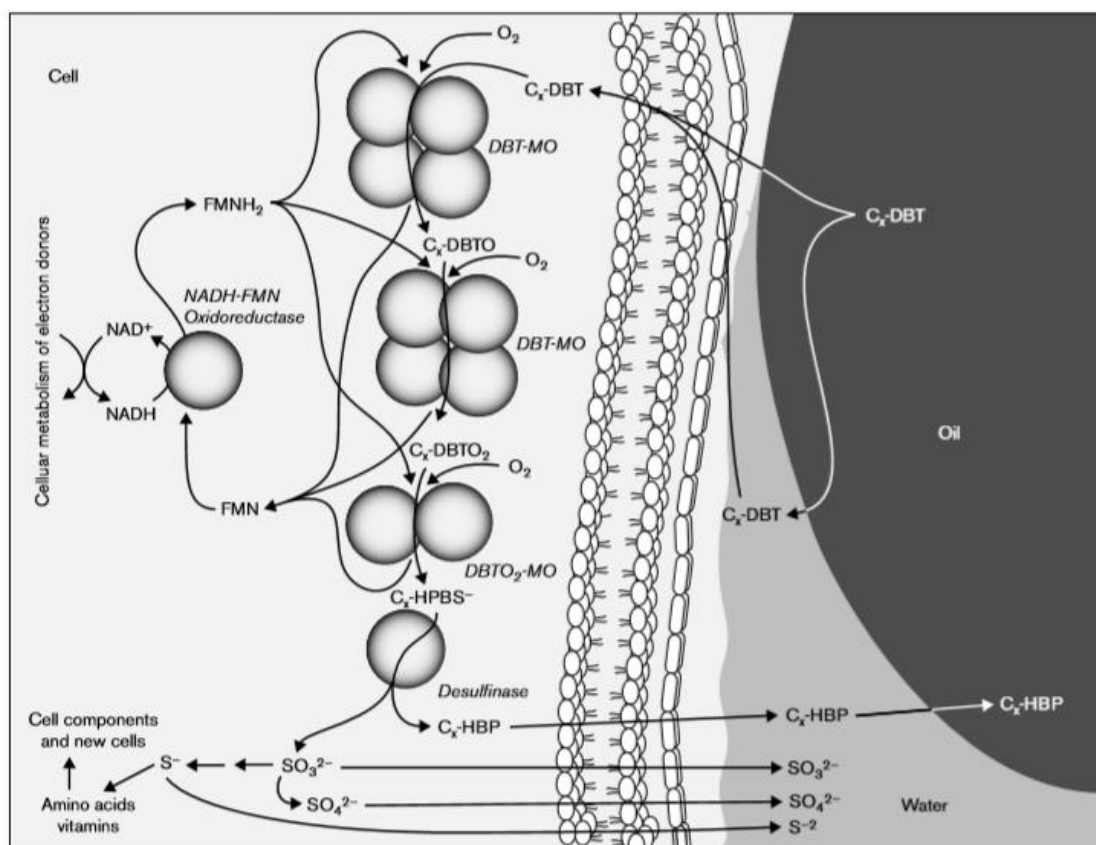
Αναφορές έχουν αποδείξει ότι το μεταβολικό μονοπάτι 4S ακολουθούν οι μικροοργανισμοί: *R. Rhodococcus IGTS8*, *R. Erythropolis D*, *Rhodococcus B1*, *Gordona CYKS1*, *Xanthomonas*, *Mycobacterium sp*, *Nocardia globelula* και άλλοι. Ιδιαίτερα το στέλεχος *Mycobacterium sp. ZD-M2* έχει βρεθεί να αξιοποιεί ένα εκτεταμένο 4S μονοπάτι καθώς μεθυλιώνει το 2-HBP και σχηματίζει τελικό προϊόν το 2-μεθξύ-διφαινύλιο (2-MBP). Από την έρευνα των Li et al. [32] αποδεικνύεται ότι το 2-MBP συγκρινόμενο με το 2-HBP εμφανίζει μικρότερη παρεμποδιστική δράση στην ανάπτυξη των κυττάρων και στην αποθειωτική ικανότητα.

Συνοψίζοντας στο σχήμα 5 φαίνονται συγκριτικά τα περισσότερα από τα μεταβολικά μονοπάτια που έχουν προταθεί για τα δύο κύρια είδη αερόβιων μηχανισμών.



Σχήμα 5. Αερόβια μεταβολικά μονοπάτια αποδόμησης του DBT: 1. Μονοπάτι 4S (μαύρα έντονα βέλη), 2. Επέκταση 4S μονοπατιού (λεπτά βέλη με στιγμές), 3. Οξειδωτικό μονοπάτι του S (λεπτά μαύρα βέλη), 4. Μονοπάτι Kodama (λεπτά άσπρα βέλη) [23].

Προηγουμένως αναφερθήκαμε στην πορεία του υποστρώματος εντός του κυττάρου από τη στιγμή που έρχεται σε επαφή με τα αποθεωτικά ένζυμα. Πρωτού όμως τεθεί σε δράση ο μηχανισμός οι θειούχες ενώσεις θα πρέπει να μεταφερθούν από την οργανική φάση του πετρελαιοειδούς εντός του κυττάρου αφού διέλθουν το κυτταρικό τοίχωμα και την πλασματική μεμβράνη. Ύστερα, εφόσον γίνει η αποθείωση τα προϊόντα θα πρέπει να εξέλθουν από το κυτταρόπλασμα πίσω στην οργανική ή υδατική φάση. Είναι φανερό δηλαδή ότι υπάρχουν πολλά δυνητικά περιοριστικά στάδια πέρα από τις ενζυμικές δράσεις. Βασικότερο περιοριστικό στάδιο επικρατεί να είναι η μεταφορά των πολυαρωματικών ετεροάτομων του S από την φάση του πετρελαιοειδούς στο κύτταρο. Οι περιορισμοί και τα φαινόμενα μεταφοράς που εντοπίζονται στα στάδια επηρεάζουν σημαντικά το ρυθμό αποθείωσης και δεν μπορούν να αγνοηθούν. Στο σχήμα που ακολουθεί γίνεται προσπάθεια ερμηνείας όλων των σταδίων αποθείωσης. Χρησιμοποιείται για υπόστρωμα αλκυλιωμένο DBT (C_x -DBT). Όπως μπορεί να διακρίνει κάποιος δεν είναι πλήρως σαφές πόσα ακριβώς είναι τα στάδια μεταφοράς του C_x -DBT από το κλάσμα πετρελαίου στο πρώτο ένζυμο. Αν δηλαδή περνάει απευθείας από την οργανική φάση ή μεταφέρεται μέσω της υδατικής. Αυτό μάλιστα εξαρτάται και από το στέλεχος που χρησιμοποιείται. Ακόμη, δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένο πως εξέρχεται το HBP από το κύτταρο [33]. Γενικότερα, η διαλεύκανση των σταδίων μεταφοράς των συστατικών από και προς το κύτταρο αποτελεί πεδίο περαιτέρω έρευνας.



Σχήμα 6. Σχηματικό διάγραμμα όπου απεικονίζονται τα βήματα της αποθείωσης του πετρελαιοειδούς. Δεν είναι ακόμη ξεκαθαρισμένο πόσα ακριβώς βήματα περιέχονται στην μεταφορά του C_x - DBT στα κύτταρα και το πρώτο ένζυμο. Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα μπορεί να εισέρχεται στο κύτταρο απευθείας από την οργανική φάση ή με ενδιάμεσο στάδιο την υδατική. Ωστόσο, ως προς τη μεταφορά των συστατικών μεταξύ των φάσεων μελέτες επιβεβαιώνουν ότι δεν περιορίζεται από τα ενδιάμεσα στάδια πετρελαιοειδούς στο νερό και νερού στο κύτταρο. Συντομογραφίες: C_x - DBT: υποκατεστημένο DBT, DBTO: dibenzothiophene sulfoxide, DBTO₂: dibenzothiophene sulfone, DBT-MO: dibenzothiophene monooxygenase [33].

Εκλεκτικότητα ως προς το υπόστρωμα

Μολονότι χρησιμοποιούμε το DBT για να περιγράψουμε τους μηχανισμούς της αποθείωσης στο πετρέλαιο περιέχονται και άλλες θειούχες οργανικές ενώσεις που πρέπει εξίσου να μεταβολιστούν προκειμένου να έχουμε ικανοποιητική μείωση του S. Άλλωστε το ευρύ φάσμα των υποστρωμάτων που μπορούν μεταβολιστούν είναι και η κινητήρια δύναμη για την δημιουργία μιας εμπορικής διεργασίας βιοαποθείωσης. Ωστόσο, ορισμένα κυτταρα εμφανίζουν εκλεκτικότητα ως προς τα μεταβολικά μονοπάτια που θα ακολουθήσουν για συγκεκριμένα υποστρώματα.

Σημειώνεται ότι ορισμένοι μικροοργανισμοί δεν μπορούν να μεταβολίσουν συγκεκριμένα υποστρώματα ενώ κάποια άλλα μπορούν όπως για παράδειγμα το στέλεχος *Gordonia sp. 213E* που είναι ικανό να αποθείωνει το Βενζοθειοφαίνιο (BT) και τα παράγωγα του και όχι το DBT ενώ ο *R. Erythropolis DS-3* είναι ικανός να αφαιρεί το S από το DBT και τα παράγωγα του και όχι από το BT. Μία άμεση εφαρμογή που λογικά προκύπτει είναι η χρήση μικτής καλλιέργειας μικροβίων για την αποδοτικότερη αποθείωση κλασμάτων πετρελαίου. Αποτελέσματα σχετικών ερευνών καταδεικνύουν ότι η χρήση συγκαλιέργειας μικροβίων αυξάνει τον αριθμό των στοχευόμενων υποστρωμάτων και βελτιώνει την συνολική απόδοση της αποθείωσης απέναντι στο πλήθος των θειούχων ενώσεων. Σε ένα τέτοιο πείραμα συγκαλλιέργεια *Gordonia sp. C-6* και *R. Erythropolis DS-3* χρησιμοποιήθηκε για να αποθείώσει ήδη υδρογονοκατεργασμένο diesel. Το ποσοστό αποθείωσης έφτασε στο 86% [34]. Εντούτοις αναφέρονται και πολλά βακτήρια που μεταβολίζουν παράλληλα το BT και το DBT: *Rhodococcus sp. KT462*, *Mycobacterium goodie X7B*, *Mycobacterium phei WU-103*, *Paenibacillus sp. A11-2*, *Sphingomonas subartica T7b* και άλλοι. Ωστόσο, οι αποδόσεις στην αποθείωση του BT και του DBT από το ίδιο στέλεχος ενδέχεται να μην είναι ίδιες.

Η παρέμβαση στα αποθειώτικα ένζυμα ούτως ώστε να διευρυνθεί η εκλεκτικότητα τους και σε άλλα υποστρώματα είναι απαραίτητη για να μπορέσουν να αξιοποιηθούν οι μικροοργανισμοί σε μία βιομηχανική μονάδα βιοαποθείωσης. Η εκλεκτικότητα τους μπορεί να αφορά όχι μόνο την ικανότητα αποθείωσης αλλά και την ανάπτυξη τους σε ορισμένα υποστρώματα. Παραδείγματος χάριν έχει βρεθεί ότι ο *Rhodococcus IGTS8* δεν μπορεί να αναπτυχθεί σε Βενζοθειοφαίνιο ή 5-μέθυλο-βένζοθειοφαίνιο ως η μόνη πηγή θείου. Ύστερα όμως από γενετική παρέμβαση στο αποθειωτικό σύστημα του μικροοργανισμού έγινε ικανός να αναπτυχθεί τόσο παρουσία όκτυλο-σουλφιδίου όσο και 5-μέθυλο-βένζοθειοφαίνιο [35].

8. Γενετική της Αποθείωσης του DBT

Από τα τέλη του περασμένου αιώνα άρχισε ήδη να μελετάται η έκφραση σε γονιδιακό επίπεδο των ενζύμων που αποικοδομούν το θείο. Δύο από τα πρώτα στελέχη που χαρακτηρίστηκαν είναι αυτά των *R. Erythropolis IGTS8* και *Rhodococcus sp. X309*.

Αναφορικά με το στέλεχος *R. Erythropolis IGTS8* έχει ήδη αναφερθεί ότι μεταβολίζει το DBT σε 2-HBP μέσα από το μηχανισμό 4S με την συμμετοχή 3 βασικών ενζύμων (DszC, DszA, DszB) και μιας NADH:FMN οξειδωαναγωγάσης (DszD). Τα γονίδια από τα τρία βασικά ένζυμα έχει διαπιστωθεί ότι υπόκεινται σε κοινό έλεγχο της έκφρασης τους σχηματίζοντας το οπερόνιο dsz. Η κλωνοποίηση και αλληλούχιση του οπερόνιου αποκάλυψε ότι τα τρία γονίδια dszA, dszB, dszC μεταγράφονται και εκφράζονται με τον ίδιο προσανατολισμό. Επιπλέον, το κωδικόνιο λήξης για το γονίδιο dszA και το κωδικόνιο έναρξης για το dszB επικαλύπτονται ενώ υπάρχει ένα κενό 13-bp μεταξύ των dszB και

dszC. Πιθανώς, αφαιρώντας την αλληλοεπικάλυψή των γονιδίων η ενεργότητα των αποθειωτικών ενζύμων αυξάνεται. Τέλος, ως προς την θέση του, σύμφωνα με τους Denome et al [36] το οπερόνιο με τα τρία γονίδια εντοπίζεται σε ένα γραμμικό πλασμίδιο μήκους 120-kb του στελέχους IGTS8.

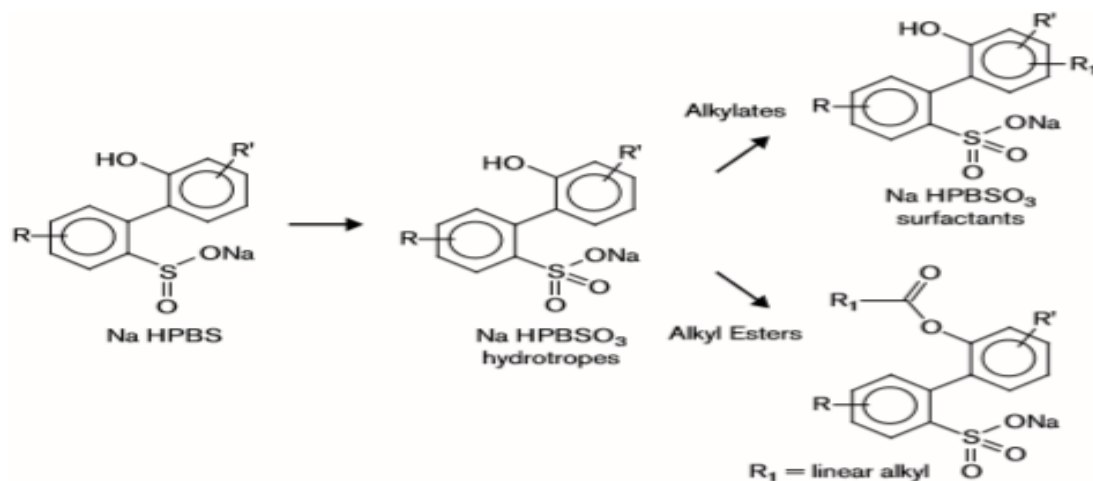
Αναζητώντας τα αποθειωτικά γονίδια (dsz genes) και σε άλλα βακτήρια με ικανότητα να απομακρύνουν το θείο, βρέθηκαν σχεδόν πανομοιότυπες αλληλουχίες κάτι που επιβεβαιώνει την υπόθεση ότι τα σχετικά βακτήρια υπόκεινται σε οριζόντια μεταφορά γονιδίων στη φύση. Έχοντας σημείο αναφοράς το γονότυπο του *R. erythropolis* IGTS8, από πλήθος στελεχών του γένους *Anthrobacter*, *Gordonia*, *Mycobacterium*, *Bacillus*, *Nocardia*, *Rhodococcus* και άλλων απομονώθηκαν τα dsz γονίδια όπου και βρέθηκαν να είναι πανομοιότυπα ή με πολύ υψηλό βαθμό ομολογίας με τα αντίστοιχα γονίδια του *R. erythropolis* IGTS8 [23]. Μάλιστα ενίσχυση των γονιδίων διαφορετικών βακτηρίων προερχόμενα από το έδαφος με χρήση της PCR αποκάλυψε μικρές διαφορές στην αλληλούχιση με τις περισσότερες αποκλίσεις να εμφανίζονται στο γονίδιο dszA. Επιπλέον, σε ορισμένα στελέχη βρέθηκε ομολογία του γονιδίου dszA με αυτό του *R. erythropolis* IGTS8 έως 95% [37].

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρακάτω διαπίστωση: Παρά την μεγάλη αν όχι πλήρη ομολογία που κατέχουν ορισμένα στελέχη στην αλληλουχία των dsz γονιδίων, είναι δυνατό να διαφέρουν σημαντικά φαινοτυπικά, και συγκεκριμένα ως προς την αποθειωτική τους δράση. Η διαφορά στον φαινότυπο συνδέεται άμεσα με την ικανότητα να μεταβολίζουν διαφορετικό εύρος υποστρωμάτων θείου, να μπορούν να αναπτύσσονται σε διαφορετικές πηγές C και S, να αποθεώνουν βέλτιστα σε διαφορετικές θερμοκρασίες και βαθμό καθώς και άλλες ιδιότητες.

Ως προς τον έλεγχο της έκφρασης των γονιδίων, έχει βρεθεί ύστερα από μελέτη των υποκινητών και άλλων ρυθμιστικών περιοχών ότι η δράση των ενζύμων καταστέλλεται από την παρουσία εύκολα «βιοδιαθέσιμων» θειούχων συστατικών όπως θειικών ιόντων, σουλφιδών, των αμινοξέων μεθειονίνης και κυστεΐνης, ταυρίνης και αμινοξέων καζεΐνης (casamino acids). Αναλυτικότερα, στο γένος *Rhodococcus* τα παραπάνω συστατικά καταστέλλουν τον υποκινητή των dsz ή την σύνθεση των ενζύμων στο επίπεδο της μεταγραφής. Για να ξεπεράσουν τον περιορισμό, ερευνητές προσπάθησαν να αντικαταστήσουν τον υποκινητή ως εναλλακτική λύση για την έκφραση των dsz σε έναν ετερόλογο ξενιστή με σκοπό να μειώσουν το πρόβλημα καταστολής που δημιουργούν οι ενώσεις του S. Παραδείγματος χάριν, το ανασυνδυασμένο στέλεχος *Rhodococcus* sp. T09 κατασκευάστηκε έτσι ώστε να μπορεί να αποθειώνει το DBT ακόμη και υπό την παρουσία μεθειονίνης, κυστεΐνης, και θειικών ιόντων ως μόνη πηγή S [38].

Επιπλέον τρόποι για να βελτιωθεί ο βαθμός αποθειώσεως είναι επίσης δυνατοί δια μέσου της γενετικής μηχανικής. Τα dsz γονίδια του IGTS8 εισήχθησαν στο χρωμόσωμα του *Pseudomonas* με σκοπό να βελτιωθεί η ικανότητα του ανασυνδυασμένου στελέχους να αποθειώνει αποδοτικά το DBT. Πράγματι αποδείχθηκε ότι το ανασυνδυασμένο στέλεχος έχει καλύτερη ικανότητα αποθειώσεως από το άγριο στέλεχος. Άλλοι τρόποι για να αυξηθεί η έκφραση των ενζύμων περιλαμβάνουν τη χρήση τρανσποζονίων για την παραγωγή ενζύμων υψηλής ενεργότητας. Λόγου χάριν, η χρήση τρανσποζονίου στη δημιουργία του μεταλλαγμένου στελέχους *R. Erythropolis* KA2-5-1 οδήγησε σε υψηλή αποθειωτική δράση ακόμη και με την παρουσία θειικών ιόντων. Η άρση της καταστολής που προκαλούν τα θειικά μπορεί να υλοποιηθεί ακόμη και με την διαγραφή του γονιδίου dszB υπεύθυνου για το τελευταίο στάδιο του μονοπατιού 4S. Η σκέψη αυτή, αν και αρχικά μπορεί να φαντάζει μη προσιτή στην πραγματικότητα οδηγεί το μεταβολικό

μονοπάτι σε μια διαφορετική πορεία, την παραγωγή σουρφακτάνων, ενώ παράλληλα δίνει λύση στο πρόβλημα της καταστολής. Η αφαίρεση του γονιδίου *dszB* επιταχύνει το μεταβολισμό, καθώς διαγράφει το βραδύτερο στάδιο του, και τερματίζει το μηχανισμό στο ενδιάμεσο HBPS. Η συσσώρευση του HBPS στην προκειμένη περίπτωση είναι πολυτιμότερη των θεικών, διότι το HBPS μπορεί εύκολα να ανακτηθεί από την υδατική φάση και να χρησιμοποιηθεί από εκεί στην παραγωγή σουρφακτάνων. Στο σχήμα 7 φαίνεται η σειρά αντιδράσεων παραγωγής σουρφακτάνων από αλκυλιωμένα HBPS.



Σχήμα 7. Μετατροπή του αλκυλιωμένου HBPS σε σουρφακτάνες προστιθέμενης αξίας. Βασική χρήση των σουρφακτάνων είναι στην παραγωγή καθαριστικών. Το μήκος της πλευρικής αλυσίδας R' ποικίλει και καθορίζει την δημιουργία υδατό- ή έλαιο-διαλυτών καθαριστικών [33].

9. Παράγοντες που επηρεάζουν την Βιοαποθείωση

Αναφορές στην βιβλιογραφία επισημαίνουν συχνά την επιρροή μιας σειράς παραγόντων στην αποδοτικότητα της Βιοαποθείωσης. Αναλυτικότερα, τα φαινόμενα διάχυσης του υποστρώματος, ουσίες με παρεμποδιστική δράση, το pH, η θερμοκρασία, ο λόγος οργανικής με υδατική φάση, η μεταφορά οξυγόνου, η αρχική συγκέντρωση του θείου, η συγκέντρωση της βιομάζας και άλλα είναι παράμετροι που θα πρέπει να ληφθούν υπόψη για την παραγωγή καλλιέργειας με ικανή αποθειωτική δράση. Υπάρχουν όμως και επιπλέον παράγοντες που δεν είναι φυσικοχημικής φύσης αλλά σχετίζονται με τις τεχνικές της διεργασίας, όπως η επιλογή μη αναπτυσσόμενων κυττάρων (resting cells) έναντι των αναπτυσσόμενων (growing cells). Επιπλέον, πολλοί από τους φυσικοχημικούς παράγοντες σε πολλές μελέτες εξετάζονται από κοινού, μελετώντας τις μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις.

9.1 Χρόνος επώασης του βιοκαταλύτη

Είναι πολύ σημαντικό να γνωρίζουμε την χρονική στιγμή που ο βιοκαταλύτης θα μας δώσει την υψηλότερη απόδοση αποθειώσεως. Ο συντομότερος χρόνος ανάπτυξης, με το μεγαλύτερο ρυθμό αποθειώσεως, θα ήταν ο συνδυασμός κλειδί για την βιομηχανική εφαρμογή και εμπορευματοποίηση της BDS.

Οι del Olmo et al [39] διαπιστώσαν πως ο *R. Erythropolis IGTS8*, εμφανίζει μέγιστη αποθείωση του DBT στο τέλος της εκθετικής φάσης (15h -25h) όταν αναπτύσσεται σε αναδευόμενες φιάλες. Άλλοι ερευνητές αναφέρουν πως τα υψηλά ποσοστά αποθείωσης μπορούν να διατηρηθούν για μεγαλύτερες περιόδους, όταν η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου παραμένει σταθερή στο 10% του κορεσμού του μέσου ενώ η απόδοση της αποθείωσης παρέμεινε ίδια για ανάδευση 250 και 400 rpm [40]. Ορισμένοι

ερευνητές υποστηρίζουν την άποψη πως δεν είναι απαραίτητο η μέγιστη απομάκρυνση του DBT να αντιστοιχεί στη μέγιστη κυτταρική ανάπτυξη και μέγιστη παραγωγή 2-HBP. Βέβαια ο ρυθμός της ανάπτυξης και η αποθειωτική δράση είναι πρωτίστως συνδεδεμένη με το είδος του μικροοργανισμού. Για παράδειγμα οι Wang et al [41] διαπίστωσαν για το στέλεχος *Corynebacterium sp. ZD-1* μέγιστη αποθειωτική ικανότητα προς το τέλος της εκθετικής φάσης ενώ για το στέλεχος *Bacillus sp. E1* η μέγιστη απομάκρυνση DBT συνέβει στις 72h [42]. Σε κάθε περίπτωση είναι πολύ χρήσιμη η μοντελοποίηση των διεργασιών ανάπτυξης και αποθείωσης ως προς την εκθετική φάση καθώς εκεί εντοπίζονται οι υψηλότεροι ρυθμοί.

Συνοψίζοντας τα παραπάνω, είναι φανερό πως για να επιτύχουμε βελτιστοποίηση της BDS είναι απαραίτητο να γνωρίζουμε τον χρόνο ανάπτυξης που θα δώσει τη σωστή κυτταρική ανάπτυξη ώστε να έχουμε μέγιστη ενζυμική ενεργότητα.

9.2 Θερμοκρασία και pH

Είναι γνωστό πως η λειτουργία των ενζύμων επηρεάζεται από τις διακυμάνσεις του pH εξαιτίας της ευαισθησίας της τρισδιάστατης δομής τους σε αυτό. Εκτός όμως από τη δομή των ενζύμων, το pH έχει επίδραση και στις ιδιότητες του ηλεκτρικού φορτίου του υποστρώματος με τέτοιο τρόπο ώστε με τυχόν μεταβολή στο pH να μην μπορέσει το υπόστρωμα να προσδεθεί στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Κατά συνέπεια το ένζυμο δεν μπορεί να επιτελέσει την καταλυτική του δράση. Αλλαγές στο pH παρατηρούνται λόγω της παραγωγής όξινων ή αλκαλικών μεταβολιτών από τη δράση των ενζύμων. Είναι προτιμότερο λοιπόν κατά την ανάπτυξη των μικροοργανισμών να διατηρούμε σταθερό το pH για τη σωστή μελέτη της απόδοσης των ενζύμων. Το pH μπορεί ελέγχεται με την προσθήκη διαλύματος οξέος και βάσης.

Η πλειοψηφία των επιστημονικών μελετών εφαρμόζει συνθήκες θερμοκρασίας 30°C και pH 6.5-7.5 για τους περισσότερους αποθειωτικούς μικροοργανισμούς. Πολλές από τις διεργασίες BDS που πραγματοποιούνται στους 30°C έδειξαν ότι το πρώτο και το τρίτο ένζυμο του 4S μονοπατιού (dszC και dszB) είναι τα πιο θερμοευαίσθητα σε σχέση με τα υπόλοιπα [43]. Οι μικροοργανισμοί με την ικανότητα να αποθειώνουν ακολουθώντας το μονοπάτι 4S μπορούν να ταξινομηθούν στις εξής 3 κατηγορίες: Μεσόφιλοι, ήπια θερμοφιλοι και υπέρ-θερμοφιλοι. Τα περισσότερα στελέχη του *Rhodococcus*, συμπεριλαμβανομένου και του *R. erythropolis IGTS8* που μελετάμε αναφέρονται ως μεσόφιλα. Πολλές κατά καιρούς μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για την εξεύρεση άριστου pH και θερμοκρασίας από ποικίλους μικροοργανισμούς για αποδοτικότερη αποθείωση.

9.3 Συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου

Σε προηγούμενη ενότητα περιγράψαμε την ικανότητα αερόβιων και αναερόβιων μικροοργανισμών να αποδοθούν ικανοποιητικά το DBT και τα υποκατεστημένα παράγωγα του με την αναερόβια αποθείωση να χαρακτηρίζεται από χαμηλούς ρυθμούς. Για τους αερόβιους μικροοργανισμούς έχει βρεθεί πως η αποθειωτική ικανότητα και η ενεργότητα των ενδο-κυτταρικών ενζύμων επηρεάζεται έντονα από τη συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου στο μέσο. Λέγεται ότι ακόμη και σε περιορισμένη διαθεσιμότητα διαλυμένου οξυγόνου το μονοπάτι 4S είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο σε αυτό. Ένας τρόπος ελέγχου της συγκέντρωσης του διαλυμένου οξυγόνου είναι μέσα από την ισχύ της ανάδευσης [44]. Η ισχύς της ανάδευσης του αντιδραστήρα σε συνδυασμό με την παροχή του αέρα καθορίζουν και το ρυθμός μεταφοράς του οξυγόνου. Να σημειωθεί πως υπό συνθήκες έντονης ανάμιξης πολλές φορές οι αναδυόμενες φυσαλίδες όταν απελευθερώνονται στην επιφάνεια προκαλούν διαταραχές στο σύστημα και έχουν αρνητικό αντίκτυπο στην απόδοση των αιωρούμενων κυττάρων. Αν η ταχύτητα ανάμιξης ρυθμιστεί ώστε να αποφευχθεί η ανάπτυξη διατμητικών τάσεων, είναι πιθανόν

τα φαινόμενα μεταφοράς μάζας να περιορίσουν την απόδοση της καλλιέργειας. Από την άλλη μεριά αν η ανάδευση υπερβεί ένα σημείο (έντονη ανάμιξη) τότε οι υδροδυναμικές δυνάμεις επιδρούν αρνητικά στα κύτταρα. Συνεπώς, η βέλτιστη λύση θα είναι για εκείνες τις συνθήκες για τις οποίες η ανάδευση και ο ρυθμός μεταφοράς μάζας ικανοποιούν την επαρκή πρόσληψη οξυγόνου και συστατικών από τα κύτταρα ώστε καθόλη η διεργασία της αποθείωσης να εξαρτάται αποκλειστικά από τον μεταβολισμό των κυττάρων.

Είναι πολύ σημαντικό να κατανοήσουμε τη σημασία του ρόλου της μεταφοράς και πρόσληψης του οξυγόνου από τα κύτταρα στην αερόβια BDS ούτως ώστε να σχεδιάσουμε σωστά τη λειτουργία και την κλιμάκωση μιας βιοαποθειωτικής μονάδας. Για το στέλεχος που χρησιμοποιούμε και στην παρούσα εργασία, *R. erythropolis IGTS8*, οι del Olmo et al [44], διαπίστωσαν μέγιστο ρυθμό ανάπτυξης και συγκέντρωση βιομάζας όταν αυτός αναπτύσσεται σε μία σταθερή συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου 20% του κορεσμού (pH 6.5, 30°C). Υπό τις ίδιες συνθήκες παρατηρήθηκε και βέλτιστη αποθειωτική ικανότητα. Για τον εν λόγω μικροοργανισμό έχει αναφερθεί ότι η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου παίζει καθοριστικό ρόλο στην ροή του άνθρακα για την ανάπτυξη των κυττάρων και την αποθειωτική τους δράση. Εκτός από τον ρυθμό ανάπτυξης επηρεάζονται και τα ένζυμα που κατόπιν χρησιμοποιούνται στην αποθείωση. Σε μία μελέτη των Gomez et al [45] στον *R. erythropolis IGTS8* παρατηρήθηκε ότι στην ανάπτυξη των κυττάρων σε DBT και διαφορετική ανάδευση, το διαλυμένο οξυγόνο άγγιξε την χαμηλότερη τιμή του στην μέση της εκθετική φάσης όπου λογικά η απαίτηση τότε σε οξυγόνο είναι μέγιστη. Ωστόσο η μείωση στην συγκέντρωση του O₂ με τον χρόνο ήταν μικρότερη με την αύξηση της ανάδευσης. Σε πολύ χαμηλές συνθήκες ανάδευσης (100-150 rpm) το οξυγόνο μηδενίστηκε μόλις μετά από λίγες ώρες ανάπτυξης (12-15h). Υπό αυτές της συνθήκες το οξυγόνο είναι περιορισμένο και έτσι ο ρυθμός μεταφοράς του ελέγχει την όλη διεργασία.

Εν γένει για τον παραπάνω μικροοργανισμό, ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης και η μέγιστη κυτταρική συγκέντρωση είναι σχετικά μικρή για ταχύτητες μικρότερες των 250 rpm. Αυτό κατά τους ερευνητές [45] οφείλεται στην υδροδυναμική του αντιδραστήρα που με αυτές τις συνθήκες ο ρυθμός μεταφορά O₂ είναι ανεπαρκής, δηλαδή μικρότερος από τον αναγκαίο ρυθμό πρόσληψης και έτσι το O₂ ανάγεται στο περιοριστικό υπόστρωμα. Για ρυθμούς ανάδευσης από 250-450 rpm ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης και η μέγιστη κυτταρική συγκέντρωση αυξήθηκαν ενώ για ακόμα μεγαλύτερες ταχύτητες 700 rpm μειώθηκαν. Αφού τα κύτταρα επηρεάστηκαν αρνητικά από την έντονη μηχανική ανάδευση συμπεραίνεται ότι είτε οι υδροδυναμικές δυνάμεις είτε τα επίπεδα οξυγόνου επηρεάζουν τον κυτταρικό μεταβολισμό, κάτι που παρατηρείται στην μείωση του ειδικού ρυθμού πρόσληψης O₂.

9.4 Αρχική συγκέντρωση του βιοκαταλύτη

Πολλοί ερευνητές υποστηρίζουν ότι υπάρχει ανάγκη βελτιστοποίησης της αρχικής ποσότητας του εμβολίου σε μία καλλιέργεια βιοαποθείωσης. Υποστηρίζεται επίσης ότι μία αύξηση του αρχικού εμβολίου έχει αρνητικό αντίκτυπο στην ανάπτυξη και την αποδοτικότητα της BDS. Αυτό διότι μια υψηλή συγκέντρωση κυττάρων θα προκαλέσει γρήγορη έλλειψη οξυγόνου και εξάντληση των θρεπτικών συστατικών του μέσου. Επί παραδείγματι για το στέλεχος *Rhodococcus* sp. P32C1 που αναπτύχθηκε σε διφασική καλλιέργεια διαλείποντος έργου με 24mM DBT σε δωδεκάνιο (50%/50% οργανικής/υδατικής φάσης), παρατηρήθηκε μικρότερος ρυθμός παραγωγής 2-HBP στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις εμβολίου. Πιθανότατα αυτό συνέβει λόγω παρεμποδίσεων στη μεταφορά μάζας ιδιαίτερα του οξυγόνου που χρειάζεται στις αντιδράσεις οξειδωτικής του DBT [46].

Άλλο σύστημα που μελετήθηκε είναι αυτό των μη αναπτυσσόμενων κυττάρων του *P. delafieldii* R-8 σε διφασικό σύστημα αναλογίας 1:1 με οργανική φάση 1mM DBT σε δωδεκάνιο. Διαπιστώθηκε ότι ο ρυθμός αποδόμησης του DBT μειώνεται με την αύξηση των αρχικών (20-80 g/L) κυττάρων λόγω αντίστασης στην μεταφορά μάζας που αποτελεί και το ελέγχον στάδιο στην παρούσα φάση. Επιπλέον στις υψηλότερες συγκεντρώσεις εμβολίου εντοπίστηκε δυσκολία στο διαχωρισμό της βιομάζας μετέπειτα.

9.5 Επίδραση υποκατεστημένων υποστρωμάτων στην αποθειωτική ικανότητα

Παρά την ευρεία χρήση του καθαρού DBT ως συστατικού πρότυπου στην ερμηνεία της δράσης των ενζύμων, συχνά βρίσκεται υποκατεστημένο στο αργό πετρέλαιο, γεγονός που διαφοροποιεί τον μετέπειτα μεταβολισμό του. Υστέρα από την εφαρμογή της υδρογονοαποθείωσης η πλειοψηφία των εναπομεινάντων ενώσεων του S είναι παρόν ως διβενζοθειοφαίνιο και τα παράγωγα του. Τα παράγωγα του αφορούν διβενζοθειοφαίνια υποκατεστημένα με ένα ή περισσότερα αλκύλια είτε άλλες αρωματικές ενώσεις σε έναν από τους δύο ή και στους δύο πλευρικούς βενζολικούς δακτυλίους του.

Είναι κατανοητό πως ανάλογα με την φύση της πλευρικής ένωσης συνεπάγεται και ένα μεγάλο εύρος υποκατεστημένων μορίων (συμβολίζονται με Cx-DBT). Το είδος και η θέση των υποκαταστατών αποδεικνύεται ότι επηρεάζει σημαντικά τη δραστηριότητα μεταξύ των μεταξύ θειούχων ενώσεων και βιοκαταλυτών. Επί παραδείγματι, τα Cx-DBT που είναι υποκατεστημένα στις θέσεις 4 και 6 εκατέρωθεν του S, πιστεύεται ότι παρεμποδίζουν στερεοχημικά την αλληλεπίδραση του S με την επιφάνεια του βιοκαταλύτη και δίνουν χαμηλότερους ρυθμούς αντίδρασης. Μελέτες δείχνουν ότι τα βακτήρια ικανά να μεταβολίζουν το DBT μπορούν και να αποθειώνουν και αλκυλιωμένα DBT δια μέσου του μηχανισμού 4S. Φυσικά διαφορές αναμένονται στην απόδοση της αντίδρασης εξαρτώμενες από το υπόστρωμα. Ο τρόπος που ένα αλκυλιωμένο υπόστρωμα προσβάλλεται από τα ένζυμα του μηχανισμού είναι συνάρτηση όχι μόνο από τη θέση αλλά και το μήκος των άλκυλο-υποκαταστατών. Εν γένει, ισχύει η εξής πρόταση: **Αυξανόμενη αλκυλίωση του DBT, μειώνει την δραστηριότητα των ενζύμων.** Ας σημειωθεί ακόμη πως η αποδοτικότητα στην αποθείωση εξαρτάται και από την συνύπαρξη ή μη περισσότερων του ενός υποκατεστημένων υποστρωμάτων αλλά και του είδους αυτών. Λόγου χάριν, έχει παρατηρηθεί ότι ο ρυθμός αποθείωσης των DBT και 4,6-διμέθυλο-DBT σε μείγμα είναι μικρότερος από το ρυθμό αποθείωσης καθενός ξεχωριστά από το στέλεχος *Mycobacterium sp. ZD-19*. Το αποτέλεσμα υπαινίσσεται μία πιθανή ανταγωνιστική δράση παρουσία και των 2 υποστρωμάτων [47]. Τέλος να επισημανθεί πως, όπως και παραπάνω, τα εργαλεία της γενετικής μηχανικής μπορούν να επιστρατευτούν για τη δημιουργία στελεχών ικανά να αποθειώνουν υποστρώματα που λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης παρουσίαζαν μικρό ρυθμό αντίδρασης.

9.6 Επίδραση της μεταφοράς μάζας

Το σύστημα που μελετάμε περιλαμβάνει δύο φάσεις από μη αναμίξιμα υγρά, όπου τα οργανοθεικά συστατικά βρίσκονται διαλυμένα στην οργανική φάση ενώ τα κύτταρα αναπτύσσονται στην υδατική φάση. Οι δύο φάσεις αλληλοεπιδρούν μεταξύ τους στην διεπιφάνεια. Εκεί το DBT έρχεται σε επαφή με τα κύτταρα και αποδομείται. Από την φύση και μόνο του συστήματος είναι φανερό η σημασία της μεταφοράς μάζας στην συνολική μετατροπή. Η μεταφορά μάζας εξαρτάται από παραμέτρους όπως η υδροφοβικότητα των συστατικών, ο βαθμός αλκυλίωσης, η μοριακή δομή και το βάρος.

Κατά τους Marcelis et al [48] η μεγαλύτερη αντίσταση στη μεταφορά μάζας των συστατικών από την οργανική στην υδατική φάση εμφανίζεται στο στάδιο της υδατικής, αν και από άλλες μελέτες υπάρχουν ενδείξεις ότι η μικροβιακή διεργασία

είναι το καθοριστικό στάδιο για τον συνολικό ρυθμό. Για το στέλεχος που εξετάζουμε *R. erythropolis IGTS8* η μελέτη της επίδρασης της μεταφοράς μάζας σε διαφασικό σύστημα 54.27 μM DBT έδειξε ότι αυτή εξαρτάται κυρίως από την υδροφοβικότητα του βιοκαταλύτη [49]. Στο ίδιο πείραμα η μετατροπή του DBT άγγιξε την τιμή του 80% με αρχική συγκέντρωση βιομάζας 8 g/L. Με αύξηση της αρχικής βιομάζας η μετατροπή παρέμεινε σταθερή εξαιτίας του κορεσμού της διεπιφάνειας από τον βιοκαταλύτη. Αυξάνοντας την επιφάνεια επαφής των φάσεων η διεργασία θα έφτανε θεωρητικά σε μεγαλύτερες μετατροπές, ωστόσο αυτό δεν συνέβει λόγω φαινομένων παρεμπόδισης και αντίστασης στη μεταφορά μάζας εξαιτίας της υψηλής πυκνότητας κυττάρων. Γενικότερα, αναφέρεται ότι σε χαμηλή αναλογία οργανικής φάσης και επίσης χαμηλές συγκεντρώσεις πηγής S αλλά και υψηλή πυκνότητα κυττάρων η μεταφορά μάζας παίζει τον καθοριστικό ρόλο στην συνολική μετατροπή [50].

9.7 Επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης του Θείου στην ανάπτυξη

Οι μικροοργανισμοί που εξετάζονται στην βιοαποθείωση χρησιμοποιούν το S τόσο για την ανάπτυξη τους όσο και ως συστατικό που θέλουν να απομακρύνουν. Είναι ευρέως αποδεκτό πως το S αποτελεί κατά προσέγγιση το 0.5-1% της ξηρής μάζας των κυττάρων. Επομένως η απαιτούμενη ποσότητα S που σχετίζεται αποκλειστικά για την κυτταρική ανάπτυξη είναι περιορισμένη από τον παραπάνω αριθμό. Για κάθε στέλεχος ανάλογα με την πηγή S που χρησιμοποιείται υπάρχει κάποια βέλτιστη συγκέντρωση της στην οποία εμφανίζει μέγιστη ανάπτυξη. Λόγου χάρη το στέλεχος *Rhodococcus sp. lawq* απαιτεί συγκέντρωση θειούχας ένωσης 0.5 mol/L Na_2SO_4 για να φτάσει την μέγιστη κυτταρική συγκέντρωση [51]. Ομοίως με αναφορά στο DBT το στέλεχος *Gordonia alkanivorans 1B* αποθειώνει και αναπτύσσεται βέλτιστα σε συγκέντρωση 0.5 mM DBT στις 120h ενώ το *Microbacterium sp. NISOC-06* σε 1 mM DBT σε 120 h [52],[53]. Ακόμη για το DBT (ως πηγή S), σε πολλές αναφορές επιβεβαιώνεται ότι σε υψηλή αρχική συγκέντρωση έχει παρεμποδιστική δράση τόσο στην ανάπτυξη όσο και στην αποθείωση [54].

9.8 Επίδραση του οργανικού διαλύτη και του λόγου οργανικής/υδατικής φάσης

Η επιλογή του οργανικού διαλύτη στα πειράματα βιοαποθείωσης ή με άλλα λόγια η επίδραση της οργανικής φάσης αποτελεί παράγοντα μεγάλης σημασίας για την επιτυχή βιοαποθείωση. Είναι γνωστό πως το αργό πετρέλαιο αποτελείται από ένα μείγμα υδρογονανθράκων διαφορετικών τύπων ως προς την δομή τους. Στην βενζίνη βρίσκονται κυρίως ενώσεις από 9 έως 12 άτομα C ενώ στο πετρέλαιο τυπικά από 12 έως 23. Γνωρίζοντας ότι το δεκαεξάνιο βρίσκεται σε ένα σημαντικό ποσοστό στο diesel, μπορεί να θεωρηθεί ως αντιπροσωπευτικός αλειφατικός υδρογονάνθρακας της οργανικής φάσης.

Στις μελέτες για την βιοαποθείωση έχουν χρησιμοποιηθεί πολλοί οργανικοί διαλύτες όπως ο διαιθυλεθέρας, η αιθανόλη, το DMSO, το διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF), το κανονικό εξάνιο, το ξυλένιο, το δωδεκάνιο, το κανονικό δεκατετράνιο, και το κανονικό δεκαεξάνιο. Για όλους τους παραπάνω διαλύτες είναι απαραίτητο πριν την επιλογή τους να έχει ερευνηθεί η τοξικότητα τους ως προς την δράση των κυττάρων. Διαλύτες όπως το n-δεκαεξάνιο και το n-δωδεκάνιο έχουν βρεθεί μη τοξικοί για τα κύτταρα και έτσι επιλέγονται σε πολλές διεργασίες αποθείωσης ως η οργανική φάση που προσομοιάζει το πετρελαϊκό κλάσμα.

Πολλές μελέτες αναζητούν απάντηση στην επίδραση του μήκους της ανθρακικής αλυσίδας της οργανικής φάση στην αποθειωτική δράση. Σύμφωνα με μία έρευνα όπου εξετάστηκαν οι διαλύτες: n-εξάνιο, κυκλοεξάνιο, επτάνιο, n-οκτάνιο, δωδεκάνιο και δεκαεξάνιο στο στέλεχος *Nocardia globerula R-9* βρέθηκε ότι ο ρυθμός αποθείωσης

αυξάνεται με τον αριθμό των ατόμων άνθρακα στο διαλύτη στο εύρος C6-C12 [55]. Τα μη αναπτυσσόμενα κύτταρα (resting cells) του στελέχους έδειξαν μεγαλύτερη αποθειωτική ικανότητα στο δεκαεξάνιο και το δωδεκάνιο από ότι στο εξάνιο και το επτάνιο. Επομένως το εν λόγω στέλεχος κρίνεται καταλληλότερο για χρήση σε κλάσματα βενζίνης από ότι diesel. Από την άλλη μεριά έχει βρεθεί ότι ο ίδιος διαλύτης είναι αποδοτικότερος σε διαφορετικούς μικροοργανισμούς όπως για παράδειγμα το DMF είναι αποδοτικότερο στον *Gordonia alkanivorans 1B* από ότι στον *R. erythropolis D1*.

Ο λόγος οργανικής προς την υδατική φάση (O/W ratio) κατά κύριο λόγο επηρεάζει την διαθεσιμότητα των οργανοθεικών ενώσεων στη διεπιφάνεια. Αυτό διότι ενώσεις του θείου στην οργανική φάση για να απομακρυνθούν θα πρέπει να έρθουν σε επαφή με τα κύτταρα που βρίσκονται στην υδατική φάση, γεγονός που πραγματοποιείται στην διεπιφάνεια. Από οικονομικής άποψης, λαμβάνοντας υπόψιν τον μετέπειτα διαχωρισμό των φάσεων, είναι επιθυμητό η διεργασία της βιοαποθείωσης να λαμβάνει χώρα με το δυνατόν υψηλότερο ποσοστό οργανικού διαλύτη. Πρακτικά, η ποσότητα της υδατικής φάσης θα πρέπει να είναι η μικρότερη δυνατή που να εξασφαλίζει όσο το δυνατόν υψηλότερη απόδοση για υψηλή συγκέντρωση του S στην τροφοδοσία. Στο σημείο αυτό, αξίζει να τονιστεί πως η ποσότητα του οργανικού διαλύτη σχετίζεται άμεσα με την υδροφοβικότητα ή μη των μικροοργανισμών που επιλέγονται. Υδροφοβοί βιοκαταλύτες όπως οι *Rhodococcus* και *Gordona* είναι ικανοί να αποθειώνουν σε μεγαλύτερη αναλογία οργανικής φάσης.

10. Πιλοτική Μονάδα Βιοαποθείωσης

Τα τελευταία χρόνια οι νομοθετικές ρυθμίσεις γύρω από τα επίπεδα θείου στην ατμόσφαιρα γίνονται όλο ένα και πιο αυστηρές. Ιδιαίτερα η νομική κατοχύρωση των εκπομπών από διεθνείς οργανισμούς επιβάλλει την άμεση εφαρμογή τους και τον έλεγχο της τήρησής τους σε επίπεδο κρατών. Έτσι εδώ και κάποιες δεκαετίες έχει ξεκινήσει ένας αγώνας μεταξύ των ερευνητών ώστε να εκμεταλλευτούν τα οφέλη της Βιοαποθείωσης στην μείωση των εκπομπών με την δημιουργία μονάδας βιοαποθείωσης βιομηχανικής κλίμακας. Η μονάδα θα λειτουργεί συμπληρωματικά της υδρογονοκατεργασίας δεχόμενη την τροφοδοσία που εξέρχεται από αυτή με σκοπό να απομακρύνει τις ενώσεις εκείνες που είναι ανθεκτικές στην δράση της HDS (DBTs, BTs, C_x-DBT), επιτυγχάνοντας βαθύτερη αποθείωση. Παράλληλα, σε οικονομικούς όρους η μονάδα πρέπει να είναι προσιτή και ασφαλώς οικονομικότερη από την υδρογονοκατεργασία. Ωστόσο, δεν έχει υπάρξει μέχρι πρότινος μονάδα διύλισης που να την ενσωματώσει στην παραγωγή καυσίμων. Η μέχρι σήμερα έρευνα έγκειται στην δημιουργία μονάδας βιοαποθείωσης σε πιλοτικό όμως στάδιο. Μεγάλα περιθώρια έρευνας υπολείπονται ακόμη στο πεδίο της βιομηχανικής εφαρμογής της.

Αρχικά, για την εμπορευματοποίηση της διεργασίας Βιοαποθείωσης σε μία μονάδα διύλισης θα πρέπει οι να ληφθούν υπόψιν τα εξής βασικά στάδια βιοχημικής μηχανικής και τεχνικών διύλισης:

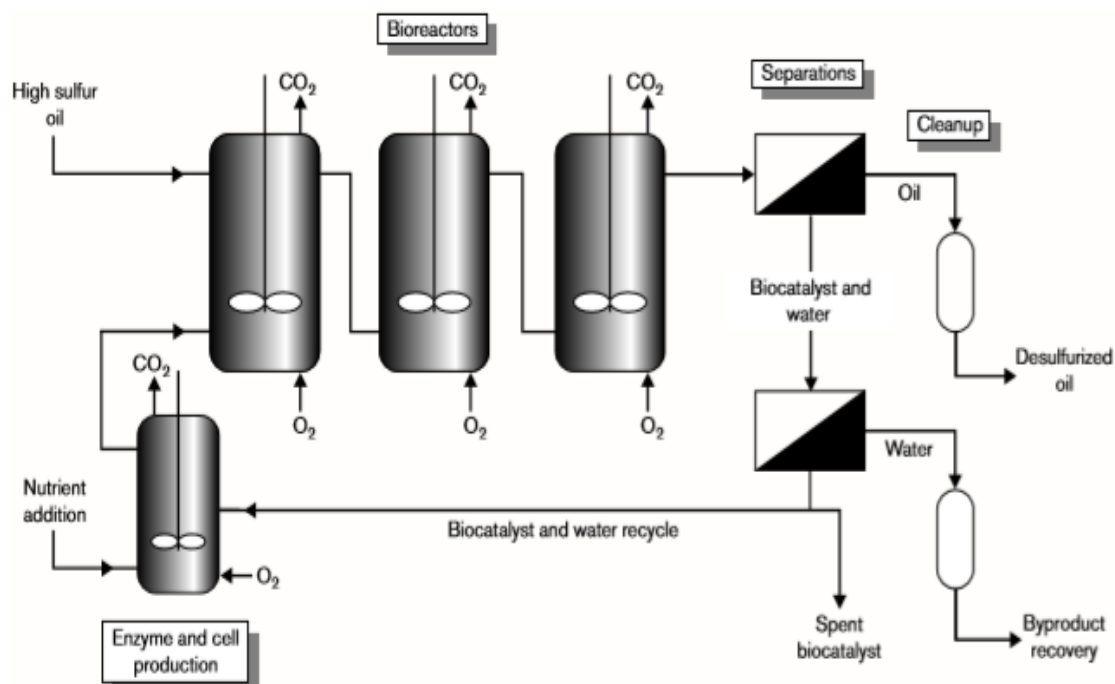
1. Παραγωγή βιομάζας με υψηλή ειδική ενζυμική ενεργότητα.
2. Παρασκευή διφασικού συστήματος που περιέχει το οργανικό κλάσμα, την υδατική φάση και την βιομάζα. Πιθανότατα περιλαμβάνεται και κάποια προκατεργασία της τροφοδοσίας του αργού πετρελαίου
3. Αποθείωση ενός μεγάλου εύρους οργανικών θειούχων ενώσεων στον επιθυμητό βαθμό.

4. Διαχωρισμός του αποθειωμένου οργανικού κλάσματος από την υδατική φάση και ανάκτηση των κυττάρων για ανακυκλοφορία.
5. Σωστή διαχείριση υδατικών αποβλήτων.

Κάθε ένα από τα παραπάνω στάδια περιλαμβάνει τον σχετικό εξοπλισμό και ειδικές λειτουργικές παραμέτρους ενώ επηρεάζεται από πλήθος άλλων παραγόντων.

Ένας από τους πρώτους που ασχολήθηκε με την εκπόνηση σχετικού έργου ήταν η U.S. Company Energy Biosystems Corporation, όπου ανέπτυξε πιλοτική μονάδα με τη δυνατότητα να αποθειώνει έως και 5 βαρέλια πετρελαίου την μέρα. Στη διεργασία ο βιοκαταλύτης και τα κύτταρα αναμιγνύονται σε ένα βιοαντιδραστήρα συνεχούς έργου όπου η βιοαποθείωση λαμβάνει χώρα. Κατόπιν, το αποθειωμένο πετρελαιοειδές οδηγείται σε δοχείο όπου με μία σειρά φίλτρων διαχωρίζεται από την βιομάζα. Τέλος, η τροφοδοσία προστίθεται σε αλκαλικό υδατικό διάλυμα προς εξουδετέρωση (neutrification). Το θειικό Νάτριο που σχηματίζεται από την αντίδραση αφαιρείται εύκολα σε σταθμό διαχείρισης υδατικών αποβλήτων [56].

Ένα πιο ολοκληρωμένο αλλά θεωρητικό σχέδιο μία βιομηχανικής μονάδας προτάθηκε από το 2000 από τους Monticello et al [33] και παρουσιάζεται *σχήμα 8*.



Σχήμα 8. Διάγραμμα ροής Πιλοτικής Μονάδας Βιοαποθείωσης [33]

Όπως υποδεικνύεται στο σχήμα, η βιομάζα αρχικά αναπτύσσεται σε βιοαντιδραστήρα συνεχούς έργου όπου παρέχεται η τροφοδοσία με το θρεπτικό υλικό και το οξυγόνο. Παράμετροι όπως ο ρυθμός ανάπτυξης ο χρόνος παραμονής και άλλοι ελέγχονται σχολαστικά και επιλέγεται εκείνος ο συνδυασμός όπου θα δώσει κύτταρα με την καλύτερη αποθειωτική δράση. Κατά την παραμονή τους στον αντιδραστήρα τα κύτταρα πέραν του πολλαπλασιασμού τους εκφράζουν τα ένζυμα εκείνα που αξιοποιούν στους μηχανισμούς αποθείωσης. Εφόσον επιτευχθεί η σωστή συγκέντρωση βιομάζας, τα κύτταρα αναμιγνύονται με το κλάσμα πετρελαίου πλούσιο σε S και το μίγμα εισάγεται σε μία συστοιχία τριών βιοαντιδραστήρων όπου πραγματοποιείται η αποθείωση. Η επιλογή τριών και όχι ενός αντιδραστήρα γίνεται με την λογική της επίτευξης υψηλού

βαθμού αποθείωσης. Επιπροσθέτως, εξαιτίας των αρκετά χαμηλών περιεκτικοτήτων σε S που επιβάλλει η νομοθεσία και των εν γένη χαμηλών ρυθμών αποδόμησης των μικροοργανισμών που έχουν έως τώρα μελετηθεί, η χρήση τριών αντιδραστήρων είναι απαραίτητη για να αυξηθεί η συνολική μετατροπή. Ακολούθως, το ρεύμα εξόδου από τους αντιδραστήρες εισέρχεται στη φάση των διαχωρισμών. Σε πρώτο στάδιο διαχωρίζονται οι δύο φάσεις: η οργανική που περιέχει το αποθειωμένο πετρέλαιο και υδατική που εμπεριέχει τα κύτταρα. Στο ένα ρεύμα εξέρχεται το αποθειωμένο πετρέλαιο, το οποίο εφόσον καθαριστεί περαιτέρω ωθείται στη συνέχεια προς τις βασικές διεργασίες διαφοροποίησης των κλασμάτων του. Στο δεύτερο ρεύμα εξέρχεται ο βιοκαταλύτης παρουσία νερού. Για τους διαχωρισμούς προτείνεται η χρήση υδροκυκλώνων σε συνδυασμό με φυγοκεντρικές διατάξεις. Το ρεύμα κυττάρων και νερού διαχωρίζεται και τα κύτταρα ανακυκλοφορούνται. Η ανακυκλοφορία των κυττάρων εξασφαλίζει τη μεγάλη διάρκεια παραμονής του βιοκαταλύτη που χρειάζεται για μία συνεχούς έργου βιομηχανική διεργασία. Το υδατικό ρεύμα παραλαμβάνεται και οδηγείται σε διεργασίες ανάκτησης κάποιου παραπροϊόντος είτε σε διεργασίες διαχείρισης αποβλήτων (wastewater treatment).

10.1 Επιλογή Βιοκαταλύτη και Παραγωγή του

Όπως έχουμε ήδη αναφέρει η διεργασία της Βιοαποθείωσης έπεται της υδρογονοαποθείωσης. Ως εκ τούτου, για την καλύτερη συμβατότητα των μεθόδων, στην έρευνα για την επιλογή των κατάλληλων βιοκαταλυτών δίνεται ιδιαίτερη μνεία σε θεرمόφιλα στελέχη λόγω των υψηλών θερμοκρασιών του ρεύματος εξόδου από την HDS.

Άλλος παράγοντας που πρέπει να ληφθεί υπόψη στην επιλογή μικροοργανισμού σχετίζεται με τον τρόπο διαχωρισμό του από το αποθειωμένο κλάσμα. Εφαρμογές της νανοβιοτεχνολογίας προτείνουν μία καινοτόμα λύση στο θέμα: Την εισαγωγή μαγνητικών νανοσωματιδίων Fe_3O_4 σε κύτταρα μέσω χημικής αντίδρασης. Ερευνητές κατάφεραν να ενσωματώσουν τα σωματίδια μεγέθους 45-50nm σε κύτταρα του *R. Erythropolis IGTS8*. Η παρατήρηση των κυττάρων σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης έδειξε την ουσιαστική επικάλυψη της επιφάνειας των κυττάρων από μαγνητικά σωματίδια. Στον έλεγχο της δραστηριότητας τους βρέθηκε ικανότητα αποθείωσης του DBT 56% μεγαλύτερη των «μαγνητικών» κυττάρων από αυτά που δεν έφεραν μαγνητικές ιδιότητες. Το πλεονέκτημα στη μέθοδο αυτή είναι ότι με το πέρας της αντίδρασης, τα κύτταρα μπορούν να διαχωριστούν ευκολότερα με την έκθεση τους σε μαγνητικό πεδίο [57]. Ανάλογη προσπάθεια έγινε και σε στελέχη *Pseudomonas delafieldii*. Τα μαγνητικά επικαλυμμένα κύτταρα βρέθηκε ότι είχαν την ίδια αποθειωτική ισχύ με τα μη επικαλυμμένα. Ωστόσο το σημαντικότερο προτέρημα ήταν η δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης τους έως και 5 φορές με το ίδιο ποσοστό μείωσης του DBT σε αντίθεση με τα μη επικαλυμμένα που δεν είχαν αποθειωτική δράση στη δεύτερη χρήση [58].

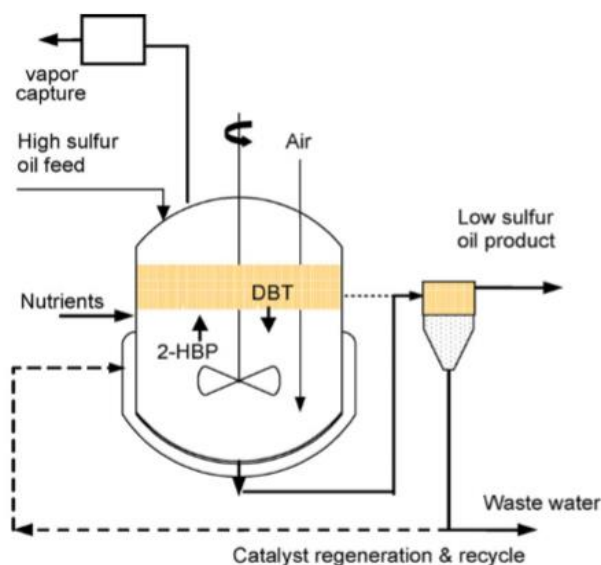
Μετά την σωστή επιλογή του μικροοργανισμού ακολουθεί η ανάπτυξή του. Είναι σαφές πως χρειάζεται μεγάλη ποσότητα κυττάρων ικανή να αποθειώνει σημαντική ποσότητα τροφοδοσίας σε δεδομένο χρόνο. Σκεπτόμενοι με αυτή τη λογική, ως αποδοτικότερη τεχνική ανάπτυξης των μικροοργανισμών επιλέγεται η τεχνική των μη αναπτυσσόμενων κυττάρων (resting cells). Πρόκειται για κύτταρα αρκετά πυκνά που έχουν μεγαλώσει σε τέτοιο βαθμό ώστε να έχουν επάγει τα ένζυμα τους για τις μεταβολικές αντιδράσεις της αποθείωσης. Τότε δεν καταναλώνουν πλέον υποστρώματα για την παραγωγή πρωτεϊνών και άλλων μηχανισμών που σχετίζονται με την περαιτέρω ανάπτυξη τους αλλά η δράση τους αφορά αποκλειστικά την αποθείωση. Η τεχνική των resting cells είναι ιδιαίτερα χρήσιμη καθότι επιτρέπει την παραγωγή βιομάζας υψηλής κυτταρικής

πυκνότητας από καλλιέργειες μεγάλων όγκων, ενισχύοντας κατά πολύ τον ρυθμό της αντίδρασης.

Η σωστή ανάπτυξη των κυττάρων προϋποθέτει μία σειρά παραγόντων που λίγο-πολύ έχουν αναφερθεί προηγουμένως. Προπάντων πρέπει να εξασφαλιστεί η ακεραιότητα του μικροοργανισμού και να αποφευχθεί η μόλυνση του. Μία πιθανή μόλυνση θα είχε ολέθρια αποτελέσματα για μία βιομηχανική διεργασία συνεχούς έργου. Θα έθετε τον μηχανισμό για μεγάλο χρονικό διάστημα εκτός λειτουργίας έως ότου καθαριστεί και τεθεί πάλι σε λειτουργία. Αναγκαστικά λοιπόν η τροφοδοσία του θρεπτικού μέσου πρέπει να είναι αποστειρωμένη και η παροχή οξυγόνου πολύ καθαρή. Επόμενο ζήτημα που πρέπει να επιλυθεί, αποτελεί όπως έχει ειπωθεί, η καταστολή της παραγωγής των ενζύμων από τα SO_4^{2-} και άλλα θειούχα συστατικά. Πέρα από τις επεμβάσεις τις γενετικής μηχανικής η καταστολή αποφεύγεται με την επιλογή διαφορετικής ένωσης ως πηγή θείου για την ανάπτυξη που δεν σχετίζεται με την απελευθέρωση SO_4^{2-} . Το DBT για παράδειγμα -εκτός από υπόστρωμα για το μηχανισμό 4S- θα μπορούσε να χρησιμεύσει και ως πηγή S για την ανάπτυξη των κυττάρων. Εν τούτοις, η μαζική παραγωγή βιοκαταλύτη χρησιμοποιώντας το DBT είναι εμπορικά μη εφαρμόσιμη λόγω του υψηλού κόστους του DBT αφενός και αφετέρου λόγω της πολύ χαμηλής διαλυτότητας του στο νερό και την παρεμπόδιση που δημιουργεί το προϊόν 2-HBP στην ανάπτυξη. Μία ένωση που έχει μελετηθεί από πολλούς ερευνητές και αποτελεί την έως τώρα επικρατέστερη επιλογή είναι το διμέθυλο-σουλφοξείδιο (DMSO). Έχει βρεθεί ότι κάνοντας χρήση του στελέχους *R. erythropolis IGTS8* σε μέσο ανάπτυξης με DMSO δεν καταστέλλεται η αποθειωτική ισχύς και ο μικροοργανισμός μπορεί παράλληλα να αποθειώνει σε ικανοποιητικό βαθμό. Άλλες πηγές S που έχουν κατά καιρούς μελετηθεί είναι το θειοφαίνιο, θειικό μαγνήσιο κ.α. Επιπλέον παράμετροι που πρέπει να ληφθούν υπόψιν είναι επιλογή του θρεπτικού, και λειτουργικές παράμετροι όπως συνθήκες ανάδευσης, θερμοκρασία, χρόνος παραμονής, παροχή οξυγόνου κ.α., τα οποία αποτελούν συνάρτηση του μικροοργανισμού που θα επιλεγεί.

10.2 Επιλογή Βιοαντιδραστήρα

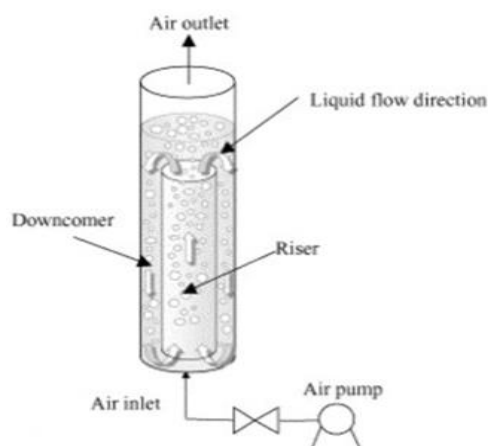
Στην έρευνα για την επιλογή αντιδραστήρα έχουν κατά καιρούς προταθεί διάφοροι τύποι όπως αντιδραστήρες δύο φάσεων υγρού-υγρού, αντιδραστήρες με ανάμιξη (stirred tanks), ακόμη και αντιδραστήρες με σύστημα ηλεκτροστατικού διασκορπισμού για την βιοαποθείωση αξιοποιώντας θειοαναγωγικά βακτήρια. Μία ενδιαφέρουσα μελέτη των Yang et al [59], σχεδίασε έναν διφασικό αντιδραστήρα διαχωρισμένης οργανικής-υδατικής φάσης σε συνεχές έργο για την ανάπτυξη στελεχών *Rhodococcus globerulus DAQ3* και την ταυτόχρονη αποθείωση κλασμάτων diesel. Η διάταξη αποτυπώνεται στο παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 9. Προτεινόμενος αντιδραστήρας δύο φάσεων συνεχούς έργου κατά τους Yang et al [59].

Όπως φαίνεται και στο σχήμα, στο πάνω στρώμα βρίσκεται η οργανική φάση του diesel ή κάποιας άλλης ένωσης που προσομοιάζει την πετρελαϊκή φάση (model oil) και περιέχει σε υψηλή περιεκτικότητα οργανικές θειούχες ενώσεις, οι οποίες εκπροσωπούνται από το DBT. Στο κάτω στρώμα βρίσκεται η υδατική φάση με κύτταρα τα οποία μεγαλώνουν σε συνθήκες μόνιμης κατάστασης (steady state). Τα οργανοθειϊκά συστατικά (DBT) διαχέονται από την οργανική στην υδατική φάση και έρχονται σε επαφή με τα κύτταρα όπου αφαιρούν το S. Το παραγόμενο προϊόν 2-HBP διαχέεται πίσω στην οργανική φάση. Ταυτόχρονα τα υδατοδιαλυτά συστατικά που παράγονται από τον μεταβολισμό ή τη λύση των κυττάρων και παρεμποδίζουν την ανάπτυξη ή την αποθείωση, απομακρύνονται από τον πυθμένα του αντιδραστήρα, βελτιώνοντας την απόδοση της αντίδρασης. Η δυσκολία στην τεχνική αυτή έγκειται στη διατήρηση των δύο φάσεων χωριστά. Στα οφέλη της τεχνικής προσμετράται η διατήρηση της αποθειωτικής ικανότητας των κυττάρων για εκτεταμένο χρονικό διάστημα συγκριτικά με καλλιέργειες διαλείποντος και ημι-διαλείποντος έργου.

Ακόμη μία εναλλακτική που έχει διαδοθεί αρκετά τα τελευταία χρόνια είναι η χρήση ενός αερο-αναδευόμενου αντιδραστήρα (airlift-reactor, ALR). Στην ουσία πρόκειται για έναν τύπο πνευματικού αντιδραστήρα με ένα εσωτερικό ανοιχτό σωλήνα που επιτυγχάνει πολύ καλή ανάδευση με την χρήση αέρα χωρίς την παρουσία κάποιου μηχανικού αναδευτήρα. Ως προς το σχεδιασμό του μπορεί να διακριθεί σε 4 μέρη: Στον πυθμένα όπου βρίσκεται διανομέας του αέριου που έρχεται σε επαφή με το υγρό και ωθείται προς τα πάνω, την άνοδο εντός του εσωτερικού σωλήνα όπου το υγρό και ο αέρας ρέουν προς τα πάνω, την κορυφή όπου μέρος του αέρα διαχωρίζεται από το μίγμα και την κάθοδο εξωτερικά του εσωτερικού σωλήνα όπου το υγρό με τον αέρα ωθούνται προς τον πυθμένα. Στην πραγματικότητα επιτυγχάνεται πολύ καλή μεταφορά των διαθέσιμων θρεπτικών άλλα και του διαθέσιμου οξυγόνου εξαιτίας των πολύ υψηλών συντελεστών μεταφοράς μάζας. Αυτός είναι και ο βασικότερος λόγος επιλογής του ALR στις αερόβιες καλλιέργειες της αποθείωσης. Στο πείραμα των Lee et al [60], για παράδειγμα, στελέχη του *Gordonia nitida* CYKS1 αναπτυσσόμενα σε αντιδραστήρα τύπου airlift κατάφεραν να απομακρύνουν έως και 67% του θείου από μίγμα περιεκτικότητας 10% σε diesel.



Σχήμα 10. Δομή αντιδραστήρα τύπου airlift

Τέλος, λιγότερο διαδεδομένη εναλλακτική είναι η χρήση αντιδραστήρα καταλυτικής κλίνης με ακινητοποιημένα κύτταρα πάνω σε κάποιο φορέα (π.χ. SiO_2). Σε αυτή την περίπτωση η βιοαποθείωση φαίνεται να είναι συνάρτηση του μήκους της κλίνης, της παροχής των οργανοθεϊκών ενώσεων και του μεγέθους των ακινητοποιημένων σωματιδίων.

10.3 Διαχωρισμός του διφασικού μίγματος

Ο διαχωρισμός του αποθειωμένου οργανικού κλάσματος από τα κύτταρα και την υδατική φάση αποτελεί κρίσιμο στάδιο στην διεργασία αποθείωσης. Πρώτα από όλα πρέπει να ερευνηθεί η υδρόφοβη ή υδρόφιλη φύση των κυττάρων για να μπορέσει να αξιοποιηθεί αυτή η ιδιότητα τους στο διαχωρισμό. Ασφαλώς αυτό εξαρτάται από την φύση των μικροοργανισμών που επιλέγονται.

Λόγου χάρη βακτήρια όπως ο *R.erythropolis IGTS8* επιδεικνύουν μία υδρόφοβη συμπεριφορά. Σε ένα σύστημα πετρελαίου-νερού, αυτά τα βακτήρια έχουν τάση να προσκολλούνται στην διεπιφάνεια πετρελαίου-νερού. Αυτό σημαίνει ότι στην δημιουργία ενός αιωρήματος κυττάρων-νερού-πετρελαίου, τα κύτταρα θα βρίσκονται σε επαφή με τις σταγόνες του πετρελαιοειδούς στην διεπιφάνεια ενώ η υδατική φάση θα είναι καθαρή. Απεναντίας, στα συστήματα του *Pseudomonas* τα κύτταρα παραμένουν αιωρούμενα στην υδατική φάση [33]. Η μία είτε ή άλλη τάση των κυττάρων επηρεάζονται από τα φαινόμενα μεταφοράς μάζας των οργανοθεϊκών ενώσεων (κυρίως του DBT το οποίο έχει και μικρή διαλυτότητα στο νερό) από το πετρέλαιο στο νερό, από το νερό στα κύτταρα κ.ο.κ. Έτσι δηλαδή βλέπουμε ότι ο *Rhodococcus* είναι ικανός να προσβάλει πολύ υδρόφοβα Cx-DBT απευθείας από την οργανική φάση ενώ ο *Pseudomonas* μπορεί να τα προσβάλει σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις στην υδατική φάση. Η προτίμηση αυτή των κυττάρων είναι πολύ σημαντικής για να επιτύχουμε το σωστό διαχωρισμό.

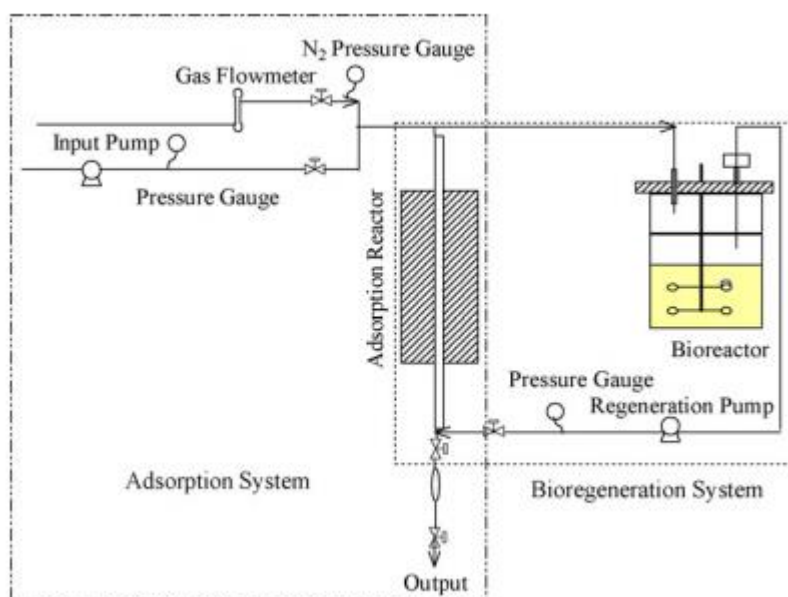
Ως προς τους υδρόφοβους βιοκαταλύτες ο διαχωρισμός των κυττάρων από την οργανική φάση εμφανίζει επίσης ένα εμπόδιο: Σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του βιοκαταλύτη δημιουργούνται «σταθερά» γαλακτώματα που πρέπει να «σπάσουν» για την ανάκτηση του αποθειωμένου κλάσματος, την ανακυκλοφορία του καταλύτη και το διαχωρισμό των παραπροϊόντων από την υδατική φάση. Προς αντιμετώπιση του θέματος, η πρώτη σκέψη είναι να αποφύγουμε την δημιουργία γαλακτωμάτων νερού-πετρελαίου αν αυτό είναι δυνατόν για διευκολύνουμε τον διαχωρισμό. Επικρατέστερη λύση είναι η χρήση της τεχνικής των ακινητοποιημένων κυττάρων σε φορέα. Η ακινητοποίηση των κυττάρων παρέχει τα πλεονεκτήματα όπως βελτιωμένη σταθερότητα, επαναλαμβανόμενη χρήση,

εύκολος διαχωρισμός από το μείγμα και δυνατότητα πιθανής τροποποίησης των καταλυτικών ιδιοτήτων. Κατά πολλούς ερευνητές τα ακινητοποιημένα κύτταρα διαθέτουν μεγαλύτερη σταθερότητα και διάρκεια ζωής από τα ελεύθερα κύτταρα. Επίσης, όπως έχουμε αναφέρει το διαχωρισμό μπορεί να διευκολύνει η εισαγωγή μαγνητικών νανόσωματιδίων Fe_3O_4 στα κύτταρα.

Σε περίπτωση που το γαλάκτωμα δεν μπορεί να αποφευχθεί μία αποδοτική μέθοδος περιλαμβάνει την χρήση υδροκυκλώνων. Οι υδροκύκλωνες είναι συστήματα σε σχήμα κωνικού σωλήνα με τυπικές διαστάσεις 1m μήκος και 5-10 cm πλάτος. Καθώς το διασπαστικό σύστημα εισέρχεται από το πλατύτερο σημείο του κώνου (κορυφή του υδροκυκλώνα) αρχίζει να περιστρέφεται γύρω από τα τοιχώματα του κώνου, τραβώντας το πυκνότερο κλάσμα (νερό) προς την έξοδο του κυκλώνα στο κάτω μέρος ενώ το ελαφρύτερο κλάσμα αρχίζει να περιστρέφεται με την αντίστροφη φορά εξερχόμενο από την κορυφή ή στο πλάι του κυκλώνα. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω τα βακτήρια έχουν την τάση να βρίσκονται γύρω από τη διεπιφάνεια πετρελαίου-νερού. Αυτό σημαίνει πρακτικά ότι στην περίπτωση γαλακτώματος τα κύτταρα «πάνε» πάντα με την διασπαρμένη φάση. Επομένως σε ένα γαλάκτωμα νερού σε πετρέλαιο τα κύτταρα επαφίονται με τις διασπαρμένες σταγόνες νερού. Το πέρασμα από τον υδροκυκλώνα θα διαχωρίσει το αποθειωμένο πετρελαιοειδές από την υδατική φάση με τα κύτταρα. Απ' την άλλη μεριά, σε ένα γαλάκτωμα πετρελαίου σε νερό τα κύτταρα συνδέονται με τις διασπαρμένες σταγόνες πετρελαίου. Μετά το πέρασμα από τον υδροκυκλώνα λαμβάνεται μία καθαρή υδατική φάση και ένα μίγμα κυττάρων και οργανικής φάσης όπου ανακυκλοφορείται στον αντιδραστήρα. Η επιλογή των υδροκυκλώνων γλυτώνει την διεργασία από αρκετά ενεργοβόρες πρακτικές όπως η φυγοκέντρηση.

11. Σύζευξη της Βιοαποθείωσης με άλλες τεχνικές

Η Αποθείωση με απορρόφηση είναι μία επίσης αναπτυσσόμενη εναλλακτική που, όπως έχει αναφερθεί, περιλαμβάνει την αφαίρεση θειούχων συστατικών παρουσία οξειδίων των μετάλλων, μοριακών κόσκινων είτε ενεργού άνθρακα που λειτουργούν ως ροφητικά μέσα κάτω από ήπιες θερμοκρασίες. Η αναγέννηση των ροφητικών μέσων μπορεί να γίνει με χημικούς τρόπους όπως η εκχύλιση του διαλύτη και η οξείδωση στον αέρα. Οι παρόμοιες ήπιες συνθήκες που επικρατούν τόσο στην προσρόφηση όσο και στην βιοαποθείωση ευνοούν την σύζευξη των δύο τεχνικών ως μια νέα προσέγγιση στην παραγωγή καθαρότερων καυσίμων. Στο πρώτο στάδιο προηγείται η ρόφηση των οργανοθειικών ενώσεων στα ροφητικά μέσα, τα οποία σε επόμενο στάδιο αναγεννούνται. Ύστερα έπεται η αποδόμηση των προσροφημένων οργανοθειικών ενώσεων από μικροοργανισμούς. Η σύζευξη των τεχνικών μελετήθηκε από τους Li et al [61] χρησιμοποιώντας το DBT ως πρότυπο συστατικό και στελέχη του *P. Delafieldi R-8*. Κατά την διεργασία το DBT προσροφάται σε π-συμπλοκοποιημένα (Cu(I)-Y, Y-τύπος ζεόλιθου) ροφητικά μέσα, και αμέσως μετά αποικοδομούνται από το στέλεχος *Delafieldi R-8*, με ταυτόχρονη αναγέννηση των ροφητών. Το μέγεθος των κυττάρων ήταν ίδιο με αυτό των ροφητικών μέσων, επομένως για τον διαχωρισμό των κυττάρων και την αναγέννηση των ροφητικών μέσων εφαρμόστηκε μαγνητικό πεδίο στα κύτταρα όπου προηγουμένως είχαν εισαχθεί μαγνητικά σωματίδια Fe_3O_4 . Μία εργαστηριακή μονάδα συνδυασμένης φυσικής και βιολογικής διεργασίας φαίνεται στο παρακάτω σχήμα. Η μέθοδος προτείνεται για την επίτευξη diesel πολύ χαμηλού θείου.



Σχήμα 11. Συνδυασμένη διάταξη αποθείωσης με προσρόφηση και βιοαποθείωσης [62].

Όπως παρατηρείται η διάταξη διαιρείται σε δύο μέρη: Το σύστημα προσρόφησης και το σύστημα αναγέννησης των ροφητικών μέσων. Να τονιστεί πως τα δύο μέρη δεν λειτουργούν σε συνεχή πορεία. Τουτέστι, μετά τον κορεσμό των ροφητικών μέσων, το σύστημα προσρόφησης κλείνει και ο αντιδραστήρας της προσρόφησης συνδέεται με τον βιοαντιδραστήρα.

Ο πλέον όμως πολυσυζητημένος συνδυασμός της Βιοαποθείωσης, εκτός από την προσρόφηση, είναι με την διεργασία της Υδρογονοαποθείωσης. Η BDS θα έπεται της HDS και ο συνδυασμός τους θα στηρίζεται στην εξής ιδέα: Η HDS, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως δεν είναι το ίδιο αποτελεσματική στην αποθείωση όλων των τύπων θειούχων συστατικών. Ιδιαίτερα τα αλκυλιωμένα DBT δεν είναι δυνατόν να αποθειωθούν με υδρογονοκατεργασία. Από την άλλη μεριά αποτελούν πολύ ελκυστικά υποστρώματα για την BDS με σημαντικό βαθμό αποθείωσης. Αν λάβουμε υπόψιν ότι η πλειοψηφία των ενώσεων του S στο πετρέλαιο είναι ενώσεις του θειοφαινίου και δει παράγωγα του DBT, τότε εύκολα συμπεραίνουμε ότι η BDS μπορεί να συμπληρώσει την HDS για την παραγωγή χαμηλών σε S καυσίμων. Στη λογική αυτή ωθούν οι ολόενα και αυστηρότερες περιβαλλοντικές απαιτήσεις των εκπομπών σε S. Αυστηρότερες απαιτήσεις επιβάλλουν την ανάγκη απομάκρυνσης από την HDS ακόμη και των πιο ανθεκτικών σε αυτήν μορίων. Αν παραμείνουμε σε εφαρμογή της HDS αυτό συνεπάγεται και πιο έντονες συνθήκες κατεργασίας με πολύ αυξημένο κόστος. Μετά από ένα σημείο, τα ανθεκτικά μόρια αποτελούν τροχοπέδη στο στόχο για πολύ χαμηλή περιεκτικότητα σε S, όποτε αναγκαστικά οδηγούμαστε στην εφαρμογή της βιοαποθείωσης ως αποδοτικής και οικονομικής συμπληρωματικής τεχνικής.

12. Μειονεκτήματα της Βιομηχανικής Εφαρμογής της Βιοαποθείωσης

Παρόλο που η βιοαποθείωση εξυπηρετεί ικανοποιητικά ως αποθειωτική τεχνική με την πάροδο του χρόνου, έχουν ανακύψει θέματα που δυσχεραίνουν την βιομηχανική εφαρμογή της. Σημαντικότερο εξ' αυτών είναι το υψηλό κόστος ανάπτυξης των

κυττάρων σε θρεπτικά υλικά. Αναλογιζόμενοι το μέγεθος των καλλιεργειών που πρέπει να αναπτυχθούν με βάση την τροφοδοσία αργού πετρελαίου που στοχεύουν να αποθειώσουν, οδηγούμαστε σε πολύ μεγάλες ποσότητες θρεπτικών μέσων, τα όποια μάλιστα θα πρέπει να ανανεώνονται τακτικά αν πρόκειται για συνεχή καλλιέργεια. Στο σημείο αυτό να αναφέρουμε πως για την ελάφρυνση των κεφαλαιακού κόστους δύναται να χρησιμοποιούνται θρεπτικά συστατικά όπως πηγή άνθρακα από βιομηχανικά αγροτικά προϊόντα. Επιπλέον δυσκολία εντοπίζεται και στην διατήρηση καθαρού του περιβάλλοντος ανάπτυξης των κυττάρων εντός του διυλιστηρίου, δεδομένων των ιδιαίτερων συνθηκών που επικρατούν λόγω πολλών διαφορετικών διεργασιών. Η χρήση μεγάλων αυτοκλείστων προς αποστείρωση των θρεπτικών μέσων και η σωστή αποθήκευση τους αυξάνουν το συνολικό κόστος.

Ακόμη ένας λόγος που δυσκολεύει την εφαρμογή της BDS στις μέρες μας είναι ότι πολλά από τα μεταβολικά μονοπάτια που χρησιμοποιούν ορισμένοι μικροοργανισμοί για την αφαίρεση του S, είναι ταυτόχρονα μονοπάτια αποδόμησης των υδρογονανθράκων, κάτι που είναι ανεπιθύμητο διότι οδηγεί σε απώλεια της θερμικής αξίας των καυσίμων [63]. Επιπρόσθετα, δυσκολίες εντοπίζονται και στις διαδικασίες διαχωρισμού των πετρελαιοειδών από τη βιομάζα, όπου βάση έρευνας είναι μικρή η πρόοδος που έχει γίνει στον τομέα ενός αποτελεσματικού διαχωρισμού ενώ πολλά πεδία που σχετίζονται με την δράση των κυττάρων στη διεπιφάνεια χρειάζονται αποσαφήνιση [64]. Επίσης, διευκρινιστικές μελέτες πρέπει να γίνουν και σε ζητήματα που αφορούν την μεταφορά μάζας των οργανοθεϊκών συστατικών από το πετρέλαιο στα κύτταρα και αντίστροφα.

Τέλος, προβλήματα στην μαζική αποθείωση προκαλεί η καταστολή της δράσης των ενζύμων από εύκολα «βιοδιαθέσιμα» θειούχα συστατικά και επιπλέον η παρεμπόδιση του προϊόντος 2-HBP στην ανάπτυξη των κυττάρων. Για ορισμένους ερευνητές η πολυενζυματική φύση της αποθείωσης είναι μειονέκτημα για την εφαρμογή της *ex situ*. Αυτό πρακτικά σημαίνει τη δυσκολία στην εφαρμογή της BDS με ελεύθερα ένζυμα που έχουν απομονωθεί από τους σχετικούς μικροοργανισμούς.

13. Μελλοντικές προκλήσεις της Βιοαποθείωσης

Ανακεφαλαιώνοντας στην παρούσα μελέτη αναφερθήκαμε στην παρουσία θειικών οργανικών ενώσεων στο πετρέλαιο, τα περιβαλλοντικά προβλήματα που προκαλούν οι εκπομπές SO_x, την ισχύουσα νομοθεσία και τις τεχνικές απομάκρυνσης του θείου με έμφαση στην Βιοαποθείωση. Η εφαρμογή της βιοαποθείωσης προϋποθέτει την σωστή αξιολόγηση των πλεονεκτημάτων και των μειονεκτημάτων της έναντι των υφιστάμενων τεχνικών. Το χαμηλότερο κόστος κεφαλαίου και λειτουργικό κόστος λόγω των ήπιων συνθηκών, η δυνατότητα παραγωγής προϊόντων με πολύ χαμηλούς ρύπους, η παραγωγή πολύτιμων παραπροϊόντων (σουρφακτάνες) είναι μερικά από τα οφέλη της βιοαποθείωσης. Παρά ταύτα, όπως αναφέρθηκε και στην παραπάνω ενότητα είναι υπαρκτά και αρκετά μειονεκτήματα. Αναμφισβήτητα, τις τελευταίες δεκαετίες έχει γίνει σημαντική ερευνητική πρόοδος στο όλο θέμα. Και όμως η κατασκευή μιας βιομηχανικής μονάδας BDS δεν έχει ακόμα επιτευχθεί. Η αποτελεσματική εμπορική χρήση της εξαρτάται από την εξεύρεση λύσης σε ένα σύνολο θεμάτων που εμποδίζουν την εκβιομηχάνισή της. Το κυριότερο είναι οι χαμηλοί ρυθμοί αποθείωσης που απαντώνται στους γνωστούς μικροοργανισμούς. Ίσως η υψηλότερη των προκλήσεων θα ήταν η αναζήτηση νέων μικροοργανισμών είτε η κατασκευή στελεχών που θα αυξάνουν το ρυθμό έως και 500 φορές [23]. Δεδομένου αυτού, το μέλλον της BDS θα εξαρτάται από την εξεύρεση βιοκαταλυτών αρμόδιων και αποτελεσματικών στα μεγάλης κλίμακας μεγέθη ενός διυλιστηρίου. Συγκεντρωτικά λοιπόν παραμένει ευρύ το πεδίο για έρευνα στην ανάπτυξη στελεχών που διαθέτουν υψηλή ειδική ενεργότητα, ευρύτερο φάσμα

υποστρωμάτων που μπορούν να μεταβολίσουν, παραμένουν ενεργά για μεγάλο χρονικό διάστημα και ενδεχομένως να είναι περισσότερο θερμοάντοχα. Η διαθεσιμότητα των γονιδιωμάτων γνωστών μικροοργανισμών με τις υπάρχουσες μεθόδους μεταβολικής μηχανικής βοηθούν στην γενετική τροποποίηση τους αλλά και τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και κατ' επέκταση της αποθειωτικής δράσης.

Η μεγάλη παροχή σε αργό πετρέλαιο απαιτεί και μεγάλα ποσά βιομάζας. Μια τυπική αναλογία αντιστοιχίζει 2,5 g βιομάζας για κάθε γραμμάριο θείου στην τροφοδοσία. Το δύσκολο έργο που καλείται να επιτελέσει η βιομηχανία είναι να διατηρήσει ζωντανά τα βιολογικά συστήματα κάτω από τις πολύ μεταβλητές συνθήκες εισόδου της τροφοδοσίας που συναντώνται στο διυλιστήριο. Μία πρόκληση ιδιαίτερα σφοδρή, αν λάβουμε υπόψιν ότι ο ρυθμός αποθείωσης εξαρτάται από το pH, την θερμοκρασία, το διαλυμένο οξυγόνο και πολλούς άλλους παράγοντες. Λύση, ακόμη, θα πρέπει να δώσει μελλοντικά η έρευνα σε θέματα που αφορούν τη σωστή αναλογία πετρελαίου/νερού στους βιοαντιδραστήρες. Αν ο λόγος αυτός μπορέσει και ελαχιστοποιηθεί συνάμα με καλή αποθειωτική δράση τότε θα μπορέσουν να μειωθούν κόστη που σχετίζονται με το διαχωρισμό των φάσεων και την διαχείριση των υδατικών αποβλήτων. Εν κατακλείδι, πολύ σημαντική πρόταση για μελλοντική έρευνα αφορά την διενέργεια οικονομοτεχνικής μελέτης εμπειρογνομώνων για την βιομηχανική εγκατάσταση και λειτουργία της βιοαποθείωσης αυτής κάθε αυτής αλλά πολύ σημαντικότερα ως μεθόδου ενσωματωμένης στην υπάρχουσα υδρογονοαποθείωση.

Πλέον τα διυλιστήρια ανταγωνίζονται σε έναν αγώνα δρόμου να εφαρμόσουν τεχνικές ώστε να ανταποκριθούν στην αυξανόμενη απαίτηση της αγοράς για προϊόντα πολύ χαμηλού θείου. Την ίδια στιγμή, τα αποθέματα και η ποιότητα του διαθέσιμου ανά τον κόσμο αργού πετρελαίου εξαντλούνται. Έτσι τα διυλιστήρια βρίσκονται αντιμέτωπα με μια «σκληρή» πρόκληση: να παράξουν υψηλότερης ποιότητας προϊόντα χαμηλού θείου (ultra-low sulphur diesel) από λιγότερη διαθέσιμη πρώτη ύλη. Βάση αυτών των δεδομένων αναμένουμε τα επόμενα χρόνια οι εταιρείες είτε να καταβάλουν προσπάθειες για αποδοτικότερη υδρογονοαποθείωση είτε να στραφούν στις ενναλακτικές τεχνικές και στην δυνατότητα συνδυασμού τους. Με μία ρεαλιστική θεώρηση, η βιομηχανική εφαρμογή της BDS δεν φαντάζει πιθανή στο άμεσο μέλλον. Τούτο διότι χρειάζεται ακόμη σημαντικό έργο στα παραπάνω πεδία για να εισάγουμε μία μέθοδο βιώσιμη και ανταγωνιστική. Αυτό που μπορούμε με βεβαιότητα να διατυπώσουμε είναι ότι η μέχρι τώρα έρευνα έχει κάνει σημαντικά βήματα στην συνειδητοποίηση των δυνατοτήτων και υψηλών προοπτικών μιας βιοτεχνολογικής εφαρμογής στον τομέα της ενέργειας και του περιβάλλοντος.

ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

14. Υλικά

14.1 Όργανα και Συσκευές

Παρακάτω δίνεται η λίστα οργάνων και συσκευών που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων.

- Ζυγοί Mark 2060, Mark 4065 (BEL Engineering) και αναλυτικός ζυγός Abs 120-4N (KERN & Sohn GmbH)
- Αυτόκαυστο Lab Autoclave, SANYO (Ιαπωνία)
- Συσκευή μέτρησης pH WTW 537, WTW (Γερμανία)
- Ανακινούμενος επωαστήρας με θερμαινόμενη πλάκα, Eppendorf Thermomixer Comfort (Γερμανία), όπου λαμβάνει Eppendorf των 2mL
- Περιστρεφόμενοι επωαστήρες ZHWY-211C, ZHICHENG, Analytical Instruments Manufacturing Co Ltd (Κίνα)
- Φωτόμετρο S-22 UV/Vis. Spectrophotometer της BOECO (Γερμανία)
- Σύστημα παραγωγής υπερκάθαρου νερού Direct-Q, Millipore (Η.Π.Α.)
- Σύστημα παραγωγής απιονισμένου νερού
- Βιοαντιδραστήρες New Brunswick Scientific-BioFlo 310 Benchtop Fermentor
- Φυγόκεντροι J2-21 και TJ-6 της Beckman Coulter (Η.Π.Α.), Sorvall® RC28S, DuPont (Η.Π.Α.) και μικροφυγόκεντρος πάγκου Zentrifuge Eppendorf 3200 (Γερμανία)
- Συσκευή ανάδευσης υπό θέρμανση Orbit LS, Lantek (Μ. Βρετανία)
- Συσκευή φωτομέτρησης Microplate Reader Spectramax 250 (Molecular Devices)
- Φούρνος Binder Type B34 (Γερμανία)
- Αποστειρωμένος θάλαμος νηματικής ροής (Laminar flow hood, Faster κατ. 2000, Ιταλία)
- Πιπέτες DIGIPETTE 084890 1000μL, 100μL
- Συσκευή υγρής χρωματογραφίας υψηλής Απόδοσης (HPLC) SHIMADZU (Ιαπωνία)

Στα αναλώσιμα που χρησιμοποιήθηκαν περιλαμβάνονται πλαστικά είδη όπως tips, eppendorfs, falcons, φίλτρα κατακράτησης στερεών για τα δείγματα της HPLC, τρυβλία, κλπ. Ενώ χρησιμοποιήθηκαν και γυάλινα είδη όπως φιάλες Erlenmeyer, ογκομετρικοί κύλινδροι, μπουκάλια αποστείρωσης κ.α.

14.2 Μικροοργανισμοί

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε ο μικροοργανισμός *Rhodococcus erythropolis IGTS8*. Η προμήθεια του μικροοργανισμού έγινε από την ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA) με κωδικό αναφοράς 53968. Παραλήφθηκε σε stock γλυκερόλης στους -80°C. Για την ύπαρξη επαρκούς αποθέματος, το στέλεχος εφόσον καλλιεργήθηκε, ποσότητα εξ' αυτού αποθηκεύτηκε και συντηρήθηκε σε γλυκερόλη στην υπερκατάψυξη (-80°C).

14.3 Θρεπτικά μέσα

Για την μελέτη των παραγόντων ανάπτυξης του *R. erythropolis IGTS8*, ο μικροοργανισμός αναπτύχθηκε σε υγρή και στερεή καλλιέργεια στα θρεπτικά μέσα *Luria-Bertani (LB)* και *Basalt Salt Medium (BSM)*. Η σύσταση τους αποτελείται από τα ακόλουθα αντιδραστήρια.

Πίνακας 6. Θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάπτυξη του *R.erythropolis IGTS8*

Θρεπτικό Μέσο: LB	
Αντιδραστήρια	Συγκέντρωση
Tryptone	10 g/L
NaCl	10 g/L
Yeast Extract	5 g/L
Agar	15 g/L
Θρεπτικό μέσο: BSM	
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	4 g/L
K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	4 g/L
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0,02 g/L
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,001 g/L
FeCl ₃ · 6H ₂ O	0,001 g/L
NH ₄ Cl	2 g/L

Στην περίπτωση ανάπτυξης του IGTS8 σε στερεή καλλιέργεια (ανάπτυξη σε τριβλία) χρησιμοποιήθηκε ανεξαρτήτως μέσου agar συγκέντρωσης 15 g/L. Στην περίπτωση του LB η πηγή S -απαραίτητη για την ανάπτυξη των κυττάρων- περιέχεται εντός του Yeast extract. Ως προς το BSM η πηγή άνθρακα και θείου και η συγκέντρωσή τους που δεν αναγράφονται παραπάνω διαφέρουν ανάλογα με τον σχεδιασμό των πειραμάτων. Για την παρασκευή του LB χρησιμοποιείται απιονισμένο νερό ενώ του BSM υπερκάρθο νερό (Milli-Q). Η ρύθμιση του pH και στα δύο μέσα γίνεται στην τιμή 7.

Όλα τα θρεπτικά μέσα μετά την παρασκευή τους αποστειρώνονται σε αυτόκλειστο (SANYO Autoclave, Ιαπωνία) στους 121 °C για 20 λεπτά υπό πίεση 0.1MPa. Η πηγή S στο θρεπτικό μέσο BSM εισάγεται μετά την αποστείρωση εντός του αποστειρωμένου θαλάμου νηματικής ροής (laminar flow hood).

14.3.1 Βοηθητικά διαλύματα

Τα κύτταρα που χρησιμοποιούνται για το εμβολιασμό καλλιέργειας, αφού φυγοκεντρηθούν, απορρίπτεται το υπερκείμενο μέσο και τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε διάλυμα Ringer σε pH=7.

Πίνακας 7. Σύσταση διαλύματος Ringer

Αντιδραστήρια	Συγκέντρωση
NaCl	8,6 g/L
KCl	0,3 g/L
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,33 g/L

Τέλος για την μέθοδο του ελέγχου της αποθιωτικής δράσης που αναλύεται στη συνέχεια παρασκευάζεται διάλυμα HEPES 50 mM σε απιονισμένο νερό με pH = 8.

15. Μέθοδοι

15.1 Ανάπτυξη μικροοργανισμού σε στερεή καλλιέργεια

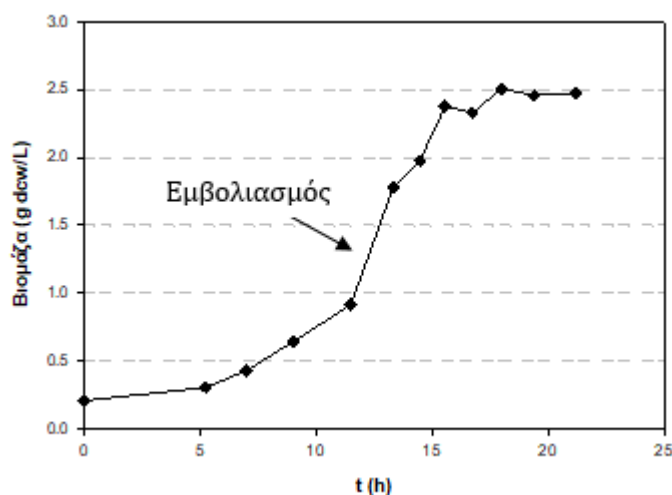
Για την στερεή καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκε μέσο LB με την προσθήκη άγαρ. Το αποστειρωμένο θρεπτικό μέσο μοιράζεται σε τρυβλία και έπεται επίστρωση του μικροοργανισμού αυστηρά κάτω από ασηπτικές συνθήκες στον ειδικό θάλαμο, παρουσία φλόγας. Ο μικροοργανισμός που χρησιμοποιείται έχει ληφθεί από απόθεμα του σε γλυκερόλη που συντηρείται στην υπερκατάψυξη. Τα τρυβλία επωάζονται για δύο μέρες σε φούρνο στους 30°C. Με το πέρας των 2 ημερών και την ικανοποιητική ανάπτυξη του βακτηρίου, τα τρυβλία συντηρούνται στο ψυγείο.

15.2 Ανάπτυξη μικροοργανισμού σε υγρή καλλιέργεια

15.2.1 Ανάπτυξη σε προκαλλιέργεια θρεπτικού μέσου LB

Ως προκαλλιέργεια θεωρούμε την αρχική ανάπτυξη του στελέχους σε υγρή καλλιέργεια μέσου LB ούτως ώστε να λάβουμε αρκετή ποσότητα βιομάζας ικανή για να εμβολιάσει στη συνέχεια την καλλιέργεια. Ο εμβολιασμός της προκαλλιέργειας έγινε με απόξυση του τρυβλίου με απιονισμένο νερό και εισαγωγή του εμβολίου στη φιάλη με τέτοιο τρόπο ώστε σε κάθε προκαλλιέργεια να έχουμε αρχική συγκέντρωση βιομάζας περίπου 0,1 g DCW/L. Οι φιάλες της προκαλλιέργειας τοποθετούνται προς ανάπτυξη σε επωαστήρα στους 30 °C και 180 rpm.

Η μελέτη της ανάπτυξης του βακτηρίου στην προκαλλιέργεια μελετήθηκε χρονικά λαμβάνοντας την παρακάτω καμπύλη ανάπτυξης.



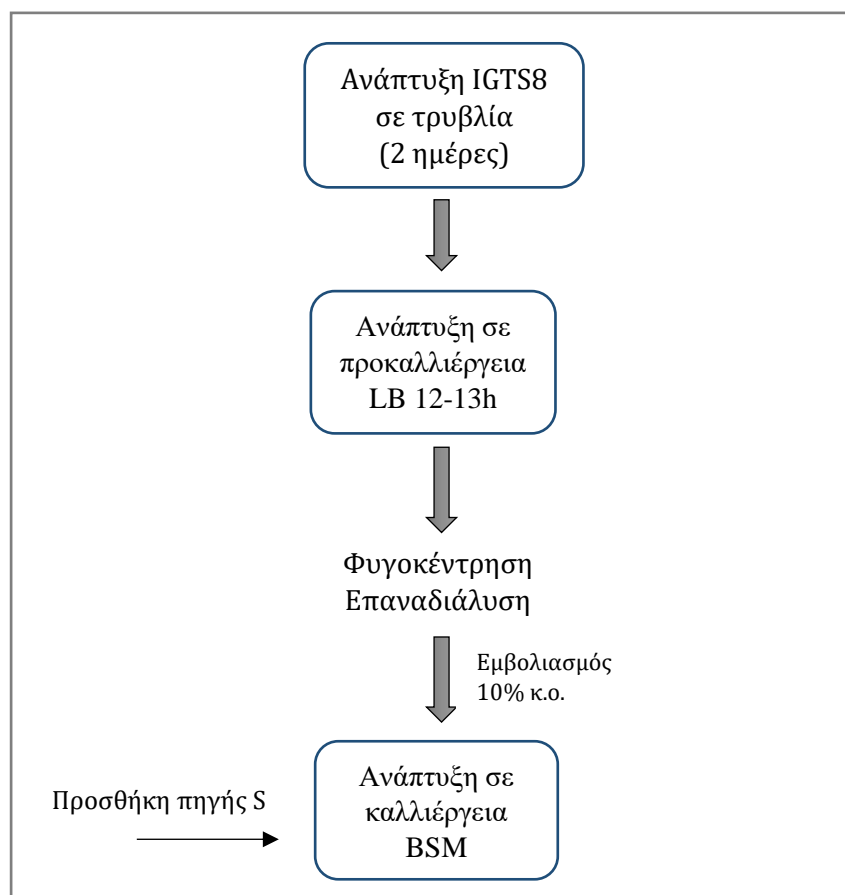
Διάγραμμα 2. Καμπύλη ανάπτυξης *R. erythropolis IGTS8* σε προκαλλιέργεια μέσου LB

Επιλέγεται ως φάση εμβολιασμού των κυττάρων από την προκαλλιέργεια στην καλλιέργεια όταν η πρώτη βρίσκεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης των κυττάρων. Από την παραπάνω καμπύλη είναι εμφανές ότι αυτή η εκθετική φάση βρίσκεται μεταξύ 11h και 15h. Με δεδομένη την καλή επαναληψιμότητα της καμπύλης για κάθε προκαλλιέργεια επιλέγεται ως χρονική περίοδος εμβολιασμού οι 12-13h ανάπτυξης.

15.2.2 Ανάπτυξη σε καλλιέργεια θρεπτικού μέσου BSM

Η καλλιέργεια του στελέχους πραγματοποιήθηκε σε θρεπτικό μέσο BSM. Η τοποθέτηση της πηγής S στις κωνικές φιάλες που περιέχουν το μέσο έπεται της αποστείρωσης. Ο

εμβολιασμός της καλλιέργειας γίνεται από κύτταρα προκαλλιέργειας που συλλέχθηκαν μετά από 12-13h ανάπτυξης, φυγοκεντρήθηκαν, επαναδιαλύθηκαν σε Ringer. Από το κυτταρικό αιώρημα εμβολιάστηκαν οι κωνικές φιάλες της καλλιέργειας BSM με ποσότητα εμβολίου 10% κ.ο., έτσι ώστε η αρχική συγκέντρωση στην καλλιέργεια να είναι σταθερή περίπου 0,1 g DCW/L. Οι φιάλες τοποθετήθηκαν ομοίως σε επωαστήρα στους 30 °C και 180 rpm όπου μελετήθηκε η ανάπτυξη τους. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης πραγματοποιούταν δειγματοληψία ανά τακτά χρονικά διαστήματα όπου προσδιορίζεται η κυτταρική συγκέντρωση και η συγκέντρωση της πηγής C. Η δειγματοληψία γινόταν σε ειδικό θάλαμο (laminar hood) υπό ασηπτικές συνθήκες παρουσία φλόγας.



Σχήμα 12. Σχηματικό διάγραμμα πειραματικής διαδικασίας ανάπτυξης *R. erythropolis IGTS8*

15.3 Προσδιορισμός αποθειωτικής ικανότητας κυττάρων (Dsz-test) σε υδατικό σύστημα

Ο έλεγχος της αποθειωτικής δράσης των κυττάρων και εφόσον αυτή είναι υπαρκτή, ο μετέπειτα προσδιορισμός της διεξάγεται σε κύτταρα καλλιέργειας που συλλεχθεί σε γνωστή φάση της ανάπτυξης τους. Ως υπόστρωμα για την μελέτη της αποθείωσης χρησιμοποιείται το DBT διαλυμένο σε αιθανόλη 50mM.

Αρχικά συλλέγεται γνωστός όγκος κυτταρικού αιωρήματος (από καλλιέργεια σε φιάλες ή βιοαντιδραστήρα), φυγοκεντρείται, απορρίπτεται το υπερκείμενο μέσο ανάπτυξης και τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε Ringer. Επακολουθεί φυγοκέντρωση και απόρριψη του διαλύματος Ringer. Τα εναπομείναντα κύτταρα συμπυκνώνονται σε διάλυμα HEPES 50mM.

Στο προκύπτον κυτταρικό αιώρημα προσδιορίζεται με ακρίβεια η κυτταρική συγκέντρωση X έπειτά από φωτομέτρηση και χρήση καμπύλης αναφοράς. Σε 3 erpendorfs τοποθετούνται 150 μL κυτταρικού αιωρήματος γνωστής συγκέντρωσης και 150 mL διαλύματος DBT 2mM. Το διάλυμα DBT 2mM έχει παρασκευαστεί με αραιώση του διαλύματος 50mM DBT σε αιθανόλη με διάλυμα HEPES. Από τα τρία Eppendorf στα δύο από τη στιγμή που εισάγεται το DBT αρχίζει να πραγματοποιείται η αντίδραση αποθείωσης, ενεργοποιώντας τον μηχανισμό 4S. Τα δύο αυτά erpendorfs, τοποθετούνται επιτόπου σε περιστροφικό αναδευτήρα (thermomixer) στους 30°C και 1200 rpm για $t = 30 \text{ min}$. Το τρίτο Eppendorf αξιοποιείται ως τυφλό δείγμα. Σε αυτό αμέσως μετά την προσθήκη του DBT προστίθενται 300 μL Ακετονιτρίλιο (καθαρότητας 99,8%) με σκοπό να μην επιτρέψει την έναρξη της αντίδρασης. Με την πάροδο των 30 min στα δύο erpendorfs τοποθετούνται 300 μL ακετονιτρίλιο για να τερματίσουν την αντίδραση αποθείωσης.

Τα τρία συνολικά erpendorfs (2 δείγματα + 1 τυφλό) φυγοκεντρώνονται και το υπερκείμενο οδηγείται προς προσδιορισμό του καταναλισκόμενου DBT και του παραγόμενου 2-HBP από γνωστή συγκέντρωση κυττάρων. Οι ποσότητες των 2-HBP (μM) και DBT (μM) προσδιορίζονται με υγρή χρωματογραφία HPLC και ανίχνευση με φθορισμό. Στην συγκέντρωση του HBP λαμβάνονται οι μέσοι όροι.

Ως μονάδα αποθειωτικής ικανότητας ορίζεται το 1 nMole 2-HBP που παράγεται στην μονάδα του χρόνου. Η αποθειωτική ικανότητα των κυττάρων δίνεται από την σχέση:

$$\frac{\text{Units}}{\text{mg dcw}} = \frac{2 (C_{\text{HBP}} - C_{\text{HBP blank}})}{(X/2) t} \quad (1)$$

Όπου C_{HBP} : ο μέσος όρος συγκέντρωσης του παραγόμενου HBP στα δύο δείγματα, μM

$C_{\text{HBP blank}}$: η συγκέντρωση του παραγόμενου HBP στο τυφλό δείγμα, μM

X: συγκέντρωση των κυττάρων του αποθειωτικού τεστ

t: ο χρόνος διάρκειας της αντίδρασης, h

Να σημειωθεί ότι η γραμμικότητα της μεθόδου έχει ελεγχθεί μέχρι $X = 20 \text{ mg/mL}$, $t = 2 \text{ h}$, και συγκέντρωση παραγόμενου HBP = 150 μM .

Η ανάλυση των δειγμάτων του αποθειωτικού τεστ έγινε με χρήση HPLC που αποτελείται από σύστημα παροχής διαλύτη Hitachi LaCrom L-7100 και ανιχνευτή φθορισμού Hewlett Packard 1046A με το μήκος κύματος διέγερσης στα 245nm και μήκος κύματος εκπομπής στα 347nm.

15.4 Ανάπτυξη μικροοργανισμού σε Βιοαντιδραστήρα με αλλαγή θρεπτικού μέσου

Για τον καλύτερο έλεγχο των λειτουργικών παραμέτρων της ανάπτυξης όπως θερμοκρασία, pH, ανάδευση, παροχή αέρα αλλά και την επίτευξη μεγαλύτερης παραγωγικότητας ο μικροοργανισμός αναπτύχθηκε σε 2 όμοιους βιοαντιδραστήρες New Brunswick Scientific-BioFlo 310. Η πειραματική διαδικασία ανάπτυξης του διαφέρει από την μέθοδο που ακολουθήθηκε στις φιάλες.

Στην προκειμένη περίπτωση για την προκαλλιέργεια και την καλλιέργεια στον αντιδραστήρα χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό μέσο BSM. Ο αρχικός λειτουργικός όγκος του αντιδραστήρα ορίζεται στο 1,5L. Το εμβόλιο όγκου 100mL (6,6% κ.ο.) προέρχεται από προκαλλιέργεια σε BSM με ανάπτυξη τέτοια ώστε να έχουμε αρχική συγκέντρωση στον αντιδραστήρα 0,1 g DCW/L. Πηγή C στους αντιδραστήρες επιλέγεται η γλυκερόλη 20 g/L στον έναν και το οξικό νάτριο 20g/L στο άλλον ενώ πηγή S τα 1,3mM DMSO και στους 2δ δύο. Το συγκριτικό πλεονέκτημα της χρήσης βιοαντιδραστήρα σε σχέση με της φιάλες είναι η δυνατότητα καταγραφής κάθε στιγμή του pH και του ποσοστού του διαλυμένου O₂ στο μέσο. Οι λειτουργικές συνθήκες του κάθε αντιδραστήρα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 8. Πειραματικές συνθήκες λειτουργίας βιοαντιδραστήρων

Συνθήκες	Τιμές
pH	7
T	30 °C
Παροχή αέρα	1,12 ls/min
Ανάδευση	200 rpm
Όγκος Εμβολίου	100 mL
Όγκος αντιδραστήρα	1,5 L
Πηγή C: Glycerol 20g/L	
Ρυθμιστής Οξέος	OXI
Ρυθμιστής Βάσης	NaOH 1N
Πηγή C: Sodium Acetate 20g/L	
Ρυθμιστής Οξέος	HCl 3N
Ρυθμιστής Βάσης	OXI

Ανά τακτά χρονικά διαστήματα, κρίνοντας και από την πρόοδο της ανάπτυξης, λαμβάνεται δείγμα όπου προσδιορίζεται η συγκέντρωση βιομάζας, η κατανάλωση σε υπόστρωμα ενώ αραιότερα λαμβάνονται κύτταρα όπου αξιοποιούνται για την εύρεση της αποθιωτικής ικανότητας (Dsz-test). Παράλληλα μετράται και η συγκέντρωσή του διαλυμένου οξυγόνου στο μέσο ως ποσοστό % της συγκέντρωσης κορεσμού του. Οι μέθοδοι ανάλυσης των παραπάνω εξηγούνται εκτενέστερα στις ενότητες 15.6.1-15.6.4.

Στην πειραματική διάταξη του αντιδραστήρα χρησιμοποιήθηκε ένα είδος «ψευδο-συνεχούς» καλλιέργειας με αλλαγή του θρεπτικού μέσου. Κάθε φορά που τα κύτταρα φθάνουν στο τέλος της ανάπτυξης τους τα 2/3 του όγκου του αντιδραστήρα απορρίπτονται και προστίθεται νέο αποστειρωμένο θρεπτικό μέσο με την ίδια ακριβώς σύσταση. Συνεχίζεται έπειτα η μελέτη της ανάπτυξης λαμβάνοντας δείγματα όπως ακριβώς αναφέρθηκε παραπάνω.

Ο σκοπός διεξαγωγής του συγκεκριμένου πειράματος είναι η μείωση της λανθάνουσας φάσης των κυττάρων. Επιπλέον απαντήσεις δίνονται στα ερώτημα αν αυτά μπορούν να αναπτύσσονται με μεγαλύτερο ρυθμό από αλλαγή σε αλλαγή αλλά και αν είναι δυνατόν να φθάνουν με διαδοχικές αλλαγές σε τιμές μεγαλύτερης βιομάζας.



Εικόνα 1. Διάταξη Βιοαντιδραστήρων ανάπτυξης σε γλυκερόλη (αριστερά) και οξικό νάτριο (δεξιά) με πηγή S 1,3 mM DMSO

15.5 Αποθείωση σε διφασικό σύστημα

Για την προσομοίωση πιο ρεαλιστικών συνθηκών αποθείωσης έγινε προσπάθεια μελέτης της αποθείωσης σε διφασικό σύστημα δωδεκάνιου-υδατικής φάσης σε αναλογία 1:1. Θεωρείται ότι το δωδεκάνιο προσομοιάζει την οργανική φάση των πετρελαιοειδών. Η διάταξη μελέτης της αποθείωσης των κυττάρων σε διφασικό σύστημα περιλαμβάνει ογκομετρικούς κυλίνδρους εμβαπτισμένους σε υδατόλουτρο όπου ρυθμίζεται σταθερή η θερμοκρασία του στους 30°C. Στο παρόν πείραμα μελετάται η αποθειωτική ικανότητα των κυττάρων με παράμετρο την παροχή αέρα. Ο αέρας που τροφοδοτείται στους κυλίνδρους είναι κορεσμένος σε υγρασία για να αποφύγουμε φαινόμενα εξάτμισης των φάσεων. Σε κάθε σύστημα αντιδραστήρα-κυλίνδρου υπάρχει η δυνατότητα ρύθμισης της παροχής αέρα. Ο αέρας εντός του κυλίνδρου ρέει υπό μορφή φυσαλίδων προκαλώντας ανάμιξη των φάσεων.

Τα κύτταρα στα οποία θα εξεταστεί το ποσοστό του θείου που μπορούν να απομακρύνουν αναπτύχθηκαν σε αντιδραστήρα με πηγή άνθρακα γλυκερόλη 20 g/L και πηγή S 1,3mM DMSO (όπως περιγράφεται στην 15.4). Έπειτα από επαρκή ανάπτυξη τους γίνεται συλλογή των 2/3 του όγκου του αντιδραστήρα, τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν, επαναιωρήθηκαν σε διάλυμα HEPES 50 mM (pH=8) και εισήχθησαν στο διφασικό σύστημα.

Ο λειτουργικός όγκος κάθε κυλίνδρου είναι τα 70mL. Η συγκέντρωση των κυττάρων στην υδατική φάση (διάλυμα HEPES) ορίστηκε στα 8,5 g/L και η αρχική συγκέντρωση DBT στα 3mM σε δωδεκάνιο (οργανική φάση με θειούχο υπόστρωμα). Σε τακτά χρονικά διαστήματα λαμβάνεται δείγμα όπου προσδιορίζεται η κατανάλωση DBT και η παραγωγή 2-HBP μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης. Η δειγματοληψία γίνεται από το αναμιγνυόμενο σύστημα των δυο φάσεων. Έπειτα από φυγοκέντρηση παραλαμβάνεται ποσότητα από την οργανική φάση για προσδιορισμό των παραπάνω στην HPLC. Με το πέρας της μελέτης υπολογίζεται και ο όγκος που νερού που εξατμίστηκε από την υδατική και οργανική φάση.

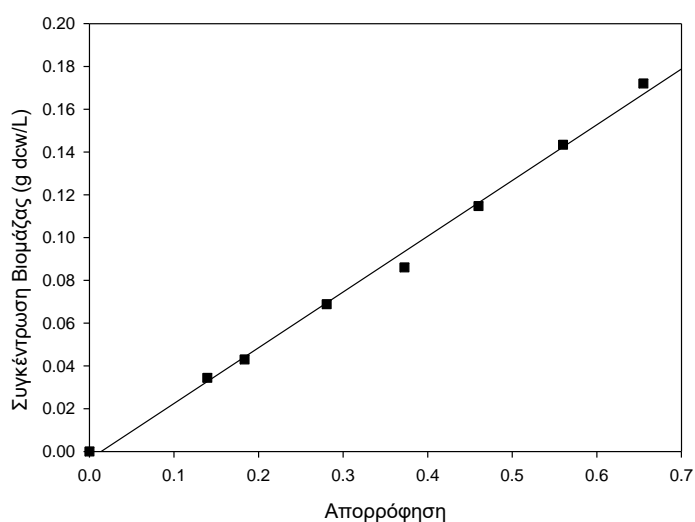


Εικόνα 2. Εργαστηριακή διάταξη αποθείωσης σε διαφασικό σύστημα

15.6 Μέθοδοι ανάλυσης

15.6.1 Προσδιορισμός κυτταρικής συγκέντρωσης

Ο προσδιορισμός της βιομάζας κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης πραγματοποιείται με την μέτρηση της οπτικής πυκνότητας των κυττάρων στα 600nm σε φωτόμετρο UV/Vis. Να αναφερθεί πως η απορρόφηση των κυττάρων στο συγκεκριμένο μήκος κύματος είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της βιομάζας στο θρεπτικό μέσο. Με τη χρήση αιωρημάτων γνωστής κυτταρικής συγκέντρωσης και μέτρηση της απορρόφησης τους κατασκευάζεται η παρακάτω καμπύλη αναφοράς. Για την ρύθμιση του φωτόμετρου ως τυφλό δείγμα χρησιμοποιείται απιονισμένο νερό.



Διάγραμμα 3. Καμπύλη αναφοράς *R.erythropolis* IGTS8

Η καμπύλη αναφοράς του στελέχους IGTS8 με γραμμική παλινδρόμηση των σημείων είναι:

$$Y = 0,2606 * Abs \quad (2)$$

$$R^2 = 0.9957$$

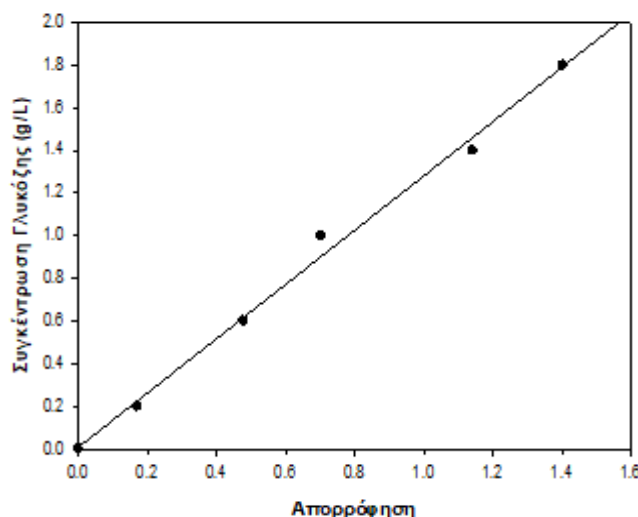
Όπου Y: η συγκέντρωση της βιομάζας, g/L και Abs: η ένδειξη του φωτόμετρου.

Να σημειωθεί ότι η γραμμικότητα της σχέσης ισχύει για εύρος απορρόφησης έως και την τιμή 0,600 κατά προσέγγιση. Για μεγαλύτερες τιμές απορρόφησης απαιτείται αραίωση του δείγματος ώστε να βρίσκεται εντός της γραμμικής περιοχής της εξ. 2.

15.6.2 Προσδιορισμός συγκέντρωσης καταναλωθείσας γλυκόζης

Στα πειράματα που επιλέγεται η γλυκόζη ως πηγή C ο προσδιορισμός της της σε κάποια φάση ανάπτυξης του μικροοργανισμού έγινε με την χρήση ειδικού εμπορικού διαγνωστικού σκευάσματος (kit). Το εμπορικό σκεύασμα GOD/PAP (glucose oxidase/peoxidase assay) αξιοποιεί τη δράση δύο ενζύμων. Βασίζεται στην μετατροπή της γλυκόζης σε ένα προϊόν ερυθρού χρώματος έπειτα από την διαδοχική δράση των ενζύμων οξειδάση και υπεροξειδάση της γλυκόζης. Σε πρώτο στάδιο η δράση της οξειδάσης της γλυκόζης παράγει γλυκονικό οξύ και H₂O₂. Το τελευταίο παρουσία κάποιου φαινολικού παραγώγου και της αμινοφαιναζόνης υπό την δράση της υπεροξειδάσης της γλυκόζης δίνει προϊόν ερυθρού χρώματος. Το έγχρωμο προϊόν απορροφά μέγιστα στα 510 nm και η απορρόφηση του είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του, η οποία από την στοιχειομετρία των ενζυμικών αντιδράσεων ανάγεται στη συγκέντρωση της γλυκόζης.

Για την μέτρηση της γλυκόζης με το εμπορικό σκεύασμα ακολουθείται συγκεκριμένη διαδικασία. Στους υποδοχείς ειδικής πλακέτας (plate) προστίθενται 240 μL εμπορικού σκευάσματος GOD/PAD υπό ψύξη καθώς και 10μL δείγματος. Για κάθε δείγμα γεμίζονται δύο υποδοχείς ενώ τοποθετούνται και 250μL νερού ως τυφλό δείγμα. Το plate τοποθετείται στην συσκευή Microplate Reader Spectramax 250 (Molecular Devices) για 15 min σε θερμοκρασία 37°C. Η απορρόφηση των δειγμάτων μετρήθηκε στα 510nm στην επίτευξη ισορροπίας της αντίδρασης (επιλογή endpoint). Η ακριβής συγκέντρωση της γλυκόζης προσδιορίζεται με χρήση καμπύλης αναφοράς της γλυκόζης. Κατασκευάστηκε μετρώντας την απορρόφηση διαλυμάτων γλυκόζης γνωστής συγκέντρωσης με τον παραπάνω τρόπο.



Διάγραμμα 4. Καμπύλη αναφοράς Γλυκόζης

Η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς είναι:

$$Y = 1,2679 * Abs + 0,013 \quad (3)$$

$$R^2 = 0,9912$$

Όπου Y: η συγκέντρωση της γλυκόζης g/L και Abs: η ένδειξη του φωτόμετρου.

Σε κάθε νέο προς μέτρηση δείγμα πραγματοποιήθηκε αραιώση ούτως ώστε η τελική απορρόφηση να βρίσκεται εντός της γραμμικής περιοχής της παραπάνω εξίσωσης.

15.6.3 Προσδιορισμός συγκέντρωσης καταναλωθείσας γλυκερόλης

Ο προσδιορισμός της γλυκερόλης έγινε με την χρήση Υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) SHIMADZU (Ιαπωνία).

Η αρχή λειτουργίας της υγρής χρωματογραφίας βασίζεται στην διέλευση του δείγματος με την βοήθεια της κινητής υγρής φάσης (διαλύτης έκλουσης) μέσα από μία στατική φάση που μπορεί να είναι στερεή ή υγρή. Ο διαχωρισμός των συστατικών στη χρωματογραφία βασίζεται στο διαφορετικό βαθμό αλληλεπίδρασης του κάθε συστατικού με τις δύο φάσεις, ο οποίος καθορίζεται από την φυσικοχημική συγγένεια του συστατικού με την κάθε φάση. Στην HPLC ο διαχωρισμός αποτυπώνεται με την κατακράτηση των συστατικών του δείγματος από την στατική φάση σε διαφορετικούς χρόνους (χρόνοι ανάσχεσης). Η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη ή μίγματος διαλυτών είναι πολύ σημαντική για την επίτευξη σωστού διαχωρισμού. Γίνεται με βασικό κριτήριο την εκλεκτικότητα του διαλύτη ως προς τα προς διαχωρισμό συστατικά.

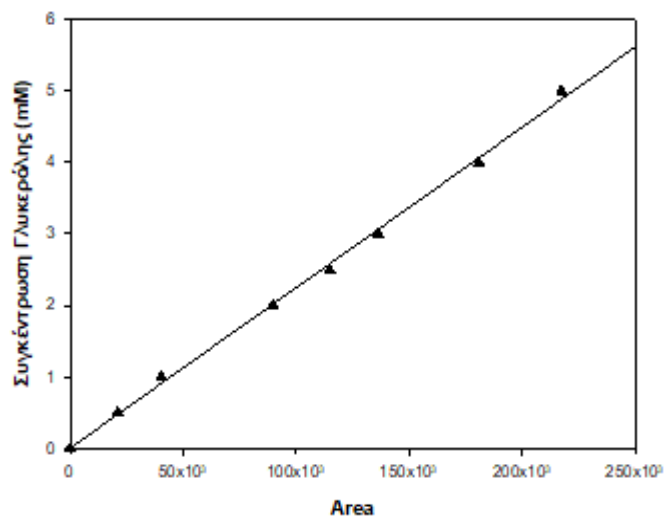
Για την προσδιορισμό της γλυκερόλης χρησιμοποιήθηκε η υγρή χρωματογραφία SHIMADZU με σύστημα παροχής διαλύτη (Shimadzu LC-20AD), σε συνδυασμό με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (Shimadzu RID 10A), αυτόματο δειγματολήπτη (Shimadzu SIL-20A) και σύστημα εισαγωγής δεδομένων στον υπολογιστή (LCsolution έκδοση 1.24 SP1, Shimadzu).



Εικόνα 3. Διάταξη εργαστηριακής συσκευής HPLC

Για την ανάλυση δειγμάτων γλυκερόλης χρησιμοποιήθηκε η στήλη H (BIO-RAD, Aminex HPX-87H Ion Exclusion Column, 300mm x 7.8mm) η οποία περιλαμβάνει και προστήλη (BIO-RAD, Micro-Guard, Cation H Cartridge). Ως κινητή φάση (διαλύτης) επιλέχθηκε διάλυμα H_2SO_4 5mM σε υπερκάθαρο νερό (Milli-Q). Πριν την έναρξη της στήλης ο διαλύτης απαερώνεται με He για 0,5 h με ροή 100 mL/min. Η στήλη τοποθετείται σε φούρνο (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) στους 65°C με την θερμοκρασία της να παραμένει σταθερή καθόλη την ανάλυση. Τα δείγματα εφόσον αραιωθούν κατάλληλα διέρχονται από ειδικό φίλτρο 0,45 μm (Whatman, Ηνωμένο Βασίλειο) προς αποφυγήν τυχόν εισροής κυττάρων (στερεών) στη στήλη. Ο χρόνος ανάλυσης κάθε δείγματος είναι στα 20 λεπτά με ροή διαλύτη 0,6 mL/min. Ο διαχωρισμός διεξάγεται ισοκρατικά.

Στο ληφθέν χρωματογράφημα η κορυφή που αντιστοιχεί στην γλυκερόλη αποτυπώνεται περίπου στα 14 λεπτά. Από το λογισμικό του προγράμματος υπολογίζεται το εμβαδόν της κορυφής που είναι ανάλογο της συγκέντρωσης της γλυκερόλης. Η παρασκευή διαλυμάτων γλυκερόλης γνωστής συγκέντρωσης και η ανάλυση τους στην HPLC μας δίνει την παρακάτω καμπύλη αναφοράς.



Διάγραμμα 5. Καμπύλη αναφοράς Γλυκερόλης

Η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς είναι:

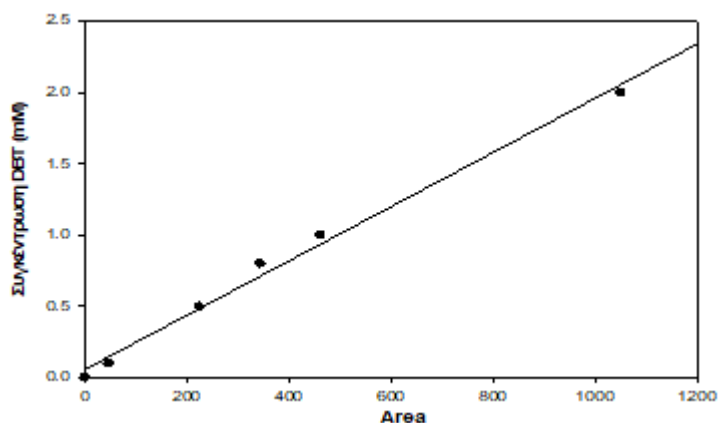
$$Y = 2 \cdot 10^{-5}x + 0,0081 \quad (4)$$

$$R^2 = 0,9982,$$

όπου Y η συγκέντρωση της γλυκερόλης (mM) και x: το εμβαδόν της κορυφής.

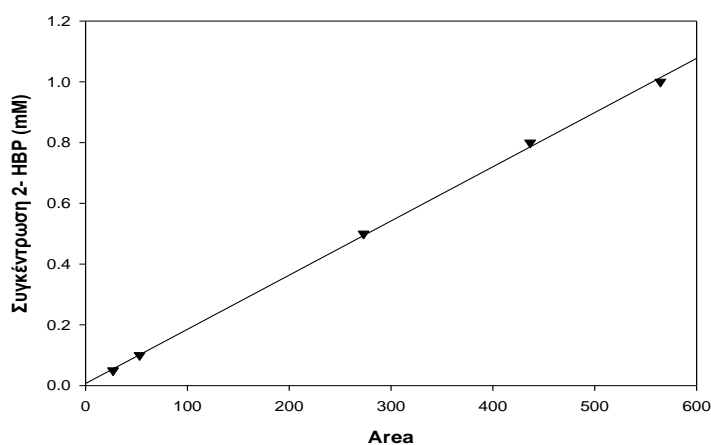
15.6.4 Προσδιορισμός καταναλισκόμενου DBT παραγόμενου 2-HBP

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του καταναλισκόμενου DBT και του παραγομένου HBP πραγματοποιήθηκε στην HPLC Shimadzu (Ιαπωνία) σε στήλη C-18 (Macherey – Nagel, Nucleosil 100-5, C18). Κινητή φάση επιλέχθηκε διάλυμα ακετονιτρίλιου – νερού σε αναλογία 80:20. Το νερό που χρησιμοποιήθηκε στον διαλύτη είναι υπερκάθαρο. Ο διαλύτης απαερώνεται με He. Ο χρόνος ανάλυσης ορίστηκε στα 18 λεπτά με παροχή κινητής φάσης 1 mL/min. Στο χρωματογράφημα το 2-HBP απομονώνεται πρώτο στο 3^ο λεπτό ενώ το DBT στο 5^ο λεπτό. Για την ανάγκη προσδιορισμού των συγκεντρώσεων κατασκευάζονται πρότυπα διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης και σχεδιάζονται οι καμπύλες αναφοράς.



Διάγραμμα 6. Καμπύλη αναφοράς DBT

Εξίσωση καμπύλης αναφοράς DBT: $Y = 0,0019x + 0,0592$, $R^2 = 0,9923$ (5)



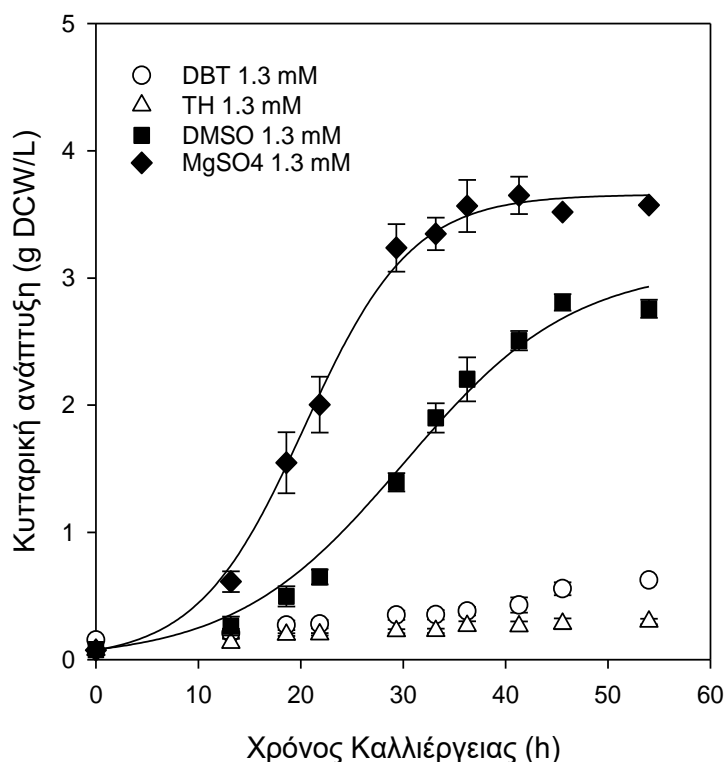
Διάγραμμα 7. Καμπύλη αναφοράς 2-HBP

Εξίσωση καμπύλης αναφοράς 2-HBP: $Y = 0,0018x + 0,0045$, $R^2 = 0,9994$ (6)

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

16.1 Επίδραση Πηγής Θείου

Μελετήθηκε η ανάπτυξη του στελέχους IGTS8 υπό την επίδραση 4 διαφορετικών υποστρωμάτων θείου: Διμέθυλοσουλφοξειδίου (DMSO), $MgSO_4$, Θειοφαίνιου (TH) και Διβενζοθειοφαίνιου (DBT) με συγκέντρωση της **ένωσης θείου** στην καλλιέργεια **1,3mM**. Οι καλλιέργειες παρασκευάστηκαν όπως αναφέρεται στις ενότητες 15.2.1 και 15.2.2 (σχήμα 12, από LB σε BSM) σε φιάλες και πηγή άνθρακα **Γλυκόζη 20 g/L**. Για κάθε πηγή S πραγματοποιήθηκε διπλή καλλιέργεια και στα αποτελέσματα παρουσιάζεται ο μέσος όρος των τιμών. Η ανάπτυξη της βιομάζας και η κατανάλωση της γλυκόζης αποτυπώνονται στα παρακάτω διαγράμματα.



Διάγραμμα 8. Συγκριτικό διάγραμμα κυτταρικής ανάπτυξης σε 4 πηγές S (1.3mM) : DBT, Thiophene, DMSO, $MgSO_4$ (Πηγή C: Γλυκόζη 20 g/L).

Στις συνθήκες όπου είναι εμφανής η κυτταρική ανάπτυξη ($MgSO_4$, DMSO) προσαρμόζεται το λογιστικό μοντέλο ανάπτυξης σύμφωνα με την σχέση:

$$X = \frac{X_0 e^{\mu t}}{1 - \left(\frac{X_0}{X_{max}}\right)(1 - e^{\mu t})} \quad (7)$$

Όπου X: κυτταρική συγκέντρωση (g DCW/L)

X_0 : κυτταρική συγκέντρωση (g DCW/L)

X_{max} : κυτταρική συγκέντρωση (g DCW/L)

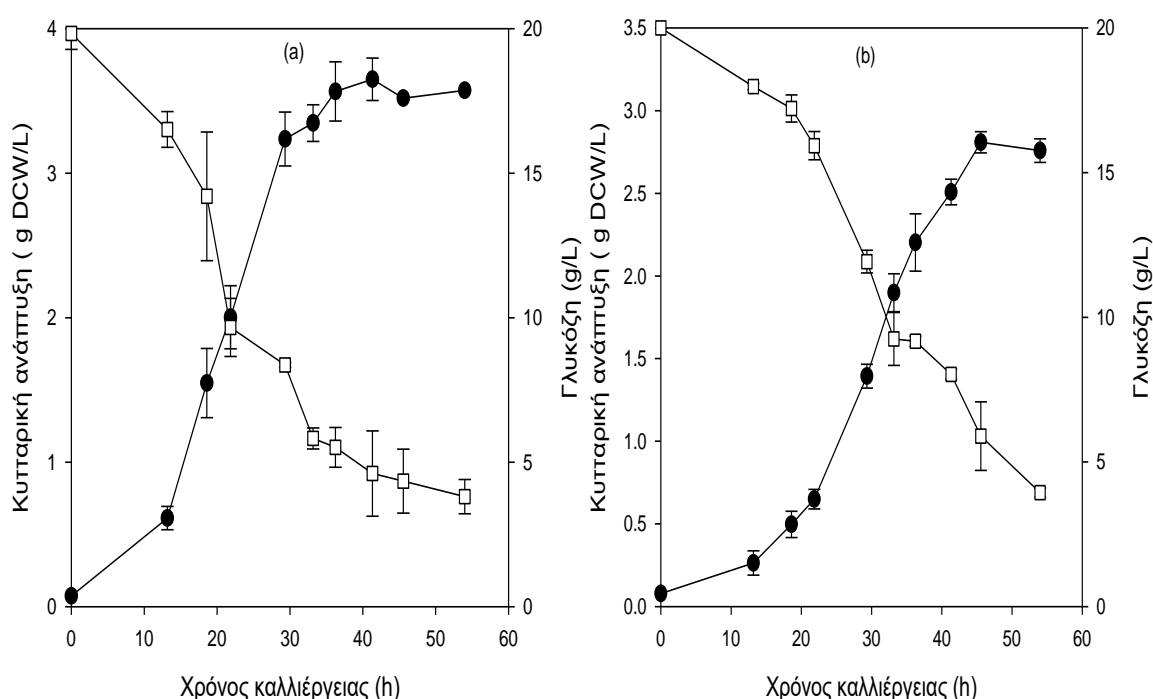
μ : ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (h^{-1})

t: χρόνος καλλιέργειας (h)

Κάνοντας χρήση υπολογιστικών εργαλείων προσδιορίζονται οι παράμετροι του μοντέλου μ και X_{max} .

Πίνακας 9. Παράμετροι και στατιστικά στοιχεία εφαρμογής λογιστικού μοντέλου ανάπτυξης στο διάγραμμα 8 (Πηγή C: γλυκόζη 20 g/L, Πηγή S: DMSO, $MgSO_4$).

Πηγή Θείου (1,3 mM)	μ (h^{-1})				X_{max} (g DCW/L)	
	Τιμή	St.error	P	R^2	Πειραματική τιμή	Προβλεπόμενη τιμή
$MgSO_4$	0,191	0,003	<0,0001	0,9952	3,65	3,66
DMSO	0,121	0,004	<0,0001	0,9862	2,81	3,10



Διάγραμμα 9. Χρονική μεταβολή της κυτταρικής συγκέντρωσης (●) και της συγκέντρωσης γλυκόζης (□) για πηγή S: **(a) 1,3 mM $MgSO_4$** **(b) 1.3 mM DMSO** (Πηγή C: Γλυκόζη 20 g/L)

Για πηγή S το θειοφαίνιο και το DBT η ανάπτυξη ήταν πολύ χαμηλή, αγγίζοντας τα 0,3 και 0,6 g/L αντίστοιχα. Η δεν κατανάλωση της γλυκόζης ανήλθε σε παρόμοια χαμηλά επίπεδα καταναλώνοντας μόνο το 10,6 % για το θειοφαίνιο και το 9,3% της αρχικής ποσότητας για το DBT. Η κατανάλωση για το $MgSO_4$ και το DMSO έφτασε το 82% και 80% της αρχικής ποσότητας γλυκόζης αντίστοιχα.

Από το συντελεστή συσχέτισης για το $MgSO_4$ και το DMSO ($R^2 = 0,9952$, $R^2 = 0,9862$ αντίστοιχα) καταδεικνύεται ότι το λογιστικό μοντέλο ερμηνεύει πλήρως ικανοποιητικά την ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν για την ανάπτυξη υπό διαφορετικές πηγές θείου δείχνουν τις εξής διαφορές: Η ανάπτυξη παρουσία θεικού μαγνησίου είναι ταχύτερη από αυτήν υπό την παρουσία DMSO, όπως υποδεικνύεται και από τους ειδικούς ρυθμούς ανάπτυξης $\mu_{MgSO_4} = 0,191 h^{-1}$ έναντι $\mu_{DMSO} = 0,121$. Αντίθετα παρουσία DBT δεν παρατηρείται σημαντική ανάπτυξη ενώ υπό την

επίδραση του θειοφαινίου η ανάπτυξη είναι ελάχιστη, κατά συνέπεια και οι ρυθμοί στα DBT και θειοφαινίο θα είναι πολύ χαμηλότεροι. Βιβλιογραφικά, στην ίδια σειρά ως προς την ταχύτητα ανάπτυξης ($MgSO_4 > DMSO > DBT$) καταλήγουν και οι del Olmo et al [39].

Η μέγιστη κυτταρική συγκέντρωση που επιτυγχάνεται είναι σημαντικά μεγαλύτερη στο $MgSO_4$ συγκριτικά με το DMSO. Εμφανώς κατά πολύ μικρότερες είναι οι τιμές X_{max} των DBT και θειοφαινίο με τις αυτές των $MgSO_4$ και DMSO. Η μη διαλυτότητα του DBT και του θειοφαινίου στα υδατικά συστήματα που μελετάμε πιθανώς να σχετίζεται με την μικρή ανάπτυξη του στελέχους. Η δυσκολία του κυττάρου να προσλάβει το S που απαιτείται για την ανάπτυξη του δεν επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό του. Στην βιβλιογραφία [65] έχει αναφερθεί ικανότητα ανάπτυξης του στελέχους παρουσία DBT ως μόνη πηγή S σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από αυτή που παρατηρήθηκε στην παρούσα εργασία, γεγονός πιθανώς να οφείλεται σε διαφορετικές συνθήκες όσον αφορά την συγκέντρωση βιομάζας και την αρχική συγκέντρωση DBT. Κατά άλλους ερευνητές Yoshikawa et al [66] η μη ανάπτυξη παρουσία του DBT οφείλεται στην τοξικότητα του για τα κύτταρα.

Η έντονη ανάπτυξη παρουσία του $MgSO_4$ πιθανά να οφείλεται στην εύκολη διάσταση του άλατος στο υδατικό περιβάλλον γεγονός που κάνει τα θειικά ιόντα εύκολα βιοδιαθέσιμα συστατικά για την ανάπτυξη του κυττάρου.

Με βάση τα πειραματικά δεδομένα υπολογίζεται ο παρατηρούμενος συντελεστής απόδοσης ως προς το υπόστρωμα (πηγή C) για κάθε συνθήκη:

$$Y_{x/s} = \frac{X_o - X_t}{S_o - S_t} \quad (8)$$

Όπου X_o : αρχική κυτταρική συγκέντρωση (g DCW/L)

X_t : τελική κυτταρική συγκέντρωση (g DCW/L)

S_o : αρχική συγκέντρωση υποστρώματος (g/L)

S_t : τελική συγκέντρωση υποστρώματος (g/L)

Πίνακας 10. Παρατηρούμενοι συντελεστές απόδοσης για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε διαφορετικές ενώσεις θείου συγκέντρωσης 1,3 mM (Διάγραμμα 8).

Πηγή S (1,3 mM)	Y x/s
DBT	0,23
Thiophene	0,10
DMSO	0,16
$MgSO_4$	0,24

Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται ότι υψηλότερος συντελεστής απόδοσης $Y_{x/s}$ λαμβάνεται χρησιμοποιώντας το $MgSO_4$. Για την συνθήκη DMSO: 1,3 mM, Γλυκόζη: 20g/L ο ίδιος συντελεστής $Y_{x/s}$ επιβεβαιώνεται και από τους del Olmo et al [39].

16.2 Έλεγχος αποθειωτικής δράσης για διαφορετικές πηγές S

Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών δεν είναι μοναδική παράμετρος καλής απόδοσης στην βιοαποθείωση. Η σωστή επιλογή της πηγής S προϋποθέτει ο μικροοργανισμός που αναπτύχθηκε σε ένα συγκεκριμένο υπόστρωμα S να διαθέτει παράλληλα υψηλή αποθειωτική δράση. Στα 4 παραπάνω υποστρώματα (Thiophene, DBT, $MgSO_4$, DMSO) έγινε έλεγχος της αποθειωτικής δράσης μέσω της αποθειωτικής δοκιμής, όπως περιγράφεται στην ενότητα 15.5.

Τα αποτελέσματα έδειξαν μηδενική αποθειωτική δράση όταν επιλέγεται το θειοφαινίλιο ως πηγή θείου. Επίσης μηδενικά αποδείχθηκαν τα ποσοστά μείωσης του θείου όταν χρησιμοποιείται το $MgSO_4$ στην ανάπτυξη του κυττάρου. Το εύρημα αυτό επιβεβαιώνεται από τις έρευνες των Ohshiro et al [67] όπου η καταστολή της αποθείωσης από τα θειικά ιόντα του $MgSO_4$ περιγράφεται ως χαρακτηριστική στο μεταβολικό μονοπάτι 4S. Η μεγάλη διαθεσιμότητα των θειικών ιόντων στο μέσο όταν χρησιμοποιείται το $MgSO_4$ προκαλεί καταστολή της δράσης των αποθειωτικών ενζύμων.

Με χρήση του DBT είναι αναμενόμενο το σύστημα να εμφανίζει αποθειωτική δράση καθώς η ίδια η ουσία αυτή κάθε αυτή, επάγει την ενεργοποίηση των αποθειωτικών ενζύμων. Ωστόσο, δεν επιλέχθηκε ως πηγή S για την ανάπτυξη παρά το γεγονός ότι στη διεξαγωγή των αποθειωτικών δοκιμών εντοπίστηκε μικρή αποθειωτική ικανότητα. Οι λόγοι βασίζονται κυρίως στην μικρή ανάπτυξη του, λόγω τις μικρής διαλυτότητας του. Επιπλέον κρίθηκε ακατάλληλο για έναν παραπάνω λόγο: Κατά την ανάπτυξη του μικροοργανισμού παρουσία DBT τα κύτταρα πέραν της χρήση του DBT ως πηγή S για την ανάπτυξη (με πολύ αργούς ρυθμούς) ταυτόχρονα αποθειώνουν και μέρος του DBT παράγοντας 2-HBP. Έχει βρεθεί από πολλούς ερευνητές ([68], [69]) ότι όταν το HBP υπερβεί μία συγκέντρωση στο μέσο τότε παρεμποδίζει την ανάπτυξη τους.

Ως προς την χρήση του DMSO, σε τρία σημεία της καμπύλης του *διαγράμματος 8* βρέθηκε ότι τα κύτταρα παρουσιάζουν την εξής αποθειωτική ικανότητα:

- 18 U/mg DCW για X= 0,5 g/L
- 27 U/mg DCW για X= 0,85 g/L
- 24 U/mg DCW για X=1,4 g/L

Η καλή αποθειωτική δράση όταν ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται παρουσία DMSO επιβεβαιώνεται και από τους del Olmo et al [39]. Μάλιστα κατά τους Li et al [70] η έκφραση αποθειωτικής ικανότητας παρουσία DMSO οφείλεται στην από-καταστολή του οπερόνιου dsz όταν απουσιάζει μία εύκολα βιοδιαθέσιμη πηγή S όπως τα θειικά ιόντα, σουλφίδια, μεθειονίνη και κυστεΐνη.

Διαπιστώνοντας λοιπόν ότι η ανάπτυξη παρόντος DMSO είναι αρκούντως καλή και ότι συνοδεύεται με υψηλή αποθειωτική δράση των κυττάρων, το DMSO επιλέγεται ως μοναδική πηγή S για την συνέχιση των πειραμάτων. Επιπλέον είναι σημαντικό να λάβουμε υπόψιν μας, πέρα από τα όρια της παρούσας εργαστηριακής μελέτης, για την παραγωγή μεγεθών βιοκαταλύτη σε μία βιομηχανία η εφαρμογή το DMSO είναι πιο ρεαλιστική πηγή S από το DBT για λόγους κόστους και διαθεσιμότητας.

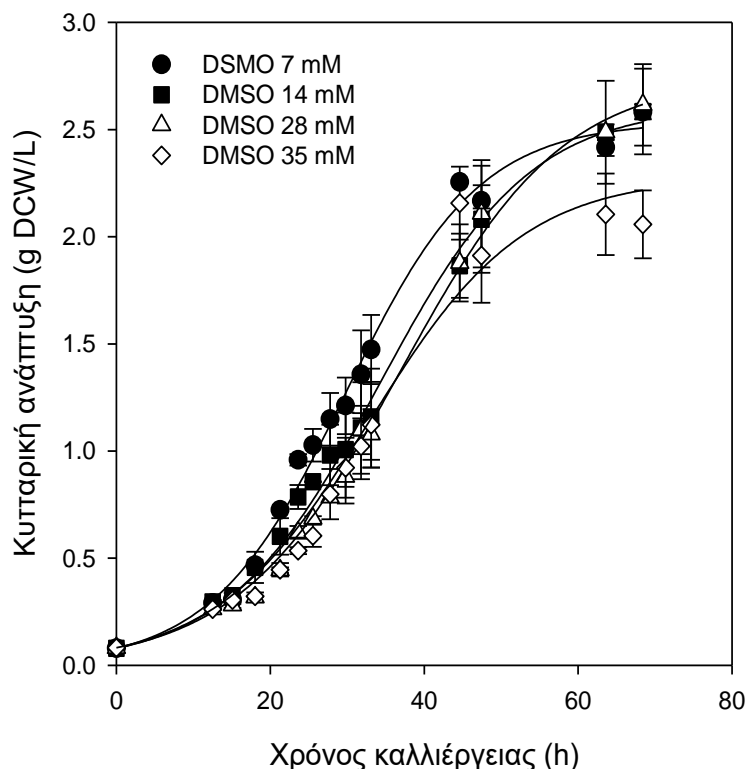
16.3 Επίδραση της συγκέντρωσης του DMSO στην κυτταρική ανάπτυξη

Μελετήθηκε η ανάπτυξη του μικροοργανισμού υπό την επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων DMSO ως πηγή S. Για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων όλες οι

υπόλοιπες παράμετροι αφέθηκαν ίδιες (ενότητα 15.2). Πηγή C παρέμεινε η γλυκόζη σε συγκέντρωση 20 g/L.

16.3.1 Υψηλές συγκεντρώσεις DMSO

Μελετήθηκε για περίπου 70h η ανάπτυξη του βακτηρίου σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις DMSO. Επιλέχθηκαν η συγκεντρώσεις: 7, 14, 28, 32 mM DMSO.



Διάγραμμα 10. Ανάπτυξη μικροοργανισμού σε υψηλές συγκεντρώσεις DMSO: 7, 14, 28 και 35 mM. (Πηγή C: Γλυκόζη 20 g/L)

Πίνακας 11. Παράμετροι και στατιστικά στοιχεία εφαρμογής λογιστικού μοντέλου ανάπτυξης στο διάγραμμα 10. (Πηγή C: γλυκόζη 20 g/L, Πηγή S: DMSO)

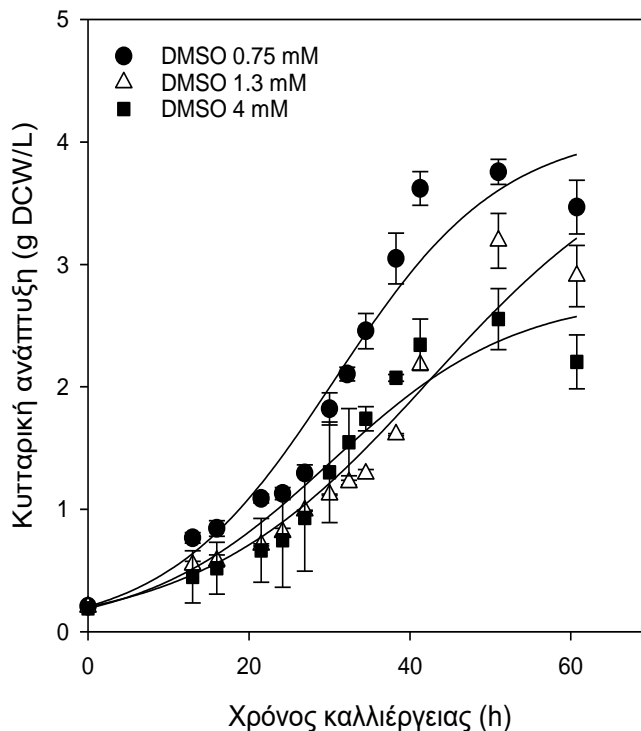
Συγκέντρωση Θείου (mM)	μ (h^{-1})				X_{max} (g DCW/L)	
	Τιμή	St.error	P	R^2	Πειραματική τιμή	Προβλεπόμενη τιμή
7	0,116	0,002	<0,0001	0,9927	2,58	2,54
14	0,102	0,001	<0,0001	0,9938	2,58	2,61
28	0,095	0,001	<0,0001	0,9965	2,61	2,75
35	0,100	0,004	<0,0001	0,9621	2,10	2,28

Κρίνοντας από τους συντελεστές συσχέτισης η προσαρμογή του λογιστικού μοντέλου εκφράζει ικανοποιητικά την ανάπτυξη. Οι τιμές των ειδικών ρυθμών ανάπτυξης είναι σχεδόν παραπλήσιες για όλες τις συγκεντρώσεις με την υψηλότερη τιμή να παρατηρείται για συγκέντρωση DMSO 7 mM όπου $\mu=0,116 h^{-1}$. Η τάση που δείχνει να επικρατεί είναι ότι όσο μικρότερη είναι η συγκέντρωση του DMSO, τόσο ταχύτερη είναι η ανάπτυξη. Παράλληλα η μέγιστη κυτταρική συγκέντρωση τόσο η πειραματική όσο και η προβλεπόμενη εμφανίζει ικανοποιητική διαφορά μεταξύ των συγκεντρώσεων 7,14 και 25 mM (~2,6 g/L) και αυτής των 35mM (2,10 g/L). Η ένδειξη αυτή πιθανά να

υπαινίσσεται μια παρεμπόδιση στην ανάπτυξη όταν εφαρμόζονται υψηλές συγκεντρώσεις DMSO.

16.3.2 Χαμηλές συγκεντρώσεις DMSO

Μελετήθηκε εξίσου η επίδραση της συγκέντρωσης του DMSO στην κυτταρική ανάπτυξη σε μικρότερες συγκεντρώσεις: 0,75, 1,3, 4 mM DMSO.



Διάγραμμα 11. Ανάπτυξη μικροοργανισμού σε χαμηλές συγκεντρώσεις DMSO: 0,75, 1,3 και 4 mM. (Πηγή C: Γλυκόζη 20 g/L)

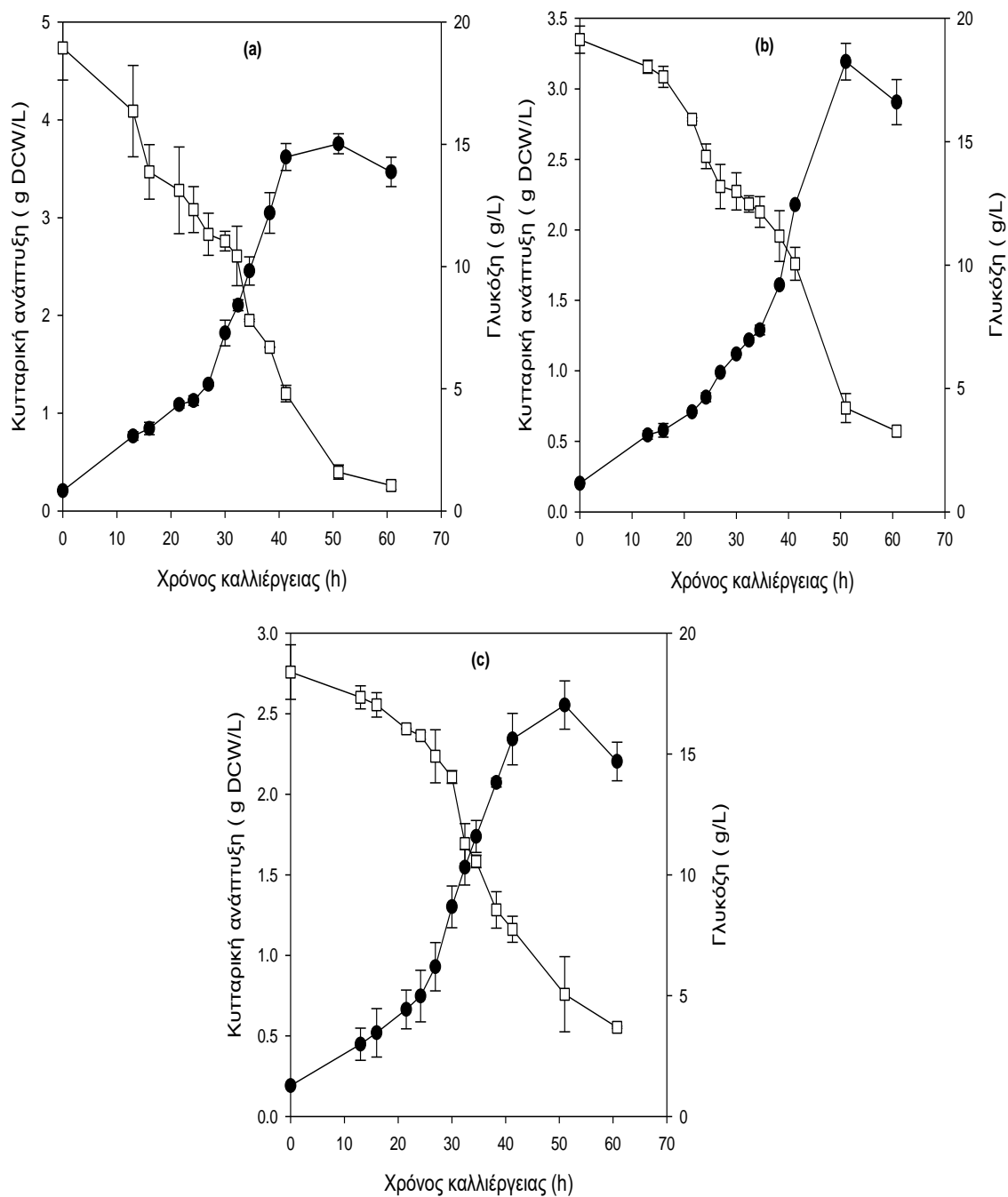
Στον παρακάτω πίνακα προσδιορίζονται οι παράμετροι του λογιστικού μοντέλου ανάπτυξης που προσαρμόζεται στα δεδομένα ανάπτυξης.

Πίνακας 12. Παράμετροι και στατιστικά στοιχεία εφαρμογής λογιστικού μοντέλου ανάπτυξης στο διάγραμμα 11 (Πηγή C: γλυκόζη 20 g/L, Πηγή S: DMSO).

Συγκέντρωση Θείου (mM)	μ (h ⁻¹)				X_{max} (g DCW/L)	
	Τιμή	St.error	P	R ²	Πειραματική τιμή	Προβλεπόμενη τιμή
0,75	0,096	0,005	<0,0001	0,9444	3,75	4,11
1,3	0,070	0,004	<0,0001	0,9402	3,19	4,12
4	0,086	0,006	<0,0001	0,9186	2,55	2,76

Η ταχύτητα της ανάπτυξης από το παραπάνω διάγραμμα φαίνεται να είναι μεγαλύτερη ελαφρώς για συγκέντρωση DMSO 0,75 mM. Η ίδια τάση φαίνεται να επιβεβαιώνεται όπως και παραπάνω ότι δηλαδή υπό συνθήκες μικρότερης συγκέντρωσης του DMSO η ανάπτυξη είναι ταχύτερη. Όταν μάλιστα χρησιμοποιείται συγκέντρωση DMSO 0,75 ή 1,3mM η πειραματική τιμή της μέγιστης κυτταρικής συγκέντρωσης είναι σημαντικά μεγαλύτερη από όλες τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις που επιλέχθηκαν.

Για τις χαμηλές συγκεντρώσεις του DMSO προσδιορίστηκε η κατανάλωση γλυκόζης όσο διαρκεί η ανάπτυξη.



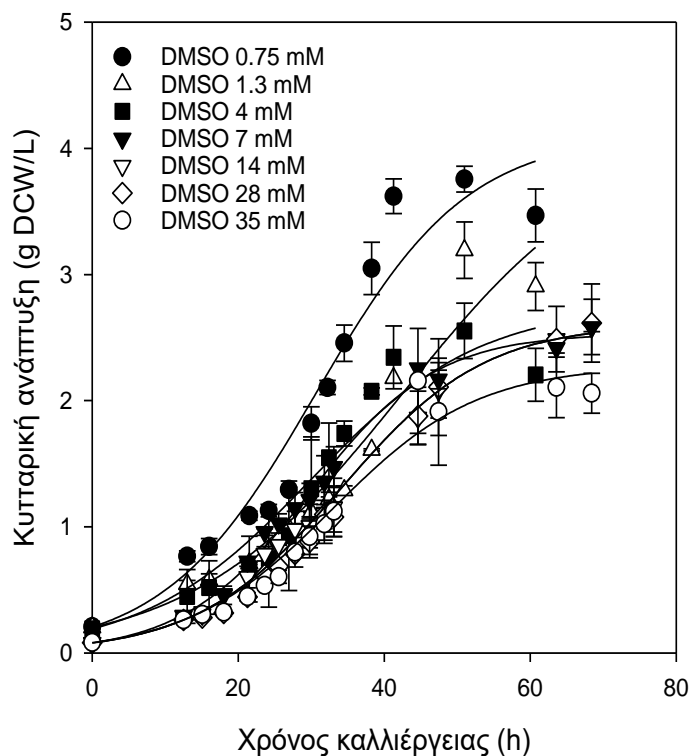
Διάγραμμα 12. Χρονική μεταβολή της κυτταρικής συγκέντρωσης (•) και της συγκέντρωσης γλυκόζης (□) για (a) 0.75 mM DMSO (b) 1.3 mM DMSO (c) 4 mM DMSO

Πίνακας 13. Παρατηρούμενοι συντελεστές απόδοσης για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε χαμηλές συγκεντρώσεις θείου (Διάγραμμα 11).

Συγκέντρωση DMSO (mM)	Y _{x/s}
0,75	0,18
1,3	0,17
4	0,14

Προφανώς, μεγαλύτερη ανάπτυξη συνεπάγεται και μεγαλύτερη κατανάλωση υποστρώματος. Η κατανάλωση υποστρώματος στο τέλος της ανάπτυξης έφτασε στο 94% για τη συνθήκη 0,75 mM DMSO, το 83% για συνθήκη την 1,3 mM DMSO και το 80% για συνθήκη 4mM DMSO. Τις απαιτήσεις σε γλυκόζη επιβεβαιώνουν και οι παρατηρούμενοι συντελεστές μετατροπής. Στις συνθήκες 0,75mM και 1,3mM DMSO οι συντελεστές Υχ/s έχουν πολύ κοντινές τιμές ελαφρώς μεγαλύτερες από τη συνθήκη 4mM DMSO.

Η ανάπτυξη του βακτηρίου για όλες τις συγκεντρώσεις DMSO που δοκιμάστηκαν απεικονίζεται παρακάτω.



Διάγραμμα 13. Συγκεντρωτικό διάγραμμα ανάπτυξης μικροοργανισμού με πηγή θείου το DMSO για συγκεντρώσεις 0,75-35 mM. (Πηγή C: Γλυκόζη 20 g/L)

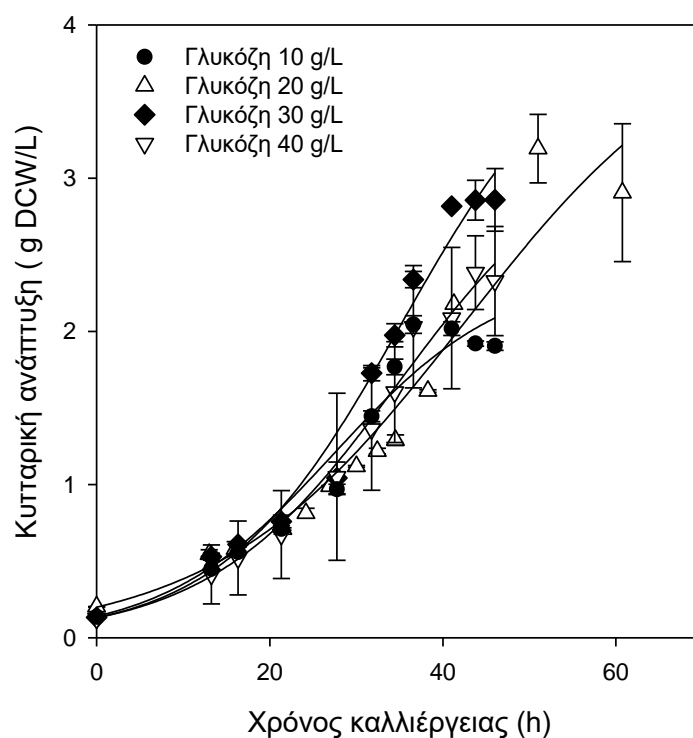
Συγκεντρωτικά, από τα δεδομένα του διαγράμματος παρατηρείται ότι η υψηλότερη παραγωγή βιομάζας επιτυγχάνεται όταν εφαρμόζονται συνθήκες 0,75mM και 1,3mM DMSO. Για υψηλότερες συγκεντρώσεις του DMSO οδηγούμαστε σε μειωμένη ανάπτυξη. Το γεγονός αυτό ερμηνεύεται επικρατέστερα από παρεμπόδιση που προκαλεί η πηγή S σε μεγάλες συγκεντρώσεις στην κυτταρική ανάπτυξη. Βιβλιογραφικά από την έρευνα των del Olmo et al [39] αναφέρεται ότι μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας και ταχύτερους ρυθμούς έχουμε στην συγκέντρωση DMSO 0.5mM, γεγονός που επιβεβαιώνει τη άποψη ότι χαμηλότερες συγκέντρωσεις υποστρώματος δίνουν ευνοϊκότερη ανάπτυξη.

Ως βέλτιστη συγκέντρωση ανάπτυξης του DMSO για τη συνέχιση των πειραμάτων μεταξύ των ευνοϊκότερων 0,75 και 1,3mM επιλέγονται τα 1,3 mM με σκοπό να έχουμε περίσσεια θείου στο μέσο.

16.4 Επίδραση της πηγής άνθρακα

16.4.1 Η Γλυκόζη ως πηγή άνθρακα

Εφόσον στην προηγούμενη σειρά πειραμάτων εντοπίστηκε η βέλτιστη συγκέντρωση του DMSO στην κυτταρική ανάπτυξη, η παράμετρος αυτή διατηρείται σταθερή και μελετάται η επίδραση της της φύσης και της συγκέντρωσης της πηγής άνθρακα για δεδομένη συγκέντρωση της πηγή S. Επιλέγεται πηγή C η Γλυκόζη σε συγκεντρώσεις 10, 20, 30, 40 g/L. Η καλλιέργεια των μικροοργανισμών πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στο σχήμα 12 (ενότητα 15.2).



Διάγραμμα 14. Ανάπτυξη του *R.erythropolis IGTS8* σε διαφορετικές συγκεντρώσεις γλυκόζης (πηγή S: DMSO 1,3mM)

Στα πειραματικά δεδομένα της ανάπτυξης προσαρμόζεται το λογιστικό μοντέλο (εξ. 7) και προσδιορίζονται οι παράμετροι του στον κάτωθι πίνακα.

Πίνακας 14. Παράμετροι και στατιστικά στοιχεία εφαρμογής λογιστικού μοντέλου ανάπτυξης στο διάγραμμα 14 (Πηγή C: γλυκόζη, Πηγή S: DMSO 1,3mM)

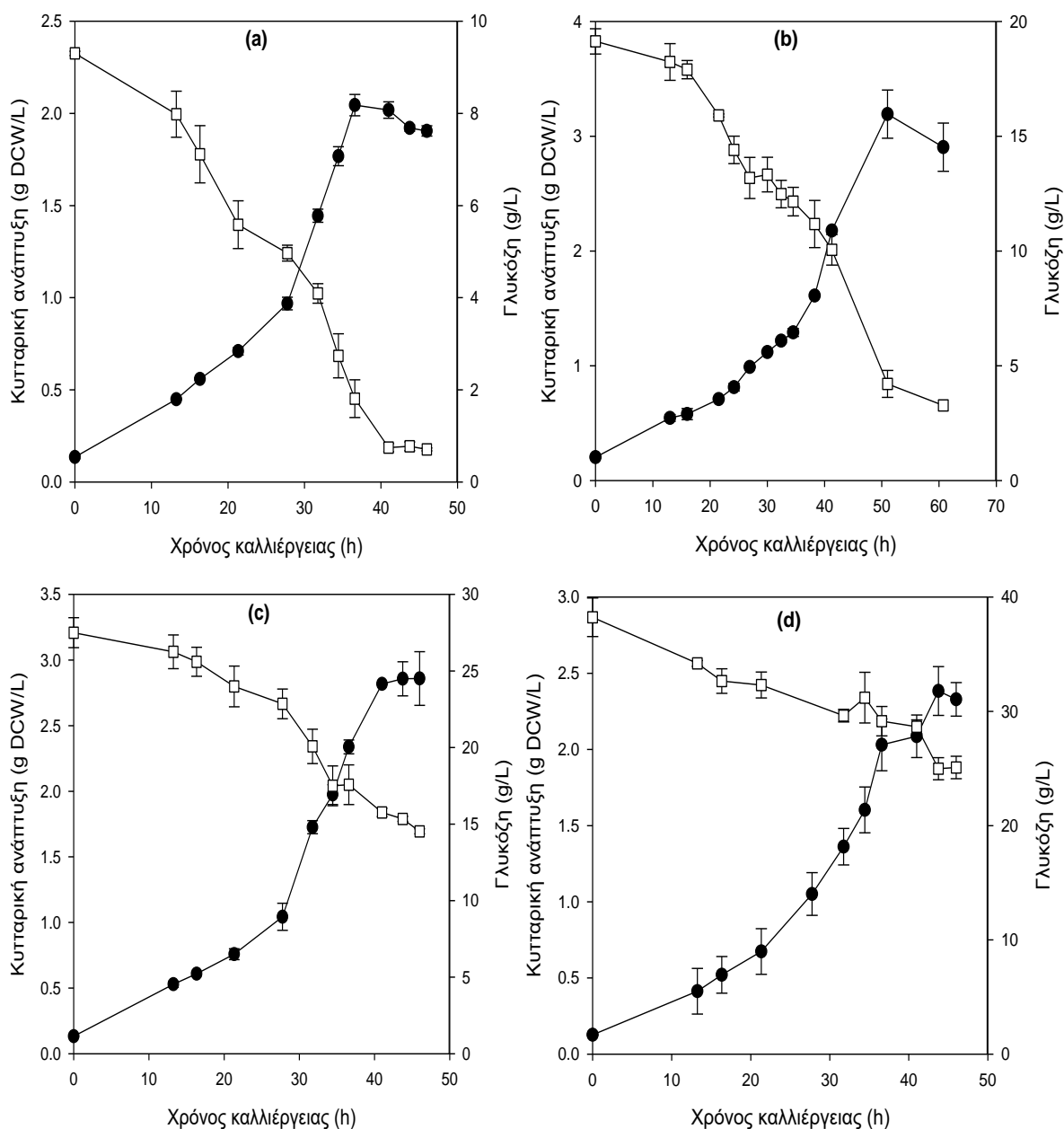
Συγκέντρωση Γλυκόζης (g/L)	μ (h ⁻¹)				X _{max} (g DCW/L)	
	Τιμή	St.error	P	R ²	Πειραματική τιμή	Προβλεπόμενη τιμή
10	0,101	0,008	<0,0001	0,9487	2,04	2,4
20	0,070	0,004	<0,0001	0,9455	3,19	4,11
30	0,097	0,004	<0,0001	0,9810	2,86	4,01
40	0,092	0,004	<0,0001	0,9859	2,38	3,31

Ερμηνεύοντας το παραπάνω διάγραμμα είναι φανερό πως μεγαλύτερη ταχύτητα ανάπτυξης επιτυγχάνεται όταν εφαρμόζεται συγκέντρωση γλυκόζης 10 g/L ($\mu = 0,101 \text{ h}^{-1}$). Ελαφρώς βραδύτερη ανάπτυξη με παραπλήσιους ειδικούς ρυθμούς παρουσιάζουν οι συνθήκες 30 και 40 g/L γλυκόζης ($0,097 \text{ h}^{-1}$ και $0,092 \text{ h}^{-1}$ αντίστοιχα). Τον μικρότερο ειδικό ρυθμό παρουσιάζει η συνθήκη 20 g/L. Ωστόσο, εκεί επιτυγχάνεται η μέγιστη

παραγωγή βιομάζας. Για την εξαγωγή ακριβέστερου συμπεράσματος για τη βέλτιστη συγκέντρωση υποστρώματος προσδιορίζεται η κατανάλωση γλυκόζης στην ανάπτυξη.

Πίνακας 15. Παρατηρούμενοι συντελεστές απόδοσης για την ανάπτυξη του στελέχους σε διαφορετικές συγκεντρώσεις γλυκόζης (Διάγραμμα 14)

Συγκ. Γλυκόζης (g/L)	Y _{x/s}
10	0,21
20	0,17
30	0,22
40	0,18



Διάγραμμα 15. Μεταβολή κυτταρικής συγκέντρωσης (●) και συγκέντρωσης γλυκόζης (□) σε αρχικές συνθήκες γλυκόζης: (a) 10 g/L (b) 20 g/L (c) 30 g/L (d) 40 g/L

Αξίζει να σημειωθεί πως στις υψηλές συγκεντρώσεις της πηγής C (30 g/L και 40 g/L γλυκόζης) η κατανάλωση του υποστρώματος στο τέλος της κυτταρικής ανάπτυξης αγγίζει το 47% και 34% της αρχικής συγκέντρωσης του υποστρώματος αντίστοιχα. Αντίθετα για συγκέντρωση γλυκόζης 10 g/L καταναλώθηκε το 92% της αρχικής της ποσότητας ενώ για συγκέντρωση 20g/L η κατανάλωση έφτασε το 83% της αρχικής ποσότητας.

Από τα παραπάνω δεδομένα φανερώνεται η τάση μείωσης της κυτταρικής ανάπτυξης όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του υποστρώματος για συγκέντρωση γλυκόζης άνω των 20g/L. Η μειωμένη ανάπτυξη για συνθήκες 30 και 40 g/L γλυκόζης ερμηνεύεται πιθανότατα λόγω παρεμπόδισης από το υπόστρωμα. Ιδιαίτερα το μεγάλο υπόλειμμα γλυκόζης (άνω του 50%) στο τέλος της ανάπτυξης για τις τελευταίες συγκεντρώσεις τις καθιστά μη προτιμητέες από άποψης εξοικονόμησης θρεπτικών συστατικών. Επιπροσθέτως η συγκέντρωση 10 g/L γλυκόζης κρίνεται ανεπαρκής καθότι καταναλώνεται σχεδόν εξολοκλήρου, γεγονός που περιορίζει την περαιτέρω ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Ως βέλτιστη συνθήκη επιλέγεται αυτή των 20 g/L γλυκόζης λόγω επαρκούς ποσότητας γλυκόζης για παραγωγή βιομάζας αλλά και ταυτόχρονη παραγωγή της σε μεγαλύτερες ποσότητες.

Βιβλιογραφικά, αν και η χρήση της γλυκόζης είναι πολύ συχνή στη καλλιέργεια μικροοργανισμών προς αποθείωση εν τούτοις δεν έχει βρεθεί μελέτη που να αποσαφηνίζει τη βέλτιστη συγκέντρωσή της. Κάτω από τις ίδιες συνθήκες (1,3 mM DMSO, γλυκόζη 20g/L) οι del Olmo et al [51] δεν ξεπέρασαν σε βιομάζα τα 2g/L.

16.4.2 Η Σακχαρόζη ως πηγή άνθρακα

Μελετήθηκε η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων σακχαρόζης στην κυτταρική ανάπτυξη (Μέθοδοι 15.2). Η πηγή θείου παρέμεινε σταθερή στα 1,3 mM DMSO ενώ μελετήθηκαν συγκεντρώσεις σακχαρόζης: 10, 15, 20, 25, 30 g/L.

Σε όλες τις συγκεντρώσεις της σακχαρόζης η κυτταρική συγκέντρωση δεν ξεπέρασε την τιμή των 0,9 g/L ενώ η κατανάλωση σακχαρόζης δεν ξεπέρασε για το σύνολο των συγκεντρώσεων το 10% της αρχικής ποσότητας.

Πίνακας 16. Πειραματικά στοιχεία ανάπτυξης μικροοργανισμού σε διαφορετικές συγκεντρώσεις σακχαρόζης (Πηγή C: 1,3mM DMSO)

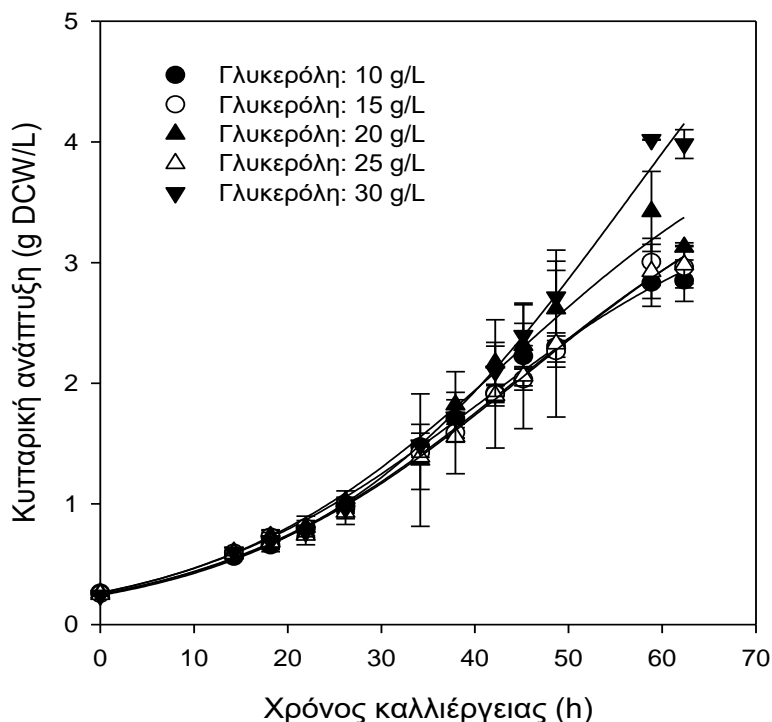
Συγκέντρωση Σακχαρόζης (g/L)	X _{max} (mg DCW/mL)	Y _{x/s}
10	0,59	0,43
15	0,62	0,53
20	0,63	0,26
25	0,87	0,17
30	0,69	0,27

Είναι γνωστό, πως ο δισακχαρίτης της σακχαρόζης αποτελείται από ένα μόριο γλυκόζης και ένα μόριο φρουκτόζης. Στην προηγούμενη ενότητα βρέθηκε η ικανότητα του μικροοργανισμού να αναπτύσσεται παρουσία γλυκόζης. Ωστόσο, ο μικροοργανισμός δεν αναπτύσσεται σε περιβάλλον σακχαρόζης όταν χρησιμοποιείται αποκλειστικά ως πηγή άνθρακα διότι πιθανότατα δεν διαθέτει τα απαραίτητα ένζυμα (ιμπερτάσες) που υδρολύουν τη σακχαρόζη σε φρουκτόζη και γλυκόζη τα οποία μπορεί να μεταβολίσει. Τα ίχνη ανάπτυξης που παρουσιάζει ο μικροοργανισμός στον πίνακα 16 οφείλονται στην κατανάλωση μικρής ποσότητας γλυκόζης από μικρό ποσοστό της σακχαρόζης που

υδρολύθηκε λόγω των συνθηκών του πειράματος. Η ύπαρξη μικρής ποσότητας αρχικής γλυκόζης επιβεβαιώθηκε με μέτρηση της όπως περιγράφεται στην ενότητα 15.6.2.

16.4.3 Η Γλυκερόλη ως πηγή άνθρακα

Σε επόμενο στάδιο μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης της γλυκερόλη στην κυτταρική ανάπτυξη διατηρώντας σταθερό πάντα των παράγοντα του θείου. Εξετάστηκαν οι συγκεντρώσεις: 10, 15, 20, 25, 30 g/L. Στα δεδομένα κυτταρικής ανάπτυξης προσαρμόστηκε το λογιστικό μοντέλο (εξ. 7).



Διάγραμμα 16. Κυτταρική ανάπτυξη σε διαφορετικές συγκεντρώσεις γλυκερόλης (Πηγή S: DMSO 1,3 mM)

Πίνακας 17. Παράμετροι και στατιστικά στοιχεία εφαρμογής λογιστικού μοντέλου ανάπτυξης στο διάγραμμα 16 (Πηγή C: γλυκερόλη, Πηγή S: 1,3 mM DMSO)

Συγκέντρωση Γλυκερόλης (g/L)	μ (h ⁻¹)				Xmax (g DCW/L)	
	Τιμή	St.error	P	R ²	Πειραματική τιμή	Προβλεπόμενη τιμή
10	0,063	0,002	<0,0001	0,9950	2,83	3,67
15	0,061	0,001	<0,0001	0,9963	3,01	4,10
20	0,063	0,003	<0,0001	0,9854	3,42	4,44
25	0,060	0,001	<0,0001	0,9975	2,98	4,16
30	0,059	0,001	<0,0001	0,9948	3,98	7,15

Από τους συντελεστές συσχέτισης του μοντέλου βλέπουμε ότι τα πειραματικά δεδομένα προσαρμόζονται ικανοποιητικά στο μοντέλο ανάπτυξης. Η επίδραση της συγκέντρωσης γλυκερόλης δεν διαφοροποιεί σημαντικά την ταχύτητα της ανάπτυξης καθότι ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης είναι παραπλήσιος για όλες της συγκεντρώσεις, περίπου ίσος με 0,06 h⁻¹. Αρκετά σημαντική είναι η διαφορά στην βιομάζα που παράγεται όταν προστίθεται γλυκερόλη σε συγκέντρωση 30 g/L, όπου εμφανίζεται η μέγιστη κυτταρική

συγκέντρωση (3,98 g/L). Επίσης υψηλή είναι και η παραγωγή βιομάζας σε συνθήκες γλυκερόλης 20 g/L.

Στις καλλιέργειες προσδιορίστηκε η αρχική και τελική συγκέντρωση γλυκερόλης για τον προσδιορισμό των συντελεστών μετατροπής.

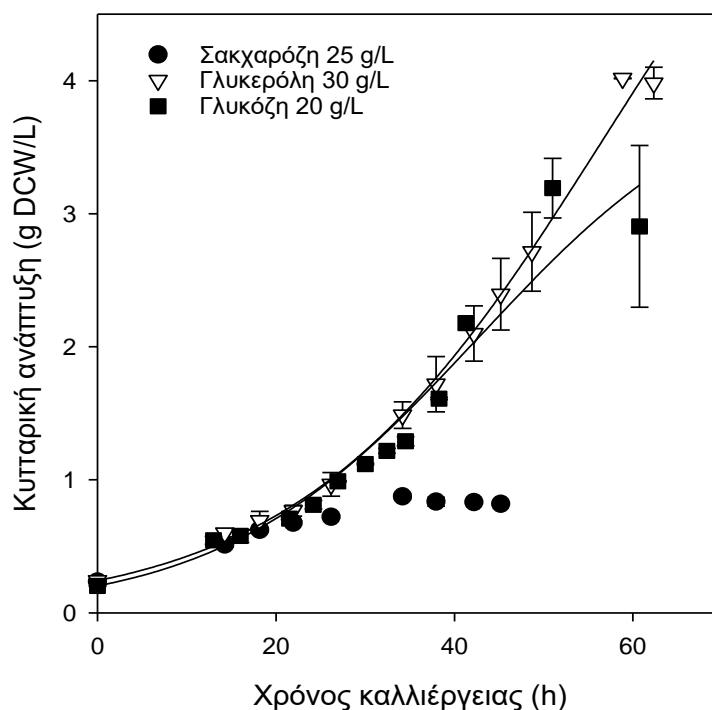
Πίνακας 18. Παρατηρούμενοι συντελεστές μετατροπής για την ανάπτυξη του στελέχους σε διαφορετικές συγκεντρώσεις γλυκερόλης (Διάγραμμα 16)

Συγκέντρωση γλυκερόλης (g/L)	Yx/s
10	0,49
15	0,34
20	0,43
25	0,40
30	0,53

Αναφορικά με την κατανάλωση της πηγής άνθρακα στις διαφορετικές συνθήκες βρέθηκε:

- Για 10 g/L αρχική συγκέντρωση: 75% κατανάλωση γλυκερόλης,
- Για 15 g/L αρχική συγκέντρωση: 51% κατανάλωση γλυκερόλης,
- Για 20 g/L αρχική συγκέντρωση: 60% κατανάλωση γλυκερόλης,
- Για 25 g/L αρχική συγκέντρωση: 29% κατανάλωση γλυκερόλης,
- Για 30 g/L αρχική συγκέντρωση: 28% κατανάλωση γλυκερόλης.

Με παράμετρο την μέγιστη κυτταρική συγκέντρωση συγκρίνεται σχηματικά η ανάπτυξη στις 3 διαφορετικές πηγές άνθρακα που χρησιμοποιήθηκαν.



Διάγραμμα 17. Συγκριτικό διάγραμμα ανάπτυξης μικροοργανισμού στις πηγές άνθρακα όπου παρατηρήθηκε μέγιστη κυτταρική συγκέντρωση (X_{max}) (Πηγή S: DMSO 1,3 mM)

Πίνακας 19. Παράμετροι και στατιστικά στοιχεία εφαρμογής λογιστικού μοντέλου ανάπτυξης στο διάγραμμα 17

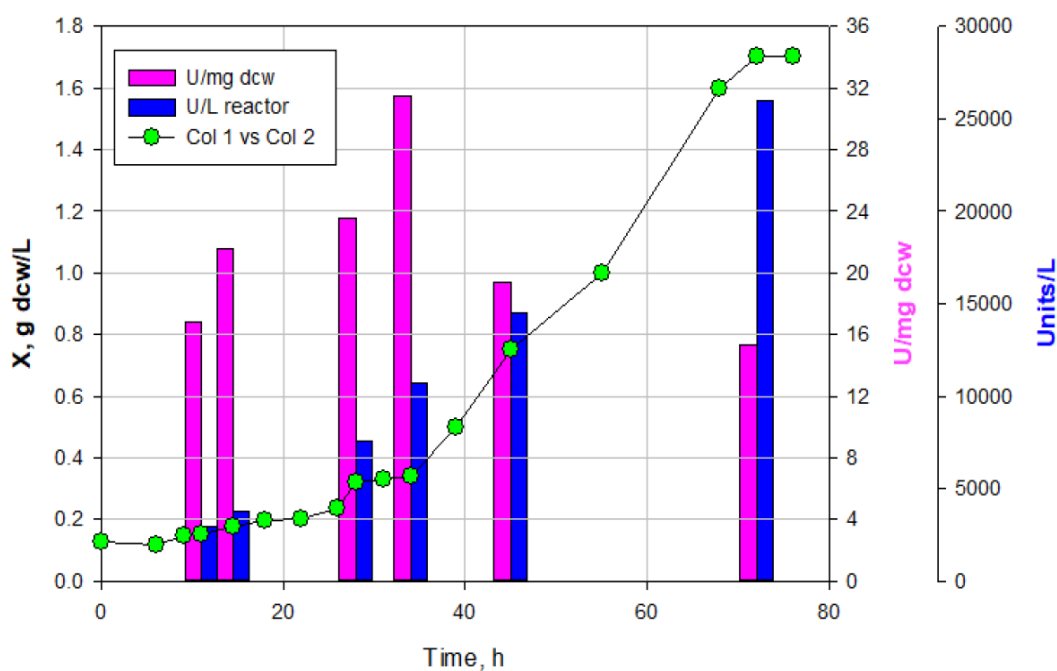
Πηγή C	μ (h^{-1})				X_{max} (g DCW/L)	
	Τιμή	St.error	P	R ²	Πειραματική τιμή	Προβλεπόμενη τιμή
Γλυκόζη 20 g/L	0,070	0,004	<0,0001	0,9455	3,19	4,11
Γλυκερόλη 30 g/L	0,059	0,001	<0,0001	0,9948	3,98	7,15

Συγκρίνοντας τις συνθήκες του πίνακα 19 παρατηρείται ότι μεταξύ της γλυκερόλης και της γλυκόζης δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης. Και στις δύο πηγές άνθρακα ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται εξίσου με παρόμοια ταχύτητα. Σημαντική όμως είναι η διαφορά στην παραγωγή της βιομάζας όπου η αρκετά μεγαλύτερη τιμή της γλυκερόλης μας ωθεί στην τελική επιλογή της ως πηγή C για την διεξαγωγή κατόπιν πειραμάτων σε αντιδραστήρα. Ένας επιπλέον παράγοντας προτίμησης της είναι η οικονομικά πιο προσιτή τιμή της γλυκερόλης έναντι της γλυκόζης. Στην ίδια απόφαση συνεισφέρει και η μεγαλύτερη διαθεσιμότητα της γλυκερόλης στη βιομηχανία πετρελαίου αν αναλογιστούμε ότι η γλυκερόλη αποτελεί παραπροϊόν του βιοντήζελ.

Λόγω του ότι η ανάπτυξη σε γλυκερόλη 30 g/L αφήνει υπόλειμμα σε υψηλό ποσοστό χωρίς να καταναλωθεί, επιλέγεται από δω και στο εξής συγκέντρωση γλυκερόλης 20 g/L όπου εμφανίζει παραπλήσιο ρυθμό, παράγει εξίσου υψηλή βιομάζα και καταναλώνεται σε μεγαλύτερο βαθμό.

16.5 Ανάπτυξη σε Βιοαντιδραστήρα Διαλείποντος έργου

Στο παρόν πείραμα μελετήθηκε η ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε αντιδραστήρα διαλείποντος έργου με παραμέτρους: πηγή C γλυκερόλη 20g/L και πηγή S DMSO σε συγκέντρωση 1,3mM. Επιχειρήθηκε **αλλαγή του μέσου ανάπτυξης** επιλέγοντας ως μέσο **προκαλλιέργειας και καλλιέργειας το BSM**. Επιπλέον προσδιορίστηκε και η αποθιωτική δράση των κυττάρων με την μέθοδο που περιγράφεται στην ενότητα 15.3.



Διάγραμμα 18. Συγκεντρωτικό διάγραμμα ανάπτυξης του μικροοργανισμού σε αντιδραστήρα διαλείποντος έργου και αποθειωτικής δράσης αυτού σε ορισμένες στιγμές της ανάπτυξης του (DMSO 1,3 mM, Γλυκόζη 20 g/L)

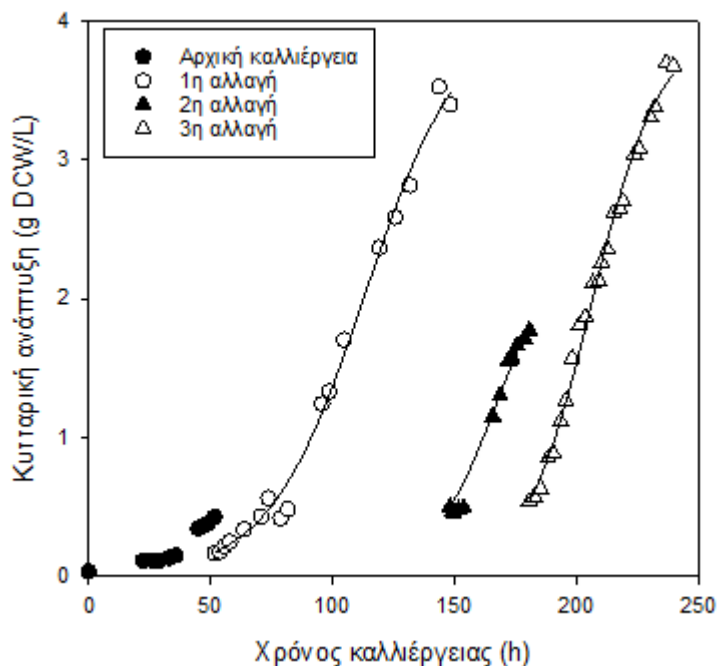
Τα πειραματικά αποτελέσματα του *διαγράμματος 18* έδειξαν μικρότερη παραγωγή βιομάζας από την αναμενόμενη αγγίζοντας μία μέγιστη τιμή στα 1,7 g/L. Η αποθειωτική δράση των κυττάρων εμφανίζει την τάση να αυξάνεται παράλληλα με την ανάπτυξη έως ότου φτάσει σε μία μέγιστη αποθειωτική ικανότητα η οποία αντιστοιχεί στην αρχή της εκθετικής φάσης. Κατόπιν, η αποθειωτική ικανότητα των κυττάρων φθίνει. Η μεγαλύτερη αποθειωτική δράση ανά ξηρή μάζα κυττάρων με τιμή 31 Units/mg dcw παρουσιάζεται ύστερα από 33h ανάπτυξης σε κυτταρική συγκέντρωση 0,35 g/L. Την ίδια συμπεριφορά ως προς την αποθείωση, δηλαδή την κλιμάκωση μέχρι ενός σημείου της ανάπτυξης και την μετέπειτα πτώση της συμπεραίνουν στις έρευνες τους οι del Olmo et al [39]. Ωστόσο, στην έρευνα τους η μέγιστη αποθείωση παρατηρείται στο τέλος της εκθετικής φάσης.

Στο ίδιο διάγραμμα παρουσιάζεται και η αποθειωτική ικανότητα ανά όγκο αντιδραστήρα, μέγεθος που ουσιαστικά εκφράζει την αποθειωτική ικανότητα του συνόλου των κυττάρων που έχουν παραχθεί εκείνη τη στιγμή. Η αποθειωτική δράση των κυττάρων ανά όγκο αντιδραστήρα αυξάνεται βαθμιαία με την ανάπτυξη των κυττάρων και εμφανίζει μέγιστη τιμή στο τέλος τις εκθετικής φάσης ανάπτυξης. Η μέγιστη τιμή είναι 2600 Units/L αντιδραστήρα και εντοπίζεται ύστερα από 73h ανάπτυξης όταν η κυτταρική συγκέντρωση λαμβάνει την μέγιστη τιμή 1,7 g/L.

Στο σημείο αυτό αξίζει να συγκρίνουμε τους δύο τύπους έκφρασης της αποθειωτικής δράσης των κυττάρων. Στην περίπτωση των 33h έχουμε λίγα κύτταρα με μεγάλη αποθειωτική ικανότητα (ανά g DCW) όποτε η συνολική αποθειωτική ικανότητα ανά όγκο αντιδραστήρα είναι σχετικά μικρή. Αντίθετα στην περίπτωση των 73h όπου έχουμε περισσότερα κύτταρα με μικρότερη αποθειωτική ικανότητα (ανά g DCW) το γινόμενο τους δίνει μεγαλύτερη αποθειωτική ικανότητα ανά όγκο αντιδραστήρα από ότι το αντίστοιχο στις 33h. Η στιγμή λοιπόν που θα παραλάβουμε τα κύτταρα για να πραγματοποιήσουμε την αποθείωση είναι παράμετρος του μέγεθους της τροφοδοσίας που θέλουμε να αποθειώσουμε. Προφανώς σε μεγάλους όγκους τροφοδοσίας που επικρατούν σε μία βιομηχανική μονάδα είναι προτιμότερη μεγαλύτερη ποσότητα κυττάρων (σε δεδομένο όγκο) με μικρότερη αποθειωτική δράση παρά το αντίστροφο.

16.6 Ανάπτυξη σε βιοαντιδραστήρα με αλλαγές θρεπτικού μέσου

Μελετήθηκε η ανάπτυξη του βακτηρίου σε αντιδραστήρα συνολικού όγκου 2 L με παράλληλες αλλαγές του θρεπτικού μέσου όταν ο μικροοργανισμός έφτανε κοντά στο τέλος της εκθετικής φάσης ανάπτυξης του (βλ. ενότητα 15.3). Πηγή άνθρακα ορίστηκε η γλυκερόλη στα 20 g/L και θείου το DMSO 1,3mM. Σε έναν δεύτερο όμοιο αντιδραστήρα τοποθετήθηκε πηγή C, το Οξικό Νάτριο 20 g/L και θείου DMSO 1,3mM.



Διάγραμμα 19. Κυτταρική ανάπτυξη έπειτα από διαδοχικές αλλαγές θρεπτικού μέσου (Γλυκερόλη 20 g/L, DMSO 1,3 mM)

Στο παραπάνω διάγραμμα φαίνεται η ανάπτυξη του μικροοργανισμού (σε γλυκερόλη και DMSO) στην αρχική καλλιέργεια και έπειτα από 3 διαδοχικές αλλαγές. Η ανάπτυξη του μικροοργανισμού στην αρχική καλλιέργεια παρουσιάζει παρόμοια συμπεριφορά με την ανάπτυξη του διαγράμματος 18, ωστόσο αυτή αλλάζει ολοκληρωτικά με τις διαδοχικές αλλαγές του μέσου. Η μικρή ανάπτυξη στο διαλείπον έργο (δ/μα 18) ήταν η αιτία που οδηγηθήκαμε στη δοκιμή των διαδοχικών αλλαγών με απώτερο σκοπό, την επιτάχυνση της ανάπτυξης και τη μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας. Πράγματι στο παραπάνω διάγραμμα είναι φανερό πως η αρχική καλλιέργεια αυξάνεται με πολύ αργό ρυθμό ο οποίος επιταχύνεται έντονα στις επόμενες τρεις αλλαγές. Αυτό που επιτυγχάνεται στο παρόν πείραμα είναι η μείωση της λανθάνουσας φάσης ανάπτυξης των μικροοργανισμών καθώς η αλλαγή του μέσου πραγματοποιείται προς το τέλος της εκθετικής φάσης ανάπτυξης οπότε τα κύτταρα έχουν εγκλιματιστεί και αναπαράγονται άμεσα με την προσθήκη νέου υλικού.

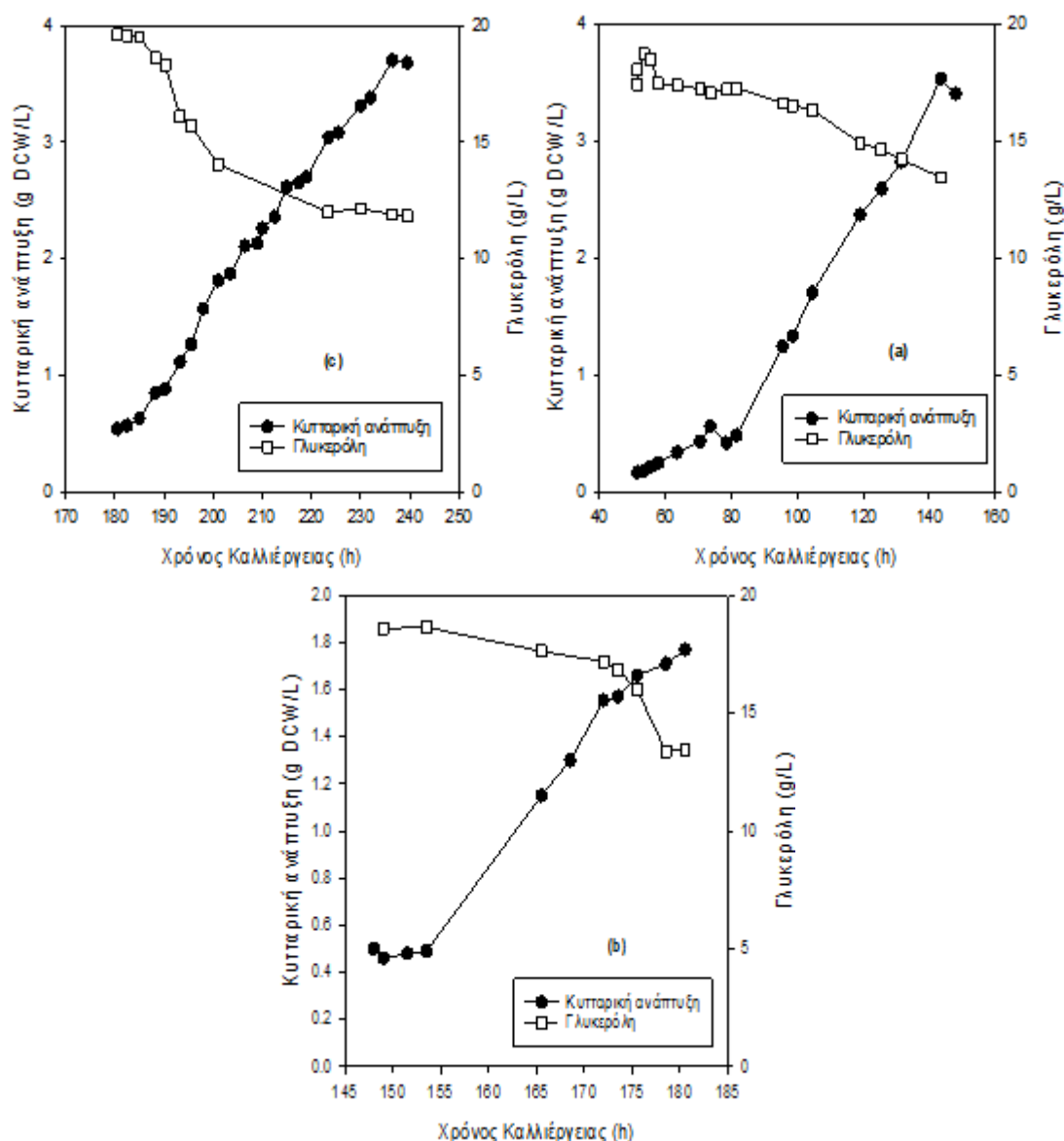
Στα δεδομένα ανάπτυξης για τις τρεις αλλαγές προσαρμόζεται το λογιστικό μοντέλο της εξίσωσης (7) και προσδιορίζονται οι παράμετροι X_{max} και μ .

Πίνακας 20. Παράμετροι και στατιστικά στοιχεία εφαρμογής λογιστικού μοντέλου στο διάγραμμα 19 (Γλυκερόλη 20 g/L, DMSO 1,3 mM)

1^η Αλλαγή μέσου				
	Τιμή	Std. error	P	R ²
μ (h ⁻¹)	0,051	0,001	< 0,0001	0,9935
X_{max} (g dcw/L)	4,07	0,16	< 0,0001	
2^η αλλαγή μέσου				
μ (h ⁻¹)	0,071	0,011	0,0001	0,9769
X_{max} (g dcw/L)	2,57	0,52	0,0008	
3^η αλλαγή μέσου				
μ (h ⁻¹)	0,072	0,002	< 0,0001	0,9929
X_{max} (g dcw/L)	3,94	0,09	< 0,0001	

Η τιμή του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης στην πρώτη αλλαγή ($0,051 \text{ h}^{-1}$) είναι μικρότερη ως προς την δεύτερη ($0,071 \text{ h}^{-1}$) και τρίτη ($0,072 \text{ h}^{-1}$) αλλαγή του μέσου. Η ανάπτυξη ελαφρώς επιταχύνεται με την εφαρμογή διαδοχικών αλλαγών. Ωστόσο δεν παρατηρείται σημαντική διαφορά στην μέγιστη κυτταρική συγκέντρωση που αγγίζουν τα κύτταρα μεταξύ της πρώτης ($3,53 \text{ g/L}$) και της τρίτης ($3,70 \text{ g/L}$) αλλαγής του θρεπτικού. Εκεί που παρατηρούνται σημαντικές διαφορές μεταξύ των αλλαγών είναι στη μείωση του χρόνου που απαιτείται για να φτάσουν τα κύτταρα μία τελική συγκέντρωση από μία δεδομένη αρχική. Με αλλά λόγια αυξάνεται η παραγωγικότητα (g/L/h) των κυττάρων από αλλαγή σε αλλαγή.

Συγκριτικά με το πείραμα ανάπτυξης σε διαλείπον έργο ($X_{\max} = 1,7 \text{ g/L}$) η παραγωγή βιομάζας είναι αρκετά μεγαλύτερη (σχεδόν διπλάσια) όταν εφαρμόζονται στο σύστημα διαδοχικές αλλαγές (X_{\max} , 1^η αλλαγή = $3,53 \text{ g/L}$, X_{\max} , 3^η αλλαγή = $3,7 \text{ g/L}$). Παρακάτω δίνεται η κατανάλωση γλυκερόλης συναρτήσει της ανάπτυξης των κυττάρων για τις 3 αλλαγές.



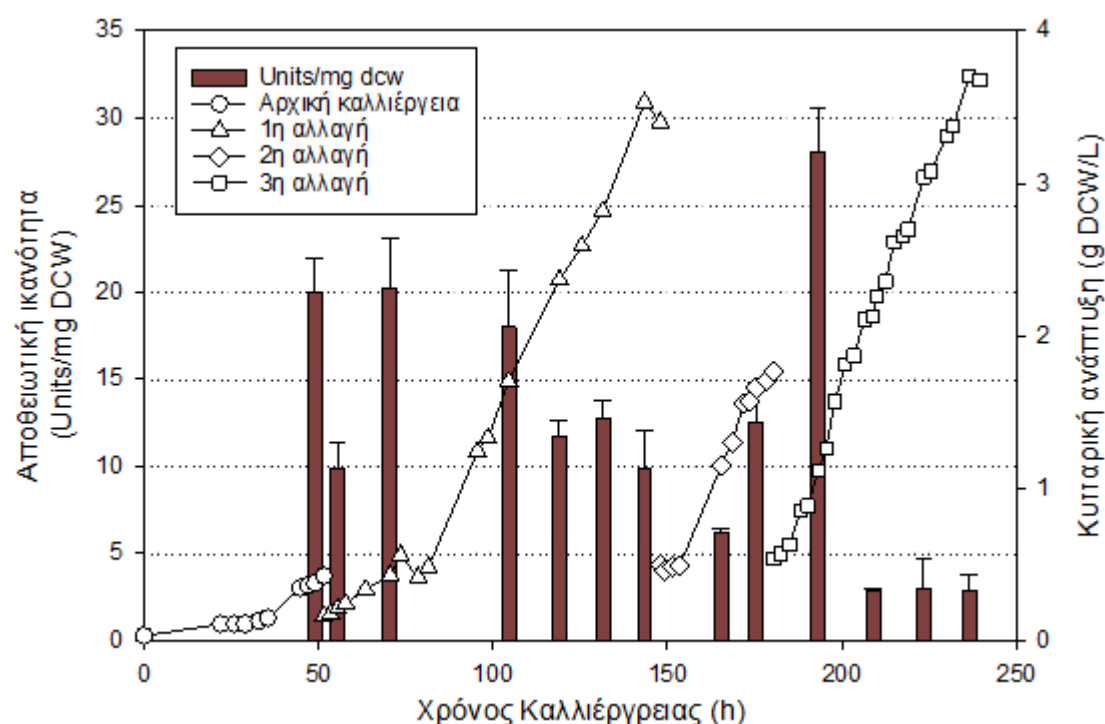
Διάγραμμα 20. Χρονική μεταβολή κυτταρικής συγκέντρωσης (•) και συγκέντρωσης γλυκερόλης (□) κατά την (a) πρώτη (b) δεύτερη και (c) τρίτη αλλαγή θρεπτικού μέσου.

Πίνακας 21. Παρατηρούμενοι συντελεστές απόδοσης και μέγιστη τιμή κυτταρικής συγκέντρωσης για διαδοχικές αλλαγές θρεπτικού μέσου (Διάγραμμα 19)

Αλλαγές μέσου	X _{max}	Y _{x/s}
1 ^η	3,53	0,64
2 ^η	1,77	0,26
3 ^η	3,70	0,40

Ο μικροοργανισμός αναπτύχθηκε καταναλώνοντας το 28% της αρχικής διαθέσιμης γλυκόζης στην 1^η και την 2^η αλλαγή ενώ κατανάλωσε το 40% αυτής στην 3^η αλλαγή.

Παράλληλα σε ορισμένες χρονικές στιγμές ελέγχεται η αποθειωτική ικανότητα των κυττάρων πραγματοποιώντας αποθειωτική δοκιμή όπως αυτό περιγράφεται στην ενότητα 1.5.



Διάγραμμα 21. Συγκεντρωτικό διάγραμμα αποθειωτικής ικανότητας κυττάρων κατά την ανάπτυξη τους σε αντιδραστήρα με αλλαγές θρεπτικού μέσου

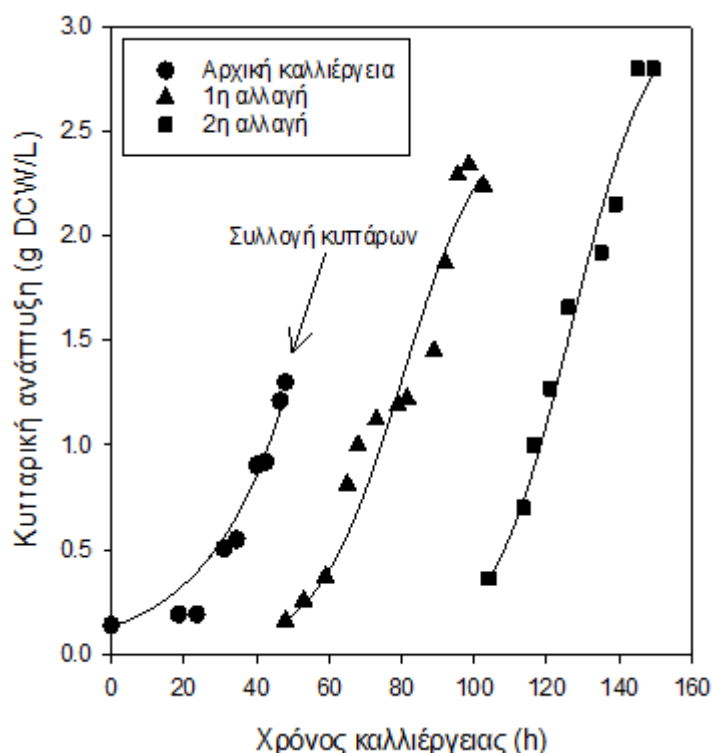
Από το διάγραμμα γίνεται φανερό πως μεγαλύτερη αποθειωτική δράση όσον αφορά την πρώτη αλλαγή εμφανίζεται στην αρχή περίπου της εκθετικής φάσης ανάπτυξης σε κυτταρική συγκέντρωση 0,43 g/L, 19h ανάπτυξης (από την αλλαγή) με τιμή 20,3 U/mg dcw. Στην δεύτερη αλλαγή μεγαλύτερη ικανότητα απομάκρυνσης θείου εντοπίζεται πάλι στην αρχή της ανάπτυξης σε συγκέντρωση αντιδραστήρα 1,66 g/L, ύστερα από 28h ανάπτυξης με τιμή 12,6 U/mg dcw. Ωστόσο το μεγαλύτερο ποσοστό αποθείωσης εμφανίζεται στην τρίτη αλλαγή με τιμή 28,1 U/ mg dcw σε συγκέντρωση 1,12 g/L και 13h ανάπτυξης από την αλλαγή του μέσου. Είναι εμφανές για κάθε αλλαγή πως τα κύτταρα αφότου αποκτήσουν την βέλτιστη αποθειωτική ικανότητα τους έπειτα αδυνατούν να προσεγγίσουν πάλι υψηλές τιμές. Η αποθειωτική ισχύ αρχικά αυξάνεται παρουσιάζει ένα μέγιστο και κατόπιν φθίνει. Η ίδια συμπεριφορά παρατηρείται και στην ανάπτυξη σε αντιδραστήρα διαλείποντος έργου χωρίς αλλαγές μέσου (ενότητα 16.5).

Κατά τους Yoshikawa et al [68] και del Olmo et al [39] η μέγιστη αποθειωτική ικανότητα του στελέχους παρατηρείται στο τέλος της εκθετικής φάσης όταν ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται σε φιάλες διαλείποντος έργου. Στο πείραμα με τις διαδοχικές αλλαγές μέσου αυτό που επιτεύχθηκε είναι η μείωση των χρόνων ανάπτυξης ώστε τα κύτταρα να εμφανίζουν σε νωρίτερο στάδιο της ανάπτυξής τη βέλτιστη αποθειωτική δράση συγκριτικά με την παραπάνω βιβλιογραφία.

Στον βιοαντιδραστήρα με πηγή άνθρακα το Οξικό Νάτριο 20 g/L **δεν σημειώθηκε ανάπτυξη** του μικροοργανισμού. Το στέλεχος παρέμεινε για 50h περίπου στην αρχική συγκέντρωση του εμβολίου. Στην βιβλιογραφία έχει αναφερθεί ότι η ανάπτυξη παρουσία πηγής C της οξικής ρίζας είναι δυνατή για μικρότερες ωστόσο συγκεντρώσεις [71].

16.7 Ανάπτυξη σε Βιοαντιδραστήρα και αποθείωση σε διαφασικό σύστημα για διαφορετικές παροχές αέρα

Ερευνήθηκε η ικανότητα αποθείωσης του *R. erythropolis IGTS8* σε διαφασικό σύστημα όταν αυτός έχει αναπτυχθεί αρχικά σε βιοαντιδραστήρα. Η ανάπτυξη του μικροοργανισμού πραγματοποιήθηκε με αλλαγές θρεπτικού μέσου όπως περιγράφεται στην ενότητα 15.4. Στην πρώτη αλλαγή του θρεπτικού τα κύτταρα που απομακρύνονται χρησιμοποιούνται για αποθείωση στο διαφασικό σύστημα όπως περιγράφεται στην ενότητα 15.5. Κατόπιν το σύστημα συνεχίζει να μελετάται ως προς την ανάπτυξή του. Οι συνθήκες του πειράματος είναι **προκαλλιέργεια και καλλιέργεια** σε BSM, Γλυκερόλη 20 g/L και DMSO 1,3 mM.



Διάγραμμα 22. Ανάπτυξη κυττάρων με διαδοχικές αλλαγές θρεπτικού μέσου. Στο σημείο που υποδεικνύεται από το βέλος στο τέλος της αρχικής καλλιέργειας γίνεται συλλογή των κυττάρων και χρήση τους στο διαφασικό πείραμα. Στα πειραματικά δεδομένα προσαρμόστηκε το λογιστικό μοντέλο ανάπτυξης.

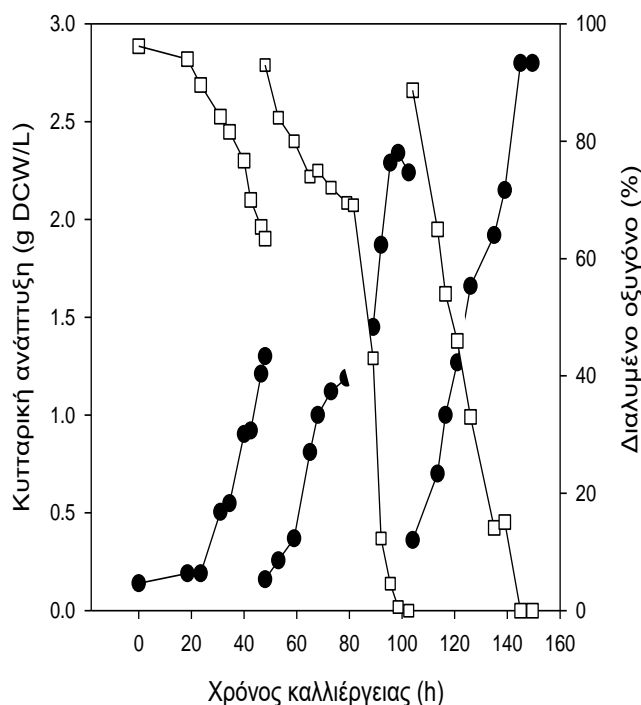
Στα πειραματικά δεδομένα του αντιδραστήρα όπου είναι έντονη η κυτταρική ανάπτυξη προσαρμόζεται λογιστικό και προσδιορίζονται οι παράμετροι της μέγιστης κυτταρικής συγκέντρωσης X_{max} και του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης μ .

Πίνακας 22. Παράμετροι και στατιστικά στοιχεία εφαρμογής λογιστικού μοντέλου στο διάγραμμα 22

Αρχική καλλιέργεια				
	Τιμή	Std. error	P	R ²
μ (h ⁻¹)	0,045	0,009	0,0015	0,9402
X_{max} (g dcw/L)	-	-	-	
1^η αλλαγή μέσου				
μ (h ⁻¹)	0,085	0,007	< 0,0001	0,9391
X_{max} (g dcw/L)	2,64	0,29	< 0,0001	
2^η αλλαγή μέσου				
μ (h ⁻¹)	0,089	0,007	< 0,0001	0,9708
X_{max} (g dcw/L)	3,15	0,25	< 0,0001	

Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν όπως και στο παραπάνω πείραμα (ενότητα 16.6) ότι ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης αυξάνεται από αλλαγή σε αλλαγή του θρεπτικού μέσου. Ειδικότερα μεταξύ της αρχικής καλλιέργειας (0,045 h⁻¹) και της πρώτης αλλαγής (0,085 h⁻¹) ο ρυθμός σχεδόν διπλασιάζεται. Στην τρίτη αλλαγή του μέσου ο ρυθμός παρουσιάζει μια ελαφριά αύξηση (0,089 h⁻¹).

Όσο διαρκεί η ανάπτυξη προσδιορίζεται η κατανάλωση του διαλυμένου οξυγόνου στο μέσο ως % ποσοστό της συγκέντρωσης κορεσμού του.

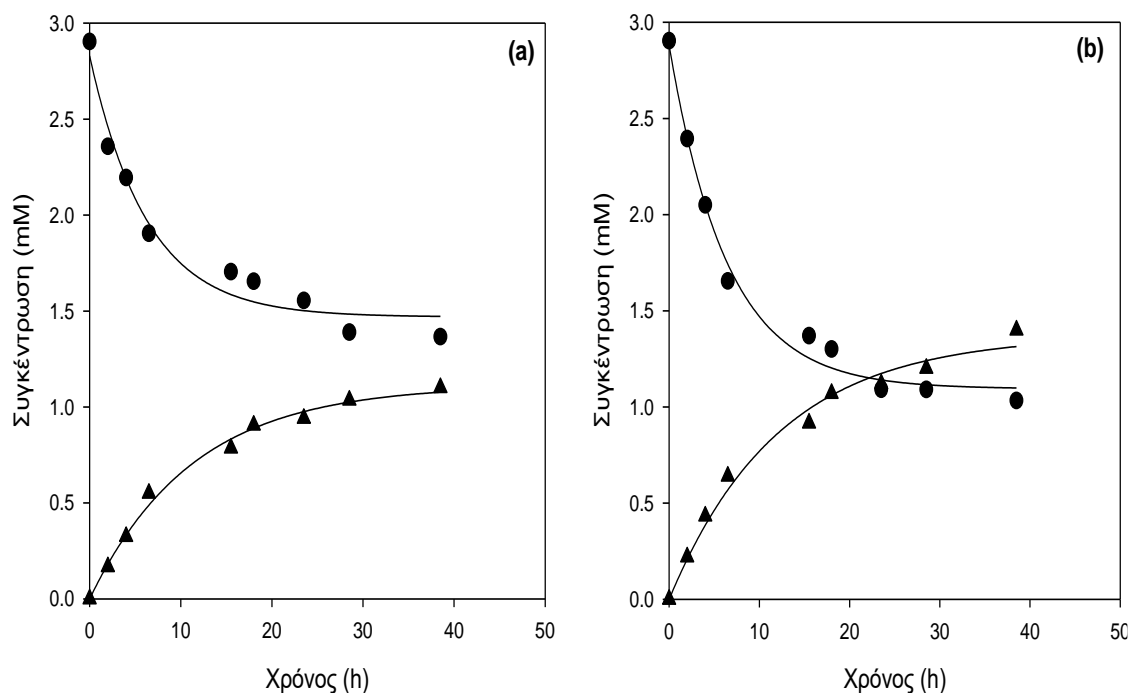


Διάγραμμα 23. Κυτταρική ανάπτυξη (•) και κατανάλωση οξυγόνου (□) για διαδοχικές αλλαγές μέσου καλλιέργειας (Πηγή C: Γλυκερόλη 20 g/L, Πηγή S: DMSO 1,3 mM)

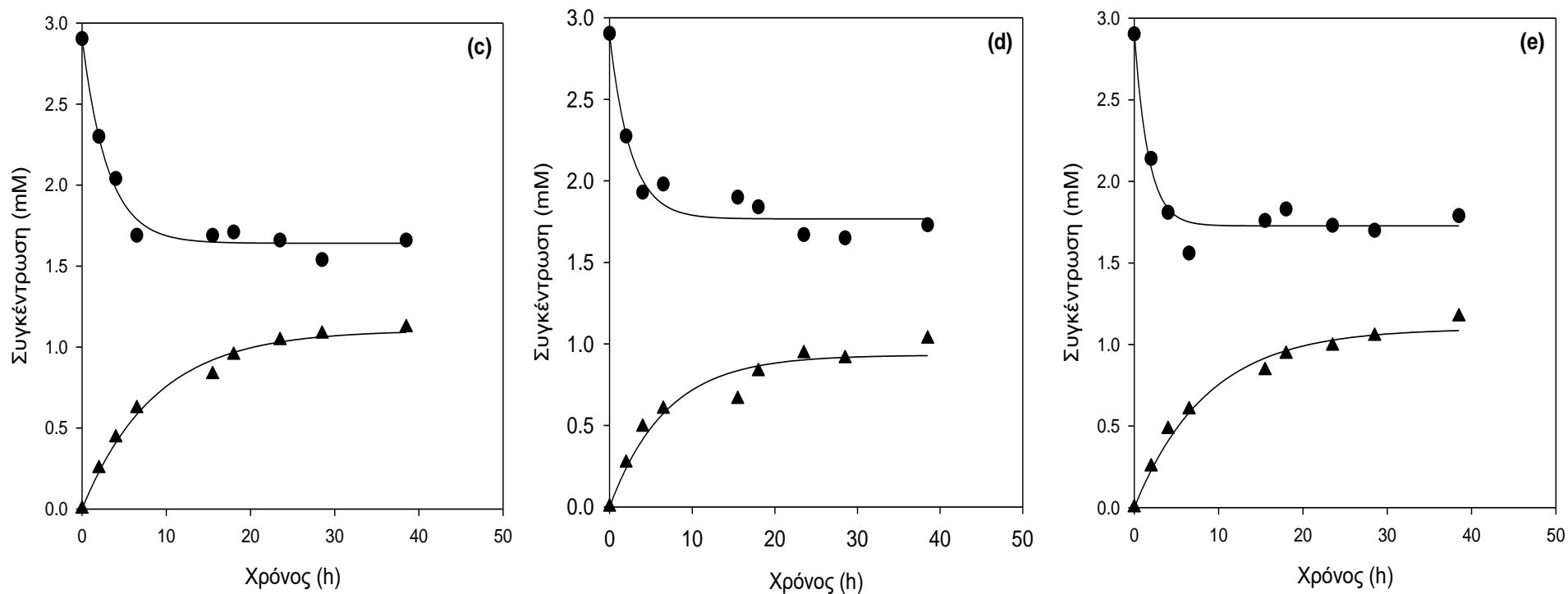
Η περιεκτικότητα του οξυγόνου στα παραπάνω διάγραμμα ακολουθεί φθίνουσα πορεία όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του μικροοργανισμού. Με το πέρας της ανάπτυξης του

μικροοργανισμού έχει καταναλωθεί και όλο το διαθέσιμο οξυγόνο στο μέσο. Συγκεκριμένα στην πρώτη αλλαγή του μέσου το ποσοστό διαθέσιμου οξυγόνου αγγίζει την ελάχιστη τιμή (0% του κορεσμού) έπειτα 50h ανάπτυξης, τιμή που αντιστοιχεί στη μέγιστη κυτταρική ανάπτυξη. Επιπλέον, στην δεύτερη αλλαγή του μέσου όπου ο ρυθμός ανάπτυξης κατά τον πίνακα 22 είναι μεγαλύτερος, η ολική κατανάλωση του διαθέσιμου οξυγόνου επιτυγχάνεται νωρίτερα σε 41h ανάπτυξης, τη στιγμή που πάλι αντιστοιχεί στη μέγιστη ανάπτυξη (μεγαλύτερη της πρώτης). Ο μεγαλύτερος, δηλαδή, ρυθμός ανάπτυξης συνεπάγεται και μεγαλύτερες απαιτήσεις σε οξυγόνο άρα και ταχύτερη μείωση του. Το συμπέρασμα που προκύπτει στο παρόν πείραμα είναι ότι ο ρυθμός ανάπτυξης του μικροοργανισμού εξαρτάται σε πολύ μεγάλο βαθμό από τη διαθεσιμότητα διαλυμένου οξυγόνου και στην προκειμένη περίπτωση το O_2 δρα ως το περιοριστικό υπόστρωμα στην ανάπτυξη. Στην σωστή διαθεσιμότητα του οξυγόνου στα κύτταρα συντελούν η ταχύτητα ανάδευσης και η παροχή αέρα. Κάτω από τις ίδιες συνθήκες διεξαγωγής του πειράματος οι Gomez et al [45] αναφέρουν ότι για ταχύτητες ανάδευσης μικρότερες των 250 rpm οι υδροδυναμικές συνθήκες στον αντιδραστήρα καθιστούν το διαλυμένο οξυγόνο ως το περιοριστικό υπόστρωμα.

Στα κύτταρα που συλλέχθηκαν με το πέρας της αρχικής καλλιέργειας μελετήθηκε η ικανότητα αποθείωσης τους σε διαφασικό σύστημα με παράμετρο τον αερισμό του συστήματος (βλ. ενότητα 15.4). Η συγκέντρωση κυττάρων στο σύστημα ήταν 8,8 g/L και αρχική συγκέντρωση DBT 3 mM στην οργανική φάση. Οι παροχές που μελετώνται είναι: 4, 6,6, 8,8, 10,4 και 43 L/h.



Διάγραμμα 24a. Χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης του DBT (●), του 2-HBP (▲) για παροχή αέρα (α) 4 L/h (β) 6,6 L/h. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν από τον αντιδραστήρα τη στιγμή που υποδεικνύει το βέλος. Συγκέντρωση κυττάρων στο διαφασικό 8,8 g/L, αρχική συγκέντρωση DBT 3 mM.



Διάγραμμα 24b . Χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης του DBT (•), του 2-HBP (▲) για παροχή αέρα **(c) 8,8 (d) 10,4 και (e) 43 L/h**. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν από τον αντιδραστήρα τη στιγμή που υποδεικνύει το βέλος. Συγκέντρωση κυττάρων στο διαφασικό 8,8 g/L, αρχική συγκέντρωση DBT 3 mM.

Στα δεδομένα παραγωγής του 2-HBP και κατανάλωσης του DBT γίνεται προσαρμογή των εξισώσεων (9) και (10) αντίστοιχα:

$$\text{Παραγωγή HBP: } y = a(1 - e^{-bt}) \quad (9)$$

και

$$\text{Κατανάλωση 2-DBT: } y = y_0 + ae^{-bt} \quad (10)$$

Η παράμετρος b (h^{-1}) και στις 2 εξισώσεις εκφράζει τον ρυθμό της παραγωγής του HBP ή το ρυθμό κατανάλωσης του DBT.

Πίνακας 23. Ρυθμός παραγωγής του 2-HBP για διαφορετικές παροχές αέρα όπως προκύπτει από προσαρμογή των δεδομένων στην εξίσωση (9)

Παροχή αερισμού (L/h)	Παραγωγή HBP ($b \cdot h^{-1}$)	St. error	P	R ²
4	0,089	0,008	<0,0001	0,9934
6,6	0,082	0,010	<0,0001	0,9866
8,8	0,116	0,011	<0,0001	0,9903
10,4	0,147	0,03	<0,0001	0,9440
43	0,116	0,014	<0,0001	0,9834

Πίνακας 24. Ρυθμός κατανάλωσης του DBT για διαφορετικές παροχές αέρα όπως προκύπτει από προσαρμογή των δεδομένων στην εξίσωση (10)

Παροχή αερισμού (L/h)	Κατανάλωση DBT ($b \cdot h^{-1}$)	St. error	P	R ²
4	0,158	0,006	<0,0001	0,9674
6,6	0,156	0,019	<0,0001	0,9889
8,8	0,331	0,043	<0,0001	0,9739
10,4	0,391	0,087	<0,0001	0,9453
43	0,602	0,134	<0,0001	0,9416

Το ποσοστό αποθείωσης του DBT εκφράζεται ως μετατροπή σε προϊόν (2-HBP) σύμφωνα με την σχέση των Del olmo et al [39]:

$$X_{BDS} = \frac{C_{HBP,t}}{C_{DBT,0}} \cdot 100 \quad (11)$$

Όπου: X_{BDS} : το ποσοστό βιοαποθείωσης (%)

$C_{HBP,t}$: η συγκέντρωση του παραγόμενου HBP μετά από χρόνο t , mM

$C_{DBT,0}$: η συγκέντρωση του DBT την χρονική στιγμή 0, mM

Το ποσοστό μείωσης της συγκέντρωσης του DBT υπολογίζεται από την σχέση:

$$X_{DBT} = \frac{C_{DBT,0} - C_{DBT,t}}{C_{DBT,0}} \quad (12)$$

Όπου $C_{DBT,0}$: η συγκέντρωση του DBT την χρονική στιγμή 0, mM

$C_{DBT,t}$: η συγκέντρωση του DBT την χρονική στιγμή t , mM

Πίνακας 25. Ποσοστό αποθείωσης και μετατροπής του DBT για διαφορετικές παροχές αέρα

Παροχή αερισμού (L/h)	Ποσοστό αποθείωσης X_{BDS}	Ποσοστό κατανάλωσης DBT X_{DBT}
4	38 %	53 %
6,6	48 %	64 %
8,8	39 %	43 %
10,4	35 %	40%
43	40 %	38%

Από τα αποτελέσματα του πίνακα 24 μπορούμε να συμπεράνουμε την τάση των κυττάρων να εμφανίζουν μεγαλύτερους ρυθμούς κατανάλωσης του DBT όσο αυξάνεται η παροχή αερισμού. Αντίθετα η επίδραση του αερισμού δεν εμφανίζεται σημαντική στην παραγωγή του 2-HBP καθότι σε γενικές γραμμές οι ρυθμοί παραγωγής προϊόντος δεν διαφέρουν σημαντικά με την αύξηση της παροχής. Μεγαλύτερος ρυθμός παραγωγής 2-HBP εμφανίζεται για παροχή 10,4 L/h και κατανάλωσης DBT για παροχή 43 L/h.

Επιπλέον, όπως φανερώνεται από τους πίνακες 23 και 24 ανεξάρτητα από τον αερισμό στο σύστημα αποθείωσης, ο ρυθμός με τον οποίο παράγεται το 2-HBP είναι σημαντικά μικρότερος από τον ρυθμό με τον οποίο καταναλώνεται το DBT. Ειδικότερα στις παροχές 4 L/h και 6,6 L/h ο ρυθμός κατανάλωσης του αντιδρώντος DBT είναι σχεδόν διπλάσιος του παραγομένου προϊόντος. Για ακόμη μεγαλύτερες παροχές ο ρυθμός μείωσης του DBT είναι κατά πολύ μεγαλύτερος του αντίστοιχου του HBP. Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η αντίδραση απομάκρυνσης του DBT δεν υπόκειται σε κάποια στοιχειομετρία καθότι δεν μετατρέπεται ακριβές μέρος ή όλη η ποσότητα του καταναλισκόμενου DBT σε 2-HBP. Από ερευνητές έχουν προταθεί ορισμένες προτάσεις για την ποσότητα εκείνη του DBT που δεν μετατρέπεται σε τελικό προϊόν. Κατά τους Gray et al. [72] αυτή η μη στοιχειομετρική αντίδραση αποδίδεται στο ίδιο το μεταβολικό μονοπάτι 4S καθώς πρόκειται για μονοπάτι πολλών ενδιάμεσων σταδίων που καταλύεται από ένζυμα με διαφορετικές ενεργότητες και τρόπους ελέγχου. Έτσι θεωρείται πιθανό ποσότητα του DBT να μετατρέπεται στα ενδιάμεσα προϊόντα του μονοπατιού 4S χωρίς αυτά να δίνουν το τελικό προϊόν. Άλλη επικρατέστερη ερμηνεία [73] αναφέρει ότι η μικρότερη παραγωγή 2-HBP οφείλεται στη συσσώρευση του ως ενός σημείο εντός ή πάνω στην επιφάνεια του κυττάρου κατά το σχηματισμό του. Τέλος, τα πτητικά χαρακτηριστικά του 2-HBP πιθανά να ερμηνεύουν την διαφορά στην παραγωγή του [74].

Αν και για όλη τη χρονική διάρκεια που μελετάται η αποθείωση στο διαφασικό σύστημα τα πειραματικά δεδομένα προσαρμόζονται πολύ καλά στις εξισώσεις (9) και (10), εντούτοις για τις πρώτες ώρες διεξαγωγής του φαινομένου τα αποτελέσματα εκφράζονται αρκετά καλά από μια γραμμική συσχέτιση της συγκέντρωσης παραγόμενου HBP ή καταναλισκόμενου DBT με το χρόνο. Στα δεδομένα κατανάλωσης DBT και παραγωγής HBP προσαρμόζεται γραμμική εξίσωση της μορφής:

$$y = a * t + b \quad (13)$$

Όπου από την κλίση της ευθείας a ανοιγμένη ως προς την μάζα των κυττάρων (mmol/g DCW/ h) υπολογίζεται η αρχική ταχύτητα παραγωγής HBP ή κατανάλωσης του DBT. Η γραμμική εξάρτηση της συγκέντρωσης HBP ή DBT ισχύει για τις 6 πρώτες ώρες της αποθείωσης.

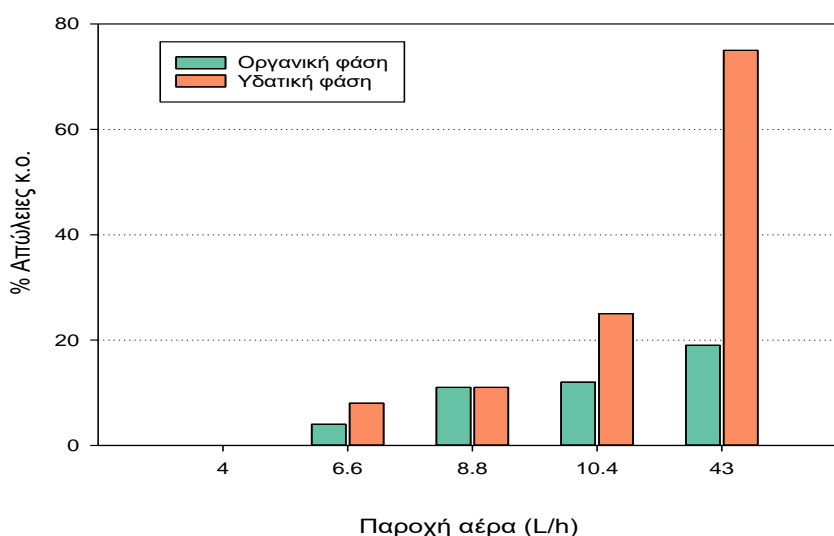
Πίνακας 26. Αρχικές ταχύτητες παραγωγής HBP και κατανάλωσης DBT έπειτα από γραμμική προσαρμογή δεδομένων έως τις πρώτες 6 ώρες της αποθείωσης

Παροχή (L/h)	Ρυθμός κατανάλωση DBT (mmol/g dcw/h)	Ρυθμός παραγωγής HBP (mmol/g dcw/h)
4	0,0165	0,0095
6,6	0,0215	0,0116
8,8	0,0205	0,0115
10,4	0,0160	0,0117
43	0,0227	0,0115

Όπως και στην περίπτωση προσαρμογής των εκθετικών μοντέλων (9) και (10) έτσι και εδώ οι αρχικοί ρυθμοί κατανάλωσης του DBT είναι ανεξαρτήτως παροχής μεγαλύτεροι από αυτούς παραγωγής του HBP και σε ορισμένες περιπτώσεις σχεδόν διπλάσιοι. Η ερμηνεία της διαφοράς αυτής αιτιολογείται όπως προαναφέρθηκε. Παρομοίως η μεταβολή της παροχής αερισμού δεν επιδρά σημαντικά στην αρχική ταχύτητα παραγωγής HBP ενώ για την αρχική ταχύτητα κατανάλωσης του DBT επικρατεί η τάση αύξηση της με αύξηση της παροχής αερισμού.

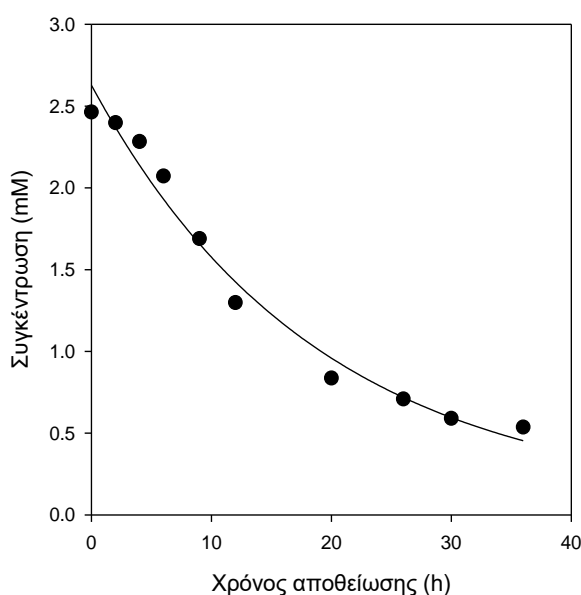
Συγκρίνοντας τα ποσοστά απομάκρυνσης του DBT (X_{DBT}) σε σχέση με το ποσοστό μετατροπής του σε HBP (X_{BDS}) διαπιστώνεται ότι το πρώτο σε όλες σχεδόν τις παροχές αερισμού είναι μεγαλύτερο, γεγονός που επιβεβαιώνει τη μη στοιχειομετρική σχέση της αντίδρασης. Ειδικότερα στην παροχή των 43 L/h όπου το ποσοστό απομάκρυνσης είναι το μικρότερο, διαπιστώνεται ότι η πολύ έντονη ανάμιξη με την μορφή φυσαλίδων προκαλεί διαταραχές στην αποθειωτική δράση των κυττάρων. Πιθανότατα αυτό οφείλεται στο υδροδυναμικό στρες που προκαλείται στα κύτταρα λόγω έντονης ανάμιξη, μειώνοντας τον ρυθμό πρόσληψης του O_2 και οδηγώντας σε μειωμένη δράση [45].

Οι παροχές 4 και 6,6 L/h εμφανίζουν τα μεγαλύτερα ποσοστά απομάκρυνσης του DBT και μετατροπής του σε προϊόν. Το αποτέλεσμα αυτό αποδίδεται στο ότι οι παροχές αυτές δημιουργούν, συγκριτικά με τις μεγαλύτερες παροχές, ευνοϊκότερες συνθήκες για την μεταφορά των συστατικών και του οξυγόνου προς τον μικροοργανισμό, μειώνοντας την αντίσταση στους ρυθμούς μεταφοράς μάζας ούτως ώστε το στέλεχος εμφανίζει καλύτερα ποσοστά αποθείωσης [75]. Με το πέρας της αποθείωσης μετρήθηκε το ποσοστό απωλειών στον όγκο της οργανικής και υδατικής φάσης.

**Διάγραμμα 25.** Ποσοστιαία κατ' όγκο απώλεια οργανικής και υδατικής φάσης ύστερα από 38 h αποθειωτικής δράσης των κυττάρων σε διαφασικό σύστημα.

Από τα δεδομένα του διαγράμματος 25 φαίνεται ότι οι απώλειες που εμφανίζονται στην υδατική φάση είναι αρκετά μεγαλύτερες της οργανικής για όλες τις παροχές αέρα. Για τη χαμηλότερη παροχή 4 L/h δεν παρατηρούνται απώλειες και στις δύο φάσεις. Αντίθετα για την υψηλότερη παροχή των 43 L/h οι απώλειες στην υδατική φάση είναι δραματικά υψηλές, γεγονός που προσθέτει ένα ακόμη μειονέκτημα στις έντονες συνθήκες ανάπτυξης. Βάση λοιπόν όλων των παραπάνω επιλέγεται ως βέλτιστη παροχή τα 4 L/h εξαιτίας τις έλλειψης απωλειών, του ικανοποιητικού ρυθμού κατανάλωσης DBT και κυρίως λόγω των υψηλών ποσοστών αποθείωσης και κατανάλωσης DBT.

Σε επόμενο στάδιο εφόσον ορίστηκε η παροχή στα 4 L/h μελετήθηκε η αποθείωση του υποκατεστημένου 4,6 διμέθυλο-διβενζοθειοφαίνιο (4,6-DMDBT). Οι συνθήκες διεξαγωγής της αποθείωσης παρέμειναν ακριβώς ίδιες με μοναδική διαφορά τη συγκέντρωση κυττάρων 10,7 g/L και αρχική συγκέντρωση 4,6-DMDBT 2.5 mM. Η μείωση της συγκέντρωσης του 4,6-DMDBT αποτυπώνεται στο διάγραμμα 26. Στα δεδομένα μείωσης του υποστρώματος προσαρμόστηκε η εξίσωση (9).



Διάγραμμα 26. Χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης του 4,6 DMDBT κατά την αποθείωση σε διαφασικό σύστημα. Συγκέντρωση κυττάρων 10,7 g/L, αρχική συγκέντρωση DM-DBT 2,5 mM, παροχή αέρα: 4 L/h

Πίνακας 27. Ρυθμός κατανάλωσης του 4,6 DM-DBT αρχικής συγκέντρωσης 2,5 mM σε διαφασικό σύστημα όπως προκύπτει από προσαρμογή των δεδομένων στην εξίσωση (10)

Παροχή αερισμού (L/h)	Κατανάλωση 4,6 DMDBT (b·h ⁻¹)	St. error	P	R ²	Ποσοστό κατανάλωσης 4,6-DMDBT X _{4,6-DMDBT}
4	0,053	0,013	0,0049	0,9807	78 %

Από την προσαρμογή των δεδομένων βρίσκεται ο ρυθμός μείωσης της συγκέντρωσης του υποκατεστημένου 4,6 DMDBT, ίσος με 0,053 h⁻¹, τιμή περίπου τρεις φορές μικρότερη από τον αντίστοιχο ρυθμό κατανάλωσης του DBT στην ίδια παροχή (0,158 h⁻¹). Αντίστοιχα η αρχική ταχύτητα κατανάλωσης του 4,6 DMDBT έπειτα από προσαρμογή του γραμμικού μοντέλου (εξ. 13) για τις πρώτες 6h βρέθηκε 0,0060 mmol/gdcw/h στο υποκατεστημένο μόριο, επίσης πολύ μικρότερη από την αρχική ταχύτητα κατανάλωσης του DBT (0,0165 mmol/gdcw/h) στην ίδια παροχή. Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται

σε συμφωνία με την έρευνα των Ohshiro et al [69] και των Chen et al [47] που επιβεβαιώνουν τον μικρότερο ρυθμό αποδόμησης του 4,6-DMDBT. Από τους Ohshiro et al αναφέρεται ότι τελικό προϊόν της αντίδρασης είναι το αντίστοιχο υδρόξυ-διμέθυλοδιφαινύλιο. Ο μειωμένος βαθμός αποδόμησης οφείλεται πιθανότερα στην ύπαρξη υποκατάστατων που παρεμποδίζουν στερεοχημικά την αποδόμηση του S, ειδικότερα λόγω της γειννίας τους στο μόριο με το άτομο του S. Παρόλα αυτά το ποσοστό κατανάλωσης του 4,6 DMDBT στο τέλος της αποθείωσης είναι σημαντικά μεγαλύτερο, από το ποσοστό κατανάλωσης του μη υποκατεστημένου DBT.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε μελέτη των συνθηκών που επηρεάζουν την ανάπτυξη του μικροοργανισμού *R. erythropolis IGTS8*.

Η μελέτη της ανάπτυξης του στελέχους σε 4 υποστρώματα θείου: DBT, DMSO, θειοφαίνιο και $MgSO_4$, έδειξε την ικανότητα επαρκούς ανάπτυξης του στα DMSO και $MgSO_4$ με ρυθμούς $0,121 h^{-1}$ και $0,191 h^{-1}$ αντίστοιχα. Η μη ανάπτυξη παρουσία DBT και θειοφαινίου αποδόθηκε στην μικρή διαλυτότητα των μορίων στο σύστημα, γεγονός που οδηγεί στην δυσκολία του κυττάρου να προσλάβει την απαραίτητη ποσότητα S για την ανάπτυξη του. Την απάντηση για τη βέλτιστη πηγή S στην ανάπτυξη έδειξε η διεξαγωγή αποθειωτικών δοκιμών για την εύρεση του υποστρώματος εκείνου που πέρα από την ανάπτυξη παρουσιάζει και επαρκή αποθειωτική ικανότητα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ικανοποιητική αποθειωτική δράση όταν στην ανάπτυξη επιλέγεται το DMSO ενώ μηδενική αποθείωση παρουσία $MgSO_4$ λόγω καταστολής του οπερονίου dsz από την μεγάλη διαθεσιμότητα των SO_4^{2-} .

Σε επόμενο στάδιο μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του DMSO (βέλτιστης πηγής S) στην κυτταρική ανάπτυξη. Από ένα εύρος συγκεντρώσεων 0,75 έως 35 mM που εξετάστηκε βρέθηκε η τάση του μικροοργανισμού να αναπτύσσεται φθάνοντας μεγαλύτερες κυτταρικές συγκεντρώσεις όσο μειώνεται η συγκέντρωση σε DMSO, γεγονός που αποδόθηκε σε παρεμπόδιση από το υπόστρωμα σε υψηλές συγκεντρώσεις αυτού. Οι αποδόσεις του στελέχους στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις των 0,75 και 1,3 mM αποδείχτηκαν αμφότερα καλές από άποψης ρυθμών και μέγιστης κυτταρικής συγκέντρωσης. Η επιλογή ως βέλτιστης των 1,3mM έγινε για λόγους ύπαρξης του S σε περίσσεια στο μέσο.

Η μελέτη της επίδρασης της πηγής C στην κυτταρική ανάπτυξη βασίστηκε στην εξέταση 3 υποστρωμάτων: Σακχαρόζη, Γλυκόζη και Γλυκερόλη. Σε έκαστο από τα υποστρώματα διερευνήθηκε η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων. Αναφορικά με την σακχαρόζη σε καμία από της συγκεντρώσεις 10 έως 30 g/L που εξετάστηκαν δεν παρουσιάστηκε σημαντική ανάπτυξη, πιθανόν λόγω ανεπάρκειας του μικροοργανισμού στα ένζυμα που υδρολύουν τον δισακχαρίτη. Ως προς την ανάπτυξη σε γλυκόζη δοκιμαστήκαν οι συγκεντρώσεις 10, 20, 30, 40 g/L. Τα αποτελέσματα έδειξαν μη σημαντική διαφορά στους ρυθμούς ανάπτυξης αλλά και μία πιθανή παρεμπόδιση από το υπόστρωμα στις μεγάλες συγκεντρώσεις των 30, 40 g/L στις οποίες ακόμη, παραμένει υψηλό υπόλειμμα σε γλυκόζη. Η ανάπτυξη σε γλυκερόλη έδειξε παρόμοιους ρυθμούς για όλες τις συγκεντρώσεις (10, 15, 20, 25, 30 g/L) που δοκιμάστηκαν. Ωστόσο, λόγω των σημαντικών διαφορών μεταξύ των παραπάνω συγκεντρώσεων στην παραγωγή βιομάζας καθώς και το μεγάλο υπόλειμμα σε γλυκερόλη στις υψηλές περιεκτικότητες (30, 40 g/L), επιλέχθηκε ως βέλτιστη συνθήκη αυτή των 20 g/L γλυκερόλης. Μεταξύ των υποστρωμάτων γλυκόζης και γλυκερόλης όπου για αμφότερα στις επιλεχθείσες βέλτιστες συγκεντρώσεις τους η ανάπτυξη τους είναι εξίσου καλή, επιλέγεται τελικά η γλυκερόλη για λόγους οικονομικής προσιτότητας και διαθεσιμότητας σε μία βιομηχανική μονάδα. Εν κατακλείδι, το σύνολο των συνθηκών που αποδόθηκε ως βέλτιστο είναι: Πηγή S: DMSO 1,3 mM και Πηγή C: Γλυκερόλη 20 g/L.

Υπό την προϋπόθεση καλύτερων συνθηκών εξακριβωμένη, εξετάστηκε η ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε αντιδραστήρα διαλείποντος έργου με παράλληλη διεξαγωγή αποθειωτικών τεστ. Διαπιστώθηκε η τάση του μικροοργανισμού να εμφανίζει

αυξανόμενη αποθειωτική δράση έως μία μέγιστη τιμή που αντιστοιχεί στην αρχή της εκθετικής φάσης ανάπτυξης του και κατόπιν αυτή να φθίνει έως το τέλος της ανάπτυξης. Έπειτα με στόχο την μείωση της λανθάνουσας φάσης ανάπτυξης του μικροοργανισμού επιχειρήθηκε η ανάπτυξη του σε αντιδραστήρα διαλείποντος έργου με διαδοχικές αλλαγές του μέσου κάθε φορά στο τέλος της εκθετικής φάσης. Τα αποτελέσματα έδειξαν την ικανότητα του μικροοργανισμού να αναπτύσσεται με ταχύτερο ρυθμό από αλλαγή σε αλλαγή και να παράγει μεγαλύτερη ποσότητα βιομάζας από ότι στο διαλείπον έργο χωρίς αλλαγές του μέσου. Η μελέτη της αποθειωτικής δράσης στο εν λόγω πείραμα επιβεβαίωσε την ίδια τάση που αναφέρθηκε προηγουμένως. Η μέγιστη τιμή αποθειωτικής ικανότητας που εντοπίστηκε είναι στα 28,1 U/g dcw στην τρίτη αλλαγή του μέσου. Ακόμη, η μέτρηση του διαλυμένου O₂ στο μέσο όταν ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται στον αντιδραστήρα έδειξε ότι το διαλυμένο O₂ αποτελεί περιοριστικό υπόστρωμα στην ανάπτυξη του.

Τέλος, διερευνήθηκε το ποσοστό αποθείωσης του DBT σε διαφασικό σύστημα από κύτταρα που έχουν αναπτυχθεί σε αντιδραστήρα με παράμετρο την παροχή αερισμού. Οι ρυθμοί κατανάλωσης/παραγωγής DBT/HBP εκφράστηκαν ικανοποιητικά από τα εκθετικά μοντέλα των εξισώσεων (9) και (10) για το σύνολο του χρόνου διεξαγωγής ενώ η συσχέτιση των αρχικών συγκεντρώσεων με το χρόνο μπορεί να εκφραστεί επίσης καλά από μία γραμμική συνάρτηση έως τις 6 πρώτες ώρες της αποθείωσης. Από τα αποτελέσματα φάνηκε ότι ο ρυθμός κατανάλωσης του DBT είναι μεγαλύτερος από τον αντίστοιχο ρυθμό παραγωγής του 2-HBP ανεξάρτητα από την παροχή του αέρα. Η διαφορά αυτή αποδόθηκε επικρατέστερα στον εγκλωβισμό του 2-HBP εντός ή πάνω στην επιφάνεια του κυττάρου κατά το σχηματισμό του. Επιπλέον, από τα αποτελέσματα συμπεραίνεται ότι η μεταβολή της παροχής αέρα αφήνει ανεπηρέαστο το ρυθμό παραγωγής του 2-HBP ενώ η αύξηση της οδηγεί σε ταχύτερο ρυθμό μείωσης του DBT. Ως βέλτιστη παροχή ορίστηκαν τα 4 L/h εξαιτίας της έλλειψης απωλειών σε όγκο στο σύστημα, του ικανοποιητικού ρυθμού κατανάλωσης DBT και κυρίως λόγω των υψηλών ποσοστών αποθείωσης και κατανάλωσης DBT. Με αυτήν την παροχή ο ρυθμός κατανάλωσης του υποκατεστημένου 4,6 DMDBT βρέθηκε μικρότερος από αυτόν του DBT, γεγονός που αποδόθηκε στην στερεοχημική παρεμπόδιση των υποκατάστατων στην αποδόμηση του μορίου, λόγω γειτνίασης τους στο μόριο με το άτομο του S.

Κρίνοντας από τα αποτελέσματα που εξήχθησαν από την παρούσα διπλωματική εργασία, εγείρονται σημαντικές μελλοντικές προκλήσεις που πρέπει να εξεταστούν με στόχο την αποδοτικότερη ανάπτυξη και βιοαποθείωση. Το βασικότερο ζήτημα που αντιμετωπίστηκε στην παρούσα εργασία είναι η χαμηλή παραγωγή βιομάζας, παρά της διαφορετικές συνθήκες που δοκιμάστηκαν. Έχοντας ως προοπτική τη βιομηχανική εφαρμογή της μεθόδου, τα ποσά βιομάζας που παράξαμε δεν αρκούν. Συνεπώς, οι μελλοντικές αναζητήσεις της βιοτεχνολογίας θα πρέπει να κατευθύνονται προς τρόπους παραγωγής αυξημένης ποσότητας βιομάζας.

Προς το σκοπό αυτό προτείνεται να μελετηθεί διεξοδικότερα η επίδραση ορισμένων υποστρωμάτων στην ανάπτυξη και με ποιον τρόπο θα μπορούσαν αυτά να συμβάλλουν στην παραγωγή περισσότερης βιομάζας. Επίσης, είναι πολύ σημαντικό να εξεταστούν εναλλακτικοί τρόποι καλλιέργειας που άρουν τους περιορισμούς της ανάπτυξης σε συνθήκες διαλείποντος έργου. Όπως παρατηρήθηκε και στην παρούσα μελέτη τόσο για την πηγή θείου όσο και για την πηγή άνθρακα, η ανάπτυξη πέρα από κάποιες συγκεντρώσεις υποστρωμάτων παρεμποδιζόταν. Μια λοιπόν μελλοντική πρόταση σχετίζεται με την ανάπτυξη σε καλλιέργεια ημι-διαλείποντος έργου, όπου τα παραπάνω υποστρώματα θα παρέχονται συνεχώς ή ημισυνεχώς στο σύστημα. Με αυτόν τον τρόπο

διατηρούνται σταθερές οι συγκεντρώσεις ενός ή περισσότερων υποστρωμάτων και αποφεύγεται η συσσώρευση περιοριστικών παραγόντων. Βιβλιογραφικά, κάνοντας χρήση τεχνικών fed-batch έχει διαπιστωθεί η ικανότητα παραγωγής βιομάζας υψηλής κυτταρικής πυκνότητας σε συνδυασμό με υψηλή αποθειωτική ικανότητα [76].

Μία επιπλέον παράμετρος που πρέπει να εξεταστεί διεξοδικότερα είναι η επίδραση του διαλυμένου οξυγόνου στην κυτταρική ανάπτυξη. Από τα πειράματα σε βιοαντιδραστήρα είδαμε ότι η ανάπτυξη σταματάει με την κατανάλωση του οξυγόνου, κάτι που καθιστά το O₂ περιοριστικό υπόστρωμα. Συνίσταται λοιπόν, η διεξαγωγή πειραμάτων με σταθερή συγκέντρωση οξυγόνου και η σχετική μελέτη του ρυθμού κατανάλωσης του O₂ συναρτήσει της ανάπτυξης. Μια τέτοια μελέτη σκοπό έχει την ανακάλυψη της βέλτιστης περιεκτικότητας σε οξυγόνο και παράλληλα την παραγωγή αυξημένης βιομάζας.

Επιπροσθέτως, ενδιαφέρον παρουσιάζει και μελέτη άλλων παραμέτρων στη σύνθεση του μέσου όπως η πηγή του αζώτου αλλά και λειτουργικών παραμέτρων όπως η θερμοκρασία και η ταχύτητα ανάδευσης.

Ως προς την αποθειωτική ισχύ του *R.erythropolis IGTS8* ενδείκνυται η μελέτη της ικανότητας αποθείωσης παρουσία ταυτόχρονα DBT και άλλων υποκατεστημένων μορίων όπως το 4,6 Dimethyl-DBT, 4,6 Diethyl-DBT, 3,4-benzo-DBT, propyl DBT και άλλα. Έτσι θα ληφθούν απαντήσεις για ποσοστά αποθείωσης σε πιο ρεαλιστικές συνθήκες οργανικής φάσης, για πιθανή εξειδίκευση των ενζύμων αλλά και φαινόμενα ανταγωνισμού μεταξύ των υποστρωμάτων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Report of World Energy Resources 2016, World Energy Council, London 2016
- [2] El-Gendy, Nour Shafik, and Hussein Mohamed Nabil Nassar. Biodesulfurization in Petroleum Refining, Chapter 1, p.8 , John Wiley & Sons, 2018.
- [3] Okoro, Emeka Emmanuel, Adewale Dosunmu, K. C. Igwilo, Paul Apeye Lucky Anawe, and Angela Onose Mamudu. "Economic Advantage of In-Country Utilization of Nigeria Crude Oil." *Open Journal of Yangtze Gas and Oil* 2 (2017): 226-236.
- [4] Kilbane Ii, J. J., and S. Le Borgne (2004). "Petroleum biorefining: the selective removal of sulfur, nitrogen, and metals." In *Studies in surface science and catalysis*, vol. 151, pp. 29-65.
- [5] Hosseini, Hossein, and Abdolghader Hamidi. "Sulfur Removal of Crude Oil by Ultrasound Assisted Oxidative Method." In *Proceedings of the International Conference on Biological, Civil and Environmental Engineering (BCEE-2014)*, Dubai, United Arab Emirates, pp. 17-18. 2014.
- [6] Wauquier, J. P. (1995). *Petroleum refining: crude oil, petroleum products, process flowsheets (Vol. 1)*. Editions Technip.
- [7] Singh, Anita, and Madhoolika Agrawal. "Acid rain and its ecological consequences." *Journal of Environmental Biology* 29, no. 1 (2007): 15.
- [8] Watt, W. D., C. D. Scott, and W. J. White. "Evidence of acidification of some Nova Scotian Rivers and its impact on Atlantic Salmon, *Salmo solar*." *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 40, no. 4 (1983): 462-473.
- [9] Tolba, M. K. "Acid rain a growing concern of industrialized countries." *Water Quality Bulletin* 8 (1983): 115-120.
- [10] Pope III, C. Arden, Richard T. Burnett, Michael J. Thun, Eugenia E. Calle, Daniel Krewski, Kazuhiko Ito, and George D. Thurston. "Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution." *Jama* 287, no. 9 (2002): 1132-1141.
- [11] Sadare, Olawumi, Franklin Obazu, and Michael Daramola. "Biodesulfurization of petroleum distillates—current status, opportunities and future challenges." *Environments* 4, no. 4 (2017): 85.
- [12] Ε.Λόης, Φ.Ζαννίκος, Δ.Καρώνης, «Τεχνολογία Καυσίμων και Λιπαντικών», Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Αθήνα 2013
- [13] Gupta, Nidhi, P. K. Roychoudhury, and J. K. Deb. "Biotechnology of desulfurization of diesel: prospects and challenges." *Applied microbiology and biotechnology* 66, no. 4 (2005): 356-366.
- [14] Beychok, Milton R., and BEYCHOK MR. "Coping With SO₂.", (1974).
- [15] Monticello DJ (1996) Multistage process for deep desulfurization of a fossil fuel. US Patent number 5510265.

- [16] Boniek D, Figueiredo D, dos Santos AF, de Resende Stoianoff MA. Biodesulfurization: a mini review about the immediate search. 2015 Jan 1;17(1):29-37.
- [17] Ma, Ting. "The desulfurization pathway in Rhodococcus." *Biology of Rhodococcus*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2010. 207-230.
- [18] Otsuki, Shujiro, Takeshi Nonaka, Noriko Takashima, Weihua Qian, Atsushi Ishihara, Tamotsu Imai, and Toshiaki Kabe. "Oxidative desulfurization of light gas oil and vacuum gas oil by oxidation and solvent extraction." *Energy* 14, no. 6 (2000): 1232-1239.
- [19] Zaykina, R. F., Yu A. Zaykin, G. Mirkin, and N. K. Nadirov. "Prospects for irradiation processing in the petroleum industry." *Radiation Physics and Chemistry* 63, no. 3-6 (2002): 617-620.
- [20] Babich, I. V., and J. A. Moulijn. "Science and technology of novel processes for deep desulfurization of oil refinery streams: a review☆." *Fuel* 82, no. 6 (2003): 607-631.
- [21] Ania, C. O., and T. J. Bandoz. "Metal-loaded polystyrene-based activated carbons as dibenzothiophene removal media via reactive adsorption." *Carbon* 44, no. 12 (2006): 2404-2412.
- [22] Moosavi, Elham S., Seyed A. Dastgheib, and Ramin Karimzadeh. "Adsorption of thiophenic compounds from model diesel fuel using copper and nickel impregnated activated carbons." *Energies* 5, no. 10 (2012): 4233-4250.
- [23] Mohebali, Ghasemali, and Andrew S. Ball. "Biodesulfurization of diesel fuels—past, present and future perspectives." *International biodeterioration & biodegradation* 110 (2016): 163-180.
- [24] Kim, Tae Sung, Hae Yeong Kim, and Byung Hong Kim. "Petroleum desulfurization by *Desulfovibrio desulfuricans* M6 using electrochemically supplied reducing equivalent." *Biotechnology Letters* 12, no. 10 (1990): 757-760.
- [25] Armstrong, S. M., B. M. Sankey, and G. Voordouw. "Conversion of dibenzothiophene to biphenyl by sulfate-reducing bacteria isolated from oil field production facilities." *Biotechnology letters* 17, no. 10 (1995): 1133-1136.
- [26] Kodama, Koki, Kazuyoshi Umehara, Katsumi Shimizu, Shigeru Nakatani, Yasuji Minoda, and Koichi Yamada. "Identification of microbial products from dibenzothiophene and its proposed oxidation pathway." *Agricultural and Biological Chemistry* 37, no. 1 (1973): 45-50.
- [27] Hou, Yingfei, Ying Kong, Jinrong Yang, Jianhui Zhang, Deqing Shi, and Wei Xin. "Biodesulfurization of dibenzothiophene by immobilized cells of *Pseudomonas stutzeri* UP-1." *Fuel* 84, no. 14-15 (2005): 1975-1979.
- [28] Laborde, Alice L., and DAVID T. Gibson. "Metabolism of dibenzothiophene by a *Beijerinckia* species." *Appl. Environ. Microbiol.* 34, no. 6 (1977): 783-790.
- [29] Frassinetti, Stefania, Leonardo Setti, Andrea Corti, Paolo Farrinelli, Piercarlo Montevecchi, and Giovanni Vallini. "Biodegradation of dibenzothiophene by a nodulating isolate of *Rhizobium meliloti*." *Canadian journal of microbiology* 44, no. 3 (1998): 289-297.

- [30] Van Afferden, Manfred, Sigrid Schacht, Jürgen Klein, and Hans G. Trüper. "Degradation of dibenzothiophene by *Brevibacterium* sp. DO." *Archives of Microbiology* 153, no. 4 (1990): 324-328.
- [31] Oldfield, Christopher, Olga Pogrebinsky, Julie Simmonds, Edwin S. Olson, and Charles F. Kulpa. "Elucidation of the metabolic pathway for dibenzothiophene desulphurization by *Rhodococcus* sp. strain IGTS8 (ATCC 53968)." *Microbiology* 143, no. 9 (1997): 2961-2973.
- [32] Li, Fu Li, Ping Xu, Cui Qing Ma, Lai Long Luo, and Xiao Shan Wang. "Deep desulfurization of hydrodesulfurization-treated diesel oil by a facultative thermophilic bacterium *Mycobacterium* sp. X7B." *FEMS microbiology letters* 223, no. 2 (2003): 301-307.
- [33] Monticello, Daniel J. "Biodesulfurization and the upgrading of petroleum distillates." *Current Opinion in Biotechnology* 11, no. 6 (2000): 540-546.
- [34] Li, Guo-Qiang, Shan-Shan Li, Shi-Wei Qu, Qing-Kun Liu, Ting Ma, Lin Zhu, Feng-Lai Liang, and Ru-Lin Liu. "Improved biodesulfurization of hydrodesulfurized diesel oil using *Rhodococcus erythropolis* and *Gordonia* sp." *Biotechnology letters* 30, no. 10 (2008): 1759.
- [35] Arensdorf, Joseph J., A. Katrina Loomis, Philip M. DiGrazia, Daniel J. Monticello, and Philip T. Pienkos. "Chemostat approach for the directed evolution of biodesulfurization gain-of-function mutants." *Appl. Environ. Microbiol.* 68, no. 2 (2002): 691-698.
- [36] Denome, Sylvia A., Christopher Oldfield, Lisa J. Nash, and Kevin D. Young. "Characterization of the desulfurization genes from *Rhodococcus* sp. strain IGTS8." *Journal of bacteriology* 176, no. 21 (1994): 6707-6716.
- [37] Duarte, Gabriela Frois, Alexandre Soares Rosado, Lucy Seldin, Welington de Araujo, and Jan Dirk van Elsas. "Analysis of bacterial community structure in sulfurous-oil-containing soils and detection of species carrying dibenzothiophene desulfurization (*dsz*) genes." *Appl. Environ. Microbiol.* 67, no. 3 (2001): 1052-1062.
- [38] Matsui, Toru, Ken-ichi Noda, Yasuhiro Tanaka, Kenji Maruhashi, and Ryuichiro Kurane. "Recombinant *Rhodococcus* sp. strain T09 can desulfurize DBT in the presence of inorganic sulfate." *Current microbiology* 45, no. 4 (2002): 240-244.
- [39] del Olmo, C.H., Alcon, A., Santos, V.E., Garcia-Ochoa, F. (2005a) Modeling the production of a *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 biocatalyst for DBT biodesulfurization: influence of media composition. *Enzyme and Microbial Technology.* 37: 157-166.
- [40] Gomez, E., Santos, V., Alcon, A., Garcia-Ochoa, F. (2006a) Oxygen transport rate on *Rhodococcus erythropolis* cultures: effect on growth and BDS capability. *Chemical Engineering Science.* 61: 4595-4604.
- [41] Wang, M.-d., Li, W., Wang, D.-h., Shi, Y. (2004) Desulfurization of dibenzothiophene by a newly isolated *Corynebacterium* sp. ZD-1 in aqueous phase. *Journal of Environmental Sciences.* 16(6): 1011-1015.
- [42] Verma, N., Sharma, R., Kaur, R. (2016) Microbial desulphurization study of dibenzothiophene and crude oil by a soil isolate. *International Journal of Science and Research Methodology.* 4(4): 133-145.

- [43] Furuya, T., Kirimura, K., Kino, K., Usami, S. (2006) Thermophilic biodesulfurization of dibenzothiophene and its derivatives by *Mycobacterium phlei* WU-F1, FEMS Microbiology Letters. 204: 129–133.
- [44] del Olmo, C.H., Santos, V.E., Alcon, A., Garcia-Ochoa, F. (2005) Production of a *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 biocatalyst for DBT biodesulfurization: influence of operational conditions. *Biochemical Engineering Journal*. 22: 229–237.
- [45] Gomez, E., Alcon, A., Escobar, S., Santos, V.E., Garcia-Ochoa, F. (2015) Effect of fluid dynamic conditions on growth rate and biodesulfurization capacity of *Rhodococcus erythropolis* IGTS8. *Biochemical Engineering Journal*. 99: 138–146.
- [46] Maghsoudi, S., Vossoughi, M., Kheirloom, A., Tanaka, E., Katoh, S. (2001) Biodesulfurization of hydrocarbons and diesel fuels by *Rhodococcus* sp. strain P32C1. *Biochemical Engineering Journal*. 8:151–156.
- [47] Chen, Han, Wen-Juan Zhang, Jian-Meng Chen, Yu-Bei Cai, and Wei Li. "Desulfurization of various organic sulfur compounds and the mixture of DBT+ 4, 6-DMDBT by *Mycobacterium* sp. ZD-19." *Bioresource technology* 99, no. 9 (2008): 3630-3634.
- [48] Marcelis, C.L.M., Ivanova, A.E., Janssen, A.J.H., Stams, A.J.M. (2003) Anaerobic desulfurization of thiophenes by mixed microbial communities from oilfields. *Biodegradation*. 14: 173–182.
- [49] Caro, A., Leton, P., Garcia-Calvo, E., Setti, L. (2007a) Enhancement of the dibenzothiophene biodesulfurization by using β -cyclodextrins in oil-to-water media. *Fuel*. 86: 2632–2636.
- [50] Caro, A., Boltes, K., Letón, P., García-Calvo, E. (2007b) Dibenzothiophene biodesulfurization in resting cell conditions by aerobic bacteria. *Biochemical Engineering Journal*. 35:191–197.
- [51] Xu, P., Li, F., Yu, J., Ma, C., Zhong, J., Qu, Y., Blankespoor, H.D. (2002) Microbial desulfurization of fuel oil. *Chinese Science Bulletin*. 47(5): 365–369.
- [52] Van der Ploeg, J.R., Leisinger, E.E.T. (2001) Sulfonate-sulfur metabolism and its regulation in *Escherichia coli*. *Archives of Microbiology*. 176: 1–8.
- [53] Papizadeh, M., Roayaei ardakani, M., Ebrahimipour, G., Motamedi, H. (2010) Utilization of dibenzothiophene as sulfur source by *Microbacterium* sp. NISOC06. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 26: 1195–1200.
- [54] Setti, L., Lanzarini, G., Pifferi, P.G. (1996) Immobilized cells for applications in non-conventional systems. *Progress in Biotechnology*. 11: 777–784.
- [55] Mingfang, L., Zhongxuan, G., Jianmin, X., Huizhou, L., Jiayong, C. (2003) Microbial desulfurization of model and straight-run diesel oils. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 78: 873–876.
- [56] Alves, Luís, Elsa Mesquita, and Francisco M. Gírio. "Dessulfurização bacteriana de combustíveis fósseis." *Bol Biotech* 62 (1999): 3-7.
- [57] Ansari, Farahnaz, Pavel Grigoriev, Susan Libor, Ibtisam E. Tohill, and Jeremy J. Ramsden. "DBT degradation enhancement by decorating *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 with magnetic Fe₃O₄ nanoparticles." *Biotechnology and bioengineering* 102, no. 5 (2009): 1505-1512.

- [58] Shan, GuoBin, JianMin Xing, HuaiYing Zhang, and HuiZhou Liu. "Biodesulfurization of dibenzothiophene by microbial cells coated with magnetite nanoparticles." *Appl. Environ. Microbiol.* 71, no. 8 (2005): 4497-4502.
- [59] Yang, Jianzhong, Yongqi Hu, Dishun Zhao, Shaozhao Wang, Peter CK Lau, and Ian W. Marison. "Two-layer continuous-process design for the biodesulfurization of diesel oils under bacterial growth conditions." *Biochemical Engineering Journal* 37, no. 2 (2007): 212-218.
- [60] Lee, In Su, Hee-Sung Bae, Hee Wook Ryu, Kyung-Suk Cho, and Yong Keun Chang. "Biocatalytic Desulfurization of Diesel Oil in an Air-Lift Reactor with Immobilized *Gordonia nitida* CYKS1 Cells." *Biotechnology progress* 21, no. 3 (2005): 781-785.
- [61] Li, Wangliang, Jianmin Xing, Xiaochao Xiong, Guobin Shan, and Huizhou Liu. "Bio-regeneration of π -complexation desulfurization adsorbents." *Science in China Series B: Chemistry* 48, no. 6 (2005): 538-544.
- [62] Li, Wangliang, Huang Tang, Qingfen Liu, Jianmin Xing, Qiang Li, Dan Wang, Maohua Yang, Xin Li, and Huizhou Liu. "Deep desulfurization of diesel by integrating adsorption and microbial method." *Biochemical Engineering Journal* 44, no. 2-3 (2009): 297-301.
- [63] Lee, M. K., J. D. Senius, and M. J. Grossman. "Sulfur-specific microbial desulfurization of sterically hindered analogs of dibenzothiophene." *Appl. Environ. Microbiol.* 61, no. 12 (1995): 4362-4366.
- [64] Li, Yu-Guang, Hong-Shuai Gao, Wang-Liang Li, Jian-Min Xing, and Hui-Zhou Liu. "In situ magnetic separation and immobilization of dibenzothiophene-desulfurizing bacteria." *Bioresource technology* 100, no. 21 (2009): 5092-5096.
- [65] Setti, L., Farinelli, P., Di Martino, S., Frassinetti, S., Lanzarini, G., & Pifferi, P. G. (1999). Developments in destructive and non-destructive pathways for selective desulfurizations in oil-biorefining processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52(1), 111-117.
- [66] Yoshikawa, Osamu, Yoshitaka Ishii, Ken-Ichi Koizumi, Takashi Ohshiro, Yoshikazu Izumi, and Kenji Maruhashi. "Enhancement and stabilization of desulfurization activity of *Rhodococcus erythropolis* KA2-5-1 by feeding ethanol and sulfur components." *Journal of bioscience and bioengineering* 94, no. 5 (2002): 447-452.
- [67] Ohshiro, T., Suzuki, K., & Izumi, Y. (1996). Regulation of dibenzothiophene degrading enzyme activity of *Rhodococcus erythropolis* D-1. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 81(2), 121-124.
- [68] Chen, H., Zhang, W.J., Cai, Y.B., Zhang, Y., Li W. (2008) Elucidation of 2-hydroxybiphenyl effect on dibenzothiophene desulfurization by *Microbacterium* sp. strain ZD-M2. *Bioresource Technology*. 99:6928-6933.
- [69] Okada, H., Nomura, N., Nakahara, T., Saitoh, K., Uchiyama, H., Maruhashi, K. (2003) Analyses of microbial desulfurization reaction of alkylated dibenzothiophenes dissolved in oil phase *Biotechnology and Bioengineering*. 83(4): 489-497.
- [70] Li, M.Z., Squires, C.H., Monticello, D.J. Childs, J.D. (1996) Genetic analysis of the dsz promoter and associated regulatory region of *Rhodococcus erythropolis* IGTS8. *Journal of Bacteriology*. 178: 6409-6418.

[71] Li, Y., Xing, J., Li, W., Xiong, X., Li, X., & Liu, H. (2007). Medium optimization of *Rhodococcus erythropolis* LSSE8-1 by Taguchi methodology for petroleum biodesulfurization. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 24(5), 781–786.

[72] Gray, K.A., Pogrebinsky, O.S., Mrachko, G.T., Lei, X., Monticello, D.J., Squires, C.H. (1996) Molecular mechanisms of biocatalytic desulphurization of fossil fuels. *Nature Biotechnology*. 14: 1705–1709.

[73] Alves, L., Salgueiro, R., Rodrigues, C., Mesquita, E., Matos, J., & Gírio, F. M. (2005). Desulfurization of Dibenzothiophene, Benzothiophene, and Other Thiophene Analogs by a Newly Isolated Bacterium, *Gordonia alkanivorans* Strain 1B. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 120(3), 199–208.

[74] Wang P., Krawiec S. (1994) Desulfurization of dibenzothiophene to 2-hydroxybiphenyl by some newly isolated bacterial strains. *Archives of Microbiology*. 161:266–271.

[75] Escobar, S., Rodriguez, A., Gomez, E., Alcon, A., Santos, V.E., Garcia-Ocho, F. (2016) Influence of oxygen transfer on *Pseudomonas putida* effects on growth rate and biodesulfurization capacity. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 39: 545–554.

[76] Berdugo, C. I., J. A. Mena, J. R. Acero, and Leonardo Mogollón. "Increasing the production of desulfurizing biocatalysts by means of fed-batch culture." *CT&F-Ciencia, Tecnología y Futuro* 2, no. 2 (2001): 7-15.

ΦΕΚ 9/12/16 Τεύχος Β', Αρ. φύλλου 3958