



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
Τομέας IV: Τομέας Σύνθεσης και ανάπτυξης Βιομηχανικών
Διαδικασιών
Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας

Διπλωματική Εργασία

**«Μελέτη των συνθηκών ανάπτυξης και της
αποθειωτικής ικανότητας γενετικά τροποποιημένου
βακτηρίου του γένους *Rhodococcus*»**

**ΜΠΡΕΓΙΑΝΝΗ ΔΗΜΗΤΡΑ
05117067**

**Επιβλέπουσα Καθηγήτρια
Διομή Μαμμά**

Αθήνα, 2022

Περίληψη

Σκοπό της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτελεί η μελέτη των συνθηκών ανάπτυξης σε βιοαντιδραστήρα, γενετικά τροποποιημένων στελεχών του *R. qingshenghii* IGTS8. Το συγκεκριμένο στέλεχος έχει την δυνατότητα να απομακρύνει επιλεκτικά το θείο από το διβενζοθειοφαίνιο (DBT), χωρίς να διασπά τον ανθρακικό σκελετό της ένωσης, με προϊόντα το 2-υδροξυδιφαινύλιο (2-HBP) και τα θειώδη ιόντα, μέσω του μονοπατιού 4S, με ενδεχόμενη εφαρμογή στην απομάκρυνση θείου από τα κλάσματα πετρελαιοειδών. Ωστόσο, το φυσικού τύπου στέλεχος παρουσιάζει περιορισμούς όσο αφορά την χρησιμοποιούμενη πηγή θείου, λόγω της παρουσίας φαινομένων καταστολής των αποθειωτικών γονιδίων από θειούχες ενώσεις, όπως τα θειικά ιόντα, η μεθειονίνη κ.ά. Με στόχο την βελτιστοποίηση της διεργασίας, εξετάζονται δύο γενετικά τροποποιημένα στελέχη, το *cbsΔ* και το *metBΔ*, τα οποία δύνανται να αναπτύσσονται και να παρουσιάζουν αποθειωτική ικανότητα παρουσία θειικών ιόντων και μεθειονίνης, αντίστοιχα.

Αρχικά, εξετάζεται η ανάπτυξη των τριών στελεχών σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου παρουσία αιθανόλης ως πηγής άνθρακα, και της προτιμώμενης πηγής θείου για το κάθε στέλεχος. Το στέλεχος *cbsΔ* παρουσιάζει την μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας, εκ των τριών, αλλά την χαμηλότερη αποθειωτική ικανότητα. Αντίστοιχα, το *metBΔ* παρουσιάζει παρόμοια αποθειωτική ικανότητα με το wt, αλλά χαμηλότερο ρυθμό ανάπτυξης. Επομένως, μεταξύ των τροποποιημένων στελεχών επιλέγεται το στέλεχος *metBΔ*. Συγκεκριμένα, εξετάζεται η επίδραση της συγκέντρωσης της πηγής άνθρακα (7.6, 4, 2.07 g/L αιθανόλη) και της πηγής θείου (1, 2, 4 mM μεθειονίνης). Εξ αυτών, ο υψηλότερος ρυθμός ανάπτυξης επιτεύχθηκε σε συνθήκες 7.6 g/L αιθανόλη και 2 mM μεθειονίνη, ενώ παρουσιαζόταν ικανοποιητική αποθειωτική ικανότητα.

Στην συνέχεια, και εφόσον έχουν προδιοριστεί οι βέλτιστες συνθήκες σε αντιδραστήρα διαλείποντος έργου, εξετάζεται η καλλιέργεια σε αντιδραστήρα ημιαδιαλείποντος έργου. Το θρεπτικό μέσο της ημιδιαλείπουσαν διεργασίας ήταν το ίδιο με αυτό της διαλείπουσας, αλλά διέφερε ως προς την συγκέντρωση της αιθανόλης. Συγκεκριμένα, εξετάζονται τρεις διαφορετικές συνθήκες ροής, δηλαδή τρεις διαφορετικές παροχές αιθανόλης (14.74, 18.8, 21.65 mg/min αιθανόλης). Στην πρώτη περίπτωση, παρατηρήθηκε η υψηλότερη συνολική ενεργότητα και η βέλτιστη συγκέντρωση βιομάζας, ενώ στις άλλες δύο περιπτώσεις παρατηρήθηκε σημαντική συσσώρευση της αιθανόλης. Και στις τρεις περιπτώσεις, η ειδική αποθειωτική ικανότητα (U/mg DCW) ήταν αντίστοιχη.

Abstract

The aim of this thesis was to study the growth conditions of genetically modified strains of *R. qingshengii* IGTS8, in a stirred tank bioreactor. This particular strain is able to selectively remove sulfur from dibenzothiophene (DBT), via the 4S pathway. Through this mechanism, DBT is catalyzed and converted to 2-hydroxydiphenyl and sulfite, without the degradation of the carbon skeleton, and therefore maintaining the energy content of fuels. Even though the wild type strain can achieve high desulfurization activity and mass yield, several constraints are caused due to the repression of the desulfurization operon, in the presence of bioavailable sulfur compounds (i.e. sulfates, methionine). To overcome the repression phenomena, two genetically modified strains were examined. The aforementioned strains, *cbsΔ* and *metBΔ*, are able to desulfurize DBT, when grown in the presence of sulfate and methionine, respectively, as sole sulfur source.

Primarily, the growth of three strains (*wild type*, *cbsΔ* and *metBΔ*) was examined in a batch reactor in the presence of ethanol, as sole carbon source, and in the presence of the preferred sulfur source for each strain. The *cbsΔ* strain demonstrated the highest maximum biomass concentration, but the lowest desulfurization activity, out of the three strains. The *metBΔ* strain displayed similar desulfurization ability to the wild type strain, but a noticeably lower growth rate. In order to achieve a higher growth rate, and to develop a cell culture with high desulfurization activity, the influence of the concentration of the carbon source (7.6, 4, 2.07g/L ethanol) and the source of sulfur (1, 2, 4 mM methionine) were investigated. The highest growth rate was achieved in the presence of 7.6g/L ethanol and 2mM methionine.

Furthermore, the optimization of the fed batch culture was attempted. The composition of the fed batch growth medium was the same as the batch process medium, except of the ethanol concentration. The effect of medium flow rate, and thus the effect of ethanol feeding rate was investigated (14.74, 18.80, 21.65 mg ethanol/min). The highest biomass concentration and total desulfurization ability was obtained, when the feeding rate was the lowest. The increase of the ethanol flow rate led to significant ethanol accumulation. The specific desulfurization activity (u/mg) was not affected.

Περιεχόμενα

Περίληψη	2
Abstract.....	3
Ευρετήριο Διαγραμμάτων	6
Ευρετήριο Πινάκων.....	8
Ευρετήριο Εικόνων	9
Θεωρητικό Μέρος.....	10
Εισαγωγή.....	10
1. Το Πετρέλαιο.....	11
1.1 Γενικά	11
1.3 Το θείο στο πετρέλαιο	12
1.4 Προβλήματα λόγω της παρουσίας θείου	14
1.4.1. Επίδραση της παρουσίας θείου στα υγρά καύσιμα.....	14
1.4.2 Περιβαλλοντικό αποτύπωμα ορυκτών καυσίμων.....	15
1.5 Νομοθετικές διατάξεις	17
2. Τεχνολογίες Αποθείωσης.....	19
2.1 Υδρογονοαποθείωση	19
2.2 Αποθείωσης μέσω οξείδωσης	22
2.3 Αποθείωση με προσρόφηση	24
2.4 Βιολογική Αποθείωση.....	25
2.4.1 Αναερόβια προσέγγιση.....	26
2.4.2 Αερόβια προσέγγιση.....	26
2.4.2.1 Μονοπάτι Kodama.....	26
2.4.2.2 Μηχανισμός 4S	28
3. Γενετική και ενζυμολογία της βιολογικής αποθείωσης του DBT	33
4. Γενετικές τροποποιήσεις για την βελτίωση της βιοαποθείωσης.....	34
5. Παράγοντες που επηρεάζουν την βιολογική αποθείωση.....	35
5.1. Επίδραση χρόνου επώασης.....	35
5.2 Επίδραση θερμοκρασίας και pH.....	35
5.3 Επίδραση διαλυμένου οξυγόνου.....	36
5.4 Επίδραση αρχικής συγκέντρωσης βιοκαταλύτη.....	37
5.5 Επίδραση αρχικής συγκέντρωσης θείου	37
5.6 Επίδραση υποκατεστημένων υποστρωμάτων στην αποθιωτική ικανότητα	38
5.7 Επίδραση οργανικού διαλύτη και λόγου οργανικής/υδατικής φάσης.....	38
6. Μειονεκτήματα Βιομηχανικής εφαρμογής βιοαποθείωσης.....	39

7. Μελλοντικές προκλήσεις	40
8. Υλικά και Μέθοδοι.....	42
8.1 Όργανα και συσκευές	42
8.2 Μικροοργανισμοί	42
8.3 Θρεπτικά μέσα.....	43
8.4 Χημικά και ρυθμιστικά διαλύματα	45
8.5 Προετοιμασία εμβολίου - Συνθήκες λειτουργίας Αντιδραστήρα	46
8.6 Προσδιορισμός αποθειωτικής ικανότητας (Desulfurization assay)	47
8.7 Ανάλυση με HPLC.....	47
8.9 Υπολογισμός αποθειωτικής ικανότητας.....	48
9. Αποτελέσματα – Συζήτηση	48
9.1 Ανάπτυξη σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου <i>R. qingshengii</i> IGTS8 (wt)	49
9.2 Ανάπτυξη σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου του στελέχους <i>cbsΔ</i>	52
9.3 Ανάπτυξη σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου του στελέχους <i>metBΔ</i>	54
9.3.1 Επίδραση συγκέντρωσης πηγής θείου	58
9.3.2 Επίδραση συγκέντρωσης πηγής άνθρακα.....	59
9.4 Ανάπτυξη σε αντιδραστήρα ημιδιαλείποντος έργου του στελέχους <i>metBΔ</i>	66
9.4.1 Επίδραση ρυθμού παροχής αιθανόλης.....	66
10. Συμπεράσματα - Προτάσεις.....	73
Βιβλιογραφία	76

Ευρετήριο Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1. Καμπύλη ανάπτυξης του *R. qingshengii* IGTS8, παρουσία 7.6g/L αιθανόλης και 1mM DMSO, συναρτήσσει: (A) της αποθιωτικής ικανότητας, (B) της ογκομετρικής αποθιωτικής ικανότητας, (C) της συγκέντρωσης αιθανόλης. 51

Διάγραμμα 2. Καμπύλη ανάπτυξης του στελέχους *cbsΔ*, παρουσία 7.6g/L αιθανόλης και 1mM SO_4^{2-} , συναρτήσσει: (A) της αποθιωτικής ικανότητας, (B) της ογκομετρικής αποθιωτικής ικανότητας, (C) της συγκέντρωσης αιθανόλης..... 53

Διάγραμμα 3. Καμπύλη ανάπτυξης του στελέχους *metBΔ*, παρουσία 7.6g/L αιθανόλης και 1mM μεθειονίνη, συναρτήσσει: (A) της αποθιωτικής ικανότητας, (B) της ογκομετρικής αποθιωτικής ικανότητας. 54

Διάγραμμα 4. Υπολογισμός μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης (μ_{max}) για τους (●) *R. qingshengii* (wt) (○) *cbsΔ*, (●) *metBΔ*..... 56

Διάγραμμα 5. Αποθιωτική ικανότητα των τριών στελεχών συναρτήσσει του χρόνου. 57

Διάγραμμα 6. Καμπύλες ανάπτυξης στελέχους *metBΔ*, παρουσία αιθανόλης 7.6 g/L.- Επίδραση της συγκέντρωσης της πηγής θείου. (A) Καμπύλη Βιομάζας- Αποθιωτικής ικανότητας (U/mg) (1mM Μεθειονίνη), (B) Καμπύλη Βιομάζας- Ογκομετρικής αποθιωτικής ικανότητας (U/L) (1mM Μεθειονίνη), (C) Καμπύλη Βιομάζας- Αποθιωτικής ικανότητας (U/mg) (2mM Μεθειονίνη), (D) Καμπύλη Βιομάζας- Ογκομετρικής αποθιωτικής ικανότητας (U/L) (2mM Μεθειονίνη), (E) Καμπύλη Βιομάζας- Αποθιωτικής ικανότητας (U/mg) (4mM Μεθειονίνη), (F) Καμπύλη Βιομάζας- Ογκομετρικής αποθιωτικής ικανότητας (U/L) (4mM Μεθειονίνη) 58

Διάγραμμα 7. Καμπύλες ανάπτυξης στελέχους *metBΔ*, παρουσία αιθανόλης 7.6 g/L.- Επίδραση της συγκέντρωσης της πηγής θείου. (A) Καμπύλη Βιομάζας- Αποθιωτικής ικανότητας (U/mg) (7.6 g/L αιθανόλη), (B) Καμπύλη Βιομάζας- Ογκομετρικής αποθιωτικής ικανότητας (U/L) (7.6 g/L αιθανόλη), (C) Καμπύλη Βιομάζας- Αποθιωτικής ικανότητας (U/mg) (4 g/L αιθανόλη), (D) Καμπύλη Βιομάζας- Ογκομετρικής αποθιωτικής ικανότητας (U/L) (4 g/L αιθανόλη), (E) Καμπύλη Βιομάζας- Αποθιωτικής ικανότητας (U/mg) (2.07 g/L αιθανόλη), (F) Καμπύλη Βιομάζας- Ογκομετρικής αποθιωτικής ικανότητας (U/L) (2.07 g/L αιθανόλη). 60

Διάγραμμα 8. Καμπύλη ανάπτυξης του στελέχους *metBΔ*, παρουσία 7.6g/L αιθανόλης και 1mM μεθειονίνη, συναρτήσσει: (A) της αποθιωτικής ικανότητας, (B) της ογκομετρικής αποθιωτικής ικανότητας. 61

Διάγραμμα 9. Υπολογισμός μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης (μ_{max}) για διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας του στελέχους *metBΔ*. (●) αιθανόλη 2 g/L, μεθειονίνη 1 mM, (○) αιθανόλη 2 g/L, μεθειονίνη 2 mM, (●) αιθανόλη 4 g/L, μεθειονίνη 2 mM, (●) αιθανόλη 7.6 g/L, μεθειονίνη 1 mM, (●) αιθανόλη 7.6 g/L, μεθειονίνη 2 mM, (●) αιθανόλη 7.6 g/L, μεθειονίνη 4 mM. 62

Διάγραμμα 10. (α) Τρισδιάστατη απεικόνιση και (β) ισοϋψείς καμπύλες της μέγιστης κυτταρικής συγκέντρωσης (X_{max}) συναρτήσσει των συγκεντρώσεων αιθανόλης και μεθειονίνης. 63

Διάγραμμα 11. Τρισδιάστατη απεικόνιση και (β) ισοϋψείς καμπύλες του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης (μ_{max}) συναρτήσσει των συγκεντρώσεων αιθανόλης και μεθειονίνης. 63

Διάγραμμα 12. (α) Τρισδιάστατη απεικόνιση και (β) ισοϋψείς καμπύλες του συντελεστή απόδοσης σε κυτταρική μάζα ($Y_{X/S}$) συναρτήσει των συγκεντρώσεων αιθανόλης και μεθειονίνης..... 64

Διάγραμμα 13. (α) Τρισδιάστατη απεικόνιση και (β) ισοϋψείς καμπύλες της ογκομετρικής παραγωγικότητας σε κυτταρική μάζα (Q_X) συναρτήσει των συγκεντρώσεων αιθανόλης και μεθειονίνης..... 64

Διάγραμμα 14. Καμπύλη ανάπτυξης *metBD*. Ο ρυθμός ροής του θρεπτικού μέσου είναι 0.32ml/min και η συγκέντρωση της αιθανόλης 1M. Παρίσταται η συγκέντρωση της βιομάζας συναρτήσει της αποθιωτικής ικανότητας και της συγκέντρωσης της αιθανόλης (A), και η κυτταρική μάζα σε συνάρτηση με την καταναλωθείσα αιθανόλη (g) και την συνολική αποθιωτική ικανότητα (B). 67

Διάγραμμα 15. Καμπύλη ανάπτυξης *metBD* συναρτήσει της συγκέντρωσης αιθανόλης. Ο ρυθμός ροής του θρεπτικού μέσου είναι 0.47ml/min και η συγκέντρωση της αιθανόλης 1M. Παρίσταται η συγκέντρωση της βιομάζας συναρτήσει της αποθιωτικής ικανότητας και της συγκέντρωσης της αιθανόλης (A), και η κυτταρική μάζα σε συνάρτηση με την καταναλωθείσα αιθανόλη (g) και την συνολική αποθιωτική ικανότητα (B)..... 69

Διάγραμμα 16. Καμπύλη ανάπτυξης *metBD* συναρτήσει της συγκέντρωσης αιθανόλης. Ο ρυθμός ροής του θρεπτικού μέσου είναι 0.51ml/min και η συγκέντρωση της αιθανόλης 0.8M. Παρίσταται η συγκέντρωση της βιομάζας συναρτήσει της αποθιωτικής ικανότητας και της συγκέντρωσης της αιθανόλης (A), και η κυτταρική μάζα σε συνάρτηση με την καταναλωθείσα αιθανόλη (g) και την συνολική αποθιωτική ικανότητα (B)..... 71

Διάγραμμα 17. Ενζυμική παραγωγικότητα συναρτήσει του χρόνου για τις τρεις διαφορετικές συνθήκες ροής, των *fed-batch* διεργασιών..... 72

Ευρετήριο Πινάκων

Πίνακας 1. Στοιχειακή Σύσταση Αργού Πετρελαίου.....	12
Πίνακας 2. Κατάταξη αργού πετρελαίου με βάση την API πυκνότητα και την συγκέντρωση σε θείο.13	
Πίνακας 3. Στελέχη <i>Rhodococcus</i> που χρησιμοποιήθηκαν.....	42
Πίνακας 4. Σύσταση LBP-agar.....	43
Πίνακας 5. Σύσταση του θρεπτικού μέσου CDM.....	44
Πίνακας 6. Σύσταση Διαλύματος Ringer.....	45
Πίνακας 7.Κινητικά χαρακτηριστικά των στελεχών <i>wt</i> , <i>cbsΔ</i> , <i>metBΔ</i> του <i>R. qingshengii</i> IGTS8.	56
Πίνακας 8. Κινητικά χαρακτηριστικά του στελέχους <i>metBΔ</i> για τις διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας.	62
Πίνακας 9. Δεδομένα αποθειωτικής ικανότητας (<i>U/mg</i>) του στελέχους <i>metBΔ</i> , για κάθε συνθήκη καλλιέργειας, συναρτήσει του χρόνου.	65

Ευρετήριο Εικόνων

<i>Εικόνα 1</i> Οργανικές ενώσεις του θείου στο αργό πετρέλαιο. [6].....	14
<i>Εικόνα 2.</i> Κλίμακα pH συναρτήσει της δυνατότητας επιβίωσης των ψαριών και των αμφιβίων [10]..	16
<i>Εικόνα 3.</i> Παγκόσμιος χάρτης στον οποίον παρίστανται οι Περιοχές Ελέγχου εκπομπών. Με σκούρο μπλε χρώμα παρίστανται οι ήδη υπάρχουσες ECAs και με ανοιχτό μπλε οι πιθανές ECAs.[15].....	18
<i>Εικόνα 4.</i> Τα μέγιστα επιτρεπόμενα όρια συγκέντρωσης του θείου στα καύσιμα για τα πλοία παγκοσμίως (κόκκινη γραμμή) και για τα πλοία που εισέρχονται στις περιοχές ελέγχου εκπομπών (πράσινη γραμμή), σύμφωνα με τα πρότυπα του IMO [17].....	18
<i>Εικόνα 5.</i> Αντιδράσεις που πραγματοποιούνται κατά την υδρογονοαποθείωση.....	20
<i>Εικόνα 6.</i> Τυπικό διάγραμμα ροής υδρογονοκατεργασίας [6].....	21
<i>Εικόνα 7.</i> Γραφική απεικόνιση της σύνδεσης της δομής των θειούχων οργανικών ενώσεων σε σχέση με τον βαθμό δυσκολίας της υδρογονοαποθείωσης [6].....	22
<i>Εικόνα 8.</i> Αντίδραση οξειδωσης διβενζοθειοφαινίου (DBT), παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου.	23
<i>Εικόνα 9.</i> Μονοπάτι Kodama οξειδωτικής αποδόμησης [28].	27
<i>Εικόνα 10.</i> Μεταβολικά μονοπάτια του στελέχους <i>P. putida</i> pathways, κατά την αποδόμηση του DBT. [30].....	28
<i>Εικόνα 11.</i> Μεταβολικό μονοπάτι 4S [28].....	30
<i>Εικόνα 12.</i> Μεταβολικό μονοπάτι 4S. Αναπαράσταση της αποθείωσης και της μεταφοράς των αντιδρώντων και των προϊόντων, από την οργανική φάση προς το κυτταρόπλασμα και το αντίστροφο. [2].....	31
<i>Εικόνα 13.</i> Μεταβολικά μονοπάτια 4S και Kodama [35].....	32
<i>Εικόνα 14.</i> Μεταβολικό μονοπάτι βιοσύνθεσης και αλληλομετατροπής της κυστεΐνης και της μεθειονίνης, στο πλαίσιο του μονοπατιού αφομοίωσης του θείου. [63].....	43

Θεωρητικό Μέρος

Εισαγωγή

Η παραγωγή και η αξιοποίηση ενέργειας, αποτελούν χαρακτηριστικά της ανθρώπινης ιστορίας, και συνδέονται άμεσα με οποιαδήποτε ανθρώπινη δραστηριότητα, σε κοινωνικό και οικονομικό επίπεδο. Το μεγαλύτερο ποσοστό της απαιτούμενης ενέργειας προέρχεται από τα ορυκτά καύσιμα, δηλαδή τα προϊόντα διύλησης του αργού πετρελαίου, του φυσικού αέριου κ.ά. Ωστόσο, η καύση των ορυκτών καυσίμων συνεπάγεται την παραγωγή αέριων εκπομπών, όπως το διοξείδιο του άνθρακα, το διοξείδιο του θείου, τα οξείδια του αζώτου και τα αιωρούμενα σωματίδια κ.ά. Οι εκπομπές αυτές συμβάλλουν στην ατμοσφαιρική ρύπανση, οδηγώντας σε πληθώρα οικολογικών προβλημάτων. Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στις εκπομπές του θείου, οι οποίες έχουν οδηγήσει στην ανάπτυξη φαινομένων, όπως αυτό της όξινης βροχής και στην οξίνιση του υδροφόρου ορίζοντα.

Λόγω των οικολογικών προβλημάτων που εγείρονται, οι προδιαγραφές της συγκέντρωσης του θείου στα καύσιμα γίνονται όλο και πιο αυστηρές. Στο πλαίσιο της μείωσης της συγκέντρωσης του θείου, και με στόχο την προσαρμογή των ιδιοτήτων των υγρών καυσίμων στις νέες νομοθετικές διατάξεις, πραγματοποιείται απομάκρυνση του θείου. Η επικρατέστερη και με την ευρύτερη βιομηχανική εφαρμογή μέθοδος είναι η υδρογονοαποθείωση. Ωστόσο, η μέθοδος αυτή απαιτεί σημαντική κατανάλωση ενέργειας, και επομένως συνεπάγεται υψηλό κόστος, λόγω της υψηλής κατανάλωσης υδρογόνου και των συνθηκών υψηλής θερμοκρασίας και πίεσης στις οποίες πραγματοποιείται.

Το υψηλό κόστος της μεθόδου οδηγεί στην αναζήτηση νέων τεχνικών, που θα δρουν ως εναλλακτική ή συμπληρωματικά της υδρογονοαποθείωσης, με στόχο την μείωση του κόστους και του περιβαλλοντικού αποτυπώματος της αποθείωσης του πετρελαίου. Μία από αυτές αποτελεί η αποθείωση με την χρήση μικροοργανισμών, μέσω της οποίας πραγματοποιείται απομάκρυνση του θείου από τις θειούχες οργανικές ενώσεις των κλασμάτων του πετρελαίου. Η μικροβιακή αποθείωση αποτελεί ελκυστική εναλλακτική, εφόσον πραγματοποιείται σε χαμηλές θερμοκρασίες και πιέσεις, ενώ δεν οδηγεί στην παραγωγή ανεπιθύμητων προϊόντων, ωστόσο δεν εφαρμόζεται σε βιομηχανικό επίπεδο. Δεδομένης της προοπτικής της, πραγματοποιείται προσπάθεια βελτιστοποίησης της διεργασίας, με την χρήση διάφορων μικροοργανισμών, την προσπάθεια αριστοποίησης των συνθηκών της καλλιέργειας, καθώς και με την πραγματοποίηση γενετικών τροποποιήσεων.

1. Το Πετρέλαιο

1.1 Γενικά

Η ανθρώπινη παρουσία και εξέλιξη είναι άμεσα συνυφασμένη με την κατανάλωση και την παραγωγή ενέργειας, είτε με την μορφή ανανεώσιμων πηγών είτε με την μορφή ορυκτών καυσίμων. Τα ορυκτά καύσιμα, και κυρίως το πετρέλαιο παραμένει η πρώτη πηγή ενέργειας σε παγκόσμιο επίπεδο, παρά την εξέλιξη των ανανεώσιμων πηγών. Εκτιμάται ότι ετησίως καταναλώνονται 95 εκατομμύρια βαρέλια την ημέρα (bbl/day) σε εφαρμογές όπως η θέρμανση, η μεταφορά, η παραγωγή ηλεκτρικού ρεύματος και η παραγωγή προϊόντων της χημικής βιομηχανίας (πολυμερή, φαρμακευτικά προϊόντα, διαλύτες, βαφές, συνθετικά υφάσματα, λιπάσματα κ.ά.). Το 84% του αργού πετρελαίου που εξορύσσεται χρησιμοποιείται για την παραγωγή καυσίμων, υψηλής ενεργειακής πυκνότητας όπως η βενζίνη, η κηροζίνη, το πετρέλαιο κίνησης κ.ά.

Ο σχηματισμός του αργού πετρελαίου (crude oil) πραγματοποιήθηκε από την καταπλάκωση νεκρής φυτικής και ζωικής ύλης, κυρίως ζωοπλαγκτού και αλγών, κάτω από ιζηματογενή πετρώματα, και την έκθεση αυτών σε υψηλές πιέσεις και θερμοκρασίες. Οι διάφορες αντιδράσεις αποσύνθεσης, μετασχηματισμού και συμπύκνωσης οδήγησαν στον σχηματισμό ενός κολλώδους, υψηλού ιξώδους και εύφλεκτου μίγματος που αποτελείται από αέριους, υγρούς και στερεούς υδρογονάνθρακες, ενώ περιέχει ενώσεις θείου, οξυγόνου, αζώτου και μικροποσότητες μετάλλων.

Το αργό πετρέλαιο διακρίνεται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με την ποιότητα των υδρογονανθράκων που περιέχει. Συγκεκριμένα, διακρίνεται σε πετρέλαιο παραφινικής, ασφαλτούχου ή μικτής βάσης. Η ποιότητα του πετρελαίου καθορίζει σε μεγάλο βαθμό τις φυσικές ιδιότητες του πετρελαίου (πυκνότητα, χρώμα, οσμή, ιξώδες, σημείο ροής). [1]

1.2 Σύσταση του αργού πετρελαίου

Το αργό πετρέλαιο αποτελεί ένα σύνθετο μίγμα οργανικών ενώσεων και περιλαμβάνει κυρίως υδρογονανθρακικές ενώσεις με μοριακά βάρη που κυμαίνονται μεταξύ αυτού του μεθανίου και ενώσεων με πάνω από 80 άτομα άνθρακα στο μόριό τους. Οι ενώσεις άνθρακα με έως πέντε άτομα άνθρακα εντάσσονται στην κατηγορία το φυσικού αερίου, ενώ σε υγρή μορφή βρίσκεται το κλάσμα ενώσεων μεταξύ 5 και 18 ατόμων άνθρακα. Ενώσεις με μεγαλύτερο μήκος αλυσίδας αντιστοιχούν σε ενώσεις παραφινικών κήρων. Γενικότερα, το αργό πετρέλαιο περιλαμβάνει τέσσερις κύριες κατηγορίες υδρογονανθράκων, τους κορεσμένους και τους αρωματικούς υδρογονάνθρακες, τις ρητίνες και τα ασφαλτένια. Η αναλογία μεταξύ των ενώσεων αυτών διαφέρει ανάλογα με τον τύπο του πετρελαίου, ο οποίος εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την περιοχή εξόρυξης, την ηλικία του κοιτάσματος

καθώς και το βάθος του πηγαδιού εξόρυξης. Ωστόσο, σε γενικές γραμμές η σύσταση του αργού πετρελαίου είναι η εξής: παραφίνες 15-60%, ναφθένια (30-60%), αρωματικές ενώσεις (3-30%) και το υπόλοιπο αντιστοιχεί σε ασφαλτένια. Η περιεκτικότητα σε ασφαλτένια καθορίζει σε σημαντικό βαθμό το πόσο ελαφρύ ή βαρύ είναι το πετρέλαιο ενός κοιτάσματος. Όσο πιο βαρύ είναι το αργό πετρέλαιο, τόσο μεγαλύτερη θα είναι η συγκέντρωσή του σε ασφαλτένια και τόσο πιο οικονομικά δυσχερές θα είναι η επεξεργασία του και η μετατροπή του σε ελαφρύτερα εμπορεύσιμα κλάσματα. Επισημαίνεται ότι στο αργό πετρέλαιο δεν εντοπίζονται ολεφίνες, λόγω της υψηλής δραστηκότητάς τους, ωστόσο στα προϊόντα του διυλιστηρίου υπάρχουν ολεφίνες, εφόσον παράγονται κατά την επεξεργασία του αργού πετρελαίου.

Παράλληλα, στο αργό πετρέλαιο εντοπίζονται ενώσεις μετάλλων, θείου, αζώτου και οξυγόνου. Οι μεταλλικές ενώσεις του πετρελαίου βρίσκονται είτε με την μορφή αλάτων, που προήλθαν από το θαλασσινό νερό που ήταν εγκλωβισμένο στο κοιτάσμα, είτε με την μορφή οργανομεταλλικών ενώσεων. Τα κυριότερα μέταλλα που εντοπίζονται στο αργό πετρέλαιο είναι το βανάδιο, το νικέλιο, ο σίδηρος, το αργίλιο, το νάτριο, το ασβέστιο και ο χαλκός. Το βανάδιο χαρακτηρίζεται από έντονη οξειδωτική συμπεριφορά και προκαλεί διάβρωση στον μεταλλικό εξοπλισμό, ενώ σε συνδυασμό με τον χαλκό και το νικέλιο, περιορίζουν σημαντικά την απόδοση των καταλυτικών διεργασιών αναβάθμισης του πετρελαίου, αφού μειώνουν σε μεγάλο βαθμό την καταλυτική ενεργότητα.

Πίνακας 1. Στοιχειακή Σύσταση Αργού Πετρελαίου.[2]

Στοιχείο	Σύσταση (%)
Άνθρακας	83.90-86.80
Υδρογόνο	11.40-14.00
Οξυγόνο	0.50
Άζωτο	0.11-1.70
Θείο	0.06-8.00
Μέταλλα (Fe, V, Ni, κλπ.)	0.03

1.3 Το θείο στο πετρέλαιο

Η παρουσία του θείου στο αργό πετρέλαιο οφείλεται στην προέλευση του πετρελαίου, και προκύπτει από την αποσύνθεση της οργανικής ύλης, σε βάθος χρόνου. Η διεργασία αυτή οδηγεί στον σχηματισμό υδροθείου (H_2S), το οποίο είτε αντιδρά προς τον σχηματισμό σύνθετων οργανικών ενώσεων και παραμένει στην υγρή οργανική φάση, είτε παραμένει στην αέρια φάση και απομακρύνεται ως συνοδό αέριο κατά την διάρκεια της εξόρυξης [2].

Η περιεκτικότητα του θείου στο πετρέλαιο κυμαίνεται μεταξύ 0.01-10%, αλλά συνηθέστερα εντός του εύρους 1-4% του πετρελαίου, και είναι το ετεροάτομο με την μεγαλύτερη

συγκέντρωση [1]. Η σύσταση του πετρελαίου σε θείο χαρακτηρίζει το κοίτασμα ως «γλυκό», αν η συγκέντρωση του θείου είναι έως 0.5%, ενώ ως «όξινο», αν η συγκέντρωση του είναι πάνω από 0.5 %. Γενικά, η ποιότητα του κοιτάσματος και η κατάταξη του αργού πετρελαίου πραγματοποιείται με βάση την συγκέντρωσή του σε θείο, καθώς και την πυκνότητα API. Συνήθως, όσο αυξάνεται η πυκνότητα του πετρελαίου, δηλαδή όσο μειώνεται η πυκνότητα API, τόσο αυξάνεται και η συγκέντρωσή του σε θείο. Επομένως, με την αύξηση του σημείου βρασμού προκύπτουν ενώσεις με αυξημένη ποσότητα θείου [2]. Παράλληλα, αργά πετρέλαια με υψηλότερο ιξώδες και πυκνότητα συνήθως περιέχουν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σύνθετων θειούχων οργανικών ενώσεων, ενώ όσο αυξάνεται ο αριθμός των ανθράκων του κάθε κλάσματος, αυξάνεται και η συγκέντρωση των θειούχων ενώσεων στο κλάσμα αυτό. Επομένως, σε κλάσματα όπως η άσφαλτος και το μαζούτ η συγκέντρωση του θείου είναι υψηλότερη, σε σύγκριση με κλάσματα όπως το πετρέλαιο ντήζελ και η κηροζίνη, τα οποία είναι ελαφρύτερα. Επισημαίνεται ότι με την αύξηση των σημείων βρασμού των κλασμάτων αυξάνεται τόσο η συγκέντρωση των θειούχων ενώσεων, όσο και η πολυπλοκότητα αυτών.[2]

Πίνακας 2. Κατάταξη αργού πετρελαίου με βάση την API πυκνότητα και την συγκέντρωση σε θείο.

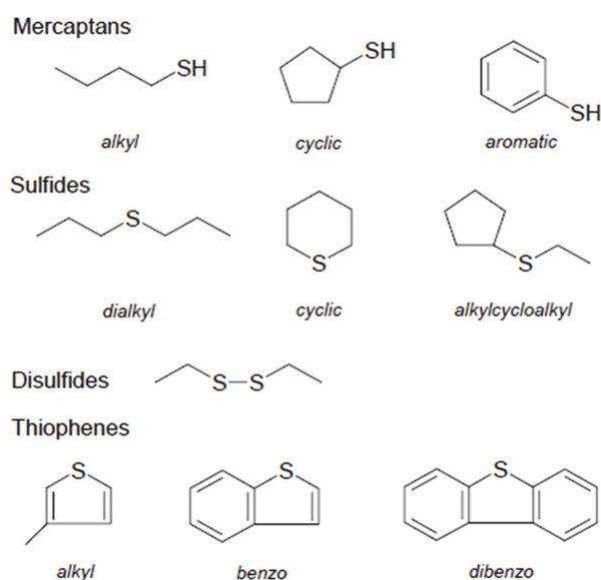
[2]

Crude oil class	API-gravity	Sulfur content (wt.%)
Ultra-light	>50	<0.1
Light and sweet	35–50	<0.5
Light and medium sour	35–50	0.5–1
Light and sour	35–50	>1
Medium and sweet	26–35	<0.5
Medium and medium sour	26–35	0.5–1
Medium and sour	26–35	>1
Heavy and sweet	10–26	<0.5
Heavy and medium sour	10–26	0.5–1
Heavy and sour	10–26	>1

Βιομηχανικά, πιο ελκυστικό είναι το αργό πετρέλαιο χαμηλού θείου (light sweet crude oil) και υψηλής API, εφόσον απαιτεί λιγότερη επεξεργασία και είναι πιο πλούσιο σε ελαφριά προϊόντα της περιοχής της νάφθας, ενώ το πετρέλαιο υψηλού θείου (sour crude oil) συνήθως βρίσκεται σε περιορισμένη ζήτηση εμπορικά, και για αυτό τον λόγο πωλείται σε χαμηλότερες τιμές [3].

Στο αργό πετρέλαιο, το θείο βρίσκεται είτε με την μορφή ανόργανων αλάτων, τα οποία εντοπίζονται με την μορφή διεσπαρμένου γαλακτώματος, είτε διαλυμένο στην οργανική φάση με την μορφή οργανικών ενώσεων [3]. Σε στοιχειακή μορφή σπάνια εντοπίζεται, λόγω της δραστικής φύσης της ένωσης, η οποία οδηγεί στον σχηματισμό οργανικών ενώσεων, όσο αυξάνεται η θερμοκρασία [3]. Οι κυριότερες μορφές των θειούχων οργανικών ενώσεων είναι

οι αρωματικές και αλειφατικές θειόλες (σουλφιδια/μερκαπτάνες), και τα οξειδωμένα παράγωγά τους (δισουλφίδια), οι αλειφατικοί, αρωματικοί και οι μικτοί θειεστέρες, και οι ετεροκυκλικές θειοφενικές ενώσεις, με χαρακτηριστικές ενώσεις το θειοφαίνιο, το βενζοθειοφαίνιο (BT), το διβενζοθειοφαίνιο (DBT), και τα αλκυλιωμένα παράγωγά τους [4] [5].



Εικόνα 1 Οργανικές ενώσεις του θείου στο αργό πετρέλαιο. [6]

Συνηθέστερα, το θείο εντοπίζεται στο πετρέλαιο σε θειοφενική μορφή, το οποίο αποτελεί το 50-95% του θείου στο αργό πετρέλαιο, και στα παραγόμενα προϊόντα, ενώ τα αλκυλιωμένα διβενζοθειοφαίνια, είναι οι θειούχες οργανικές ενώσεις με την μεγαλύτερη συγκέντρωση. [2][5]

1.4 Προβλήματα λόγω της παρουσίας θείου

1.4.1. Επίδραση της παρουσίας θείου στα υγρά καύσιμα

Η παρουσία του θείου στο αργό πετρέλαιο είναι ανεπιθύμητη λόγω της δυσάρεστης οσμής, της επίδρασης στην σταθερότητα του χρώματος, και της αρνητικής επίδρασης στα οξειδωτικά χαρακτηριστικά και την αντικροτική ικανότητα του καυσίμου. Επίσης, οι ενώσεις του θείου παρουσιάζουν έντονη διαβρωτική ικανότητα στα μεταλλικά μέρη του εξοπλισμού, σχηματίζοντας, υπό υψηλές θερμοκρασίες, μεταλλικά σουλφίδια, οργανικές θειούχες ενώσεις και υδρόθειο. Οι αντιδράσεις αυτές οδηγούν στην δημιουργία επικαθίσεων που συμβάλλουν στην κατά τόπους αύξηση της θερμοκρασίας του εξοπλισμού ή στην μείωση της αντοχής των υλικών, αυξάνοντας έτσι την πιθανότητα εμφάνισης αστοχιών [2]. Παράλληλα, δημιουργούν προβλήματα κατά τις καταλυτικές διεργασίες αναβάθμισης του πετρελαίου, οδηγώντας σε δηλητηρίαση ή απενεργοποίηση του καταλύτη [2] [6].

Αντίστοιχα, η παρουσία θειούχων ενώσεων στα υγρά καύσιμα οδηγεί στον σχηματισμό επικαθίσεων στην δεξαμενή του καυσίμου, οι οποίες οδηγούν στην φράξη των φίλτρων του κινητήρα, ενώ συμβάλλουν στην απενεργοποίηση του καταλύτη του οχήματος, με αποτέλεσμα την εκπομπή μονοξειδίων του θείου και του αζώτου, καθώς και την εκπομπή άκαυστων υδρογονανθράκων. Η οξείδωση των ενώσεων αυτών, οδηγεί στον σχηματισμό αεροζόλ νιτρικού και θειικού οξέος και στην δημιουργία αιωρούμενων σωματιδίων [6] [7] [8].

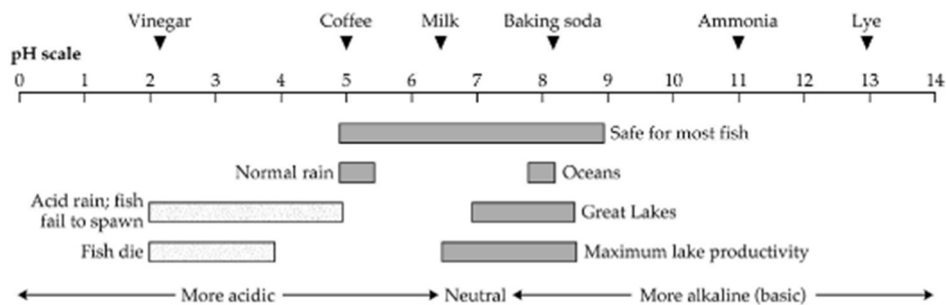
1.4.2 Περιβαλλοντικό αποτύπωμα ορυκτών καυσίμων

Η παρουσία ενώσεων του αζώτου και του θείου στα ορυκτά καύσιμα, έχει ως συνέπεια την παραγωγή οξειδίων του αζώτου (NO_x) και του θείου (SO_2), καθώς και την εκπομπή αιωρούμενων σωματιδίων (Particulate Matter- PM). Μάλιστα αναφέρεται ότι το 73% του παραγόμενου διοξειδίου του θείου προέρχεται από την ανθρωπογενή δραστηριότητα, και συγκεκριμένα από την καύση των προϊόντων του πετρελαίου [2] [5].

Η σφαίρα επιρροής των οξειδίων του θείου δεν περιορίζεται στο σημείο της παραγωγής τους, αλλά εκτείνεται σε ακτίνα χιλιομέτρων, εφόσον διασπείρονται με την βοήθεια του αέρα [2]. Οι εκπομπές αυτές επηρεάζουν το στρατοσφαιρικό όζον, διευρύνοντας την τρύπα του όζοντος [9].

Παράλληλα, τα οξείδια του αζώτου και του θείου, αντιδρούν με τα στοιχεία της ατμόσφαιρας, όπως το οξυγόνο και το νερό, προς τον σχηματισμό νιτρικού και θειικού οξέος, αντίστοιχα. Η συμπύκνωση και η κατακρήμνιση των οξέων αυτών συμβάλλει στο φαινόμενο της όξινης βροχής - "όξινη" εφόσον, λόγω των οξέων παρουσιάζει χαμηλότερο pH από την φυσιολογική βροχή. Επισημαίνεται ότι το pH των φυσιολογικών κατακρημνίσεων κυμαίνεται μεταξύ 5.0-6.0, ενώ ως όξινη χαρακτηρίζεται η βροχή με pH χαμηλότερο από 5. [10][11]

Η όξινη βροχή οδηγεί μείωση του pH του υδροφόρου ορίζοντα, επηρεάζοντας την φυσική ισορροπία, υποβαθμίζοντας την βιοποικιλότητα των υδατικών οικοσυστημάτων, αυξάνοντας τον ρυθμό θνησιμότητας ή δημιουργώντας μόνιμες βλάβες στον οργανισμό ορισμένων ειδών, ενώ συνδέεται στενά με την δραματική μείωση των πληθυσμών των αμφιβίων [12]. Επίσης, η όξινη βροχή καταστρέφει το φύλλωμα των δέντρων, ενώ οδηγεί στην οξύνιση του εδάφους με αποτέλεσμα την δημιουργία βλαβών στα ριζικά συστήματα των φυτών, και κατ' επέκταση τόσο την υποβάθμιση της αγροτικής παραγωγής, όσο και των δασικών εκτάσεων [5] [9].



Εικόνα 2. Κλίμακα pH συναρτήσει της δυνατότητας επιβίωσης των ψαριών και των αμφιβίων [10].

Οι εκπομπές του SO_x επηρεάζουν αρνητικά και την ανθρώπινη υγεία, εφόσον η έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις όξινων αερίων δημιουργεί ερεθισμό των οφθαλμών, του δέρματος και των βρόγχων των πνευμόνων, πυροδοτεί την εμφάνιση άσθματος, ενώ η μακροχρόνια έκθεση δημιουργεί καρδιοπνευμονικές παθήσεις και καρκίνο του πνεύμονα [2] [8]. Παράλληλα, η μείωση του pH ευνοεί την συσσώρευση βαρέων μετάλλων στον υδροφόρο ορίζοντα, κυρίως του υδραργύρου, με αποτέλεσμα την έκθεση του ανθρώπου σε υψηλές συγκεντρώσεις, μέσω της τροφικής αλυσίδας, η οποία συνδέεται με την πρόκληση καρδιαγγειακών παθήσεων [10].

Όπως επισημαίνεται, η παρουσία του θείου στα καύσιμα συνδέεται στενά με τον σχηματισμό αιωρούμενων σωματιδίων. Η έκθεση στα σωματίδια αυτά έχει ως συνέπεια την επιδείνωση ήδη υπάρχοντων παθήσεων των πνευμόνων, όπως το άσθμα, την δημιουργία ερεθισμών στους οφθαλμούς, ενώ αυξάνει τις πιθανότητες εμφάνισης λοιμώξεων του αναπνευστικού συστήματος, χρόνιας βρογχίτιδας, καρκίνου του πνεύμονα και εγκεφαλοαγγειακών παθήσεων. [5] [8]

Τέλος, η αυξημένη οξύτητα των ατμοσφαιρικών κατακρημνίσεων οδηγεί στην διάβρωση των κτηρίων, και κυρίως των μαρμάρινων μνημείων, με υψηλή ιστορική σημασία, ενώ έχει παρατηρηθεί ότι η όξινη βροχή συμβάλλει στην επιτάχυνση της φυσικής φθοράς των υλικών κατασκευής, κυρίως των σιδηροδρομικών δικτύων. [5] [10]

Η παρουσία του θείου στα υγρά καύσιμα οδηγεί στην απελευθέρωση επικίνδυνων εκπομπών με καθοριστικές συνέπειες στην ανθρώπινη υγεία, την οικολογική ισορροπία, καθώς και την παγκόσμια οικονομία. Για την αντιμετώπιση και την πρόληψη της αρνητικής επίδρασης του θείου, απαιτείται αφενός η ανάπτυξη νέων τεχνολογιών εις βάθος αποθείωσης των καυσίμων, και αφετέρου η εφαρμογή κατάλληλης νομοθεσίας με σκοπό τον περιορισμό των επικίνδυνων εκπομπών.

1.5 Νομοθετικές διατάξεις

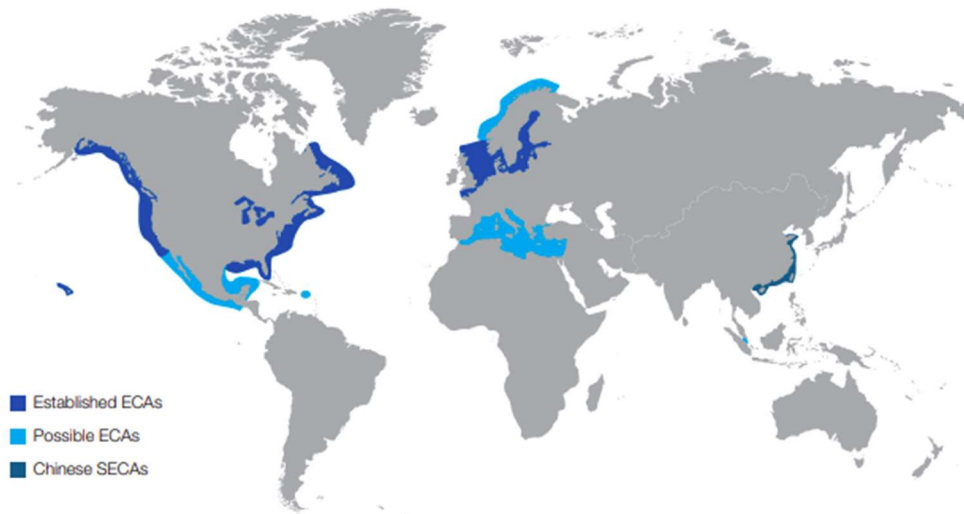
Στο πλαίσιο του περιορισμού των αρνητικών συνεπειών του θείου, εφαρμόστηκε παγκόσμια περιβαλλοντική πολιτική, βάση της οποίας περιορίζονται σημαντικά τα μέγιστα όρια της συγκέντρωσης του θείου στα καύσιμα μεταφορών.

Σε παγκόσμιο επίπεδο, η υπηρεσία περιβαλλοντικής προστασίας των Η.Π.Α. (US EPA) μείωσε το 2006, την μέγιστη επιτρεπόμενη συγκέντρωση των καυσίμων μεταφοράς, της βενζίνης και του πετρελαίου ντήζελ, σε 15 και 30 ppm αντίστοιχα, από 350 και 500 ppm. Στην περίπτωση του πετρελαίου κίνησης, η χαμηλή αυτή προδιαγραφή το καθιστά πετρέλαιο εξαιρετικά χαμηλού θείου (Ultra Low Sulfur Diesel -ULSD) [14]. Σε ευρωπαϊκό επίπεδο, η Ευρωπαϊκή Επιτροπή Τυποποίησης (European Committee for Standardization – CEN) έθεσε σε εφαρμογή ένα σύνολο προδιαγραφών (Euro I έως VI) με βάση τις οποίες καθορίζονται τα μέγιστα επιτρεπόμενα όρια τόσο εκπομπών των οχημάτων (μονοξείδιο του οξυγόνου, αιωρούμενων σωματιδίων, άκαυστων υδρογονανθράκων κλπ), όσο και συγκέντρωσης του θείου. Οι συγκεκριμένοι κανονισμοί αφορούν τα καύσιμα μεταφορών, εκτός των ναυτιλιακών καυσίμων και των καυσίμων αεροσκαφών. Κάθε κανονισμός, περιλαμβάνει διατάξεις για τους διαφορετικούς τύπους οχημάτων. Ο πιο πρόσφατος κανονισμός επιβάλλει προδιαγραφές συγκέντρωσης του θείου, για το πετρέλαιο κίνησης και για την βενζίνη, 10 ppm (Euro VI). [2] [13]

Επίσης, από το 2008 και έπειτα, σημαντική μείωση έχει υποστεί και η προδιαγραφή του πετρελαίου θέρμανσης, εφόσον στην ευρωπαϊκή ένωση, η μέγιστη επιτρεπόμενη συγκέντρωση του θείου μειώθηκε από 2000 σε 1000 ppm. [2]

Δεδομένου ότι η μεταφορά αγαθών σε παγκόσμια κλίμακα πραγματοποιείται, ως επί το πλείστον, μέσω θαλάσσης, αξιοσημείωτες είναι και οι προδιαγραφές περιεκτικότητας του θείου των ναυτιλιακών καυσίμων. Τα ναυτιλιακά καύσιμα συμβατικά περιέχουν υψηλότερες συγκεντρώσεις θείου, σε σχέση με τα καύσιμα αερομεταφορών και χερσαίων μεταφορών. Οι προδιαγραφές των ναυτιλιακών καυσίμων καθορίζονται από την διεθνή συνθήκη MARPOL (Marine Pollution), η οποία αφορά την ατμοσφαιρική ρύπανση που προκύπτει από τους κινητήρες των πλοίων. Το 2005 τέθηκε σε εφαρμογή το παράρτημα VI της συνθήκης MARPOL, και το 2008 το αναθεωρημένο παράρτημα VI υιοθετήθηκε από τον IMO (International Maritime Organization). Μάλιστα, με στόχο τον περιορισμό της αέριας ρύπανσης, από το 2020, υιοθετήθηκαν ακόμα πιο αυστηρά μέτρα, όσο αφορά την συγκέντρωση των καυσίμων σε θείο, αφού από τον Ιανουάριο του 2020, η περιεκτικότητα του θείου περιορίζεται από 3.5% m/m σε 0.5% m/m, ενώ τα καύσιμα που χρησιμοποιούνται στις περιοχές ελέγχου εκπομπών οξειδίου του θείου (SOx Emission Control Areas – SECA's) στην Ευρώπη, δηλαδή στην Βαλτική Θάλασσα, της Βόρεια Θάλασσα και την Μάγχη, θα πρέπει να έχουν συγκέντρωση χαμηλότερη από 0.10% m/m. Επίσης, με βάση την απόφαση του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου (Οδηγία 2005/33/EC), όλα τα πλοία που πλέουν σε ευρωπαϊκά ύδατα υπόκεινται σε ανώτατα όρια συγκέντρωσης θείου 0.5% m/m, ή υποχρεούνται να χρησιμοποιούν τεχνολογίες απογύμνωσης των καυσαερίων από εκπομπές

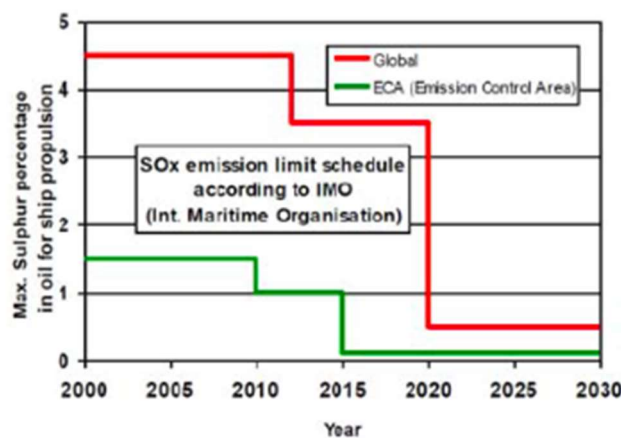
του θείου (scrubbers), έτσι ώστε να συμμορφώνονται στα ανώτατα επιτρεπόμενα όρια εκπομπών [14][1].



Εικόνα 3. Παγκόσμιος χάρτης στον οποίο παρίστανται οι Περιοχές Ελέγχου εκπομπών. Με σκούρο μπλε χρώμα παρίστανται οι ήδη υπάρχουσες ECAs και με ανοιχτό μπλε οι πιθανές ECAs. [15]

Αντίστοιχα, στα καύσιμα αεροπορίας οι προδιαγραφές συγκέντρωσης του ολικού θείου της κηροζίνης είναι 3000 ppm. Συνηθέστερα, η περιεκτικότητα των αεροπορικών καυσίμων σε θείο κυμαίνεται μεταξύ 550 και 750 ppm. Ωστόσο, πραγματοποιείται προσπάθεια για την παραγωγή αεροπορικών καυσίμων εξαιρετικά χαμηλού θείου (Ultra Low Jet Fuel), με συγκέντρωση σε θείο 15 ppm. [2][16]

Η Ελλάδα ως κράτος μέλος της ευρωπαϊκής ένωσης, προσαρμόζεται στις ευρωπαϊκές προδιαγραφές και τηρεί τους κανονισμούς που θέτει η Ευρωπαϊκή Επιτροπή Τυποποίησης για την βενζίνη και το πετρέλαιο ντήζελ 10 ppm, για το πετρέλαιο θέρμανσης 1000 ppm, ενώ αντίστοιχα συμμορφώνεται στα πρότυπα της συνθήκης MARPOL, όσο αφορά τα ναυτιλιακά καύσιμα. [1]



Εικόνα 4. Τα μέγιστα επιτρεπόμενα όρια συγκέντρωσης του θείου στα καύσιμα για τα πλοία παγκοσμίως (κόκκινη γραμμή) και για τα πλοία που εισέρχονται στις περιοχές ελέγχου εκπομπών (πράσινη γραμμή), σύμφωνα με τα πρότυπα του IMO [17].

2. Τεχνολογίες Αποθείωσης

Η εξάντληση, σε παγκόσμια κλίμακα, των κοιτασμάτων πετρελαίου χαμηλού θείου -υψηλής ποιότητας - και ταυτόχρονα η ολοένα μείωση των προδιαγραφών της περιεκτικότητας του θείου στα καύσιμα, έχει συμβάλλει στην ανάπτυξη και την συνεχή εξέλιξη διάφορων τεχνολογιών αποθείωσης του πετρελαίου. Η αποθείωση περιλαμβάνει την απομάκρυνση, όσο το δυνατόν, των ενώσεων του θείου, με σκοπό τον περιορισμό των επικίνδυνων εκπομπών, που επιδρούν αρνητικά τόσο στην ανθρώπινη υγεία όσο και στο περιβάλλον.

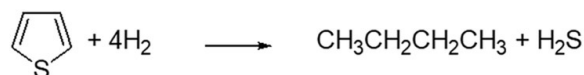
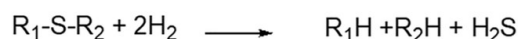
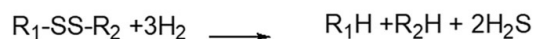
Γενικότερα, η συγκέντρωση των θειούχων ενώσεων και η πολυπλοκότητά τους αυξάνεται με την αύξηση των σημείων βρασμού των κλασμάτων, με αποτέλεσμα να αυξάνεται και ο βαθμός δυσκολίας της αποθείωσης των συγκεκριμένων κλασμάτων. Έτσι, η αποθείωση των μερκαπτανών είναι σαφώς πιο εύκολη από την αποθείωση πολυαρωματικών θειούχων ενώσεων.

Η αποθείωση του αργού πετρελαίου και των κλασμάτων του πραγματοποιείται με διάφορους τρόπους. Η τεχνολογία με την μεγαλύτερη εφαρμογή βιομηχανικά είναι η καταλυτική αποθείωση με την χρήση υδρογόνου (υδρογονοαποθείωση), η οποία συνδυαζόμενη με άλλες φυσικοχημικές διεργασίες, συμβάλει στην παραγωγή τελικών προϊόντων κατάλληλων προδιαγραφών. Παράλληλα, λόγω των υψηλών ενεργειακών απαιτήσεων, καθώς και του υψηλού κόστους της υδρογονοαποθείωσης, διερευνώνται και άλλες μέθοδοι όπως η αποθείωση μέσω οξείδωσης, η αποθείωση μέσω χημικής ή φυσικής προσρόφησης και η βιολογική αποθείωση, οι οποίες πραγματοποιούνται σε πιέσεις και θερμοκρασίες κοντινές με αυτές του περιβάλλοντος, με αποτέλεσμα την μειωμένη κατανάλωση ενέργειας και την μείωση της παραγωγής εκπομπών και άλλων ανεπιθύμητων παραπροϊόντων.

2.1 Υδρογονοαποθείωση

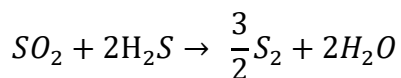
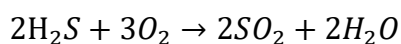
Η υδρογονοαποθείωση ή υδρογονοκατεργασία είναι η πιο ευρέως εφαρμοσμένη τεχνολογία αποθείωσης και αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι κάθε σύνθετου διυλιστηρίου. Μέσω της υδρογονοαποθείωσης πραγματοποιείται η απομάκρυνση ετεροατόμων, δηλαδή των ατόμων οξυγόνου, αζώτου και του θείου, και ταυτόχρονα κορεσμός των πολλαπλών δεσμών άνθρακα-άνθρακα, με αποτέλεσμα την μείωση του μέσου μοριακού βάρους και την αύξηση της παραγωγής ελαφρύτερων προϊόντων, στην περιοχή της βενζίνης και του ντήζελ. Όσο αφορά το θείο, η υδρογονοαποθείωση περιλαμβάνει την μετατροπή του οργανικού θείου σε αέριο υδρόθειο, το οποίο στην συνέχεια απομακρύνεται, και μεταφέρεται σε μονάδα επεξεργασίας Claus, με σκοπό την περαιτέρω επεξεργασία του σε στοιχειακό θείο ή θειικό οξύ [1][2]. Μέσω της υδρογονοαποθείωσης επιτυγχάνονται συγκεντρώσεις θείου χαμηλότερες από 15 ppm [18].

Οι αντιδράσεις που πραγματοποιούνται σε μία μονάδα υδρογονοαποθείωσης πετρελαίου είναι οι εξής [19]:



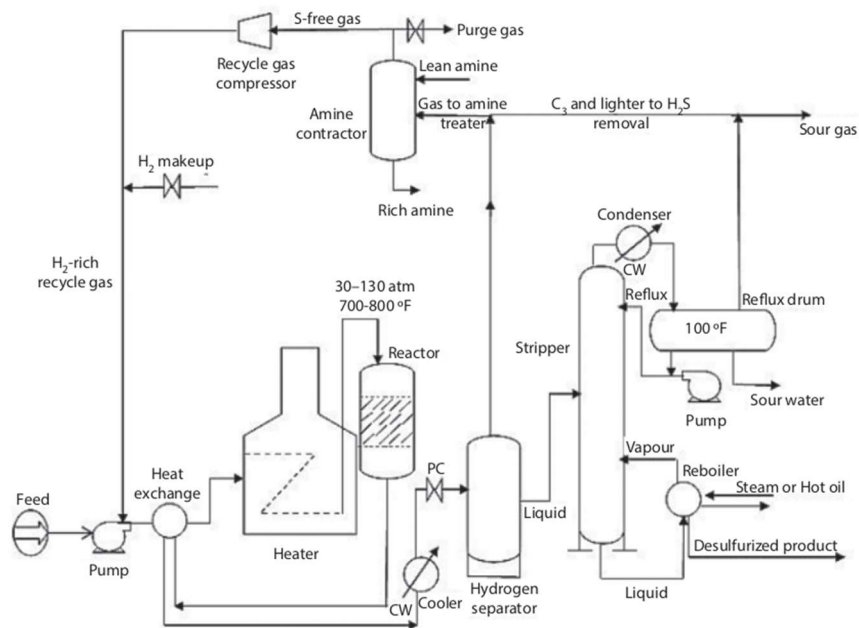
Εικόνα 5. Αντιδράσεις που πραγματοποιούνται κατά την υδρογονοαποθείωση

Επίσης, οι αντιδράσεις που πραγματοποιούνται στην μονάδα Claus είναι οι εξής [2]:



Η υδρογονοαποθείωση πραγματοποιείται παρουσία καταλύτη, με στόχο την αύξηση της απόδοσης της διεργασίας. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι καταλύτες είναι οι καταλύτες οξειδίου του μολυβδαινίου, σε μήτρα από αλούμινα, ενισχυμένοι είτε με κοβάλτιο είτε με νικέλιο [6]. Κατά την υδρογονοκατεργασία του πετρελαίου πραγματοποιείται μετατροπή του οξειδίου του μολυβδαινίου σε σουλφίδιο του μολυβδαινίου, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό των απαραίτητων ενεργών κέντρων και κατ' επέκταση την κατάλυση της διεργασίας. Οι καταλύτες αυτοί παρουσιάζουν καλή εκλεκτικότητα, αντίσταση στην δηλητηρίαση και ευκολία στην αναγέννηση [6] [20].

Η διεργασία αυτή πραγματοποιείται σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας 200-425°C και πίεσης 1-18 MPa [3]. Οι τιμές της θερμοκρασίας και της πίεσης ρυθμίζονται ανάλογα με τον βαθμό δυσκολίας και το επιθυμητό επίπεδο αποθείωσης [2] [8].



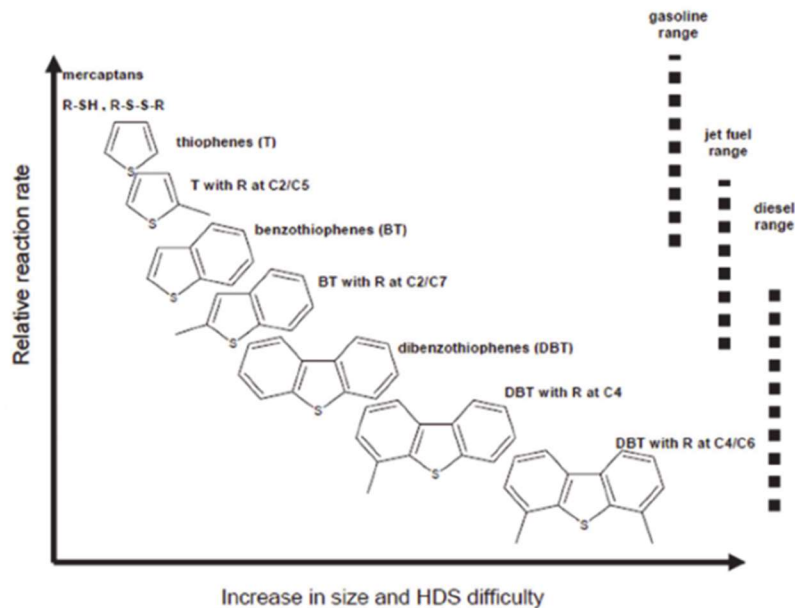
Εικόνα 6. Τυπικό διάγραμμα ροής υδρογονοκατεργασίας [6].

Η υδρογονοαποθείωση αποτελεί την πλέον εφαρμοσμένη μέθοδο για την απομάκρυνση των θειούχων ενώσεων, ωστόσο παρουσιάζει σημαντικά μειονεκτήματα. Αρχικά, κύριο παραπροϊόν της διεργασίας αυτής είναι το υδρόθειο, το οποίο αποτελεί άκρως τοξική και επικίνδυνη ένωση με σημαντική διαβρωτική ικανότητα, με αποτέλεσμα να αυξάνεται το πάγιο κόστος του εξοπλισμού. Παράλληλα, οι υψηλές θερμοκρασίες και πιέσεις στις οποίες πραγματοποιείται η διεργασία αυξάνουν σημαντικά το λειτουργικό κόστος της υδρογονοαποθείωσης, στο οποίο προστίθεται και το υψηλό κόστος της σύνθεσης του υδρογόνου, το οποίο στην πλειοψηφία των περιπτώσεων παράγεται εντός του διυλιστηρίου. [8][18].

Ταυτόχρονα, η υψηλή θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιείται η υδρογονοαποθείωση, συχνά οδηγεί στην υποβάθμιση του τελικού προϊόντος, ενώ η προσθήκη υδρογόνου οδηγεί σε κορεσμό των ολεφινικών ενώσεων με αποτέλεσμα την απόκλιση των προϊόντων από τις επιθυμητές προδιαγραφές (π.χ. μείωση του αριθμού οκτανίου της βενζίνης), και την ανάγκη για περαιτέρω επεξεργασία των κλασμάτων [8]. Επίσης, οι αρωματικές ενώσεις του πετρελαίου, καθώς και οι οξυγονούχες και αζωτούχες ενώσεις, συχνά δρουν παρεμποδιστικά στην κατάλυση της υδρογονοαποθείωσης. [21]

Μέσω της υδρογονοαποθείωσης πραγματοποιείται απομάκρυνση των πιο απλών θειούχων ενώσεων, δηλαδή των μερκαπτανών και των σουλφιδίων. Πιο πολύπλοκες ενώσεις, όπως τα βενζοδιοφένια, τα διβενζοθειοφαίνια και οι πολυαρωματικές ετεροκυκλικές ενώσεις του θείου παρουσιάζουν αντίσταση στην αποθείωση. Γενικότερα, η σειρά δραστηριότητας των πιο σύνθετων οργανικών ενώσεων είναι η εξής: Θειοφαίνια > Αλκυλιωμένα θειοφαίνια > Βενζοδιοφαίνια > αλκυλιωμένα διβενζοθειοφαίνια και διβενζοδιοφαίνια. Η αντίσταση αυτή

των πολύπλοκων ενώσεων στην υδρογονοαποθείωση οφείλεται στην ύπαρξη των αρωματικών δακτυλίων, οι οποίοι συμβάλλουν στην σταθερότητα των μορίων [2].



Εικόνα 7. Γραφική απεικόνιση της σύνδεσης της δομής των θειούχων οργανικών ενώσεων σε σχέση με τον βαθμό δυσκολίας της υδρογονοαποθείωσης [6].

Μάλιστα, το ποσοστό των θειούχων ενώσεων που μπορεί να απομακρυνθεί μέσω υδρογονοκατεργασίας αποτελεί περίπου το 70% του συνολικού θείου, με αποτέλεσμα η έρευνα να στρέφεται στην αναζήτηση μεθόδων και τεχνολογιών που αποσκοπούν στην απομάκρυνση των πιο ανθεκτικών θειούχων ενώσεων [5] [18]. Μία εκ των εξεταζόμενων τεχνικών αποτελεί και η βιολογική αποθείωση, η οποία οδηγεί σε πολύ χαμηλότερο κόστος, εφόσον πραγματοποιείται σε πιέσεις και θερμοκρασίες πλησίον των ατμοσφαιρικών, ενώ δεν οδηγεί στην παραγωγή επικίνδυνων παραπροϊόντων.

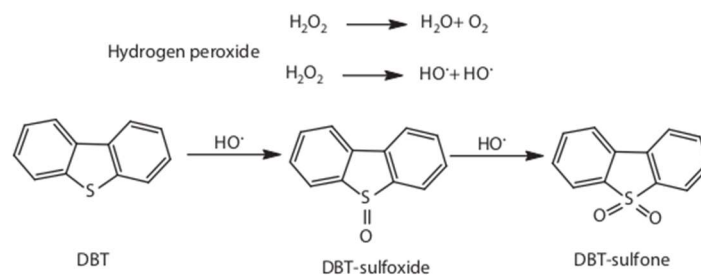
2.2 Αποθείωσης μέσω οξειδωσης

Η οξειδωτική αποθείωση αποτελεί μια πρωτοποριακή τεχνολογία, μέσω της οποίας μειώνεται το κόστος παραγωγής ντίζελ εξαιρετικά χαμηλού θείου (ULSD). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην πολικότητα των ενώσεων του θείου. Η ηλεκτροαρνητικότητα ενός ατόμου του θείου είναι παρόμοια με αυτή του άνθρακα, επομένως ο δεσμός άνθρακα-θείου είναι μη πολικός, με αποτέλεσμα και οι θειούχες οργανικές ενώσεις να είναι μη πολικές, και επομένως μη διαλυτές σε πολικούς διαλύτες. Ωστόσο, κατά την οξείδωση των θειούχων ενώσεων, παράγονται τα αντίστοιχα οξείδια του θείου ή σουλφόνες, χωρίς να διασπάται ο δεσμός θείου-άνθρακα. Έτσι, οι αρχικά μη πολικές θειούχες ενώσεις μετατρέπονται σε

πολικές ενώσεις, διαλύονται σε πολικούς διαλύτες και δύνανται να απομακρυνθούν με εκχύλιση, προσροφητική απόσταξη ή θερμική αποσύνθεση [2][21].

Συνήθως, σε βιομηχανική κλίμακα, η απομάκρυνση των οξειδωμένων θειούχων ενώσεων πραγματοποιείται μέσω εκχύλισης με την χρήση διαλύτη. Ο διαλύτης αυτός ανακτάται, αναγεννάται και επαναχρησιμοποιείται. Παρόλα αυτά, μέσω της εκχύλισης συχνά πραγματοποιείται και απομάκρυνση μέρους των υδρογονανθράκων, με αποτέλεσμα να υποβαθμίζεται η ποιότητα του τελικού προϊόντος. [21]

Ως οξειδωτικοί παράγοντες έχουν εξεταστεί διάφορες ενώσεις όπως οργανικά και ανόργανα υπεροξύ οξέα, υπεροξειδικά άλατα, διοξείδιο του αζώτου, όζον κ.ά. Το διοξείδιο του αζώτου ήταν από τις πρώτες ενώσεις που εξετάστηκαν, ενώ η απομάκρυνση των οξειδωμένων ενώσεων πραγματοποιούνταν με εκχύλιση με μεθανόλη. Μέσω της μεθόδου αυτής πραγματοποιούνταν μετατροπή των θειούχων ενώσεων κατά 70% [21] [22]. Αντίστοιχα, εξετάστηκαν διάφορα υπεροξειδικά οξέα, όπως το φορμικό, το οξικό και το περφορμικό οξύ. Ωστόσο, το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο οξειδωτικό μέσο ήταν το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), εφόσον είναι φιλικό προς το περιβάλλον, οικονομικό, και δεν οδηγεί στην παραγωγή ανεπιθύμητων παραπροϊόντων. Συνηθέστερα, χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με κάποιο οργανικό μέσο, οδηγώντας σε εις βάθος αποθείωση με υψηλή απόδοση, σε ήπιες σχετικά συνθήκες (ατμοσφαιρική πίεση και θερμοκρασία 60-65 °C). Επίσης, η οξείδωση συνήθως πραγματοποιείται παρουσία καταλύτη, ομογενούς ή ετερογενούς. [2][21]



Εικόνα 8. Αντίδραση οξείδωσης διβενζοθειοφαινίου (DBT), παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου.

Επίσης, εκτός από την οξείδωση με την χρήση χημικού οξειδωτικού μέσου, έχει εξεταστεί και η οξείδωση με την χρήση ακτινοβολίας, με την χρήση υπερήχων, φωτοχημική οξείδωση, ηλεκτροχημική καταλυτική οξείδωση και οξείδωση με την χρήση πλάσματος, αλλά όχι σε βιομηχανική κλίμακα.

Η αποθείωση μέσω οξείδωσης παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι της υδρογονοαποθείωσης, αφού πραγματοποιείται σε ατμοσφαιρική πίεση και σημαντικά χαμηλότερες θερμοκρασίες, με αποτέλεσμα το μειωμένο λειτουργικό κόστος, ενώ ταυτόχρονα απαιτεί πολύ πιο οικονομικά αντιδραστήρια, σε σχέση με την υδρογονοκατεργασία. [8]

Ωστόσο, λόγω της φύσης της διεργασίας, και της πραγματοποίησης της αντίδρασης σε διφασικό σύστημα, εφόσον οι θειούχες ενώσεις βρίσκονται στην οργανική φάση και τα

οξειδωτικά μέσα στην υδατική, ο ρυθμός της αντίδρασης είναι σχετικά χαμηλός, λόγω των περιοριστικών φαινομένων μεταφοράς μάζας. Ο ρυθμός της αντίδρασης δύναται να αυξηθεί με την παροχή ανάδευσης, η οποία ωστόσο αυξάνει το λειτουργικό κόστος της διεργασίας. Επίσης, λόγω της χρήσης μεγάλων ποσοτήτων οξειδωτικών μέσων, απαιτείται απομάκρυνση της υδατικής φάσης, με αποτέλεσμα να αυξάνεται σημαντικά το κόστος διαχωρισμού. [21] [8]

2.3 Αποθείωση με προσρόφηση

Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει την αποθείωση του πετρελαίου με την χρήση προσροφητικών μέσων, μέσω της οποίας απομακρύνονται επιλεκτικά οι θειούχες ενώσεις. Η αποθείωση με προσρόφηση αποτελεί πολλά υποσχόμενη τεχνολογία, όσο αφορά την παραγωγή καυσίμων ντίζελ και βενζίνης χαμηλής συγκέντρωσης θείου, σε σχετικά χαμηλές πιέσεις και θερμοκρασίες. Γενικότερα, η αποδοτικότητα της αποθείωσης με προσρόφηση επηρεάζεται από την χωρητικότητα, την επιλεκτικότητα, την σταθερότητα και την δυνατότητα του προσροφητικού μέσου να αναγεννηθεί [2]. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση της διεργασίας είναι ο χρόνος επαφής του προσροφητικού μέσου και της τροφοδοσίας, η αρχική συγκέντρωση των ενώσεων του θείου και η θερμοκρασία. [23]

Η αποθείωση με προσρόφηση διακρίνεται σε δύο κατηγορίες, την προσρόφηση με αντίδραση και την φυσική προσρόφηση. Στην προσρόφηση με αντίδραση (Reactive Adsorption Desulfurization – RADS), το προσροφητικό μέσο αντιδρά με τις θειούχες ενώσεις, παρουσία υδρογόνου, με αποτέλεσμα το θείο να δεσμεύεται, ενώ ο υδρογονανθρακικός σκελετός να παραμένει στο καύσιμο [8]. Στην συγκεκριμένη διεργασία, ως προσροφητικά μέσα χρησιμοποιούνται μέταλλα μετάπτωσης σε βάσεις οξειδίων. Ιδανικό προσροφητικό μέσο αποτελεί το νικέλιο σε βάση ψευδαργύρου (Ni/ZnO), αφού το μεταλλικό οξείδιο λειτουργεί ταυτόχρονα ως προσροφητικό υλικό και ως καταλύτης της υδρογόνωσης του θείου [21]. Η μέθοδος αυτή συνδυάζει τα πλεονεκτήματα της προσρόφησης και της καταλυτικής υδρογονοαποθείωσης, με αποτέλεσμα να καθίσταται ιδανική μέθοδος για την εις βάθος αποθείωση των κλασμάτων του πετρελαίου [8].

Όσο αφορά την φυσική προσρόφηση, βασίζεται στην απομάκρυνση αυτούσιων των οργανικών θειούχων ενώσεων, χωρίς να πραγματοποιείται κάποια αντίδραση. Τα προσροφητικά μέσα της μεθόδου αυτής, αποτελούν τα μοριακά κόσκινα ενεργού άνθρακα, με ή χωρίς την προσθήκη μετάλλων, και το νικέλιο σε αλούμινα (Ni-Al₂O₃), τα οποία παρουσιάζουν ικανοποιητικά χαρακτηριστικά όσο αφορά την απομάκρυνση θειοφαινίων, σουλφιδίων και μερκαπτανών, σε ήπιες συνθήκες. Εναλλακτικά, προσροφητικά μέσα σαποτελούν η σίλικα, οι ζεόλιθοι και τα μεταλλικά οργανικά πλαίσια (Metal Organic Frameworks – MOFs). Η σειρά με την οποία απομακρύνονται οι θειούχες ενώσεις είναι η αντίστροφη σε σχέση με την υδρογονοκατεργασία, δηλαδή απομακρύνονται πρώτα τα αλκυλιωμένα διβενζοδιοφαινία, στην συνέχεια τα διβενζοθειοφαινία κ.ο.κ. Μειονέκτημα της

μεθόδου αποτελεί η προσρόφηση ολεφινών, η οποία οδηγεί στην μειωμένη απομάκρυνση των αρωματικών θειούχων ενώσεων. [23] [11]

Η αποθείωση με προσρόφηση προσφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι της υδρογονοκατεργασίας, εφόσον πρόκειται για μία μέθοδο αποθείωσης χαμηλότερου κόστους, με λιγότερες εκπομπές, και είναι σχετικά απλή στην λειτουργία της, ενώ οδηγεί σε πολύ υψηλό βαθμό αποθείωσης. Ωστόσο, προς το παρόν εφαρμόζεται μόνο σε εργαστηριακή κλίμακα. [23]

2.4 Βιολογική Αποθείωση

Μια εναλλακτική μέθοδος απομάκρυνσης θείου από ορυκτά καύσιμα είναι η βιολογική αποθείωση. Το θείο αποτελεί το 0.5-1% της ξηρής μάζας των κυττάρων, και αποτελεί καθοριστικό παράγοντα στην ανάπτυξη και την δομή των μικροοργανισμών, αφού εντοπίζεται σε συμπράγοντες ενζύμων, αμινοξέα και πρωτεΐνες [9]. Ανάλογα με τα μεταβολικά μονοπάτια κάθε μικροοργανισμού και τα ένζυμα που αυτό συνθέτει, μπορεί να χρησιμοποιήσει αντίστοιχες ενώσεις ως πηγές θείου. Ορισμένοι μικροοργανισμοί δύνανται να χρησιμοποιήσουν ως πηγή θείου το DBT, με αποτέλεσμα την μείωση της συγκέντρωσης του θείου στα καύσιμα. [2] [9].

Η μέθοδος αυτή παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα, εφόσον πραγματοποιείται σε ήπιες συνθήκες, επομένως οδηγεί σε χαμηλό ενεργειακό κόστος, παρουσιάζει υψηλή εκλεκτικότητα, ως βιολογική ενζυμική διεργασία, ενώ δεν οδηγεί στην παραγωγή σημαντικών ποσοτήτων ανεπιθύμητων προϊόντων [9] [8].

Μέσω της βιολογικής αποθείωσης απομακρύνονται οι ανθεκτικές θειούχες ενώσεις (DBT's, alkyl-DBT's). Οι ανθρακικοί σκελετοί των ενώσεων, μετά την απομάκρυνση του θείου, είτε αφομοιώνονται ως πηγές άνθρακα, είτε απελευθερώνονται στο περιβάλλον του μικροοργανισμού, ανάλογα με τα μεταβολικά μονοπάτια που περιλαμβάνει ο κάθε μικροοργανισμός [8]. Συνήθως, στην περίπτωση που ο οργανικός σκελετός δεν αφομοιώνεται και απελευθερώνεται στο περιβάλλον του κυττάρου, μετά από κάποια συγκέντρωση, λειτουργεί παρεμποδιστικά στην αποθειωτική ικανότητα του μικροοργανισμού.

Διάφοροι μικροοργανισμοί έχουν εξεταστεί για την αποθειωτική τους ικανότητα, ωστόσο οι έρευνα εξελίσσεται κυρίως γύρω από τα στελέχη του γένους *Rhodococcus*. Παράλληλα, έχουν εξεταστεί στελέχη των γενών *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Pseudomonas*, *Gordonia*, *Mycobacterium* κ.ά. [7][8][21]

Δεδομένου ότι, το DBT και τα αλκυλιωμένα παράγωγά του αποτελούν την πληθώρα των θειούχων ενώσεων, και εφόσον οι ενώσεις αυτές αποτελούν τις πιο επίμονες κατά την αποθείωση του πετρελαίου, είναι ευνόητο ότι το DBT αποτελεί την ένωση-μοντέλο, όσο αφορά την μελέτη της αποθείωσης. [5]

Ένας βασικός παράγοντας της ανάπτυξης των μικροοργανισμών αποτελεί η παρουσία οξυγόνου, επομένως ο τρόπος προσέγγισης της μικροβιακής αποθείωσης διακρίνεται από το αν οι αντιδράσεις που πραγματοποιούνται είναι αναερόβιες ή αερόβιες.

2.4.1 Αναερόβια προσέγγιση

Οι αναερόβιες διεργασίες χαρακτηρίζονται από την ανάπτυξη των μικροοργανισμών απουσία οξυγόνου. Συνηθέστερα, πραγματοποιούνται με χαμηλότερη ταχύτητα, ενώ τα παραγόμενα προϊόντα είναι τα ίδια με αυτά της υδρογονοαποθείωσης (H_2S , αποθειωμένο πετρέλαιο).

Η αποθείωση υπό αναερόβιες συνθήκες βασίζεται στην αναγωγή των θειούχων ενώσεων από θειοαναγωγικά βακτήρια (sulfate reducing bacteria – SRB) και την θραύση του δεσμού άνθρακα-θείου. Αρκετά αναερόβια στελέχη παρουσιάζουν αποθειωτική ικανότητα με πιο γνωστό τον *Desulfonibrio desulfuricans* [9]. Συγκεκριμένα, το στέλεχος M6 ανάγει το DBT σε διφαινύλιο και H_2S . Αντίστοιχα, αποθειωτική ικανότητα παρουσιάζουν και οι μικροοργανισμοί *Desulfomicrobium scambium* και *Desulfonibrio longreachii*, με χαμηλή απόδοση, σε κηροζίνη. [24]

Μέσω της αναερόβιας αποθείωσης αποφεύγεται οποιοδήποτε κόστος αφορά τον αερισμό, το θείο απελευθερώνεται ως αέριο, με αποτέλεσμα την εύκολη διοχέτευση του προς επεξεργασία, ενώ αποφεύγεται η παραγωγή ανεπιθύμητων προϊόντων [9]. Ωστόσο, πραγματοποιείται με αργό ρυθμό, η επίτευξη και η διατήρηση ανοξικών συνθηκών είναι ιδιαίτερα απαιτητική, ενώ δεν υπάρχει πλήρης επίγνωση της βιοχημείας και της γενετικής των αναερόβιων μικροοργανισμών, με αποτέλεσμα η αναερόβια αποθείωση να μην είναι βιώσιμη βιομηχανικά, και έμφαση να προσφέρεται στην αερόβια αποθείωση [9][25][26]

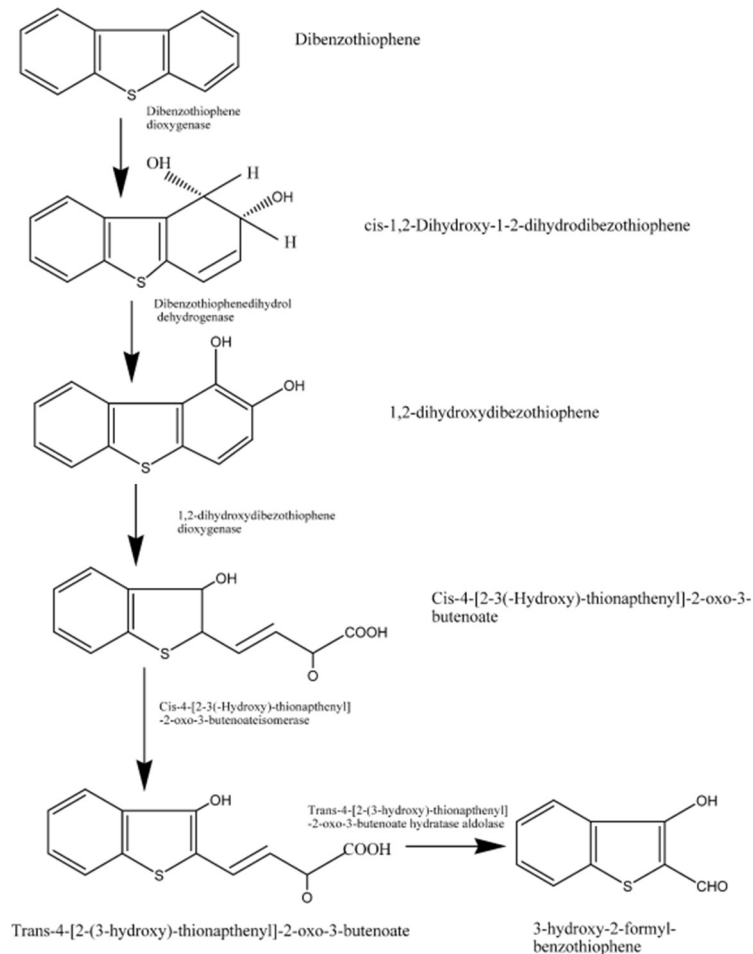
2.4.2 Αερόβια προσέγγιση

Η αερόβια αποθείωση, σε αντίθεση με την αναερόβια, πραγματοποιείται παρουσία οξυγόνου. Η απομάκρυνση θειούχων ενώσεων με την χρήση αερόβιων μικροοργανισμών πραγματοποιείται μέσω δύο διαφορετικών μεταβολικών μονοπατιών, το μονοπάτι Kodama, μέσω του οποίου πραγματοποιείται διάρρηξη του δεσμού C-C, και το μονοπάτι 4S, μέσω του οποίου πραγματοποιείται ρίξη του δεσμού C-S. [26]

2.4.2.1 Μονοπάτι Kodama

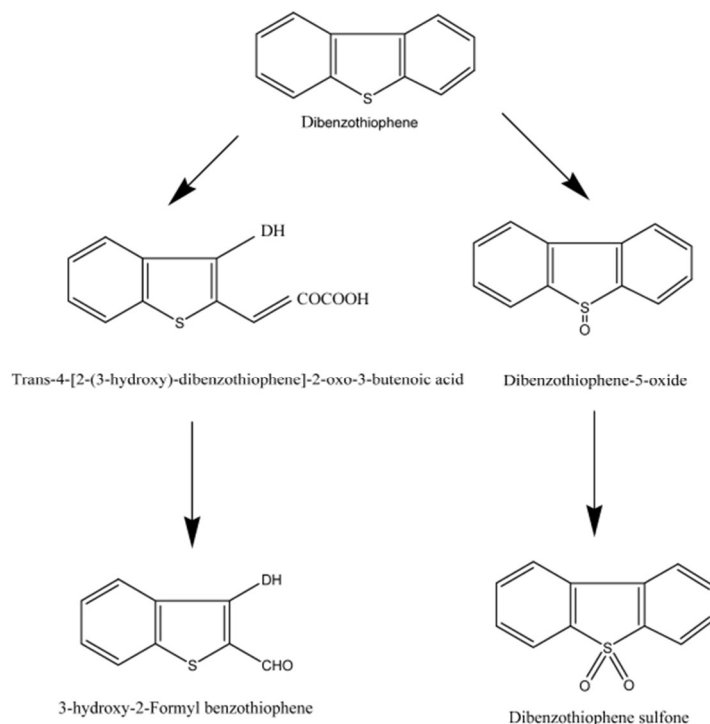
Το μονοπάτι Kodama, ή αλλιώς ο μηχανισμός καταστροφής δακτυλίου, προτάθηκε από τον Kodama το 1973 και περιγράφει μια σειρά ενζυμικών αντιδράσεων, μέσω των οποίων οι δεσμοί C-C στον έναν αρωματικό δακτύλιο του DBT οξειδώνονται και διακόπτονται

επιλεκτικά, ενώ ταυτόχρονα οι δεσμοί C-S διατηρούνται και μεταφέρονται σε μικρότερα οργανικά μόρια, με αποτέλεσμα την διάσπαση των αρωματικών δακτυλίων [27]. Το μονοπάτι Kodama περιλαμβάνει τρία βασικά στάδια, την υδροξυλίωση, την διάσπαση του δακτυλίου και την υδρόλυση με τελικό προϊόν το 3-υδροξύ-2- φόρμυλο βενζοθειοφαίνιο (HBFT) [26]. Το συγκεκριμένο μονοπάτι αποδόμησης του DBT, φαίνεται να ακολουθείται από τους μικροοργανισμούς *Pseudomonas jijani* και *P. abiconesis*, οι οποίοι αποτέλεσαν την βάση για την ερμηνεία του μηχανισμού [28]. Το προϊόν της αποθείωσης δρα παρεμποδιστικά τόσο στην ανάπτυξη των κυττάρων, όσο και στην ικανότητα οξείδωσης του DBT [28].



Εικόνα 9. Μονοπάτι Kodama οξειδωτικής αποδόμησης [28].

Κάποια στελέχη *P. putida* έχει παρατηρηθεί ότι ακολουθούν το τροποποιημένο μονοπάτι Kodama, με τελικό προϊόν σουλφόνη (DBTO₂) ή σουλφοξείδιο (DBTO) [29]. Αντίστοιχες τροποποιήσεις έχουν παρατηρηθεί στα στελέχη *Cunninghamella elegans*, *Pleutoris ostreatus* και *Rhizobium meliloti* [28].



Εικόνα 10. Μεταβολικά μονοπάτια του στελέχους *P. putida* pathways, κατά την αποδόμηση του DBT. [30]

Ο ρυθμός αποδόμησης του DBT μέσω του μονοπατιού Kodama είναι αντίστοιχος με τον ρυθμό αποσύνθεσης μικρών αρωματικών μορίων [27].

Το συγκεκριμένο μεταβολικό μονοπάτι δεν θεωρείται κατάλληλο για την βιολογική αποθείωση του πετρελαίου, εφόσον οδηγεί σε διάσπαση του αρωματικού δακτυλίου και στην παραγωγή υδατοδιαλυτών μορίων, τα οποία απομακρύνονται από το πετρέλαιο, με αποτέλεσμα την μείωση της θερμογόνου δύναμης του καυσίμου και την αλλοίωση της υδρογονανθρακικής του σύνθεσης [31].

2.4.2.2. Μηχανισμός 4S

Το μονοπάτι 4S περιγράφει την απομάκρυνση του θείου από το DBT, με εκλεκτικό τρόπο, χωρίς να επηρεάζεται ο ανθρακικός σκελετός της ένωσης, με αποτέλεσμα την διατήρηση της θερμογόνου δύναμης του καυσίμου. Η διεργασία αυτή πραγματοποιείται λόγω οξειδωτικής διάσπασης των δεσμών C-S [30]. Η ονομασία του μηχανισμού προκύπτει από την παραγωγή των τεσσάρων θειούχων ενδιάμεσων προϊόντων (DBTO- σουλφοξείδιο, DBTO₂- σουλφόνη, HBPS- σουλφονικό υδροξύ-διφαινύλιο, SO₃⁻-θειώδη ανιόντα). Τελικά προϊόντα του μονοπατιού 4S είναι το 2-υδρόξυ-διφαινύλιο (2-HBP) και τα θειώδη ανιόντα [28].

Οι πρώτες αναφορές για το μονοπάτι 4S αφορούν το στέλεχος *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8 το 1993, το οποίο στη συνέχεια ταξινομήθηκε ως *R. erythropolis*, ενώ πρόσφατα

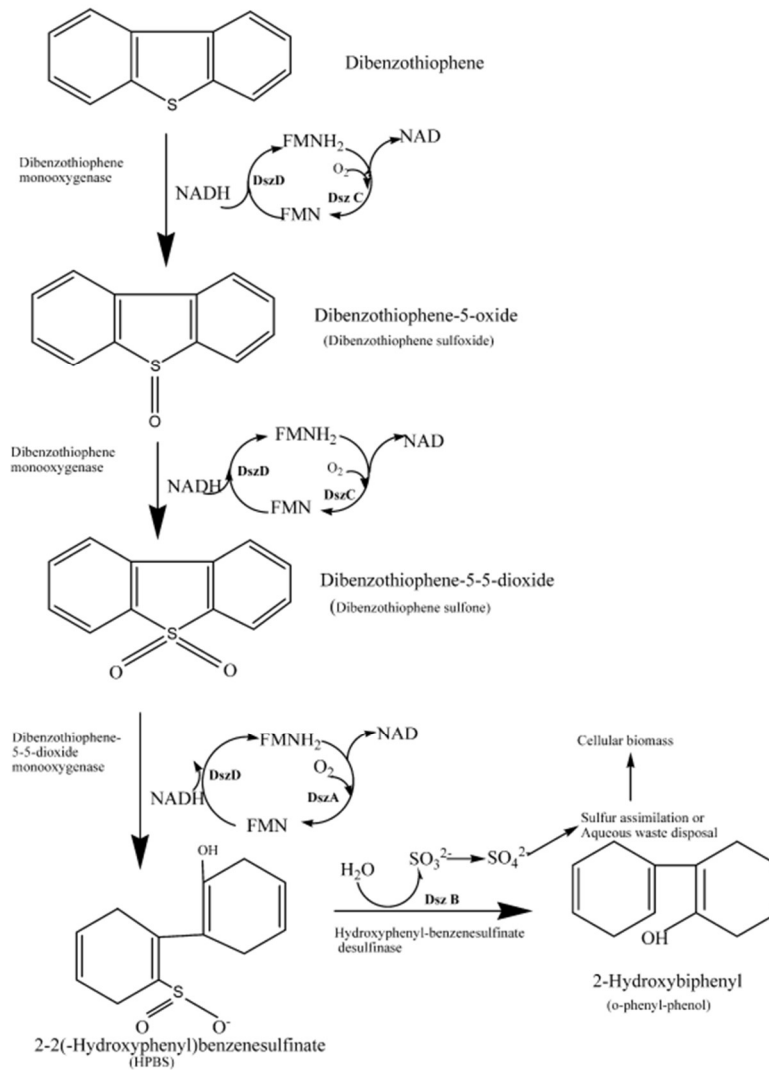
ταξινομήθηκε ως *R. qingshengii* IGTS8, ωστόσο και άλλα στελέχη παρατηρήθηκε ότι ακολουθούν το συγκεκριμένο μονοπάτι (*R. erythropolis* D1, *Rhodococcus* ECRD1, *Rhodococcus* B1, *Rhodococcus* SY1, *Rhodococcus* UM3, *Gordonia* CYKS1, *Xanthomonas*, *Nocardia globelula*, *Paenibacillus strain*, *Mycobacterium* sp.). Οι περισσότεροι μικροοργανισμοί που αναφέρονται στην βιβλιογραφία ανήκουν στην κατηγορία των μεσόφιλων, με βέλτιστη θερμοκρασία δράσης τους 30°C, ενώ έχουν βρεθεί και θερμοφιλοι μικροοργανισμοί με δυνατότητα αποθείωσης [28]. Μάλιστα, σε ορισμένα θερμοφιλα βακτήρια, και συγκεκριμένα σε στελέχη *Mycobacterium*, παρατηρείται η χρήση του εκτεταμένου μονοπατιού 4S, κατά το οποίο το παραγόμενο 2-HBP μετατρέπεται σε 2-μεθοξυ-διφαινύλιο (2MBP), το οποίο σε σχέση με το 2-HBP, παρουσιάζει σε μικρότερο βαθμό παρεμπόδιση στην ανάπτυξη και στην αποθειωτική ικανότητα του μικροοργανισμού. [5]

Το μονοπάτι 4S αποτελείται από τέσσερες βασικές αντιδράσεις, που καταλύονται από τα τρία ένζυμα των γονιδίων *dszABC*. Αρχικά, πραγματοποιείται η διπλή οξείδωση του DBT σε DBTO, και στην συνέχεια σε DBTO₂, με την βοήθεια μίας μονοξυγενάσης του DBT (*DszC*). Το στάδιο αυτό, περιγράφεται ως ενεργοποίηση του θειοφαινικού δακτυλίου και σχάση του δεσμού μέσω οξείδωσης του θείου. Στην συνέχεια, πραγματοποιείται οξείδωση του DBTO₂ με την βοήθεια μιας μονοξυγενάσης, η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο *dszA*, με αποτέλεσμα την παραγωγή του HPBS. Ουσιαστικά, η διάσπαση του δακτυλίου πυροδότησε τον σχηματισμό αρωματικού σουλφινικού ιόντος. Η αντίδραση αυτή που καταλύεται από το *DszA* είναι πέντε έως δέκα φορές ταχύτερη από τις οξειδώσεις που καταλύει το *DszC*. Τέλος, το HPBS μετατρέπεται σε 2-HBP με την βοήθεια μιας αποθειωνάσης - υδρολάσης σουλφινικού οξέος (*DszB*). Η αντίδραση αυτή πραγματοποιείται μέσω πυρηνόφιλης προσβολής ενός μορίου νερού στο θείο του HPBS [37]. Έτσι απελευθερώνεται ένα μόριο 2-HBP, ενώ το θείο αποβάλλεται με την μορφή θειώδους ιόντος. Το απαιτούμενο οξυγόνο των αντιδράσεων *dszC* και *dszA* προσλαμβάνεται από διαλυμένο μοριακό οξυγόνο. [31] [32]

Επιπλέον των τριών αυτών ενζύμων, απαιτείται η δράση μίας NADH-FMN οξειδοαναγωγάσης, η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο *dszD*, μέσω της οποίας πραγματοποιείται αναγέννηση του συμπαραγόντα του FMNH₂ (FMN⁻ μονονουκλεοτίδιο φλαβίνης). Το ένζυμο αυτό απαιτείται για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων *dszC* και *dszA*, και παρέχει το απαιτούμενο FMNH₂, από FMN, οξειδώνοντας NADH σε NAD⁺. [32]

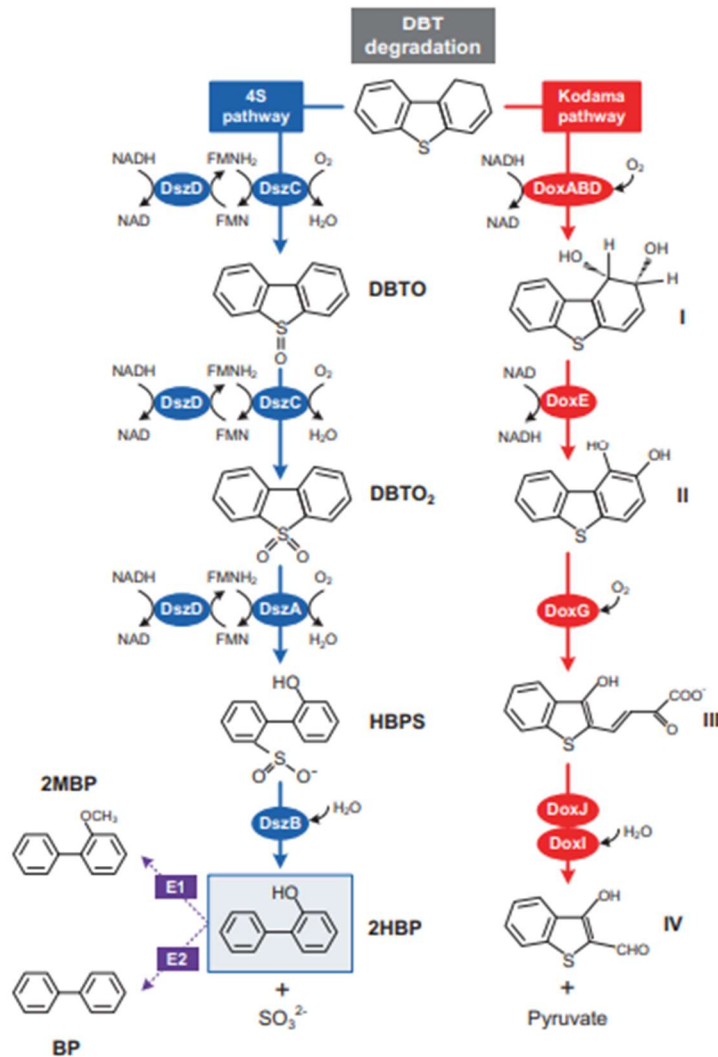
Το γονίδιο *dszB* θεωρείται το γονίδιο-σηματοδότης, εφόσον η αντίδραση απόσπασης του θειώδους ιόντος είναι η πλέον καθοριστική για την αποδόμηση του DBT. [31]

Η παραπάνω σειρά αντιδράσεων περιγράφεται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 11. Μεταβολικό μονοπάτι 4S [28]

Το παραγόμενο 2-HBP αποτελεί υδρόφοβη ένωση, και επομένως μεταφέρεται εύκολα στην φάση του πετρελαίου, με αποτέλεσμα να διατηρείται η θερμογόνος δύναμη του καυσίμου. Δεν υπάρχει κάποια ένδειξη για την ενεργή μεταφορά του 2-HBP από το κύτταρο, αλλά αποτελεί πολύ πιθανό, δεδομένου ότι το 2-HBP αποτελεί βιοκτόνο, ενώ η αφομοίωσή του παρεμποδιστικά στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού και στην αποθειωτική του ικανότητα. Αντίστοιχα, τα θειώδη ιόντα μετατρέπονται σε θειικά και είτε αφομοιώνονται από το κύτταρο, είτε απομακρύνεται ως απόβλητο [33] [30].



Εικόνα 13. Μεταβολικά μονοπάτια 4S και Kodama [35]

Το DBT αποτελεί την ένωση-μοντέλο όσο αφορά την βιολογική αποθείωση, λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς του στα καύσιμα. Παρόλα αυτά, αφενός το πετρέλαιο αποτελεί μίγμα από πλήθος αρωματικών και μη θειούχων ενώσεων, αφετέρου δεν παρουσιάζουν όλοι οι μικροοργανισμοί την ίδια εκλεκτικότητα στο συγκεκριμένο υπόστρωμα. Για αυτό τον λόγο, εξετάζεται η χρήση μικτών καλλιεργειών, με σκοπό την απομάκρυνση του θείου από όσο το δυνατόν περισσότερα διαφορετικά υποστρώματα γίνεται.

Επισημαίνεται ότι παρά την ομοιότητα τους, το BT και το DBT, αποθειώνονται από διαφορετικά μεταβολικά μονοπάτια. Έτσι εξετάστηκε η χρήση μικτών καλλιεργειών. Συγκεκριμένα, εξετάστηκε η ανάμιξη των στελεχών *R. erythropolis* DS-3, που αποθειώνει DBT, και *Gordonia* sp. C-6, που αποθειώνει το BT και τα παράγωγά του. Παρατηρήθηκε μείωση της συγκέντρωσης του θείου, σε καύσιμο που έχει υποστεί υδρογονοκατεργασία, κατά 86%, έπειτα από τρεις κύκλους καλλιεργειών. Παρόλα αυτά, υπάρχουν μικροοργανισμοί που μπορούν ταυτόχρονα να αποθειώνουν BT και DBT (*Rhodococcus* sp.

KT462, *Mycobacterium goodii* X7B, *Mycobacterium phlei* WU-0103, *R. erythropolis*, *Paenibacillus* sp. A11-2, *Sphingomonas subarctica* T7b κ.ά), αλλά με χαμηλότερη απόδοση σε σχέση με τις μικτές καλλιέργειες. [5]

3. Γενετική και ενζυμολογία της βιολογικής αποθείωσης του DBT

Τα γονίδια *dszABC*, όπως περιγράφεται παραπάνω, κωδικοποιούν τα απαραίτητα ένζυμα για την κατάλυση των τεσσάρων αντιδράσεων της αποθείωσης του DBT. Το μήκος των τριών γονιδίων είναι περίπου 3750 ζεύγη βάσεων και μεταγράφεται σε πολυιστρονικό mRNA που κωδικοποιεί τα τρία ένζυμα. Το κωδικόνιο λήξης του *dszA* και το κωδικόνιο έναρξης του *dszB*, παρουσιάζουν μία αλληλοεπικάλυψη 4 ζευγών βάσεων, ενώ μεταξύ των *dszB* και *dszC*, υπάρχει μια απόσταση 13 ζευγών βάσεων. Για αυτόν τον λόγο τα επίπεδα έκφρασης του *dszB* είναι χαμηλότερα, σε σχέση με τα άλλα δύο γονίδια [34]. Τα τρία γονίδια βρίσκονται σε οπερόνιο και μεταγράφονται προς την ίδια κατεύθυνση, ενώ στον IGTS8 αναφέρεται ότι το οπερόνιο αυτό εντοπίζεται σε ένα μεγαπλασμίδιο μεγέθους 150 kbp, το *pSOX*. [36]

Η δυνατότητα αποθείωσης των μικροοργανισμών συνδέεται με την ικανότητα πρόσληψης θείου και κατ' επέκταση την ανάπτυξη και την επιβίωση των μικροοργανισμών. Επομένως, πολλοί διαφορετικοί μικροοργανισμοί διαθέτουν τα αποθειωτικά γονίδια *dsz*, συχνά με πολύ υψηλό ποσοστό ομοιότητας, σε σχέση με τον IGTS8. Τα αποθειωτικά γονίδια του στελέχους *Gordonia alkinovorans* 1B, παρουσιάζουν 88% ομοιότητα με τον IGTS8. Αντίστοιχες ομοιότητες παρατηρούνται και σε θερμοφιλά στελέχη, όπως στον *Paenibacillus* sp. A11-2, τα γονίδια του οποίου, *tdsABC*, παρουσιάζουν ομολογία κατά 73%, 61% και 52% ομολογία σε σχέση με τα *dszABC*. [37]

Παρόλα αυτά, η ομοιότητα των αλληλουχιών των αποθειωτικών γονιδίων μεταξύ των στελεχών, δεν συνδέεται απαραίτητα με τον ίδιο φαινότυπο. Συγκεκριμένα, τα στελέχη *Mycobacterium phlei* GTIS10 και *R. erythropolis* IGTS8 παρουσιάζουν την ίδια αλληλουχία των αποθειωτικών γονιδίων, ωστόσο η μέγιστη αποθειωτική τους ικανότητα επιτυγχάνεται σε διαφορετική θερμοκρασία καλλιέργειας, στους 50°C και τους 30°C, αντίστοιχα [36]. Μάλιστα, μεταξύ τεσσάρων μικροοργανισμών με ταυτόσημες ακολουθίες αποθειωτικών γονιδίων παρατηρήθηκε διαφορά όσο αφορά την αποθειωτική ικανότητα, την εκλεκτικότητα ως προς τα υποστρώματα και στην παραγωγή μεταβολιτών [38]. Η διαφορά αυτή ενδεχομένως οφείλεται στην δυνατότητα μεταφοράς του υποστρώματος, καθώς και την δυνατότητα παροχής NADH, FMNH₂, και οξυγόνου για το κάθε στέλεχος [34].

Κατά την αποθείωση του DBT, τα παραγόμενα προϊόντα είναι τα θειώδη ιόντα και το 2HBP. Τα θειώδη ιόντα μετατρέπονται σε θειικά, τα οποία είναι προτεινόμενη πηγή θείου για πολλούς μικροοργανισμούς, ειδικά εφόσον αποτρέπει από την περαιτέρω αξιοποίηση οργανικών θειούχων ενώσεων. Ωστόσο, όταν το κύτταρο βρίσκεται σε συνθήκες έλλειψης πηγών θείου (sulfur-starving conditions), τότε επάγεται η ενεργοποίηση μεταβολικών μονοπατιών και η σύνθεση των κατάλληλων ενζύμων και μεταφορέων για την αξιοποίηση

εναλλακτικών πηγών θείου. Έτσι, όταν στο περιβάλλον του κυττάρου παρευρίσκονται θειικά ιόντα, σουλφίδια και αμινοξέα που περιέχουν θείο (κυστεΐνη, μεθειονίνη), τότε πραγματοποιείται καταστολή των *dsz* γονιδίων. Οι ενώσεις αυτές παρεμποδίζουν τους υποκινητές των αποθειωτικών γονιδίων και την έκφραση αυτών, αλλά δεν δρουν παρεμποδιστικά στα ίδια τα ένζυμα [39]. Αντίστοιχα, το 2-HBP, εκτός από τοξικό για τα κύτταρα, όπως αναφέρεται ανωτέρω, δρα παρεμποδιστικά στα *dsz* ένζυμα, μάλιστα σε συγκέντρωση αρκετά χαμηλότερη από αυτή που αφομοιώνεται ενδοκυτταρικά [40].

4. Γενετικές τροποποιήσεις για την βελτίωση της βιοαποθείωσης

Γενικότερα, τα φυσικού τύπου στελέχη δεν παρουσιάζουν την απαιτούμενη αποθειωτική ικανότητα, ώστε να αποτελούν ελκυστικά για περαιτέρω βιομηχανικές εφαρμογές. Για αυτόν τον λόγο, εξετάζονται γενετικές τροποποιήσεις σε διάφορα στελέχη, με σκοπό την βελτίωση της αποθειωτικής ικανότητας. Παραδείγματος χάρη, σε ανασυνδυασμένο στέλεχος *Pseudomonas*, στο οποίο είχαν εισαχθεί τα γονίδια *dszABC* στο χρωμόσωμα, παρατηρήθηκε υψηλότερη αποθειωτική ικανότητα, λόγω της παραγωγής επιφανειοδραστικών ενώσεων. [28]

Ταυτόχρονα, η καταστολή των αποθειωτικών γονιδίων παρουσία θειούχων ενώσεων, αποτελεί περιοριστικό παράγοντα στην βιομηχανική ανάπτυξη της βιολογικής αποθείωσης. Με σκοπό την μείωση της καταστολής του υποκινητή των *dsz* γονιδίων από τα θειικά ιόντα, εξετάστηκε η τροποποίηση και του υποκινητή του οπερονίου *dszABC*, και στην συνέχεια αυτό εισήχθη με πλασμιδιακό φορέα σε στέλεχος *Pseudomonas*, και προέκυψε υψηλότερη αποθειωτική ικανότητα, σε σχέση με του φυσικού τύπου στέλεχος [41]. Αντίστοιχα, χρησιμοποιώντας πλασμιδιακό φορέα έκφρασης εξετάστηκε η αντικατάσταση του υποκινητή στελεχών φυσικού τύπου, με αυτόν του στελέχους *Rhodococcus erythropolis* KA2-5-1 (*P_{kap1}*), ο οποίος παρουσία θειικών ιόντων δεν παρουσιάζει καταστολή [42]. Επίσης, η διαγραφή του γονιδίου *dszB* από το οπερόνιο, άρει την καταστολή, απαλείφει το πιο αργό στάδιο της αποθείωσης και ταυτόχρονα επιτρέπει την αφομοίωση του HBPS, το οποίο χρησιμοποιείται στην βιοσύνθεση επιφανειοδραστικών ουσιών. Όσο αφορά το γονίδιο *dszB*, εξετάστηκε και η υπερέκφραση του γονιδίου, αυξάνοντας τον αριθμό των αντιγράφων του και βελτιστοποιώντας το σημείο πρόσδεσης του ριβοσώματος, και ο επανασχεδιασμός του οπερονίου, αίρωντας την αλληλοεπικάλυψη των γονιδίων *dszA* και *dszB*. [35]

Παράλληλα, στο πλαίσιο της άρσης της καταστολής, εξετάστηκε η μεταλλαγμένη σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια του μεταβολισμού του θείου. Συγκεκριμένα, σε μεταλλαγμένα βακτήρια του στελέχους *Rhodococcus erythropolis* KA2-5-1, τα οποία παρουσίαζαν πέντε φορές μεγαλύτερη αποθειωτική ικανότητα, παρουσία θειικών ιόντων, πραγματοποιήθηκε ανάλυση της αλληλουχίας και αποκαλύφθηκε ότι το τρανσποζόνιο υπεύθυνο για την μετάλλαξη είχε εισαχθεί στην αλληλουχία του γονιδίου *cbs*, το οποίο κωδικοποιεί την β-συνθάση της κυσταθειονίνης, ένα ένζυμο που αφορά τον

μεταβολισμό του θείου στα κύτταρα [43]. Η διαγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα που λαμβάνουν μέρος στον μεταβολισμό του θείου, θα συζητηθεί πιο αναλυτικά στις επόμενες παραγράφους.

5. Παράγοντες που επηρεάζουν την βιολογική αποθείωση

Η βιολογική αποθείωση αποτελεί ένα σύνθετο σύστημα με πολλούς βαθμούς ελευθερίας να καθορίζουν την αποδοτικότητά του. Συγκεκριμένα, όπως κάθε βιολογική διεργασία, επηρεάζεται από παράγοντες όπως το pH, η θερμοκρασία και η παροχή αερισμού. Ταυτόχρονα, δεδομένου ότι η αποθείωση πραγματοποιείται σε διφασικό σύστημα, καθοριστική παράμετρο αποτελεί η αναλογία οργανικής-υδατικής φάσης, καθώς και η αρχική συγκέντρωση των θειούχων ενώσεων. Επίσης, δεν μπορεί να αγνοηθεί η παρουσία ή μη παρεμποδιστικών φαινομένων, καθώς και ο ρυθμός διάχυσης του υποστρώματος και των προϊόντων, από το κύτταρο στην οργανική φάση και το αντίστροφο.

5.1. Επίδραση χρόνου επώασης

Με στόχο την επίτευξη του υψηλότερου δυνατού βαθμού αποθείωσης, απαιτείται η γνώση του ρυθμού ανάπτυξης του μικροοργανισμού καθώς και η συνάρτηση της αποθιωτικής ικανότητας με τον χρόνο. Όσο αφορά τον *R. erythropolis* IGTS8, η μέγιστη αποθιωτική ικανότητα επιτυγχάνεται στο μέσο την εκθετικής φάσης, δηλαδή στις 15-25h ανάπτυξης σε αναδευόμενες κωνικές φιάλες [44]. Αντίστοιχα, στο στέλεχος *Rhodococcus* sp. FUM94, σε διφασικό σύστημα, η μέγιστη αποθιωτική ικανότητα επιτυγχάνεται στο τέλος της εκθετικής, και στην αρχή της στατικής φάσης [45]. Άλλα στελέχη, όπως η *P. putida*, παρουσιάζει μέγιστη παραγωγή 2HBP ήταν στις 30h, δηλαδή στην αρχή της στατικής φάσης [46]. Τέλος, στο θερμόφιλο στέλεχος *Mycobacterium phlei* GTIS10, η μέγιστη παραγωγή HBP παρουσιάζεται, και σε αυτήν την περίπτωση στην αρχή της στατικής φάσης, δηλαδή περίπου στις 50h ανάπτυξης, όταν αυτό καλλιεργείται παρουσία DBT, ως μοναδική πηγή θείου [47].

Εμφανώς, η γνώση της καμπύλης ανάπτυξης του μικροοργανισμού σε συνάρτηση με την αποθιωτική ικανότητα είναι καθοριστική με στόχο την βέλτιστη δυνατή παραγωγικότητα της διεργασίας.

5.2 Επίδραση θερμοκρασίας και pH

Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών επηρεάζεται σημαντικά από την διακύμανση της θερμοκρασίας και του pH.

Η θερμοκρασία αποτελεί καθοριστικό παράγοντα όσο αφορά την δραστικότητα και την σταθερότητα των ενζύμων ενός μικροοργανισμού. Οι περισσότεροι μικροοργανισμοί που δύνανται να αποθειώνουν το DBT μέσω του μονοπατιού 4S ανήκουν στους μεσόφιλους οργανισμούς, με άριστη θερμοκρασία δράσης τους 30°C, συμπεριλαμβανομένων των περισσότερων στελεχών του *Rhodococcus* [48]. Παρόλα αυτά, εκτός από μεσόφιλους, υπάρχουν τόσο θεرمόφιλοι όσο και υπερθερμόφιλοι μικροοργανισμοί με αποθειωτική δυνατότητα, όπως τα στελέχη *Sulfolobus acidocaldarius* με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 70°C και *Sulfolobus solfataricus* P2, με βέλτιστη θερμοκρασία 78°C [49] [50].

Αντίστοιχα το pH της καλλιέργειας, είναι καθοριστικό για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, εφόσον επηρεάζει την στερεοδομή των ενζύμων και κατ' επέκταση την ενζυμική τους ενεργότητα. Ταυτόχρονα, το pH καθορίζει το ηλεκτρικό φορτίο του υποστρώματος και την ικανότητά του να προσδεθεί στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Οι περισσότερες μελέτες πραγματοποιούνται σε pH 6.5-7.5. Ωστόσο, το στέλεχος *Gordonia* sp. CYKS1, παρουσίασε την μέγιστη αποθειωτική ικανότητα σε pH 8, ενώ σε pH χαμηλότερο από 6, δεν παρουσίαζε σημαντική δράση [5]. Γενικά, το pH μιας καλλιέργειας επηρεάζεται από την παραγωγή προϊόντων του μεταβολισμού των κυττάρων και συνήθως ρυθμίζεται με την προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος στο θρεπτικό μεσο, και με την ρίψη μικρών ποσοτήτων οξέος (HCl) ή βάσης (NaOH).

5.3 Επίδραση διαλυμένου οξυγόνου

Οι μικροοργανισμοί που πραγματοποιούν αποθείωση μέσω του μηχανισμού 4S είναι αερόβιοι, ενώ ταυτόχρονα το μοριακό οξυγόνο είναι απαραίτητο για την πραγματοποίηση των οξειδώσεων του DBT κατά την αποθείωση. Επομένως, η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου στην καλλιέργεια είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη και την βιοκαταλυτική δράση του μικροοργανισμού.

Η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου ρυθμίζεται με την παροχή αερίσμου και την ταχύτητα ανάπτυξης. Ωστόσο αν η ταχύτητα ανάδευση είναι υψηλή, δημιουργούνται υψηλές διαμητικές τάσεις οι οποίες δύνανται να επηρεάσουν αρνητικά τα κύτταρα. Έτσι, η σωστή ρύθμιση του αερισμού και της ανάδευσης οδηγεί στην ικανοποιητική πρόσληψη οξυγόνου, ειδικά εφόσον συμβαδίζει με την μεταβολισμό τον κυττάρων. [51]

Όσο αφορά τον *R. erythropolis* IGTS8, η βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης και αποθειωτικής ικανότητας επιτυγχάνονται σε συνθήκες 30°C, pH 6.5 και σε συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου 20% της συγκέντρωσης κορεσμού [44]. Επίσης, η διατηρώντας την παροχή του οξυγόνου σταθερή, παρατηρήθηκε ότι η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου ήταν η ελάχιστη στο μέσο της εκθετικής, όπου οι ενεργειακές απαιτήσεις του κυττάρου ήταν υψηλότερες. Έτσι, κρίνεται ότι ο ρυθμός μεταφοράς του οξυγόνου καθορίζει την πορεία της βιοαποθείωσης [52].

5.4 Επίδραση αρχικής συγκέντρωσης βιοκαταλύτη

Μια καλλιέργεια με υψηλή συγκέντρωση κυττάρων, αφενός οδηγεί σε μειωμένο κόστος, αφετέρου έχει παρατηρηθεί ότι η αύξηση του εμβολίου αναπτυσσόμενων κυττάρων στο στέλεχος *R. erythropolis* HN2, είχε αρνητικό αντίκτυπο στην μικροβιακή ανάπτυξη [53]. Ενδεχομένως, λόγω της έλλειψης κατάλληλου αερισμού και της γρήγορης εξάντλησης των θρεπτικών συστατικών. Επίσης, σε καλλιέργεια διαλείποντος έργου του στελέχους *Corynebacterium* sp. ZD-1, όπου το αρχικό εμβόλιο αποτελούνταν από μη αναπτυσσόμενα κύτταρα, η συγκέντρωση του παραγόμενου 2-HBP ήταν υψηλότερη, όταν η συγκέντρωση του αρχικού εμβολίου ήταν χαμηλότερη. Το γεγονός αυτό πιθανός οφείλεται σε περιορισμούς λόγω μεταφοράς μάζας [54]. Στην περίπτωση του *Bacillus cereus* σε διφασικό σύστημα 1:2 σε δωδεκάνιο με συγκέντρωση DBT 500mM, παρατηρήθηκε αύξουσα αποθειωτική ικανότητα έως μία μέγιστη δυνατή συγκέντρωση αρχικού εμβολίου, μετά από την οποία παρατηρήθηκε μείωση, πιθανότατα λόγω των περιορισμών μεταφοράς μάζας, και την αδυναμία των κυττάρων να έρθουν σε επαφή με την οργανική φάση [55]. Σε αυτό το σημείο υποδεικνύεται ότι η αποδοτικότητα μιας διεργασίας αποθείωσης, εξαρτάται άμεσα από τους περιορισμούς λόγω φαινομένων μεταφοράς μάζας, ειδικά όσο αυξάνεται η κλίμακα της διεργασίας.

5.5 Επίδραση αρχικής συγκέντρωσης θείου

Το θείο αποτελεί το 0.5-1% του ξηρού βάρους του κυττάρου, επομένως η απαιτούμενη προσλαμβανόμενη ποσότητα θείου είναι περιορισμένη. Παράλληλα, το DBT σε υψηλές συγκεντρώσεις λειτουργεί παρεμποδιστικά στην ανάπτυξη του κυττάρου και στην αποθειωτική ικανότητα, παρά την χαμηλή του διαλυτότητα. Το γεγονός αυτό, ενδεχομένως οφείλεται στην σύνθεση βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών, με σκοπό την αύξηση της διαλυτότητας του DBT, και κατ'έπекταση της βιοδιαθεσιμότητάς του [56].

Η αποθειωτική ικανότητα ενός μικροοργανισμού εξαρτάται τόσο από την χρησιμοποιούμενη πηγή θείου για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού, όσο και από την αρχική συγκέντρωση του DBT που πρόκειται να αποθειωθεί. Κάθε μικροοργανισμός παρουσιάζει διαφορετικές ιδανικές συγκεντρώσεις θείου. Το στέλεχος *Gordonia alkanivorans* 1B παρουσίασε ποσοστό αποθείωσης 64.8%, με αρχική συγκέντρωση DBT 0.5 mM στις 120h καλλιέργειας, ενώ το *Microbacterium* ZD-M2 παρουσίασε 100% με αρχική συγκέντρωση 0.3 mM DBT στις 72h [57] [58]. Στην περίπτωση του στελέχους *Rhodococcus* sp. P32C1, όταν αυτό αναπτύσσεται σε διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις DBT, από 0.05-0.5 mM, δεν παρατηρείται διαφορά στην ανάπτυξη, ωστόσο στην περίπτωση του 0.1 mM DBT, επιτυγχάνεται η υψηλότερη αποθειωτική ικανότητα. [59]

5.6 Επίδραση υποκατεστημένων υποστρωμάτων στην αποθειωτική ικανότητα

Όπως αναφέρεται παραπάνω, η αποθειωτική ικανότητα κυρίως αξιολογείται με βάση την ικανότητα ενός μικροοργανισμού να απομακρύνει το θείο από την ένωση-μοντέλο DBT. Ωστόσο, στο πετρέλαιο υπάρχει πληθώρα οργανικών ενώσεων. Συνήθως, μετά την υδρογονοαποθείωση οι θειούχες ενώσεις που παραμένουν στο πετρέλαιο είναι τα υποκατεστημένα παράγωγα του DBT. Το είδος και η θέση των πλευρικών ομάδων επηρεάζει σημαντικά την δραστηριότητα των βιοκαταλυτών. Γενικότερα, όσο αυξάνεται η πολυπλοκότητα των διβενζοθειοφαινίων, δηλαδή όσο αυξάνεται ο βαθμός υποκατάστασης και το μέγεθος των μορίων, μειώνεται η δραστηριότητα των ενζύμων.

Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι τα στελέχη *Pseudomonas delafieldii* R-8 και *Nocardia glaucofarangosa* R-9 έχουν την δυνατότητα να χρησιμοποιούν διάφορες θειούχες ενώσεις, ως μοναδικές πηγές θείου. Η πιο σημαντική παρατήρηση αποτελεί η ιδιότητα των στελεχών να αποθειώνουν το 4,6-DMDBT και το DBT₂ με υψηλότερο ρυθμό από ότι το DBT, ενώ δύνανται να αποθειώνουν και τα BT και DBS [60]. Επίσης, στο πλαίσιο της μελέτης της εκλεκτικότητας του υποστρώματος, παρατηρήθηκε ότι τα στελέχη *Rhodococcus erythropolis* KA2-5-1, και *Escherichia coli* JM109 στην οποία είχαν εισαχθεί τα αποθειωτικά γονίδια του θερμόφιλου *Paenibacillus* sp. A11-2 (tds σύστημα), δύνανται να αποθειώσουν διάφορα υποκατεστημένα DBTs (4,6-dialkyl-DBTs), προς τα αντίστοιχα υδροξύ-διφαινύλια. Επίσης, παρόλο που φαίνεται να αποικοδομούν αλκυλιωμένα βενζοθειοφαινία, αποθειωμένα προϊόντα φαίνεται να εντοπίζονται μόνο στην περίπτωση του tds συστήματος. Στην συγκεκριμένη εφαρμογή, παρατηρήθηκε υψηλή επίδραση της θέσης του αλκυλίου στην λειτουργικότητα του αποθειωτικού συστήματος, ενώ η αύξηση του μήκους της αλκυλικής αλυσίδας οδηγούσε σε μειωμένη αποθειωτική ενεργότητα [61].

5.7 Επίδραση οργανικού διαλύτη και λόγου οργανικής/υδατικής φάσης

Η βιομηχανική εφαρμογή της βιολογικής αποθείωσης περιλαμβάνει την χρήση διφασικού συστήματος οργανικής φάσης, στην οποία θα βρίσκεται το πετρέλαιο, και υδατικής φάσης η οποία αφορά την καλλιέργεια του μικροοργανισμού. Η αναλογία της οργανικής προς την υδατική φάση (oil to water ratio – O/W) επηρεάζει σημαντικά την αποδοτικότητα της διεργασίας. Επίσης, η επιλογή του διαλύτη στις μελέτες της βιοαποθείωσης φαίνεται να είναι καθοριστική για την διεξαγωγή των πειραμάτων. Στις περισσότερες περιπτώσεις ως οργανική φάση χρησιμοποιείται το κανονικό δωδεκάνιο και το δεκαεξάνιο, τα οποία δεν είναι τοξικά για το κύτταρο, εφόσον εντοπίζονται στις κυτταρικές μεμβράνες. Επισημαίνεται το πετρέλαιο αποτελείται από ένα μείγμα υδρογονανθράκων, το οποίο διαχωρίζεται με βάση το σημείο βρασμού και κατ' επέκταση το μέγεθος των μορίων. Έτσι, η βενζίνη

περιλαμβάνει υδρογονάνθρακες μεγέθους 6 έως 12 ατόμων άνθρακα, ενώ το πετρέλαιο 8 έως 28.

Σε πειράματα μελέτης της επίδρασης διάφορων οργανικών διαλυτών (κανονικό εξάνιο, επτάνιο, οκτάνιο δωδεκάνιο και δεκαεξάνιο), στο στέλεχος *Nocardia globerula* R-9, παρατηρήθηκε αύξηση του ρυθμού αποθείωσης με της αύξηση των ατόμων άνθρακα στο εύρος C6-C16, επομένως φαίνεται ότι το συγκεκριμένο στέλεχος είναι καταλληλότερο για την αποθείωση κλασμάτων βενζίνης και όχι ντίζελ [62]. Επίσης, στην περίπτωση των resting cells του στελέχους *Rhodococcus* sp. P32C1, παρατηρήθηκε αύξηση του ρυθμού αποθείωσης όσο αυξανόταν η συγκέντρωση του DBT στην οργανική φάση (εξάνιο, ξυλένιο και επτάνιο) [59].

Ταυτόχρονα, όσο αφορά τον λόγο O/W, φαίνεται να επηρεάζει την διαθεσιμότητα των οργανικών θειούχων ενώσεων προς αποθείωση. Γενικότερα, όσο μειώνεται ο λόγος O/W, τόσο αυξάνεται το κόστος διαχωρισμού της υδατικής από την οργανική φάση. Επομένως, απαιτείται μια χρυσή τομή μεταξύ του κόστους διαχωρισμού και του βέλτιστου δυνατού βαθμού αποθείωσης. Σε μελέτη της επίδρασης του λόγου O/W στο στέλεχος *Staphylococcus* sp. S3/C, παρατηρήθηκε μέγιστος βαθμός αποθείωσης στην αναλογία 2:1, ενώ ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αποθείωσης επιτεύχθη στην αναλογία 3:1. Ο μικρότερος ειδικός ρυθμός αποθείωσης παρατηρήθηκε στην αναλογία 10:1, πιθανότατα λόγω της μειωμένης επαφής του συνόλου των οργανικών θειούχων ενώσεων με την υδατική φάση καθώς και λόγω της περιορισμένης παροχής οξυγόνου στην καλλιέργεια [56]. Αντίστοιχη παρατήρηση πραγματοποιήθηκε και στην περίπτωση του στελέχους *Rhodococcus* sp. P32C1 [59]. Ωστόσο, την περίπτωση των resting cells του στελέχους *Pseudomonas delafieldii* R-8, παρατηρήθηκε βέλτιστη αναλογία 1:4, πιθανότατα λόγω του σχηματισμού γαλακτώματος, μέσω του οποίου εξασφαλιζόταν η μέγιστη δυνατή επιφάνεια επαφής των δύο φάσεων [60].

6. Μειονεκτήματα Βιομηχανικής εφαρμογής βιοαποθείωσης

Η βιολογική αποθείωση προς το παρόν εξετάζεται ως συμπληρωματική διεργασία της υδρογονοκατεργασίας, αλλά όχι ως αυτούσια μέθοδος αποθείωσης λόγω των δυσκολιών που σε βάθος χρόνου έχουν προκύψει. Αρχικά, η ανάπτυξη των καλλιεργειών απαιτεί την χρήση θρεπτικών μέσων υψηλού κόστους, ειδικά λαμβάνοντας υπόψη τους μεγάλους όγκους καλλιεργειών που απαιτούνται για την κάλυψη των αναγκών ενός διυληστηρίου, και κυρίως αν πρόκειται για μία συνεχή διεργασία. Το κόστος αυτό θα μπορούσε να αποφευχθεί με την χρήση βιομηχανικών αγροτικών αποβλήτων ως πηγών άνθρακα. Παράλληλα, υψηλό είναι και το κόστος των μικροοργανισμών, γεγονός που θα μπορούσε να αποφευχθεί με την ακινητοποίηση των βιοκαταλυτών, μέσω της οποίας εξασφαλίζεται η δυνατότητα της ανάκτησης και της επαναχρησιμοποίησης του βιοκαταλύτη, ενώ ευνοείται και ο διαχωρισμός της οργανικής από την υδατική φάση. Μία επιπλέον δυσκολία αποτελεί η διατήρηση στειρών συνθηκών και καθαρού περιβάλλοντος, δεδομένου του περιβάλλοντος

ενός διυλιστηρίου. Η αποστείρωση των θρεπτικών μέσων με την περαιτέρω χρήση αυτόκαυστων και η κατάλληλη αποθήκευση, ενδεχομένως να οδηγούν σε αύξηση του συνολικού κόστους. Ακόμα, η δημιουργία προβλημάτων μεταφοράς μάζας, τόσο στην μεταφορά των υποστρωμάτων όσο και των προϊόντων, από την οργανική στην υδατική φάση και το αντίστροφο αποτελεί περιοριστικό παράγοντα στην αύξηση της απόδοσης της διεργασίας, ειδικά εφόσον πρόκειται για την μεγάλη κλίμακα ενός διυλιστηρίου. [28]

Επίσης, καθοριστικό παράγοντα αποτελεί η εκλεκτικότητα ορισμένων μικροοργανισμών σε συγκεκριμένα υποστρώματα, με αποτέλεσμα την μη ικανοποιητική αποθείωση ενός ενδεχόμενου κλάσματος, λόγω της προτίμησης του οργανισμού σε συγκεκριμένη θειούχα ένωση. Ταυτόχρονα, πολύ οργανισμοί δεν διαθέτουν μεταβολικά μονοπάτια για τον μεταβολισμό αρκετών οργανικών θειούχων υποστρωμάτων, ενώ αρκετοί μικροοργανισμοί, όπως περιγράφεται ανωτέρω, διαθέτουν καταστροφικά μονοπάτια αποθείωσης, με αποτέλεσμα την υποβάθμιση της ποιότητας και της θερμογόνου δύναμης των καυσίμων. [8]

Τέλος, χαρακτηριστικό πρόβλημα της βιολογικής αποθείωσης σε μεγάλη κλίμακα είναι η καταστολή της έκφρασης των αποθειωτικών γονιδίων, όταν στο θρεπτικό μέσο βρίσκονται βιοδιαθέσιμες θειούχες ενώσεις (θειικά και θειώδη ιόντα, σουλφίδια, αμινοξέα), γεγονός που αποτελεί μεγάλο κίνδυνο δεδομένης της έντονης ποικιλομορφίας του υδρογονανθρακικού μείγματος του πετρελαίου. Ταυτόχρονα, κίνδυνο αποτελεί και η τοξικότητα ορισμένων υδρογονανθράκων, οι οποίοι σε υψηλές συγκεντρώσεις λειτουργούν παρεμποδιστικά στην ανάπτυξη των κυττάρων και στην αποθείωση (π.χ DBT), καθώς και η δημιουργία παρεμποδιστικών φαινομένων στην δράση των ενζύμων, λόγω της παραγωγής του προϊόντος της αποθείωσης, του 2-HBP.

7. Μελλοντικές προκλήσεις

Η παρουσία του θείου στο πετρέλαιο δημιουργεί, όπως αναφέρεται ανωτέρω, πληθώρα περιβαλλοντικών και οικονομικών προβλημάτων. Στο πλαίσιο της πρόληψης των αρνητικών συνεπειών της παρουσίας του θείου, έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές απομάκρυνσης του θείου, με κυρίαρχη σε βιομηχανικό επίπεδο τη υδρογονοαποθείωση. Οι συνεχώς μειούμενες προδιαγραφές της συγκέντρωσης του θείου στα καύσιμα μεταφοράς (Ultra- Low Sulfur), η δυσκολία απομάκρυνσης των επίμονων θειοφαινικών ενώσεων και η ταυτόχρονη μείωση των αποθεμάτων του αργού πετρελαίου, έχει οδηγήσει στην αναζήτηση νέων τεχνολογιών αποθείωσης, έναντι της εξαιρετικά ενεργοβόρας υδρογονοαποθείωσης. Η συμβατική υδρογονοαποθείωση απομακρύνει το 90% του θείου από το πετρέλαιο, αλλά περαιτέρω απομάκρυνση του θείου απαιτεί πολύ υψηλότερες θερμοκρασίες και πιέσεις, μεγαλύτερη ποσότητα καταλυτών υψηλού κόστους, και σημαντικά περισσότερη ποσότητα υδρογόνου.

Με στόχο την ανάπτυξη νέων τεχνικών, οικονομικότερων και φιλικότερων προς το περιβάλλον, διερευνήθηκε η ανάπτυξη της βιολογικής αποθείωσης. Η βιολογική αποθείωση αποτελεί μια οικονομικότερη μέθοδο αποθείωσης και πιο φιλική προς το περιβάλλον, εφόσον πραγματοποιείται σε ήπιες θερμοκρασίες και πιέσεις, δεν οδηγεί στην παραγωγή επικίνδυνων αποβλήτων, ενώ μπορεί να συνδυαστεί και με την σύνθεση πολύτιμων ουσιών όπως οι επιφανειοδραστικές ενώσεις. Στο πλαίσιο αυτής, πραγματοποιήθηκε μελέτη του μεταβολισμού των θειούχων ετεροκυκλικών ενώσεων, η οποία παρουσίασε έντονο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον. Παρόλα, αυτά η τεχνολογία αυτή δεν έχει καταφέρει να εφαρμοστεί σε μεγάλη κλίμακα, λόγω διάφορων περιορισμών οι οποίοι περιγράφονται παραπάνω.

Με στόχο να γίνει η βιολογική αποθείωση ανταγωνιστική σε σχέση με την επικρατούσα υδρογονοαποθείωση, απαιτούνται ορισμένα καθοριστικά βήματα για την βελτίωση της διεργασίας. Αρχικά, απαιτείται αύξηση της απόδοσης της διεργασίας, με την παραγωγή βιοκαταλυτών υψηλής ειδικής ενεργότητας, εφόσον προς το παρόν, οι βαθμοί απόδοσης των διεργασιών είναι αρκετά χαμηλοί. Ταυτόχρονα, απαιτείται η αναζήτηση νέων στελεχών ή η γενετική τροποποίηση των ήδη υπαρχόντων, με σκοπό την αύξηση του εύρους των προς αποθείωση υποστρωμάτων, καθώς και η αύξηση της ανοχής των μικροοργανισμών στην τοξικότητα των διαλυτών, με στόχο την δημιουργία βιοκαταλυτών υψηλής απόδοσης -ως προς το συνολικό θείο- και υψηλής διάρκειας ζωής. Αναγκαία θα ήταν και η γενετική τροποποίηση με στόχο την άρση καταστολής του *dsz* οπερονίου, όταν στο περιβάλλον του βρίσκονται βιοδιαθέσιμες ενώσεις. Παράλληλα, απαιτείται η ανάπτυξη δυνατότητας διαχωρισμού των βιοκαταλυτών, ανάκτησης και επαναχρησιμοποίησής τους, με σκοπό τη μείωση του κόστους παραγωγής του βιοκαταλύτη.

Μια ακόμα σημαντική πρόκληση προς επίλυση, είναι η μεταβλητότητα της τροφοδοσίας και η υψηλή ευαισθησία ενός βιολογικού συστήματος. Το διυλιστήριο καλείται να διατηρήσει την βιωσιμότητα της διεργασίας, δεδομένης μιας τροφοδοσίας χαμηλού pH, υψηλής θερμοκρασίας και μεταβλητής σύστασης. Το χαμηλό pH και η υψηλή θερμοκρασία των διεργασιών του διυλιστηρίου, μπορούν να αντιμετωπιστούν με την περαιτέρω ανάπτυξη των θερμόφιλων και τον οξεόφιλων μικροοργανισμών. Παράλληλα, απαιτείται η μελέτη της σωστής αναλογίας οργανικής και υδατικής φάσης, με στόχο την μεγιστοποίηση του λόγου αυτού, την μείωση του κόστους διαχωρισμού και τον περιορισμό των υδατικών αποβλήτων που σχετίζονται με την καλλιέργεια.

Οι απαιτήσεις της αγοράς δημιουργούν όλο και μεγαλύτερες απαιτήσεις όσο αφορά την συγκέντρωση των καυσίμων μεταφορών σε θείο. Η προδιαγραφές των καυσίμων εξαιρετικά χαμηλού θείου, ορίζουν την μέγιστη επιτρεπόμενη συγκέντρωση του θείου στα 50 mg/kg, με αποτέλεσμα να αυξάνονται σημαντικά τα κόστη της αποθείωσης. Η βιολογική αποθείωση θα μπορούσε να δράσει συμπληρωματικά της υδρογονοαποθείωσης, με στόχο την επίτευξη των χαμηλών αυτών προδιαγραφών, με σημαντικά λιγότερο κόστος και πολύ μικρότερο περιβαλλοντικό αποτύπωμα. Ωστόσο, με βάση τις έως τώρα εξελίξεις, η βιολογική

αποθείωση σε βιομηχανική κλίμακα δεν αποτελεί βιώσιμη και ανταγωνιστική λύση, παρά τις υψηλές προοπτικές της ως βιοτεχνολογική εφαρμογή στον τομέα της ενέργειας.

8. Υλικά και Μέθοδοι

8.1 Όργανα και συσκευές

Στο πλαίσιο της συγκεκριμένης μελέτης, χρησιμοποιήθηκαν τα εξής όργανα:

- Βιοαντιδραστήρας: Infors HT Labfors
- Περιστροφικός επωαστήρας: Thermo Shaker TS-100 (BOECO, Germany)
- Φωτόμετρο: Multiskan GO Microplate Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA)
- Υγρός χρωματογράφος υψηλής απόδοσης: Agilent HPLC 1220 Infinity LC System, με ανιχνευτή φθορισμού (FLD) και στήλη αντιστρόφου φάσης με δεκαοκτάνιο (C-18) (Poroshell 120 EC-C18, 4 μm, 4.6x150 mm, Agilent)
- Αέριος χρωματογράφος: Agilent 5890 Gas Chromatographer

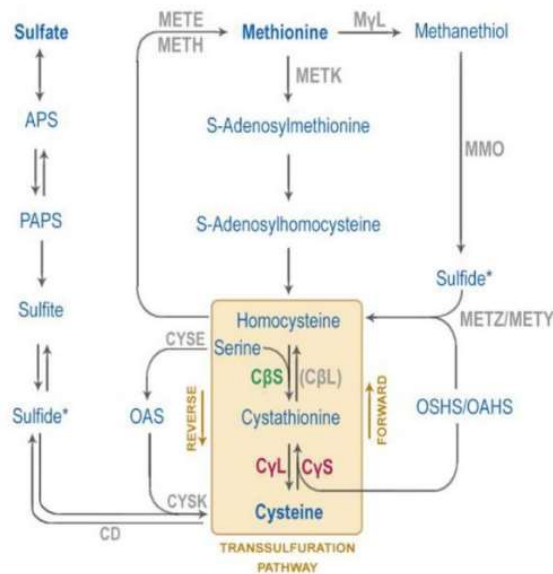
8.2 Μικροοργανισμοί

Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην συγκεκριμένη διπλωματική είναι τα εξής:

Πίνακας 3. Στέλεχη *Rhodococcus* που χρησιμοποιήθηκαν.

Στέλεχος	Περιγραφή	Πηγή
R. qingshengii IGTS8 (wt)	Στέλεχος φυσικού τύπου	ATCC 53968
<i>cbsΔ</i>	Γενετικά τροποποιημένο στέλεχος IGTS8 με διαγραφή του γονιδίου <i>cbs</i>	[63]
<i>metBΔ</i>	Γενετικά τροποποιημένο στέλεχος IGTS8 με διαγραφή του γονιδίου <i>metB</i>	[63]

Τα γενετικά τροποποιημένα στελέχη *cbsΔ* και *metBΔ*, προέκυψαν από σταθερές γενετικές τροποποιήσεις μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού σε δύο βήματα, και πρόκειται για γονιδιακές διαγραφές των γονιδίων *cbs* και *metB*, αντίστοιχα, από το βακτηριακό χρωμόσωμα [63].



Εικόνα 14. Μεταβολικό μονοπάτι βιοσύνθεσης και αλληλομετατροπής της κυστεΐνης και της μεθειονίνης, στο πλαίσιο του μονοπατιού αφομοίωσης του θείου. [63]

Τα δύο αυτά γονίδια κωδικοποιούν ένζυμα του μεταβολικού μονοπατιού αφομοίωσης του θείου και της βιοσύνθεσης της κυστεΐνης και της μεθειονίνης. Συγκεκριμένα, καταλύουν την αλληλομετατροπή των δύο αμινοξέων, μέσω του σχηματισμού δύο ενδιάμεσων προϊόντων, της ομοκυστεΐνης και της κυσταθειονίνης (transsulfuration pathway). Το γονίδιο *cbs* κωδικοποιεί τη β-συνθάση της κυσταθειονίνης (CβS), υπεύθυνο για την παραγωγή κυσταθειονίνης λαμβάνοντας ως υποστρώματα την ομοκυστεΐνη και την σερίνη, ενώ το γονίδιο *metB* κωδικοποιεί την γ-λυάση της κυσταθειονίνης (CyS), το οποίο καταλύει τη διάσπαση της κυσταθειονίνης, με προϊόντα την κυστεΐνη, το 2-oxobutanoate και την αμμωνία. [63]

8.3 Θρεπτικά μέσα

Στο πλαίσιο της μελέτης της αποθειωτικής ικανότητας των τριών στελεχών, πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια των μικροοργανισμών σε στερεό θρεπτικό μέσο Luria-Bertani Peptone (LBP-agar). Η σύσταση του στερεού θρεπτικού μέσου:

Πίνακας 4. Σύσταση LBP-agar.

Αντιδραστήριο	Συγκέντρωση (% w/v)
Yeast Extract	1
NaCl	1
Peptone	0.5
Agar	1.5

Το pH του θρεπτικού ρυθμίζεται στο 7, με την προσθήκη διαλύματος καυστικού νατρίου.

Επίσης, το υγρό θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια των μικροοργανισμών στον βιοαντιδραστήρα ήταν θρεπτικό μέσο χημικά προκαθορισμένης σύστασης (chemically defined medium – CDM), με την εξής σύσταση:

Πίνακας 5. Σύσταση του θρεπτικού μέσου CDM

Διάλυμα Α - Ρυθμιστικό Διάλυμα φωσφορικών PO ₄ ³⁻ (20x)	
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	75.84 g/L
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	65.10 g/L
Διάλυμα Β (20x)	
NH ₄ Cl	16g/L
NaCl	170g/L
KCl	10g/L
Διάλυμα C – Διάλυμα αλάτων (1000x)	
MgCl ₂ ·6H ₂ O	324g/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O	29.4g/L
Διάλυμα D - Πυκνό διάλυμα ιχνοστοιχείων (1000x)	
Na ₂ -EDTA	5.2g/L
FeCl ₂ ·4H ₂ O	3mg/L
H ₂ BO ₃	30mg/L
MnCl ₂ ·4H ₂ O	100mg/L
CoCl ₂ ·6H ₂ O	190mg/L
NiCl ₂ ·6H ₂ O	24g/L
CuCl ₂	0.2mg/L
ZnCl ₂	0.5mg/L
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	36g/L
Διάλυμα Ε – Πυκνό διάλυμα βιταμινών (1000x)	
4-aminobeznoic acid	0.4mg/L
nicotinic acid	1mg/L
Calcium D- (+) Pantothenate	0.5mg/L
Pyridoxal Hydrochloride	1.5mg/L
Διάλυμα G -Se-Wo- (1000x)	
NaOH	400mg/L
Na ₂ SeO ₃ ·5H ₂ O	6mg/L
Na ₂ WO ₄ ·2H ₂ O	8mg

Το διάλυμα Ε παρασκευάζεται με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών.

Το pH του διαλύματος D ρυθμίζεται στο 6.5, με την χρήση καυστικού νατρίου.

Τα διαλύματα C, D, E, και G αποστειρώνονται με την χρήση φίλτρου.

Ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιείται αιθανόλη, καθαρότητας 99.8%.

Στο πλαίσιο της μελέτης χρησιμοποιούνται τρεις διαφορετικές πηγές θείου, θειικά ιόντα, μεθειονίνη και DMSO.

Στην περίπτωση των θειικών ιόντων, παρασκευάστηκε πυκνό διάλυμα $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ συγκέντρωσης 2.5M. Η χρησιμοποιούμενη ποσότητα εξαρτάται από την επιθυμητή τελική συγκέντρωση της πηγής θείου.

Στην περίπτωση, της μεθειονίνης ως πηγή θείου, πραγματοποιούταν εκ νέου η παρασκευή διαλύματος 0.5 M, η ποσότητα του οποίου διέφερε, ανάλογα με την επιθυμητή τελική συγκέντρωση και με τον τελικό όγκο του θρεπτικού μέσου. Για την παρασκευή του διαλύματος χρησιμοποιούταν αποστειρωμένο απιονισμένο νερό.

Στην περίπτωση του διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO) ως πηγή άνθρακα, χρησιμοποιήθηκε πυκνό διάλυμα συγκέντρωσης 14.11M, η ποσότητα του οποίου εξαρτάται από τον τελικό όγκο του θρεπτικού μέσου.

Αρχικά, πραγματοποιείται αποστείρωση του βιοαντιδραστήρα με το απαιτούμενο νερό και τα διαλύματα A και B. Αν ως πηγή θείου χρησιμοποιούνται τα θειικά ιόντα, προστίθεται και το πυκνό διάλυμα θειικών. Εναλλακτικά, η πηγή θείου, η πηγή άνθρακα, και τα διαλύματα C, D, E, G προστίθενται μετά την αποστείρωση, με την χρήση αποστειρωμένης σύριγγας.

Ο τελικός όγκος του θρεπτικού μέσου είναι 5L για τις διεργασίες διαλείποντος έργου (batch), και 3L για τις διεργασίες ημιδιαλείποντος έργου (fed-batch).

Στην περίπτωση των διεργασιών ημιδιαλείποντος έργου, πραγματοποιείται παρασκευή επιπλέον 4L θρεπτικού υλικού ίδιας σύστασης, με διαφορά στην συγκέντρωση της πηγής άνθρακα, δηλαδή της αιθανόλης.

8.4 Χημικά και ρυθμιστικά διαλύματα

Για την συγκομιδή των βακτηρίων από τις στερεές καλλιέργειες και την μετατροπή τους σε μη αναπτυσσόμενα κύτταρα (resting cells), απαιτείται η χρήση διαλύματος Ringer (Ringer's Solution), με την εξής σύσταση:

Πίνακας 6. Σύσταση Διαλύματος Ringer.

NaCl	7.2 g/L
CaCl ₂	0.17g/L
KCl	0.37g/L

Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται με την προσθήκη διαλυμάτων υδροχλωρίου και καυστικού νατρίου, ίσο με 7.

Επίσης, για την διεξαγωγή της δοκιμασίας αποθείωσης απαιτείται χρήση ρυθμιστικού διαλύματος HEPES, συγκέντρωσης 50 mM ($M_r=238.31\text{g/mol}$, άρα 11.92 g/L) και pH=8. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται με την προσθήκη καυστικού νατρίου.

Επισημαίνεται ότι για την παρασκευή όλων των θρεπτικών μέσων και των διαλυμάτων χρησιμοποιείται απιονισμένο νερό.

8.5 Προετοιμασία εμβολίου - Συνθήκες λειτουργίας Αντιδραστήρα

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια του εκάστοτε στελέχους σε τρυβλία με LBP-agar (10 για τις batch διεργασίες, 6 για τις fed-batch διεργασίες), και στην συνέχεια επώασή στους 30°C, για 72h. Ο αριθμός των τρυβλίων είναι σταθερός για το κάθε είδος διεργασίας και αποσκοπεί σε αρχική συγκέντρωση βιομάζας στον αντιδραστήρα ίση με 0.05 g/L.

Για την προετοιμασία του εμβολίου, πραγματοποιήθηκε συγκομιδή των κυττάρων από τα τρυβλία, και αναδιάλυσή τους σε διάλυμα Ringer. Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ο εμβολιασμός του θρεπτικού μέσου του αντιδραστήρα, με την χρήση αποστειρωμένης σύριγγας και παρουσία φλόγας.

Οι συνθήκες ανάπτυξης στον αντιδραστήρα ήταν θερμοκρασία 30°C, pH 7, ταχύτητα ανάδευσης 450 rpm και αερισμός 1 vol/vol/min. Το pH της διεργασίας ρυθμιζόταν με την προσθήκη διαλυμάτων NaOH 1M και HCl 1M. Επίσης, πραγματοποιούταν προσθήκη μερικών σταγόνων αντιαφριστικού διαλύματος πολυπροπυλενογλυκόλης, στην αρχή της καλλιέργειας. Κατά την διάρκεια της διεργασίας, πραγματοποιούταν λήψη δειγμάτων ανά συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα, με σκοπό τον προσδιορισμό της οπτικής πυκνότητας (OD_{600}) και της αποθειωτικής ικανότητας. Ο προσδιορισμός της οπτικής πυκνότητας αποσκοπεί στον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της βιομάζας, εφόσον η σχέση της οπτικής πυκνότητας στα του φωτομέτρου στα 600 nm είναι ανάλογη με την συγκέντρωση των κυττάρων. Ο τερματισμός του πειράματος πραγματοποιούταν όταν σημειωνόταν μείωση της αποθειωτικής ικανότητας, ή παύση της ανάπτυξης.

Στην περίπτωση των διεργασιών ημιδιαλείποντος έργου, πραγματοποιούταν καλλιέργεια σε συνθήκες διαλείποντος έργου, και στο μέσο της εκθετικής φάσης (46-51h), πραγματοποιούταν σύνδεση του επιπλέον θρεπτικού υλικού. Η ρίψη του επιπλέον θρεπτικού πραγματοποιούταν με σταθερό ρυθμό, με την χρήση αντλίας.

8.6 Προσδιορισμός αποθειωτικής ικανότητας (Desulfurization assay)

Για τον προσδιορισμό της αποθειωτικής ικανότητας πραγματοποιείται λήψη δείγματος 0.1-4 ml, ανάλογα με την συγκέντρωση της βιομάζας την συγκεκριμένη χρονική στιγμή, και φυγοκέντρωσή του στις 3000rpm για 10 min. Το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης, δηλαδή το θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας, απορρίπτεται, και πραγματοποιείται αναδιάλυση των κυττάρων σε διάλυμα HEPES, με σκοπό την πλήρη απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού. Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 10min στις 3000rpm και απόρριψη του υπερκειμένου. Το εναπομείναν ίζημα κυττάρων αναδιαλύεται σε διάλυμα HEPES, τελικού όγκου 450μL. Πραγματοποιείται διαχωρισμός του όγκου αυτού σε τρία erpendorfs 150μL (t_0 , t_1 , t_2). Τα t_1 και t_2 αποτελούν τεχνικά αντίγραφα της δοκιμασίας. Στην συνέχεια, παρασκευάζεται διάλυμα DBT 2mM σε HEPES, από αρχικό stock 100 mM DBT σε αιθανόλη, και προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος 2mM, στα δύο εκ των τριών erpendorfs. Έτσι, η συγκέντρωση του DBT καταλήγει να είναι 1mM. Ακολουθεί επώαση στους 30°C, για 30min, με ανάδευση 1200rpm. Η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη ίσου όγκου (300μL) ακετονιτριλίου (ACN) και έντονη ανάδευση (vortex). Έπειτα, πραγματοποιείται φυγοκέντρωση στις 11000rpm για 10 min, λαμβάνεται το υπερκείμενο και αποθηκεύεται στους -20°C, έως την ανάλυση του δείγματος στο HPLC.

Στην περίπτωση του t_0 , προηγείται η προσθήκη του ACN, ώστε να μην πραγματοποιηθεί η αντίδραση, και στην συνέχεια προστίθεται το διάλυμα DBT. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 11000rpm για 10 min, λαμβάνεται το υπερκείμενο, και αποθηκεύεται, ομοίως με τα t_1 και t_2 .

8.7 Ανάλυση με HPLC

Η δοκιμασία αποθείωσης βασίζεται στην ανίχνευση του παραγόμενου 2HBP, μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, με ανιχνευτή φθορισμού. Στην ουσία, πραγματοποιείται διαχωρισμός των ενώσεων με βάση την πολικότητά τους, η οποία αντικατοπτρίζεται στην χρονική στιγμή της έκλουσης. Ο ρυθμός ροής της κινητής φάσης είναι 1.2 mL/min, και η βαθμίδωση έκλουσης (elution gradient) αποτελείται από 4 min ισοκρατικής έκλουσης με διαλύτη 60/40 ACN/H₂O, και στην συνέχεια 15min γραμμικής βαθμίδωσης έως την παροχή 100% ACN. Η ανίχνευση του φθορισμού πραγματοποιείται σε μήκη κύματος 245nm (διέγερση) και 345nm (εκπομπή). Το 2HBP εκλύεται περίπου στα 3min. Η ποσοτικοποίησή του πραγματοποιείται με βάση την κατάλληλη καμπύλη βαθμονόμησης, εφόσον η επιφάνεια της κορυφής του χρωματογραφήματος εμφανίζει γραμμική σχέση με την συγκέντρωση του 2HBP (γραμμικό εύρος από 10-1000ng/mL).

8.9 Υπολογισμός αποθειωτικής ικανότητας

Ως μονάδα αποθειωτικής ικανότητας ορίζεται το 1nmole παραγόμενου 2HBP ανά την ώρα, το οποίο αντιστοιχεί σε ένα Unit (U). Συγκεκριμένα, η ενζυμική ενεργότητα εκφράζεται ανά μονάδα ξηρής βιομάζας κυττάρων (dry cell weight – mg dcw).

Οι υπολογισμοί που πραγματοποιούνται είναι οι εξής:

$$X = \frac{X_0 \cdot V}{450 \mu L} \quad (1)$$

$$X_R = \frac{X}{2} \quad (2)$$

$$C_{HBP_{1,2}} = 2 \cdot (HBP_{1,2} - HBP_0) \cdot 0.0356 \quad (3)$$

$$C_{HBP} = \frac{C_{HBP_1} + C_{HBP_2}}{2} \quad (4)$$

$$U/mg = \frac{C_{HBP}}{X_R \cdot 0.5} \quad (5)$$

$$U/L = U/mg \cdot X \quad (6)$$

Όπου:

- X_0 η συγκέντρωση της βιομάζας (mg/mL)
- V ο όγκος του δείγματος (μL)
- X η τελική συγκέντρωση της βιομάζας, στον όγκο των 450μL
- X_R η συγκέντρωση της βιομάζας στον όγκο της αντίδρασης
- HBP_x το εμβαδόν της επιφάνειας της κορυφής του δείγματος t_x ($x=0,1,2$)
- C_{HBP_x} η συγκέντρωση του HBP το κάθε δείγμα ($x=1,2$)
- C_{HBP} η μέση τιμή της συγκέντρωσης του HBP

9. Αποτελέσματα – Συζήτηση

Στο πλαίσιο της διερεύνησης της βιοαποθείωσης, έχει πραγματοποιηθεί πληθώρα μελετών πάνω στην αποθειωτική ικανότητα του στελέχους *R. qingshengii* IGTS8, ενός από τους εκτενέστερα μελετημένους μικροοργανισμούς, όσο αφορά τα βιολογικά συστήματα αποθείωσης. Με στόχο την βελτιστοποίηση της καλλιέργειας κυττάρων υψηλής αποθειωτικής ικανότητας, έχει πραγματοποιηθεί αριστοποίηση της σύστασης του θρεπτικού μέσου, με την δοκιμή διαφορετικών πηγών άνθρακα (αιθανόλη, γλυκερόλη, γλυκόζη, γλουταμικό οξύ κλπ.) και θείου (DMSO, DBT, $MgSO_4$ κ.ά) [65][66]. Ταυτόχρονα, έχουν βελτιστοποιηθεί οι διάφορες φυσικές απαιτήσεις της καλλιέργειας (θερμοκρασία, pH,

συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου) [44], ενώ έχει εξεταστεί και η χρήση βιοαντιδραστήρα για την καλλιέργεια κυττάρων και την ταυτόχρονη αποθείωση. Παράλληλα, έχουν πραγματοποιηθεί διάφορες γενετικές τροποποιήσεις του φυσικού τύπου στελέχους, όπως περιγράφονται στο υποκεφάλαιο 4, με στόχο την βελτίωση της αποθειωτικής ικανότητας και την άρση της καταστολής των αποθειωτικών γονιδίων, παρουσία βιοδιαθέσιμων ενώσεων θείου, όπως η μεθειονίνη, τα θειικά ιόντα και η κυστεΐνη.

Στο πλαίσιο της συγκεκριμένης διπλωματικής, εξετάζονται δύο γενετικά τροποποιημένα στελέχη, τα *cbsΔ* και *metBΔ*, που όπως περιγράφεται παραπάνω, έχουν προκύψει από γονιδιακές διαγραφές των *cbs* και *metB*, αντίστοιχα, από το βακτηριακό χρωμόσωμα. Στόχος των διαγραφών αυτών είναι αφενός η μελέτη του μηχανισμού της καταστολής των αποθειωτικών γονιδίων και αφετέρου η βελτίωση της αποθειωτικής ικανότητας, με γενετικές τροποποιήσεις στο μονοπάτι μεταβολισμού του θείου, χωρίς επέμβαση στο *dsz* οπερόνιο.

Με βάση την βιβλιογραφία, η αιθανόλη αποτελεί την προτιμώμενη πηγή άνθρακα, όσο αφορά την παραγωγή βιομάζας και την αποθειωτική ικανότητα του φυσικού τύπου στελέχους [63] [67]. Σύμφωνα με τους Martzoukou et al., τα προαναφερθέντα στελέχη καλλιεργήθηκαν παρουσία αιθανόλης, ως πηγής άνθρακα, και DMSO, ως πηγής αζώτου, με στόχο την σύγκριση του ρυθμού ανάπτυξης βιομάζας και της αποθειωτικής ικανότητας, σε συνθήκες μη καταστολής. Στην συνέχεια, εξετάστηκε η επίδραση της πηγής θείου (μεθειονίνη, κυστεΐνη και θειικά ιόντα), και προέκυψε ότι το *cbsΔ* παρουσιάζει την βέλτιστη ανάπτυξη και αποθειωτική ικανότητα παρουσία θειικών ιόντων, ενώ το *metBΔ* αναπτύσσεται καλύτερα παρουσία μεθειονίνης και παρουσιάζει υψηλή αποθειωτική ικανότητα στις 65 ώρες ανάπτυξης. Παρουσία κυστεΐνης, και τα τρία στελέχη, παρουσίαζαν πρακτική μηδενική αποθειωτική ικανότητα. Στόχο των παραπάνω, αποτελεί η μελέτη της ανάπτυξης της βιομάζας και της αποθειωτικής ικανότητας, σε συνθήκες που οδηγούν σε καταστολή της αποθειωτικής ικανότητας στο φυσικού τύπου στέλεχος. [63]

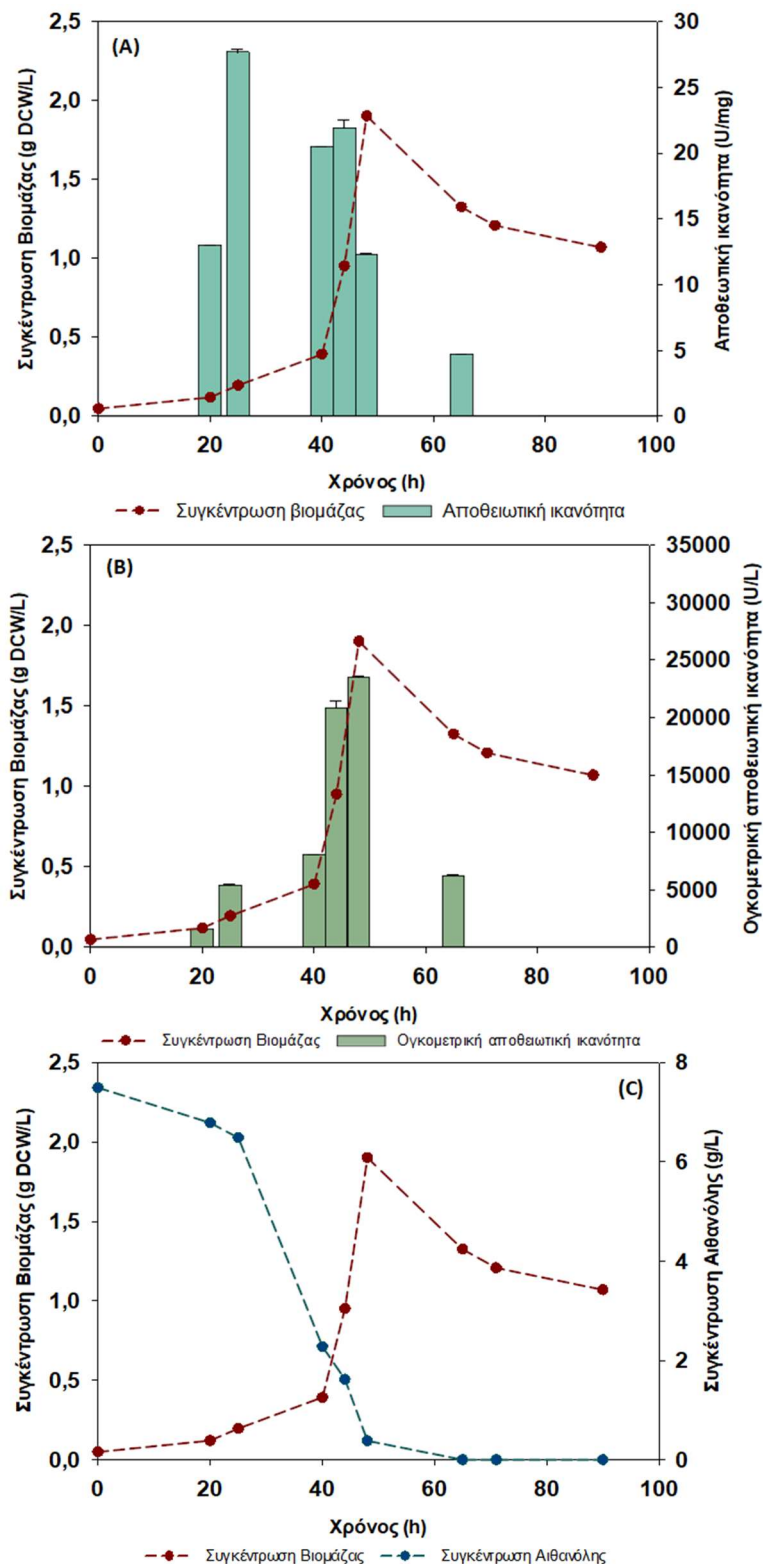
Με βάση αυτά, εξετάζεται η καλλιέργεια των τριών στελεχών σε αντιδραστήρα διαλείποντος έργου, σε πηγή άνθρακα αιθανόλη, και με πηγή θείου του βιβλιογραφικά προτεινόμενη.

9.1 Ανάπτυξη σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου *R. qingshengii* IGTS8 (wt)

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια του φυσικού τύπου στελέχους, σε αντιδραστήρα διαλείποντος έργου όγκου 5L, με το θρεπτικό υπόστρωμα που περιγράφεται στην ενότητα 8.3. Η συγκέντρωση της πηγής άνθρακα, δηλαδή της αιθανόλης ήταν 7.6 g/L (165 mM), ενώ της πηγής θείου, δηλαδή του DMSO ήταν 1mM.

Η αιθανόλη αποτελεί την πηγή άνθρακα με την μεγαλύτερη απόδοση σε κυτταρική μάζα, ανάμεσα στην γλυκερόλη και την γλυκόζη [63], όπως και στο στέλεχος *R. erythropolis* KA2-5-1 [66]. Αντίστοιχα, το DMSO αποτελεί πηγή θείου που δεν οδηγεί σε καταστολή της

αποθειωτικής ικανότητας Η καμπύλη ανάπτυξης του φυσικού τύπου στελέχους, σε συνάρτηση με την αποθειωτική του ικανότητα, παρατίθεται στο διάγραμμα (1).



Διάγραμμα 1. Καμπύλη ανάπτυξης του *R. qingshenghii* IGTS8, παρουσία 7.6g/L αιθανόλης και 1mM DMSO, συναρτήσει: (A) της αποθειωτικής ικανότητας, (B) της ογκομετρικής αποθειωτικής ικανότητας, (C) της συγκέντρωσης αιθανόλης.

Με βάση τα παραπάνω, η μέγιστη συγκέντρωση της βιομάζας είναι 1.90 g DCW/L και σημειώνεται στις 48h ανάπτυξης, ενώ η μέγιστη αποθειωτική ικανότητα είναι 27.68 ± 0.24 U/mg, παρατηρείται στις 25h, παρόλο που βιβλιογραφικά αναμένεται στο μέσο της εκθετικής φάσης. Επίσης, ο θάνατος της καλλιέργειας συνδέεται άμεσα με την μείωση της αποθειωτικής ικανότητας.

Ταυτόχρονα, με βάση την καμπύλη κατανάλωσης της αιθανόλης, παρατηρείται μηδενισμός του υποστρώματος στο τέλος της εκθετικής φάσης, γεγονός που αιτιολογεί την μείωση της αποθειωτικής ικανότητας και την έναρξη της φάσης θανάτου.

Αντίστοιχα, η αποθειωτική ικανότητα ανά λίτρο καλλιέργειας παρουσιάζει την μέγιστη αποθειωτική ικανότητα στο τέλος της εκθετικής φάσης. Η μεγιστοποίηση σε αυτό το σημείο οφείλεται στην αύξηση της συγκέντρωσης της βιομάζας και όχι στην βέλτιστη αποθειωτική ικανότητα.

9.2 Ανάπτυξη σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου του στελέχους cbsΔ

Η ανάπτυξη του γενετικά τροποποιημένου στελέχους cbsΔ πραγματοποιήθηκε σε αντιδραστήρα διαλείποντος έργου όγκου 5L, με το θρεπτικό υπόστρωμα που περιγράφεται στην ενότητα 8.3. Η συγκέντρωση της πηγής άνθρακα, δηλαδή της αιθανόλης ήταν 7.6 g/L (165mM) ενώ της πηγής θείου, δηλαδή των SO_4^{2-} ήταν 1mM (0.096 g/L).

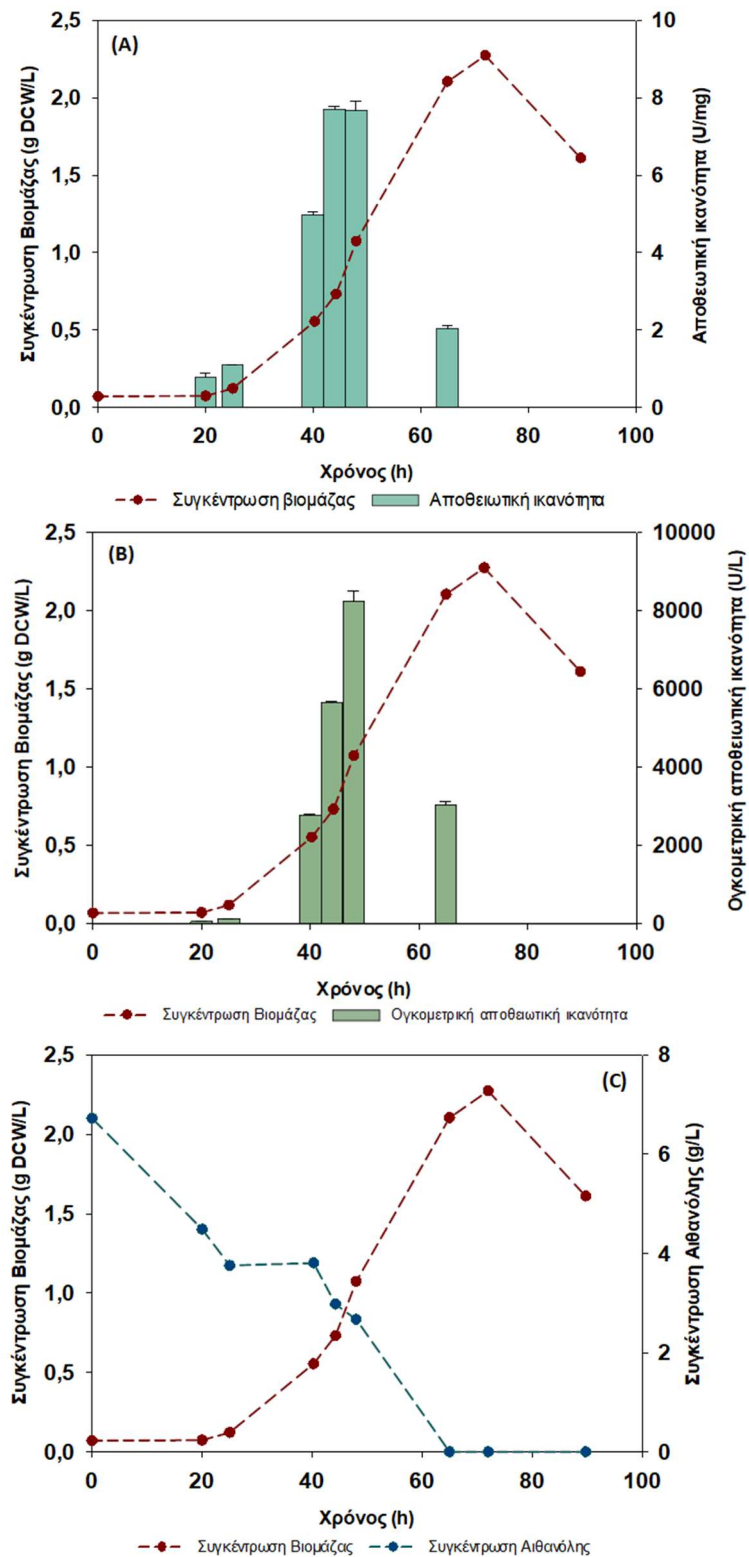
Στο φυσικού τύπου στέλεχος παρατηρείται έντονη καταστολή της αποθειωτικής ενεργότητας του μικροοργανισμού, όταν χρησιμοποιούνται ως μοναδική πηγή θείου τα θειικά ιόντα [65]. Ωστόσο, η γενετική διαγραφή του γονιδίου cbs, συμβάλλει στην άρση της καταστολής των αποθειωτικών γονιδίων, παρουσία θειικών ιόντων [63].

Η καμπύλη ανάπτυξη του στελέχους cbsΔ, σε συνάρτηση με την αποθειωτική ικανότητα και την συγκέντρωση της αιθανόλης, παρουσιάζεται στο διάγραμμα (2).

Με βάση την καμπύλη ανάπτυξης του στελέχους cbsΔ, η μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας είναι 2.28 g DCW/L και επιτυγχάνεται στις 65 ώρες ανάπτυξης. Η μέγιστη αποθειωτική ικανότητα παρατηρείται στο μέσο της εκθετικής φάσης (44h, 7.70 ± 0.07 U/mg), όπως αναμένεται βιβλιογραφικά για το φυσικού τύπου στέλεχος [44]. Παρόλα αυτά, η παρατηρούμενη αποθειωτική ικανότητα είναι σημαντικά χαμηλότερη από αυτή του φυσικού τύπου στελέχους κατά 3.6 φορές. Παράλληλα, παρατίθεται η καμπύλη κατανάλωσης της αιθανόλης.

Παρατηρείται ότι η κατανάλωση της αιθανόλης συνδέεται άμεσα με την παύση της κυτταρικής ανάπτυξης και τον θάνατο της καλλιέργειας. Μάλιστα, ο μηδενισμός της πηγής άνθρακα συνδέεται με την έναρξη της φάσης θανάτου. Αντίστοιχα, παρατήρηση

πραγματοποιείται και όσο αφορά την μείωση της αποθειωτικής ικανότητας, λόγω της μείωσης της συγκέντρωσης του υποστρώματος.



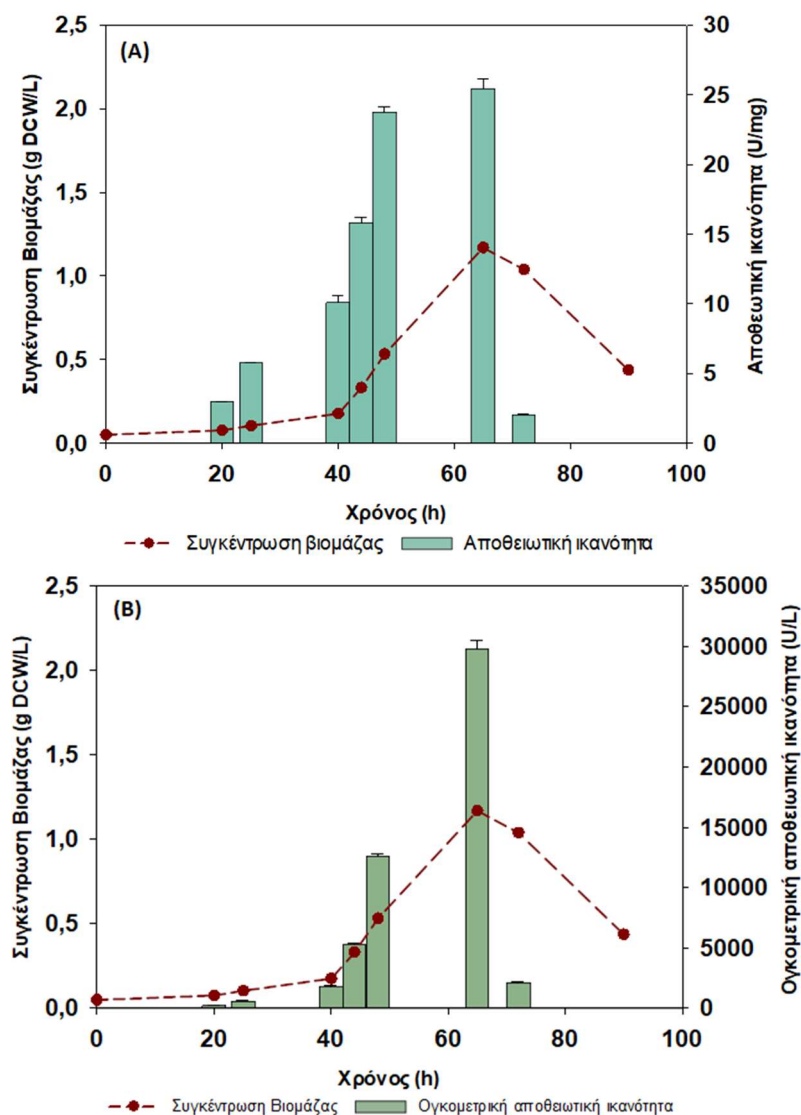
Διάγραμμα 2. Καμπύλη ανάπτυξης του στελέχους *cbsΔ*, παρουσία 7.6g/L αιθανόλης και 1mM SO_4^{2-} , συναρτήσει: (A) της αποθειωτικής ικανότητας, (B) της ογκομετρικής αποθειωτικής ικανότητας, (C) της συγκέντρωσης αιθανόλης.

9.3 Ανάπτυξη σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου του στελέχους metBΔ

Όσο αφορά το στέλεχος metBΔ, ανάπτυξή του πραγματοποιήθηκε σε αντιδραστήρα διαλείποντος έργου όγκου 5L, με το θρεπτικό υπόστρωμα που περιγράφεται στην ενότητα 8.3. Η συγκέντρωση της πηγής άνθρακα, δηλαδή της αιθανόλης ήταν 7.6 g/L (165mM) ενώ της πηγής θείου, δηλαδή της μεθειονίνης ήταν 1mM.

Η μεθειονίνη αποτελεί ιδανική πηγή θείου για το στέλεχος metBΔ, σε αντίθεση με το φυσικού τύπου στέλεχος, το οποίο παρουσία μεθειονίνης παρουσιάζει χαμηλό ρυθμό ανάπτυξης και ελάχιστη αποθειωτική ικανότητα [63].

Η καμπύλη ανάπτυξης, σε συνάρτηση με την αποθειωτική ικανότητα της καλλιέργειας, παρουσιάζεται στο διάγραμμα (3).



Διάγραμμα 3. Καμπύλη ανάπτυξης του στελέχους metBΔ, παρουσία 7.6g/L αιθανόλης και 1mM μεθειονίνη, συναρτήσε: (A) της αποθειωτικής ικανότητας, (B) της ογκομετρικής αποθειωτικής ικανότητας.

Με βάση τις καμπύλες ανάπτυξης, παρουσία μεθειονίνης το τροποποιημένο στέλεχος παρουσιάζει μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας και, ταυτόχρονα, μέγιστη αποθειωτική ικανότητα στις 65h ανάπτυξης, 1.17 g DCW/L και 25.46±0.65 U/mg, σε αντίθεση με το στέλεχος φυσικού τύπου που παρουσίαζε μέγιστο στο μέσο της εκθετικής φάσης. Παράλληλα, η ειδική αποθειωτική ενεργότητα (U/mg) φαίνεται να διατηρείται σταθερή κατά το χρονικό διάστημα 48-65h, ωστόσο λόγω της σημαντικής αύξησης της συγκέντρωσης της βιομάζας, αυξάνεται σημαντικά η αποθειωτική ενεργότητα κατ'όγκο (U/L).

Με στόχο την σύγκριση των τριών στελεχών, υπολογίζονται τα κινητικά χαρακτηριστικά της ανάπτυξής τους.

Στην εκθετική φάση ανάπτυξης (λογαριθμική φάση) ο ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων είναι πρώτης τάξης:

$$\frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = \mu_{net} = constant = \mu_{max} \quad (\text{Εξ. 1})$$

Όπου X η συγκέντρωση των κυττάρων (g DCW/L), μ_{net} (h^{-1}) ο καθαρός ειδικός ρυθμός ανάπτυξης και μ_{max} (h^{-1}) μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης.

Με ολοκλήρωση της εξίσωσης (1) για $X=X_0$, $t=0$ προκύπτει:

$$\ln \frac{X}{X_0} = \mu_{max} t \quad (\text{Εξ. 2})$$

Ο χρόνος διπλασιασμού των κυττάρων δίνεται από την εξίσωση (3):

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu_{max}} \quad (\text{Εξ. 3})$$

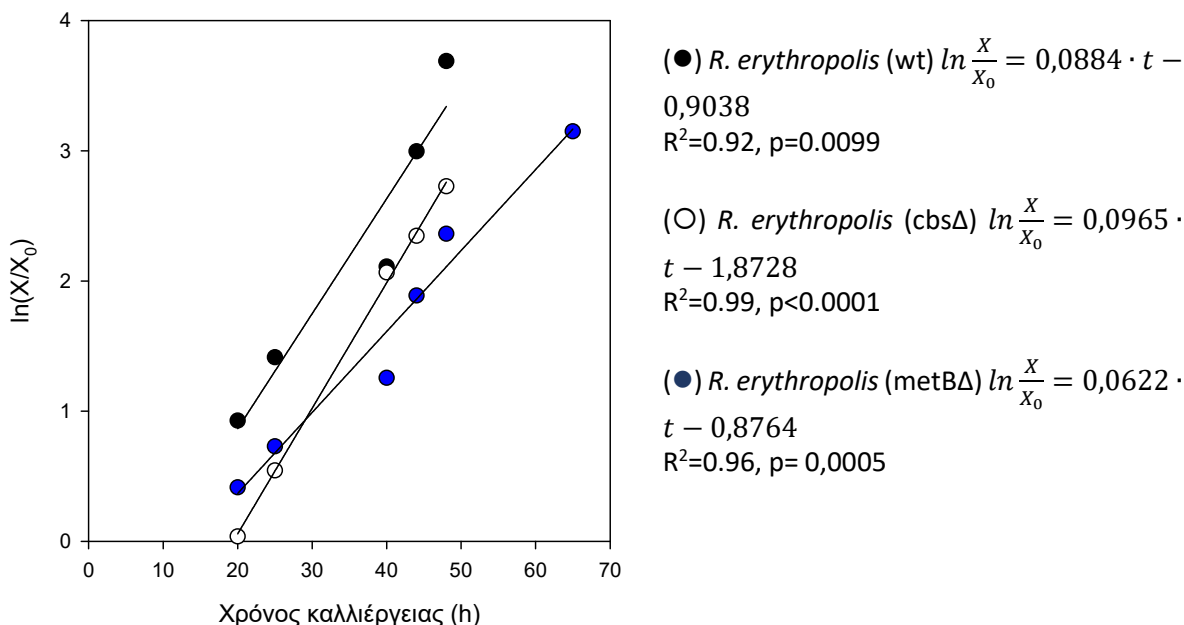
Ο συντελεστής μετατροπής υποστρώματος σε κυτταρική μάζα ($Y_{X/S}$), καθώς και η ογκομετρική παραγωγικότητα σε κύτταρα (Q_X) υπολογίζονται από τις εξισώσεις (4) και (5) αντίστοιχα:

$$Y_{X/S} = -\frac{dX}{dS} \quad (\text{Εξ. 4})$$

$$Q_X = \frac{X_t - X_0}{t} \quad (\text{Εξ. 5})$$

Όπου X_0 και X_t η συγκέντρωση των κυττάρων (g DCW/L) τις χρονικές στιγμές 0 και t, αντίστοιχα.

Ο υπολογισμός του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης πραγματοποιείται με γραφική απεικόνιση του $\ln \frac{X}{X_0}$ συναρτήσεως του χρόνου καλλιέργειας t. Η κλίση της ευθείας γραμμής που συνδέει τα δεδομένα είναι η τιμή του μ_{max} (h^{-1}) (Διάγραμμα 4).



Διάγραμμα 4. Υπολογισμός μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης (μ_{max}) για τους (●) *R. qingshengii* (wt) (○) *cbsΔ*, (●) *metBΔ*

Τα κινητικά χαρακτηριστικά των τριών στελεχών παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7.Κινητικά χαρακτηριστικά των στελεχών wt, cbsΔ, metBΔ του *R. qingshengii* IGTS8.

Στέλεχος	X_{max} (g DCW/L)	μ_{max} (h ⁻¹)	$t_{1/2}$ (h)	$Y_{x/s}$ (g/g)	Q_x (g DCW/L/h)
wt	1.90	0.09	7.84	0.25	0.04
cbsΔ	2.28	0.10	7.18	0.34	0.03
metBΔ	1.17	0.06	11.14	0.15	0.02

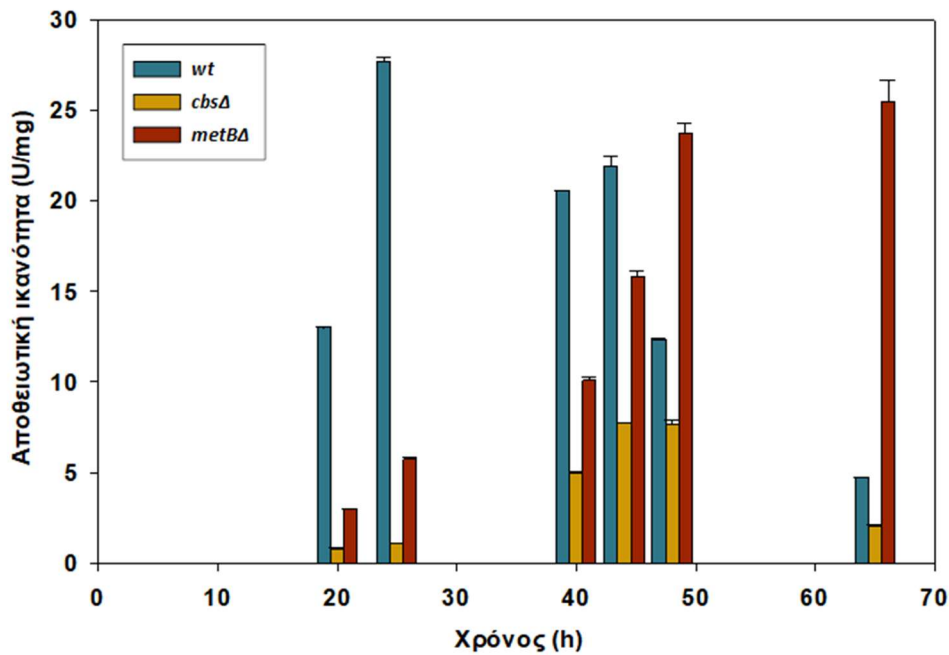
Με βάση τα δεδομένα του πίνακα 7, το *cbsΔ* παρουσιάζει, εκ των τριών, τα καλύτερα κινητικά χαρακτηριστικά ανάπτυξης, με υψηλότερη μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας, μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης, απόδοση βιομάζας και χαμηλότερο χρόνο διπλασιασμού. Ακολουθεί το φυσικού τύπου στέλεχος, ενώ τα χειρότερα χαρακτηριστικά παρουσιάζει το *metBΔ*. Ωστόσο, φαίνεται η υψηλότερη παραγωγικότητα σε βιομάζα να παρουσιάζεται από το wt.

Επίσης, στο διάγραμμα (5) φαίνεται η αποθειωτική ικανότητα των τριών στελεχών.

Με βάση τα παραπάνω, την μέγιστη αποθειωτική ικανότητα επιτυγχάνει το φυσικού τύπου στέλεχος (27.68 ± 0.24 U/mg), ακολουθεί το *metBΔ* (25.46 ± 1.17 U/mg) με μικρή διαφορά, ενώ την χαμηλότερη τιμή σημειώνει το *cbsΔ* (7.70 ± 0.07 U/mg).

Σαφώς, το στέλεχος *metBΔ* παρουσιάζει μεγαλύτερο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον, σε σχέση με το *cbsΔ*, εφόσον παρουσία της προτιμώμενης πηγής άνθρακα και θείου, παρουσιάζει υψηλότερη μέγιστη αποθειωτική δράση (U/mg), παρόλο που παρουσιάζει χαμηλότερο

ρυθμό ανάπτυξης. Αντίστοιχα, συγκρινόμενο με το φυσικού τύπου στέλεχος, παρουσιάζει παρόμοια βέλτιστη αποθειωτική ικανότητα, αλλά χαμηλότερη ανάπτυξη βιομάζας.

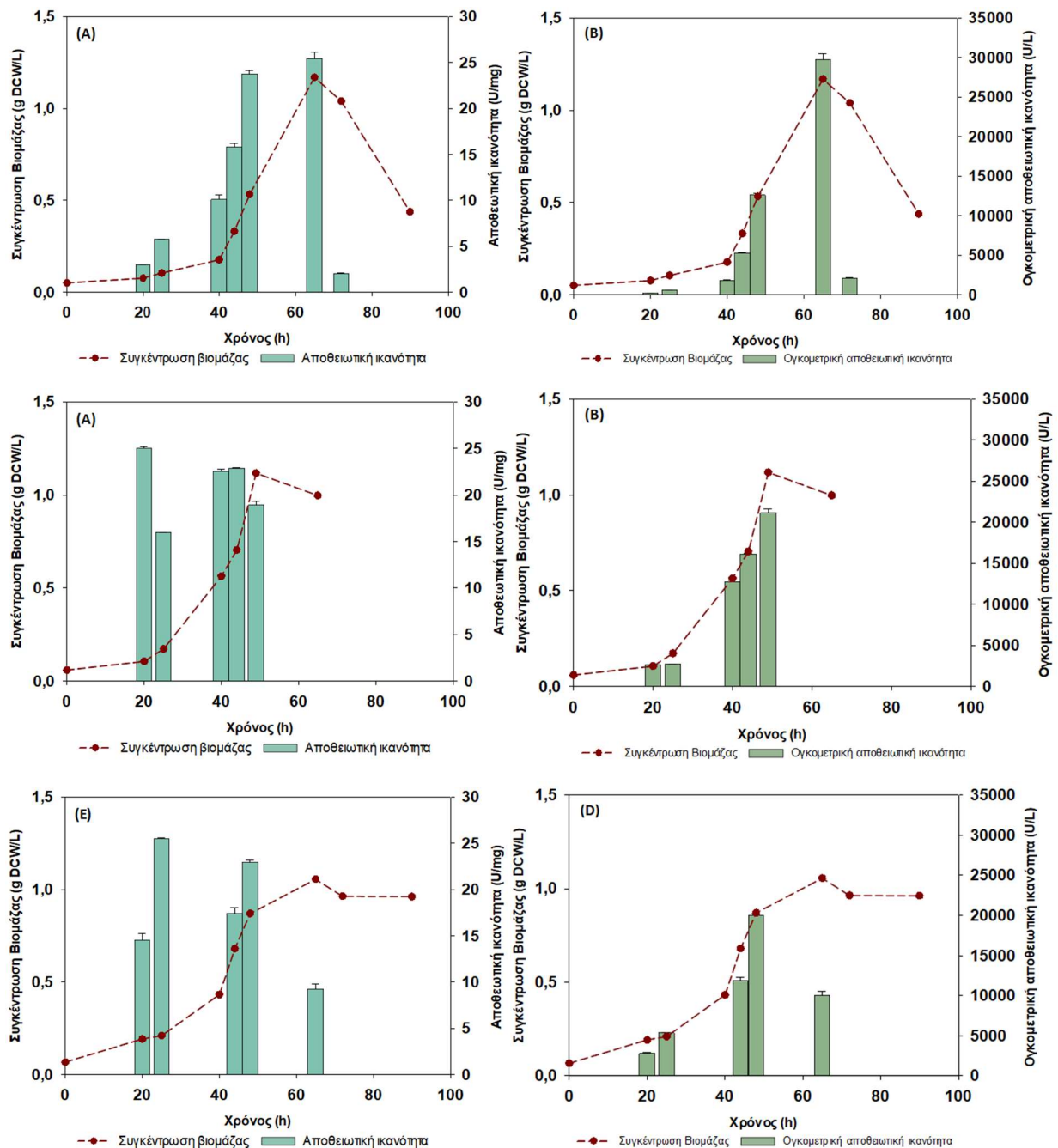


Διάγραμμα 5. Αποθειωτική ικανότητα των τριών στελεχών συναρτήση του χρόνου.

Με δεδομένο ότι το στέλεχος *metBΔ* παρουσιάζει αποθειωτική ικανότητα αντίστοιχη με αυτή του φυσικού τύπου στελεχούς, πραγματοποιείται μελέτη των συνθηκών ανάπτυξής του (συγκέντρωση πηγής θείου και πηγής άνθρακα), με σκοπό την βελτίωση των κινητικών χαρακτηριστικών και με στόχο την παραγωγή κυττάρων σταθερής αποθειωτική ικανότητας.

9.3.1 Επίδραση συγκέντρωσης πηγής θείου

Εξετάζεται η ανάπτυξη του στελέχους *metBΔ* παρουσία αιθανόλης 7.6 g/L, και με μεταβλητή συγκέντρωση πηγής θείου. Συγκεκριμένα, εξετάζονται συκεντρώσεις μεθειονίνης 1, 2 και 4 mM.



Διάγραμμα 6. Καμπύλες ανάπτυξης στελέχους *metBΔ*, παρουσία αιθανόλης 7.6 g/L.- Επίδραση της συγκέντρωσης της πηγής θείου. (A) Καμπύλη Βιομάζας- Αποθεωτικής ικανότητας (U/mg) (1mM Μεθειονίνη), (B) Καμπύλη Βιομάζας- Ογκομετρικής αποθεωτικής ικανότητας (U/L) (1mM Μεθειονίνη), (C) Καμπύλη Βιομάζας- Αποθεωτικής ικανότητας (U/mg) (2mM Μεθειονίνη), (D) Καμπύλη Βιομάζας- Ογκομετρικής αποθεωτικής ικανότητας (U/L) (2mM Μεθειονίνη), (E) Καμπύλη Βιομάζας- Αποθεωτικής ικανότητας (U/mg) (4mM Μεθειονίνη), (F) Καμπύλη Βιομάζας- Ογκομετρικής αποθεωτικής ικανότητας (U/L) (4mM Μεθειονίνη)

Οι καμπύλες ανάπτυξης του στελέχους *metBΔ* για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις μεθειονίνης, συναρτήσει της αποθειωτικής ικανότητας, παρίστανται στο διάγραμμα (6).

Γενικότερα, η κυτταρική ανάπτυξη δεν φαίνεται να επηρεάζεται από την συγκέντρωση του θείου, εφόσον σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρείται μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας περίπου 1.10 g DCW/L. Παράλληλα, παρατηρείται παρόμοια μέγιστη αποθειωτική δυνατότητα (23-25 U/mg), μεταξύ των τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων.

Παρόλα αυτά, στην περίπτωση των 2mM, επιτυγχάνεται μέγιστη βιομάζα σε μικρότερο χρονικό διάστημα, σε σχέση με τις συγκεντρώσεις 1 και 4 mM, ενώ παρατηρείται διατήρηση της ποιότητας των κυττάρων ως επί το πλείστον, όσο αφορά την αποθειωτική τους ικανότητα, καθ'όλη την διάρκεια της ανάπτυξης της καλλιέργειας, γεγονός που αποτελεί και στόχο της διεργασίας.

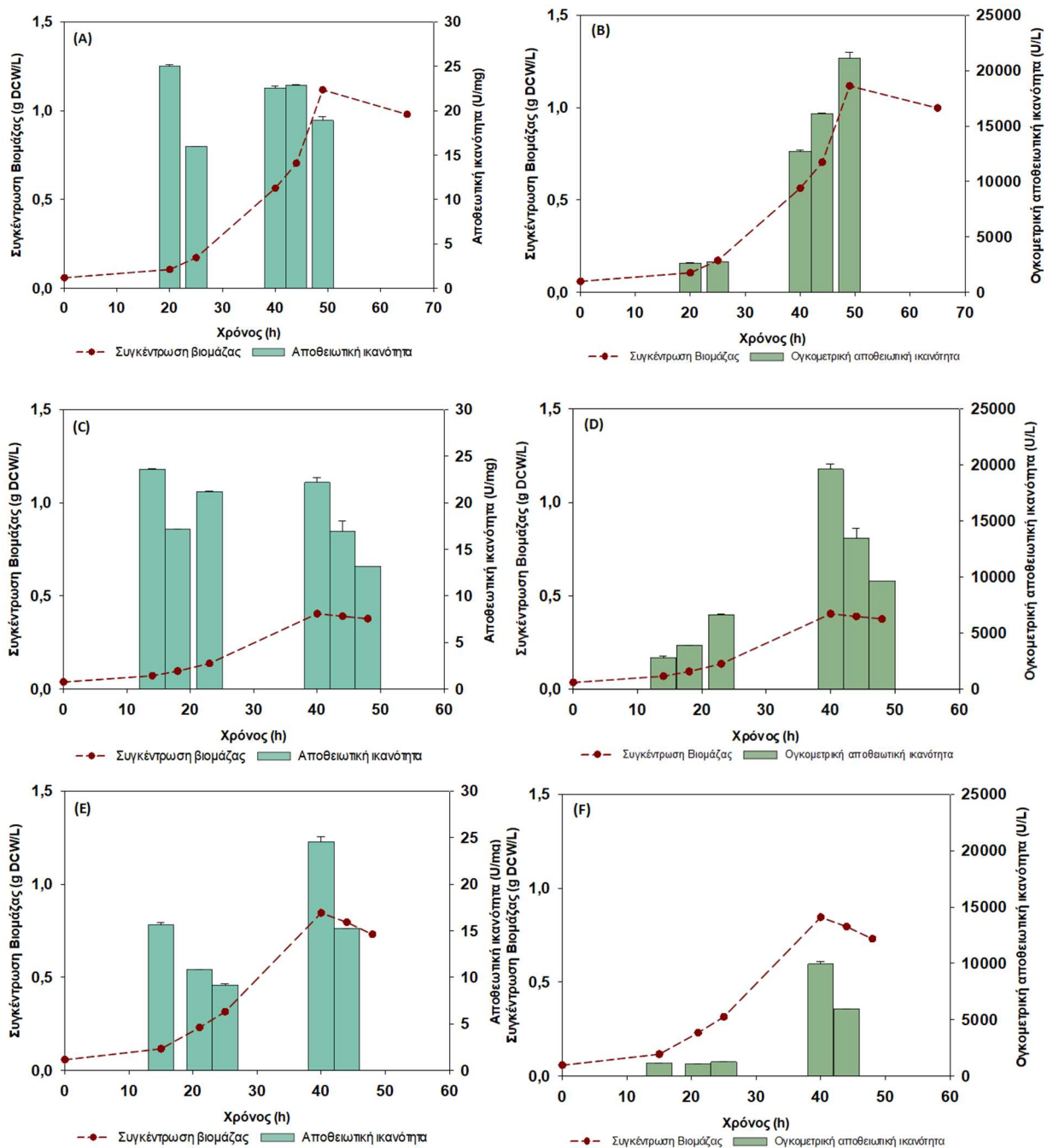
9.3.2 Επίδραση συγκέντρωσης πηγής άνθρακα

Στο πλαίσιο του προσδιορισμού της βέλτιστης συγκέντρωσης αιθανόλης, εξετάστηκαν τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις (7.6, 4, 2.07 g/L), παρουσία 2 mM μεθειονίνης.

Σε γενικές γραμμές, η μείωση της αρχικής συγκέντρωσης της πηγής άνθρακα, συνδέεται άμεσα με την κυτταρική ανάπτυξη. Παρατηρείται χαρακτηριστική μείωση της μέγιστης συγκέντρωσης βιομάζας, ενώ ταυτόχρονα πραγματοποιείται και μείωση της διάρκειας ζωής της καλλιέργειας. Στην περίπτωση των 7.6 g/L, η μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας επιτυγχάνεται στις 49h (1.12 g DCW/L), ενώ στις άλλες δύο περιπτώσεις η μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας επιτυγχάνεται στις 40h (0.40 g DCW/L σε συγκέντρωση 4g/L, και 0.85 g DCW/L σε συγκέντρωση 2.07g/L).

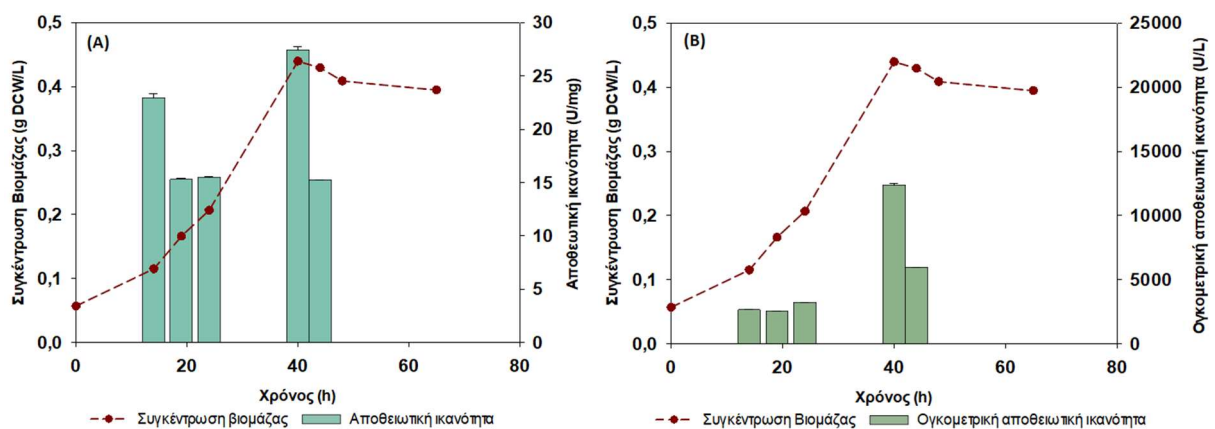
Όσο αφορά την αποθειωτική ικανότητα, δεν παρατηρείται σημαντική επίδραση της συγκέντρωσης της αιθανόλης στην μέγιστη ενζυμική ενεργότητα της καλλιέργειας. Παρ'όλα αυτά, όσο μειώνεται η συγκέντρωση της πηγής άνθρακα, παρατηρείται αύξηση της διακύμανσης και μείωση της διατήρησης της αποθειωτικής ικανότητας κατά την διάρκεια ζωής της καλλιέργειας. Μάλιστα, στην περίπτωση των 2.07g/L, η συγκέντρωση της αιθανόλης, ήταν τόσο χαμηλή ώστε να μην επιτρέπεται η ανάπτυξη της καλλιέργειας και της αποθειωτικής ικανότητας.

Οι καμπύλες ανάπτυξης του στελέχους *metBΔ* για τις τρεις συγκεντρώσεις αιθανόλης, συναρτήσει της αποθειωτικής ικανότητας παρίστανται στο διάγραμμα (7).



Διάγραμμα 7. Καμπύλες ανάπτυξης στελέχους *metBΔ*, παρουσία αιθανόλης 7.6 g/L.- Επίδραση της συγκέντρωσης της πηγής θείου. (A) Καμπύλη Βιομάζας- Αποθειωτικής ικανότητας (U/mg) (7.6 g/L αιθανόλη), (B) Καμπύλη Βιομάζας- Ογκομετρικής αποθειωτικής ικανότητας (U/L) (7.6 g/L αιθανόλη), (C) Καμπύλη Βιομάζας- Αποθειωτικής ικανότητας (U/mg) (4 g/L αιθανόλη), (D) Καμπύλη Βιομάζας- Ογκομετρικής αποθειωτικής ικανότητας (U/L) (4 g/L αιθανόλη), (E) Καμπύλη Βιομάζας- Αποθειωτικής ικανότητας (U/mg) (2.07 g/L αιθανόλη), (F) Καμπύλη Βιομάζας- Ογκομετρικής αποθειωτικής ικανότητας (U/L) (2.07 g/L αιθανόλη).

Επίσης, εξετάστηκαν οι συνθήκες ελάχιστης πηγής άνθρακα και θείου, δηλαδή 2.07g/L αιθανόλης και 1mM μεθειονίνης. Οι καμπύλες ανάπτυξης παρίστανται στο διάγραμμα (8).

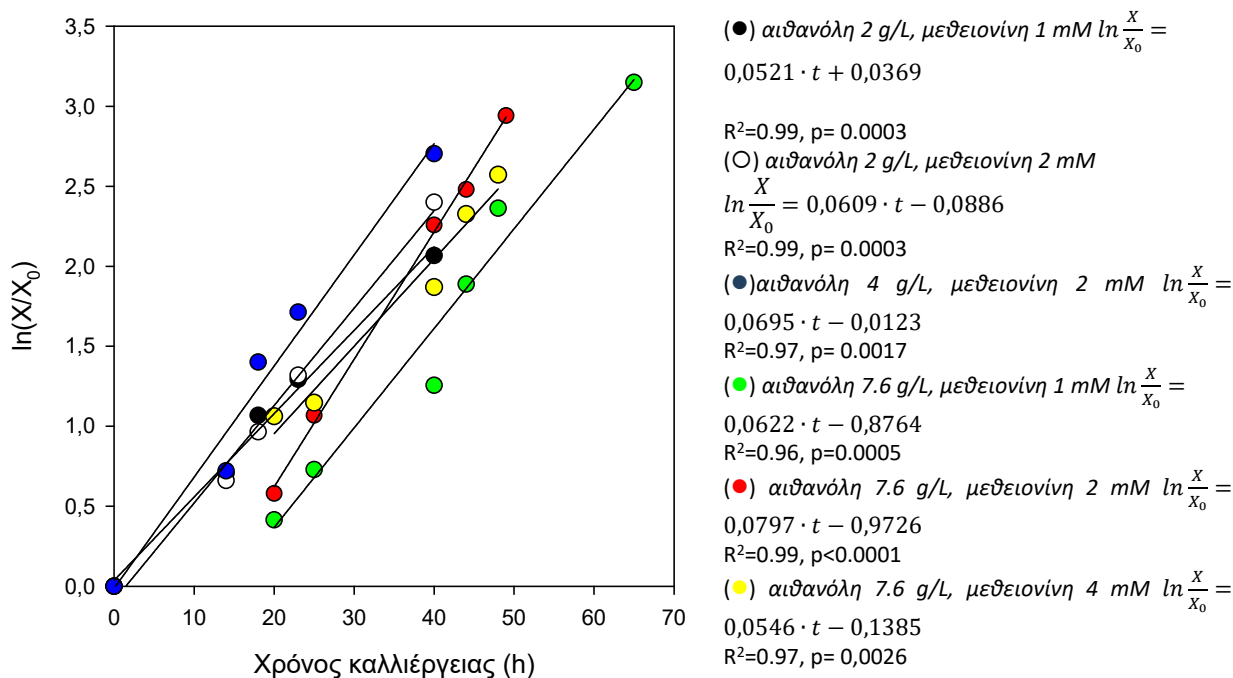


Διάγραμμα 8. Καμπύλη ανάπτυξης του στελέχους *metBΔ*, παρουσία 7.6g/L αιθανόλης και 1mM μεθειονίνη, συναρτήσε: (A) της αποθειωτικής ικανότητας, (B) της ογκομετρικής αποθειωτικής ικανότητας.

Παρατηρείται ότι ο περιορισμός της συγκέντρωσης της πηγής άνθρακα και θείου οδηγούν σε μείωση της διάρκειας ζωής της καλλιέργειας, μειωμένη μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας, και χαμηλό ρυθμό ανάπτυξης. Η μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας και η βέλτιστη αποθειωτική ικανότητα, επιτυγχάνεται στις 40h ανάπτυξης και είναι ίση με 0.44g/L και 27.44 ± 0.30 U/mg.

Ωστόσο, η ενζυμική ικανότητα δεν φαίνεται να επηρεάζεται από τις συνθήκες χαμηλών συγκεντρώσεων των υποστρωμάτων, ενώ διατηρείται σχετικά υψηλή καθ'όλη την διάρκεια της ανάπτυξης. Παρόλα αυτά, δεδομένης της χαμηλής συγκέντρωσης βιομάζας, η ενζυμική ενεργότητα που σημειώνεται για τον όγκο της καλλιέργειας είναι αρκετά χαμηλή.

Με βάση τις εξισώσεις 1-5, προσδιορίζονται τα κινητικά χαρακτηριστικά του στελέχους *metBΔ* για τις παραπάνω συνθήκες καλλιέργειας (Πίνακας 8). Ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης υπολογίζεται από την κλίση της ευθείας που προκύπτει από την γραφική απεικόνιση του $\ln \frac{X}{X_0}$ συναρτήσε το χρόνου καλλιέργειας t .

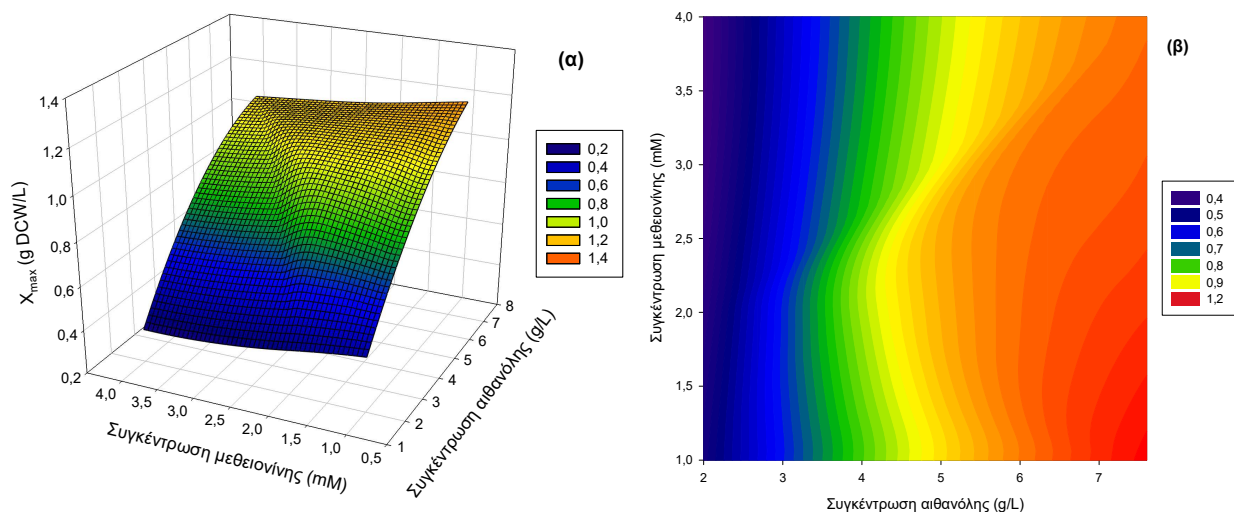


Διάγραμμα 9. Υπολογισμός μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης (μ_{max}) για διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας του στελέχους *metBΔ*. (●) αιθανόλη 2 g/L, μεθειονίνη 1 mM, (○) αιθανόλη 2 g/L, μεθειονίνη 2 mM, (●) αιθανόλη 4 g/L, μεθειονίνη 2 mM, (●) αιθανόλη 7.6 g/L, μεθειονίνη 1 mM, (●) αιθανόλη 7.6 g/L, μεθειονίνη 2 mM, (●) αιθανόλη 7.6 g/L, μεθειονίνη 4 mM.

Πίνακας 8. Κινητικά χαρακτηριστικά του στελέχους *metBΔ* για τις διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας.

Αιθανόλη (g/L)	Μεθειονίνη (mM)	X_{max} (g DCW/L)	μ_{max} (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)	$Y_{X/S}$ (g/g)	Q_x (g DCW/L/h)
2	1	0.45	0.05	13.33	0.21	0.01
2	2	0.40	0.06	11.38	0.18	0.01
4	2	0.85	0.07	9.97	0.21	0.02
7.6	1	1.17	0.06	11.14	0.15	0.02
7.6	2	1.12	0.08	8.70	0.15	0.02
7.6	4	1.06	0.05	12.70	0.14	0.02

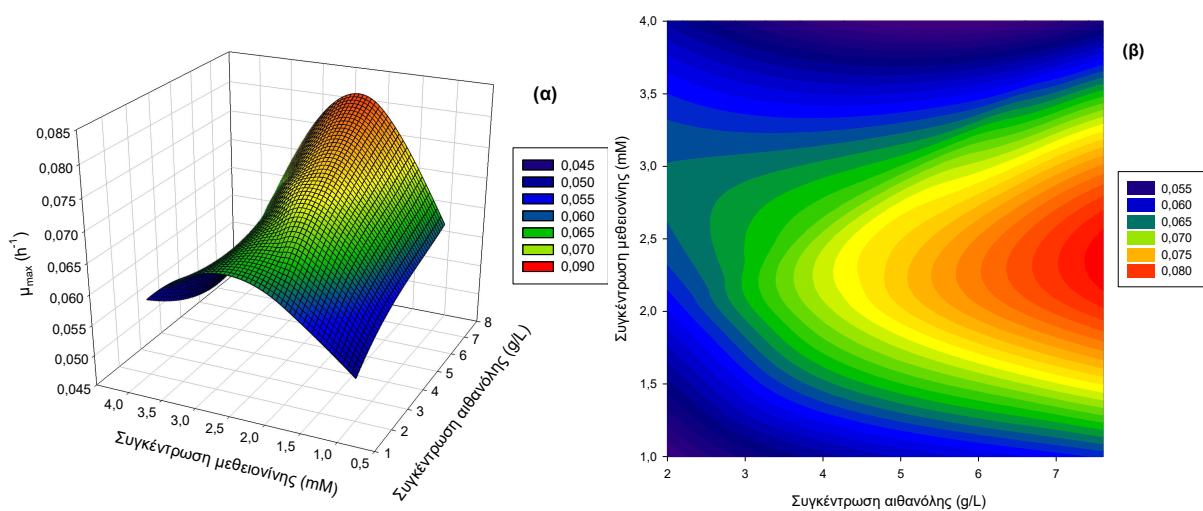
Όπως φαίνεται, η μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας αυξάνεται, όσο αυξάνεται και η συγκέντρωση της αιθανόλης, ενώ δεν φαίνεται να επηρεάζεται σημαντικά από την μεταβολή της συγκέντρωσης του θείου. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνεται από το διάγραμμα (10), όπου απεικονίζεται η εξάρτηση της μέγιστης συγκέντρωσης βιομάζας από την συγκέντρωση της αιθανόλης και της μεθειονίνης.



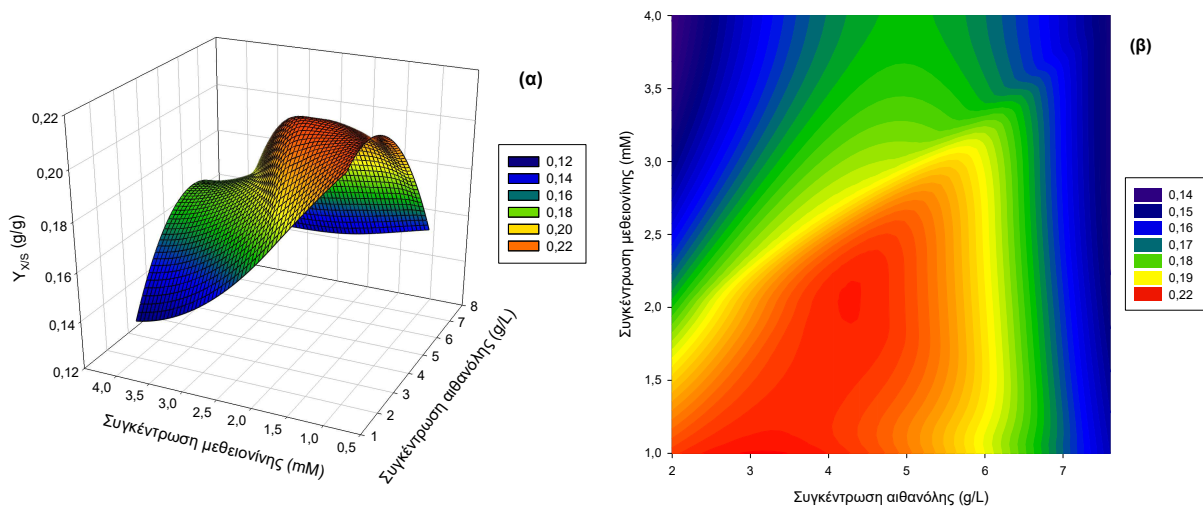
Διάγραμμα 10. (α) Τρισδιάστατη απεικόνιση και (β) ισοϋψείς καμπύλες της μέγιστης κυτταρικής συγκέντρωσης (X_{max}) συναρτήσεως των συγκεντρώσεων αιθανόλης και μεθειονίνης.

Επίσης, όσο αφορά τον μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης, φαίνεται να λαμβάνει την μέγιστη τιμή του σε συγκέντρωση αιθανόλης 7.6 g/L και 2 mM μεθειονίνης.

Με βάση το διάγραμμα 11, όπου απεικονίζεται η εξάρτηση του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης από την συγκέντρωση της αιθανόλης και της πηγής θείου, ο μ_{max} φαίνεται να μεγιστοποιείται όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της αιθανόλης, ενώ παρουσιάζει μέγιστο σε συγκέντρωση μεθειονίνης, λίγο χαμηλότερης από 2.5 mM.

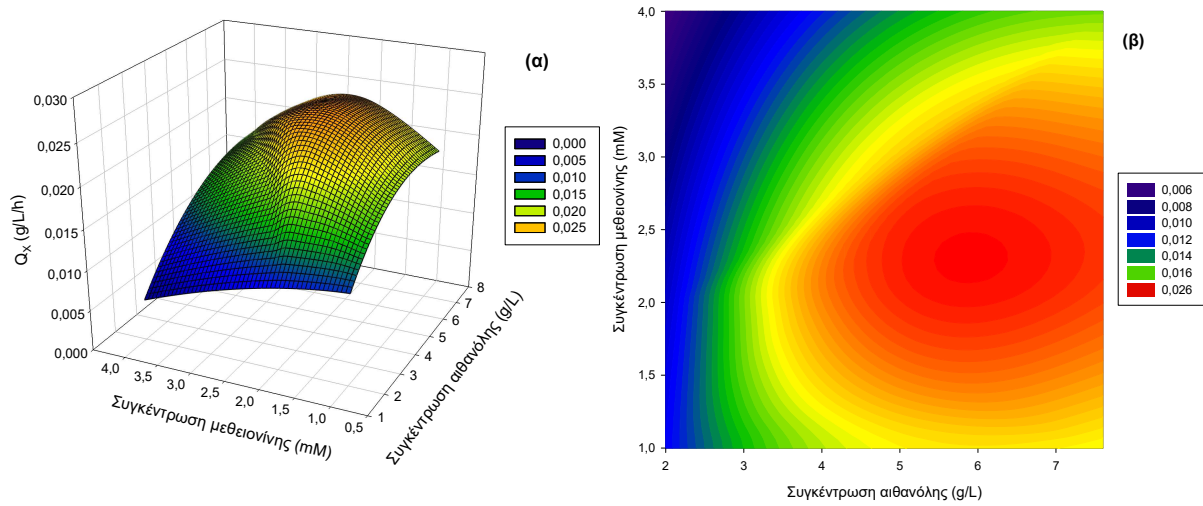


Διάγραμμα 11. Τρισδιάστατη απεικόνιση και (β) ισοϋψείς καμπύλες του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης (μ_{max}) συναρτήσεως των συγκεντρώσεων αιθανόλης και μεθειονίνης.



Διάγραμμα 12. (α) Τρισδιάστατη απεικόνιση και (β) ισοψείς καμπύλες του συντελεστή απόδοσης σε κυτταρική μάζα ($Y_{x/s}$) συναρτήσεως των συγκεντρώσεων αιθανόλης και μεθειονίνης.

Παράλληλα, ο συντελεστής απόδοσης σε κυτταρική μάζα δεν φαίνεται να παρουσιάζει σαφή εξάρτηση από την συγκέντρωση του θείου, ενώ φαίνεται να υψηλότερος σε χαμηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης. Με βάση το διάγραμμα 12, ο συντελεστής απόδοσης σε κυτταρική μάζα, φαίνεται να μεγιστοποιείται σε συγκέντρωση αιθανόλης 4g/L και 2mM μεθειονίνης.



Διάγραμμα 13. (α) Τρισδιάστατη απεικόνιση και (β) ισοψείς καμπύλες της ογκομετρικής παραγωγικότητας σε κυτταρική μάζα (Q_x) συναρτήσεως των συγκεντρώσεων αιθανόλης και μεθειονίνης.

Όσο αφορά την ογκομετρική παραγωγικότητα σε βιομάζα, δεν φαίνεται να εξαρτάται από την συγκέντρωση της μεθειονίνης, ενώ φαίνεται να αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης της αιθανόλης. Μάλιστα, σύμφωνα με το διάγραμμα 13, όπου παρουσιάζεται η εξάρτηση της ογκομετρικής παραγωγικότητας από τις συγκεντρώσεις της αιθανόλης και

της πηγής άνθρακα, η τιμή ογκομετρικής παραγωγικότητας φαίνεται να λαμβάνει μέγιστη τιμή σε συγκέντρωση μεθειονίνης λίγο κάτω από 2.5mM και σε συγκέντρωση αιθανόλης 6g/L.

Παράλληλα, παρατίθενται τα δεδομένα της αποθειωτικής ικανότητας του στελέχους metBΔ, για τις διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας, στον πίνακα 9.

Πίνακας 9. Δεδομένα αποθειωτικής ικανότητας (U/mg) του στελέχους metBΔ, για κάθε συνθήκη καλλιέργειας, συναρτήσει του χρόνου.

2.07 g/L αιθανόλη 1mM μεθειονίνη		2.07 g/L αιθανόλη 2 mM μεθειονίνη		4 g/L αιθανόλη 2 mM μεθειονίνη	
t (h)	U/mg	t (h)	U/mg	t (h)	U/mg
14	22.92	15	15.63	14	23.61
19	15.29	21	10.83	18	17.14
24	15.47	25	9.15	23	21.19
40	27.44	40	24.58	40	22.19
44	15.27	44	15.27	44	16.94
				48	13.20
7.6 g/L αιθανόλη 1 mM μεθειονίνη		7.6 g/L αιθανόλη 2 mM μεθειονίνη		7.6 g/L αιθανόλη 4 mM μεθειονίνη	
t (h)	U/mg	t (h)	U/mg	t (h)	U/mg
20	2.97	20	25.00	20	14.56
25	5.73	25	15.97	25	25.47
40	10.09	40	22.54	-	-
44	15.82	44	22.89	44	17.41
48	23.75	49	18.91	48	22.92
65	25.46			65	9.25
72	2.01				

Με βάση τα δεδομένα του πίνακα 9, η μέγιστη αποθειωτική ικανότητα του στελέχους metBΔ, είναι παρόμοια σε όλες της περιπτώσεις (22-26 U/mg). Ωστόσο, λόγω των καλύτερων κινητικών χαρακτηριστικών, δηλαδή του σχετικά υψηλού μέγιστου ρυθμού ανάπτυξης και της υψηλής μέγιστης συγκέντρωσης βιομάζας και κυτταρικής παραγωγικότητας, επιλέγονται ως καταλληλότερες συνθήκες τα 7.6g/L αιθανόλης και 2mM μεθειονίνης.

9.4 Ανάπτυξη σε αντιδραστήρα ημιδιαλείποντος έργου του στελέχους metBΔ

Στόχος της διεργασίας, είναι η διατήρηση της βέλτιστης αποθειωτικής ικανότητας για όσο το δυνατόν περισσότερο χρονικό διάστημα, με ταυτόχρονη αύξηση της βιομάζας. Στο πλαίσιο αυτού, εξετάζεται η διεξαγωγή διεργασίας ημιδιαλείποντος έργου, δεδομένου ότι, η πτώση της αποθειωτικής ικανότητας και ο θάνατος της καλλιέργειας, συνδέονται άμεσα με την πλήρη κατανάλωση της πηγής άνθρακα.

9.4.1 Επίδραση ρυθμού παροχής αιθανόλης

Εφόσον έχουν προσδιοριστεί οι βέλτιστες συνθήκες για την διεργασία διαλείποντος έργου, εξετάζεται η μετατροπή της διεργασίας σε ημιδιαλείποντος έργου. Δεδομένου ότι, περιοριστικό παράγοντα για την διάρκεια ζωής της καλλιέργειας και της εξέλιξης της αποθειωτικής ικανότητας αποτελεί η συγκέντρωση της πηγής άνθρακα, εξετάζονται τρεις διαφορετικές συνθήκες παροχής θρεπτικού-συγκέντρωσης αιθανόλης, με σκοπό την βελτιστοποίηση της διεργασίας. Συγκεκριμένα, εξετάστηκαν τρία διαφορετικά ζεύγη τιμών ρυθμού ροής- αιθανόλης, με αποτέλεσμα τρεις διαφορετικές περιπτώσεις παροχής πηγής άνθρακα. Επισημαίνεται ότι, το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιείται για την διεξαγωγή των fed-batch διεργασιών είναι αυτό που περιγράφεται στο υποκεφάλαιο 8.3, με συγκέντρωση μεθειονίνης 2 mM, ενώ η συγκέντρωση της αιθανόλης διαφέρει, ανάλογα με την διεργασία.

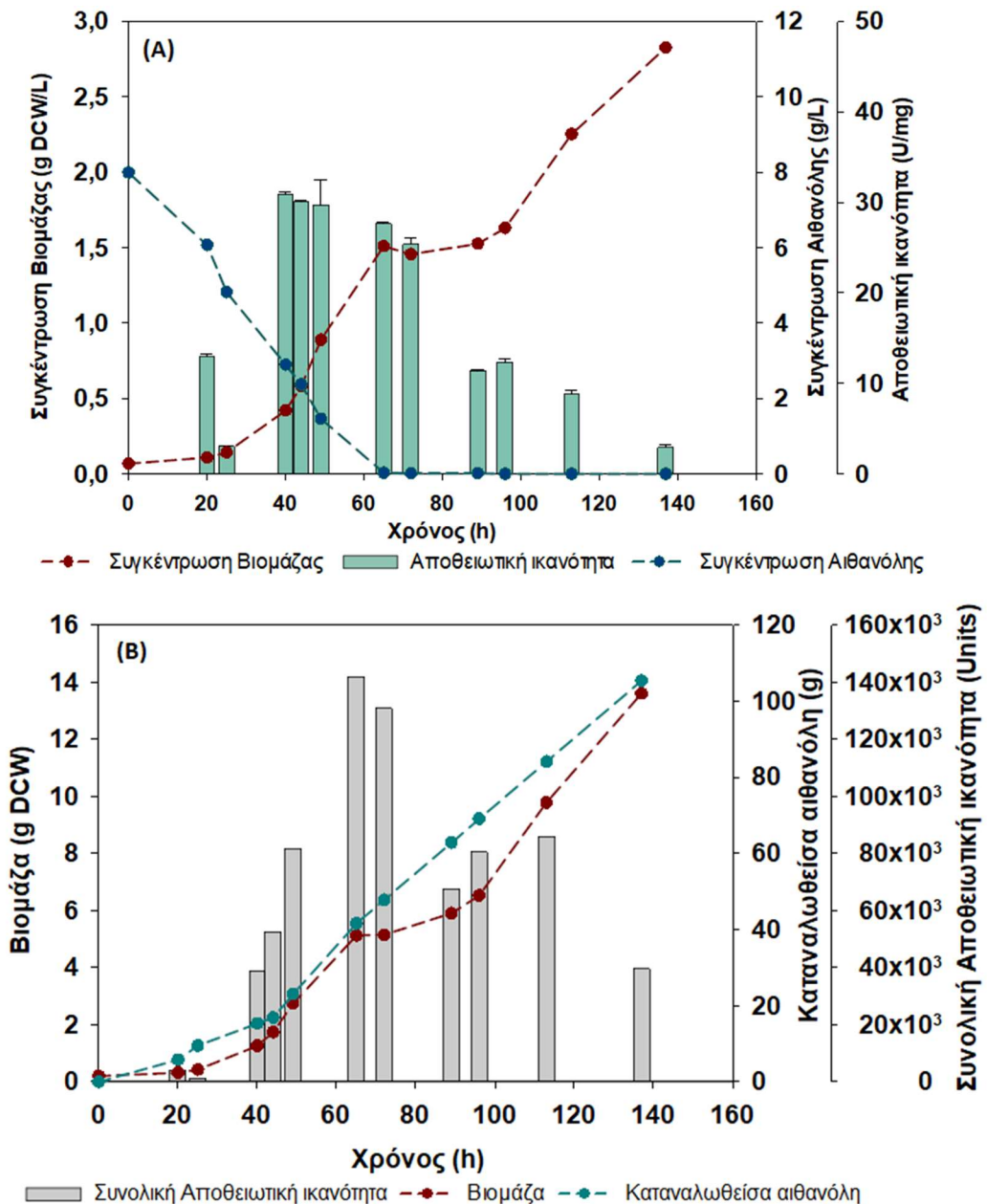
α. Ρυθμός Παροχής Αιθανόλης 14.74 mg/min

Στην πρώτη περίπτωση εξετάστηκε η παροχή θρεπτικού μέσου, συγκέντρωσης αιθανόλης 1M, με ρυθμό ροής 0.32 ml/min. Επομένως, η παροχή της αιθανόλης είναι:

$$1M EtOH \cdot 0.32 \frac{ml}{min} = \frac{1mmol}{ml} \cdot 0.32 \frac{ml}{min} = 0.32 \frac{mmol}{min} = 14.74 mg/min$$

Η έναρξη της ημιδιαλείποντος έργου διεργασίας, πραγματοποιήθηκε στο μέσον την εκθετικής φάσης, δηλαδή στις 45h.

Οι καμπύλες ανάπτυξης, συναρτήσεως της αποθειωτικής ικανότητας, και της συγκέντρωσης της αιθανόλης, παρατίθενται στο διάγραμμα (14).



Διάγραμμα 14. Καμπύλη ανάπτυξης *metBΔ*. Ο ρυθμός ροής του θρεπτικού μέσου είναι 0.32ml/min και η συγκέντρωση της αιθανόλης 1M. Παρίσταται η συγκέντρωση της βιομάζας συναρτήσει της αποθειωτικής ικανότητας και της συγκέντρωσης της αιθανόλης (A), και η κυτταρική μάζα σε συνάρτηση με την καταναλωθείσα αιθανόλη (g) και την συνολική αποθειωτική ικανότητα (B).

Η ανάπτυξη της καλλιέργειας έως το μέσο της εκθετικής φάσης, όπου η διεργασία είναι διαλείπωντος έργου, παρουσιάζει αντίστοιχα αποτελέσματα με την batch διεργασία, δηλαδή παρατηρείται σχετικά σταθερή αποθειωτική ικανότητα κατά την διάρκεια της εκθετικής φάσης.

Από την προσθήκη του επιπλέον θρεπτικού μέσου και έπειτα, παρατηρείται αρχικά η αύξηση της συγκέντρωσης της βιομάζας, έως την έναρξη μίας στατικής φάσης, για το χρονικό διάστημα 65-86 ώρες, η οποία ακολουθείται από μία δεύτερη εκθετική φάση. Με βάση τα

δεδομένα των διεργασιών διαλείποντος έργου, οι 65 ώρες αντιστοιχούν στο τέλος της εκθετικής φάσης και στην αρχή της φάσης θανάτου, παρόλα αυτά, η προσθήκη του επιπλέον θρεπτικού μέσου οδήγησε στην έναρξη της στατικής φάσης, κατά την οποία πραγματοποιούνταν προσαρμογή των κυττάρων στην παροχή της πηγής άνθρακα.

Όσο αφορά την αποθειωτική ικανότητα, παρατηρείται να μεγιστοποιείται στην αρχή της εκθετικής φάσης ($30.92 \pm 0.20 \text{ U/mg}$), ενώ φαίνεται να διατηρείται σταθερή κατά την προαναφερθείσα στατική φάση. Ωστόσο, όταν σημειώνεται η δεύτερη εκθετική φάση, παρατηρείται σταδιακή μείωση την ενζυμικής ενεργότητας της καλλιέργειας. Με βάση τα δεδομένα συγκέντρωσης της αιθανόλης, η μείωση αυτή ενδεχομένως οφείλεται στην έλλειψη πηγής άνθρακα. Πιθανόν, η παρεχόμενη αιθανόλη να είναι αρκετή για την ανάπτυξη της βιομάζας, αλλά όχι αρκετή για την διατήρηση της αποθειωτικής ικανότητας των κυττάρων.

Με βάση τα παραπάνω, εξετάζεται η αύξηση του ρυθμού παροχής του θρεπτικού μέσου, με σκοπό την αύξηση της παροχής αιθανόλης.

β. Ρυθμός ροής παροχής αιθανόλης 18.80 mg/min

Εφόσον η παροχή της αιθανόλης ήταν αρκετά υψηλότερη από την απαιτούμενη, εξετάστηκε η αύξηση του ρυθμού ροής, αλλά με χαμηλότερη συγκέντρωση αιθανόλης.

Επομένως, η παροχή της αιθανόλης είναι:

$$0.8 \text{ M EtOH} \cdot 0.51 \frac{\text{ml}}{\text{min}} = \frac{0.8 \text{ mmol}}{\text{ml}} \cdot 0.51 \frac{\text{ml}}{\text{min}} = 0.41 \frac{\text{mmol}}{\text{min}} = 18.80 \text{ mg/min}$$

Οι καμπύλες ανάπτυξης, συναρτήσεως της αποθειωτικής ικανότητας, και της συγκέντρωσης της αιθανόλης, παρατίθενται στο διάγραμμα (15).

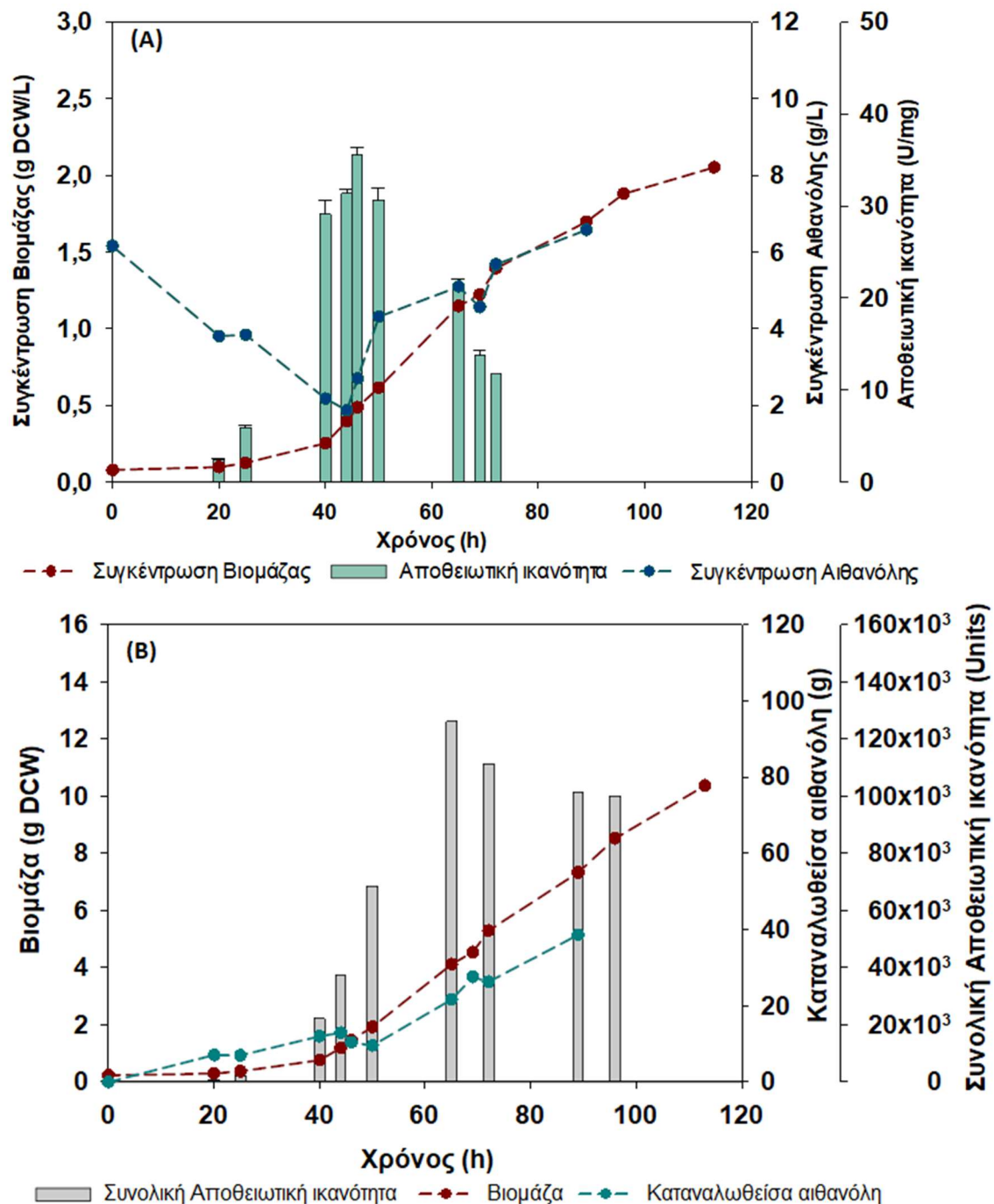
Η έναρξη της ημιδιαλείπουσας διεργασίας πραγματοποιήθηκε στις 46h ώρες ανάπτυξης.

Και σε αυτήν την περίπτωση, παρατηρείται αρχικά αύξηση της συγκέντρωσης της βιομάζας, έως τις 65 ώρες ανάπτυξης, ενώ στην συνέχεια παρατηρείται μείωση του ρυθμού ανάπτυξης. Ωστόσο, η μείωση του ρυθμού αύξησης της συγκέντρωσης οφείλεται και στην αραιώση της βιομάζας, λόγω της προσθήκης θρεπτικού μέσου.

Αντίστοιχα, παρατηρείται αύξηση της αποθειωτικής ικανότητας, έως το μέσο της εκθετικής φάσης, με μέγιστη τιμή ενεργότητας τα $35.59 \pm 0.82 \text{ U/mg}$, και έπειτα σταδιακή μείωσή της.

Γενικά, και σε αυτήν την περίπτωση παρατηρείται συσσώρευση της πηγής άνθρακα, ενώ παρόλο που η καλλιέργεια αναπτύσσεται, η αποθειωτική ικανότητα συνεχίζει να μειώνεται.

Ενδεχομένως, η συγκέντρωση της αιθανόλης να δρα παρεμποδιστικά στην ενζυμική ενεργότητα.



Διάγραμμα 15. Καμπύλη ανάπτυξης *metBΔ* συναρτήσει της συγκέντρωσης αιθανόλης. Ο ρυθμός ροής του θρεπτικού μέσου είναι 0.47ml/min και η συγκέντρωση της αιθανόλης 1M. Παρίσταται η συγκέντρωση της βιομάζας συναρτήσει της αποθειωτικής ικανότητας και της συγκέντρωσης της αιθανόλης (A), και η κυτταρική μάζα σε συνάρτηση με την καταναλωθείσα αιθανόλη (g) και την συνολική αποθειωτική ικανότητα (B).

γ. Ρυθμός παροχής αιθανόλης 21.65 mg/min

Στην δεύτερη περίπτωση, εξετάστηκε η παροχή θρεπτικού μέσου, συγκέντρωσης αιθανόλης 1M, με ρυθμό ροής 0.47 ml/min. Επομένως, η παροχή της αιθανόλης είναι:

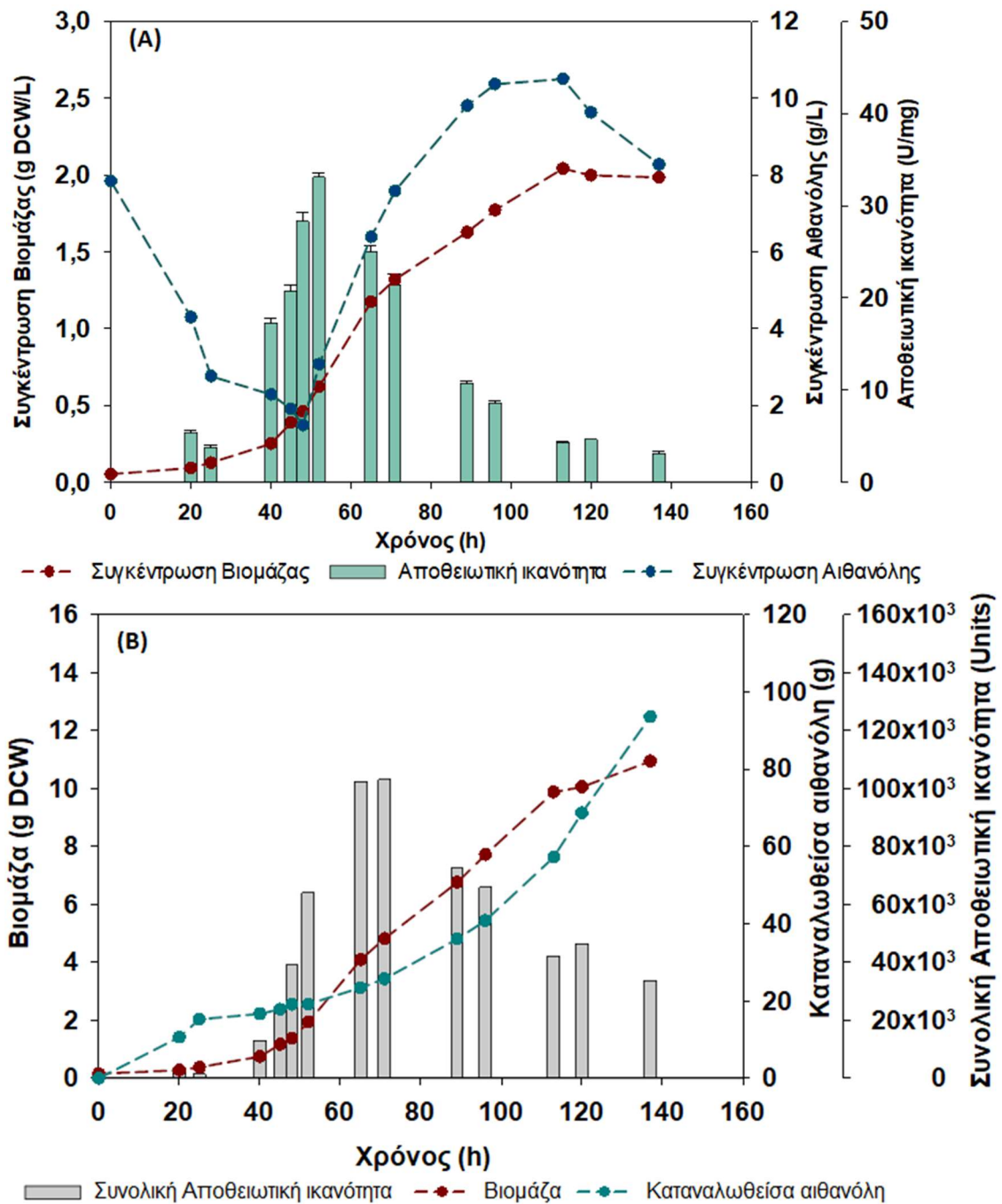
$$1M \text{ EtOH} \cdot 0.47 \frac{\text{ml}}{\text{min}} = \frac{1\text{mmol}}{\text{ml}} \cdot 0.47 \frac{\text{ml}}{\text{min}} = 0.47 \frac{\text{mmol}}{\text{min}} = 21.65 \text{ mg/min}$$

Οι καμπύλες ανάπτυξης, συναρτήσκει της αποθειωτικής ικανότητας, και της συγκέντρωσης της αιθανόλης, φαίνονται στο διάγραμμα 16.

Η έναρξη της ημιδιαλείπουσας διεργασίας πραγματοποιήθηκε στις 48h. Στο χρονικό διάστημα 48-65h, δεν παρατηρείται διαφορά στην ρυθμό ανάπτυξης, σε σχέση με την διαλείποντος έργου διεργασία, ωστόσο, από τις 65h έως τις 113h, παρατηρείται μείωση του ρυθμού ανάπτυξης, ενώ από τις 113h και έπειτα, παρατηρείται έναρξη της στατικής φάσης. Στην συγκεκριμένη περίπτωση, δεν μεσολαβεί κάποια στατική φάση, μεταξύ των δύο εκθετικών φάσεων ανάπτυξης.

Όσο αφορά την συγκέντρωση της αιθανόλης, παρατηρείται συσσώρευσή της στο θρεπτικό μέσο, από την έναρξη της ημιδιαλείπουσας διεργασίας και έπειτα, γεγονός που υποδηλώνει ότι η παρεχόμενη αιθανόλη είναι σημαντικά περισσότερη από την απαιτούμενη. Από τις 113h και έπειτα παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσης της αιθανόλης, το οποίο οφείλεται τόσο στην κατανάλωσή της, όσο και στην αραίωση του θρεπτικού μέσου.

Παράλληλα, παρατηρείται αρχικά αύξηση της αποθειωτικής ικανότητας, όσο η καλλιέργεια βρίσκεται στην εκθετική φάση, με μέγιστη τιμή τα 33.10 ± 0.40 U/mg στο μέσο της, ενώ από τις 51h και έπειτα, παρατηρείται σταδιακή μείωση τη αποθειωτικής ικανότητας, παρά την αύξηση της βιομάζας. Η συσσώρευση της αιθανόλης υποδηλώνει ότι η μείωση της αποθειωτικής ικανότητας δεν οφείλεται στην έλλειψη πηγής άνθρακα. Ενδεχομένως, η υψηλή συγκέντρωση της αιθανόλης να δημιουργεί παρεμποδιστικά φαινόμενα στην ενζυμική ενεργότητα.

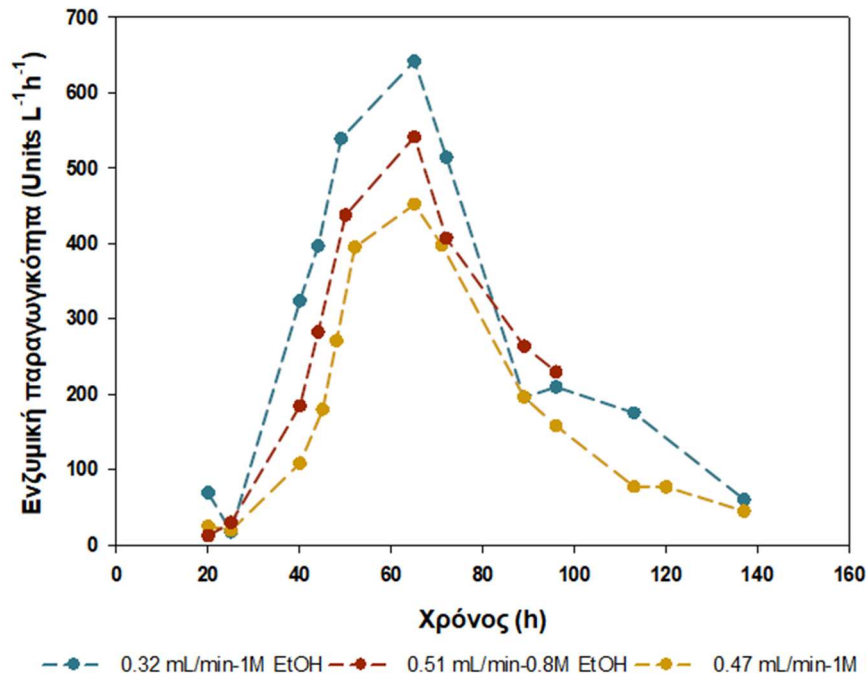


Διάγραμμα 16. Καμπύλη ανάπτυξης *metBΔ* συναρτήσει της συγκέντρωσης αιθανόλης. Ο ρυθμός ροής του θρεπτικού μέσου είναι 0.51ml/min και η συγκέντρωση της αιθανόλης 0.8M. Παρίσταται η συγκέντρωση της βιομάζας συναρτήσει της αποθειωτικής ικανότητας και της συγκέντρωσης της αιθανόλης (A), και η κυτταρική μάζα σε συνάρτηση με την καταναλωθείσα αιθανόλη (g) και την συνολική αποθειωτική ικανότητα (B).

Στο πλαίσιο της σύγκρισης των τριών συνθηκών ροής, κατασκευάζεται η γραφική παράσταση της ενζυμικής παραγωγικότητας συναρτήσει του χρόνου ($\text{Units L}^{-1} \text{h}^{-1}$) (Διάγραμμα 17). Ως ενζυμική παραγωγικότητα ορίζεται η αποθειωτική ικανότητα, ανά λίτρο καλλιέργειας στην

μονάδα του χρόνου, και εκφράζει ένα αντικειμενικό κριτήριο σύγκρισης των τριών πειραμάτων, δεδομένου του διαφορετικού όγκου της κάθε καλλιέργειας.

Με βάση τα παραπάνω, και για τις τρεις περιπτώσεις, η ενζυμική παραγωγικότητα παρουσιάζει αρχικά αύξηση έως τις 65h, όπου επιτυγχάνεται η μέγιστη τιμή, και στην συνέχεια ακολουθείται φθίνουσα πορεία.



Διάγραμμα 17. Ενζυμική παραγωγικότητα συναρτήσει του χρόνου για τις τρεις διαφορετικές συνθήκες ροής, των *fed-batch* διεργασιών.

Εκ των τριών, η βέλτιστη ενζυμική παραγωγικότητα επιτυγχάνεται στην περίπτωση του ρυθμού ροής 0.32ml/min, δηλαδή στην παροχή αιθανόλης 14.74 mg/min, με μέγιστη τιμή 642.15 U L⁻¹ h⁻¹. Ακολουθεί ο ρυθμός ροής 0.51 ml/min (18.80 mg EtOH/min), με μέγιστη τιμή ενζυμική παραγωγικότητας 541.42 U L⁻¹ h⁻¹, ενώ η χαμηλότερη μέγιστη τιμή επιτυγχάνεται στην περίπτωση του ρυθμού ροής 0.47ml/min, δηλαδή στα 21.65 mg/min EtOH, και είναι ίση με 452.11 U L⁻¹ h⁻¹. Όπως φαίνεται, η αύξηση του ρυθμού ροής της αιθανόλης οδηγεί σε μείωση την ενζυμικής παραγωγικότητας, ανεξάρτητα από τον ρυθμό αραίωσης της καλλιέργειας. Τα δεδομένα αυτά συμφωνούν με τις καμπύλες ανάπτυξης συναρτήσει της αποθειωτικής ικανότητας και της συγκέντρωση της αιθανόλης, βάσει των οποίων όσο αυξάνεται ο ρυθμός παροχής της αιθανόλης, τόσο μειώνεται ο ρυθμός ανάπτυξης της βιομάζας, κατά την ανάπτυξη της καλλιέργειας.

10. Συμπεράσματα - Προτάσεις

Στο πλαίσιο της συγκεκριμένης διπλωματικής εξετάστηκε μελέτη των συνθηκών ανάπτυξης γενετικά τροποποιημένων μικροοργανισμών του γένους *Rhodococcus*, και η επίδραση αυτών στην αποθειωτική ικανότητα του μικροοργανισμού.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια των τριών στελεχών, του φυσικού τύπου στελέχους, του *cbsΔ* και του *metBΔ*, σε αντιδραστήρα διαλείποντος έργου παρουσία αιθανόλης 7.6g/L και πηγής θείου 1mM. Κάθε στέλεχος εξετάστηκε στην βιβλιογραφικά βέλτιστη πηγή θείου για την ανάπτυξη και την αποθειωτική του ικανότητα. Επομένως, το φυσικού τύπου στέλεχος καλλιεργήθηκε σε πηγή θείου DMSO, το *metBΔ* σε μεθειονίνη και το *cbsΔ* σε θειικά ιόντα.

Με βάση τα πειράματα αυτά, προέκυψε ότι μεγαλύτερο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον παρουσίαζε το στέλεχος *metBΔ*, εφόσον παρουσίαζε σημαντικά υψηλότερη αποθειωτική ικανότητα κατά 3.3 φορές σε σχέση με το *cbsΔ* (25.46±1.17 U/mg και 7.70±0.07 U/mg αντίστοιχα). Μάλιστα, παρόλο που το *cbsΔ* κατέληγε σε διπλάσια μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας, λόγω της υψηλής αποθειωτικής ικανότητας του *metBΔ* επιτυγχανόταν μεγαλύτερη ενζυμική ενεργότητα ανά τον όγκο της καλλιέργειας.

Εφόσον, το στέλεχος *metBΔ* παρουσίαζε υψηλότερη αποθειωτική ικανότητα, συγκρίσιμη με αυτή του φυσικού τύπου στελέχους, επομένως εξετάστηκε η αριστοποίηση των συνθηκών της καλλιέργειας, με στόχο την παραγωγή κυττάρων σταθερής υψηλής αποθειωτικής ικανότητας. Στο πλαίσιο της βελτιστοποίησης της διεργασίας, εξετάστηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις πηγής άνθρακα και πηγής θείου, με στόχο τον προσδιορισμό των ιδανικών συνθηκών καλλιέργειας του στελέχους *metBΔ* σε αντιδραστήρα διαλείποντος έργου.

Όσο αφορά την πηγή θείου, εξετάστηκαν τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις **μεθειονίνης, 1, 2 και 4 mM**. Παρατηρήθηκε ότι η συγκέντρωση της πηγής θείου δεν είχε σημαντική επίδραση στην μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας, ωστόσο στην περίπτωση των 2 mM επιτυγχανόταν ο υψηλότερος ρυθμός ανάπτυξης. Αντίστοιχα, στην περίπτωση της συγκέντρωσης της πηγής άνθρακα, εξετάστηκαν τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις, **7.6, 4 και 2.07g/L αιθανόλης**. Προέκυψε ότι η μείωση της συγκέντρωσης της πηγής άνθρακα οδηγεί στην μείωση του ρυθμού ανάπτυξης της βιομάζας και της μέγιστης συγκέντρωσης βιομάζας, ενώ ταυτόχρονα πραγματοποιείται μείωση της διάρκειας ζωής της καλλιέργειας, εφόσον στην περίπτωση των 7.6g/L η μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας επιτυγχάνεται στις 49 ώρες ανάπτυξης, ενώ στις συγκεντρώσεις 4 και 2.07g/L στις 40 ώρες. Επίσης, όσο μειώνεται η συγκέντρωση της πηγής άνθρακα, τόσο αυξάνεται η διακύμανση στην αποθειωτική ικανότητα, κατά την ανάπτυξη της καλλιέργειας. Επομένως, εκ των τριών συγκεντρώσεων πιο κατάλληλη κρίνεται η συγκέντρωση των 7.6g/L.

Στο πλαίσιο της εύρεσης των βέλτιστων συνθηκών εξετάστηκε και η καλλιέργεια του μικροοργανισμού σε συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης πηγής θείου και άνθρακα, δηλαδή σε συνθήκες 2.7 g/L αιθανόλης και 1 mM μεθειονίνης. Στην συγκεκριμένη εφαρμογή, παρατηρήθηκε μείωση της διάρκειας ζωής της καλλιέργειας, μειωμένη μέγιστη

συγκέντρωση βιομάζας, και χαμηλός ρυθμός ανάπτυξης. Παρόλα αυτά, δεν παρατηρήθηκε μείωση της μέγιστης αποθειωτικής ικανότητας, αλλά λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης της βιομάζας παρατηρήθηκε χαμηλή ενζυμική ενεργότητα στον όγκο του αντιδραστήρα.

Επισημαίνεται ότι ο θάνατος της καλλιέργειας και η μείωση της αποθειωτικής ικανότητας συνδεόταν άμεσα με την πλήρη κατανάλωση της αιθανόλης.

Δεδομένων των ιδανικών συγκεντρώσεων πηγής θείου και άνθρακα, και εφόσον περιοριστικό παράγοντα για την βελτίωση της διεργασίας αποτελεί η πλήρης κατανάλωση της πηγής άνθρακα, εξετάστηκε η διεξαγωγή της καλλιέργειας σε αντιδραστήρα ημιδιαλείποντος έργου. Συγκεκριμένα, εξετάστηκαν τρεις διαφορετικές συνθήκες ροής του θρεπτικού υλικού, και επομένως τρεις διαφορετικοί ρυθμοί παροχής της πηγής άνθρακα (0.32ml/min-1M EtOH → **14.74 mg/min EtOH**, 0.47ml/min-1M EtOH → **21.65 mg/min EtOH** και 0.51ml/min- 0.8M EtOH → **18.80 mg/min EtOH**). Στην πρώτη περίπτωση, η παροχή της αιθανόλης ήταν επαρκής για την ανάπτυξη της καλλιέργειας αλλά όχι για την ανάπτυξη της αποθειωτικής ικανότητας, ενώ στις άλλες δύο παρατηρήθηκε συσσώρευση της αιθανόλης η οποία ενδεχομένως να οδήγησε στον θάνατο της καλλιέργειας, λόγω της υψηλής συγκέντρωσης της αιθανόλης και της αδυναμίας αφομοίωσής της. Με βάση αυτά, προκύπτει ότι η ανάπτυξη της καλλιέργειας επηρεάζεται, τόσο από τον ρυθμό παροχής του θρεπτικού μέσου, όσο και από την συγκέντρωση της αιθανόλης. Με αυτόν τον τρόπο, καθορίζεται ο ρυθμός αραίωσης της καλλιέργειας, μέσω του οποίου επηρεάζεται αφενώς ο ρυθμός αφομοίωσης της αιθανόλης, αφετέρου η τελική συγκέντρωση της αιθανόλης στην καλλιέργεια, και συνεπώς το ενδεχόμενο παρεμπόδισης ή τοξικότητας.

Επισημαίνεται ότι στο πλαίσιο των fed-batch διεργασιών, που ξεκινούσαν με αρχικό όγκο 3 L, έναντι των batch καλλιεργειών που πραγματοποιούνταν σε όγκο καλλιέργειας 5 L, παρατηρήθηκε εν γένει υψηλότερη μέγιστη αποθειωτική ικανότητα, στο διαλείπον κομμάτι της διεργασίας. Αυτό ενδεχομένως οφείλεται στον χαμηλότερο όγκο της αντίδρασης, οποίος εξασφαλίζει μικρότερους περιορισμούς λόγω φαινομένων μεταφοράς μάζας, καθώς και στον ικανοποιητικότερο αερισμό και ανάδευση του όγκου της αντίδρασης.

Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής, απαιτούνται σημαντικές βελτιώσεις όσο αφορά την καλλιέργεια του στελέχους metBΔ σε αντιδραστήρα ημιδιαλείποντος έργου. Οι βελτιώσεις αυτές αφορούν την αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης και της μέγιστης συγκέντρωσης της βιομάζας, καθώς και την παραγωγή κυττάρων σταθερής και υψηλής αποθειωτικής ικανότητας. Αρχικά, απαιτείται η διεξαγωγή περαιτέρω πειραμάτων, με σταθερό ρυθμό ροής και μεταβλητή συγκέντρωση αιθανόλης, και το αντίστροφο. Στόχος αυτών αποτελεί η διαλεύκανση του προβλήματος της συσσώρευσης της αιθανόλης και η εύρεση της χρυσής τομής μεταξύ της συγκέντρωσης της αιθανόλης και του ρυθμού αραίωσης της καλλιέργειας, και κατ'έπекταση την αύξηση της διάρκειας ζωής και της αποθειωτικής ικανότητας. Αντίστοιχα πειράματα θα μπορούσαν να πραγματοποιηθούν με την μεταβολή της συγκέντρωσης της μεθειονίνης στο προστιθέμενο θρεπτικό μέσο, και δευτερευόντως με την συγκέντρωση του αζώτου. Παράλληλα, θα μπορούσαν να εξεταστούν

γενικότερα οι συνθήκες ανάδευσης και αερισμού της καλλιέργειας, καθώς και η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου, αρχικά στην διαλείποντος έργου, και μετέπειτα στην ημιδιαλείποντος έργου διεργασία.

Βιβλιογραφία

- [1] E. Λόης, Φ. Ζαννίκος, and Καρώνης Δ., “Τεχνολογία Καυσίμων και Λιπαντικών,” Αθήνα, 2014.
- [2] N. S. El-Gendy and H. N. Nassar, *Biodesulfurization in petroleum refining*, John Wiley & Sons, 2017 doi: 10.1002/9781119224075.
- [3] B. E. Alkhalili, A. Yahya, N. Abraham, and B. Ganapathy, “Biodesulfurization of Sour Crude Oil,” *Mod Appl Sci*, vol. 11, no. 9, p. 104, 2017, doi: 10.5539/mas.v11n9p104.
- [4] A. Vetere, D. Pröfrock, and W. Schrader, “Quantitative and Qualitative Analysis of Three Classes of Sulfur Compounds in Crude Oil,” *Angewandte Chemie - International Edition*, vol. 56, no. 36, pp. 10933–10937, 2017, doi: 10.1002/anie.201703205.
- [5] G. Mohebbali and A. S. Ball, “Biodesulfurization of diesel fuels - Past, present and future perspectives,” *Int Biodeterior Biodegradation*, vol. 110, pp. 163–180, 2016, doi: 10.1016/j.ibiod.2016.03.011.
- [6] N. S. El-Gendy and J. G. Speight, *Handbook of Refinery Desulfurization*. 2015. doi: 10.1201/b19102.
- [7] D. J. Monticello, “Biodesulfurization and the upgrading of petroleum distillates,” *Curr Opin Biotechnol*, vol. 11, no. 6, pp. 540–546, 2000, doi: 10.1016/S0958-1669(00)00154-3.
- [8] O. O. Sadare, F. Obazu, and M. O. Daramola, “Biodesulfurization of petroleum distillates—current status, opportunities and future challenges,” *Environments - MDPI*, vol. 4, no. 4, pp. 1–20, 2017, doi: 10.3390/environments4040085.
- [9] M. Soleimani, A. Bassi, and A. Margaritis, “Biodesulfurization of refractory organic sulfur compounds in fossil fuels,” *Biotechnol Adv*, vol. 25, no. 6, pp. 570–596, 2007, doi: 10.1016/j.biotechadv.2007.07.003.
- [10] W. H. Smith, “Pollution, Overview,” *Encyclopedia of Biodiversity*. Elsevier, pp. 731–743, Jan. 01, 2001. doi: 10.1016/B0-12-226865-2/00349-7.
- [11] G. Mohebbali and A. S. Ball, “Biocatalytic desulfurization (BDS) of petrodiesel fuels,” *Microbiology (N Y)*, vol. 154, no. 8, pp. 2169–2183, 2008, doi: 10.1099/mic.0.2008/017608-0.
- [12] R. B. Primack, “Extinction, Causes of,” in *Encyclopedia of Biodiversity*, vol. 2, 2001, pp. 697–713. doi: 10.1016/b0-12-226865-2/00116-4.
- [13] M. Agarwal, P. K. Dikshit, J. B. Bhasarkar, A. J. Borah, and V. S. Moholkar, “Physical insight into ultrasound-assisted biodesulfurization using free and immobilized cells of *Rhodococcus rhodochrous* MTCC 3552,” *Chemical Engineering Journal*, vol. 295, pp. 254–267, Jul. 2016, doi: 10.1016/J.CEJ.2016.03.042.
- [14] International Maritime Organization, “IMO 2020 : consistent implementation of MARPOL Annex VI.,” *OMI*, pp. 2019–2020, 2020, Accessed: Sep. 09, 2022. [Online]. Available: <https://www.imo.org/en/MediaCentre/HotTopics/Pages/Sulphur-2020.aspx>
- [15] C. Secas, “Established ECAs Possible ECAs”.
- [16] Z. Z. Kapadia *et al.*, “Impacts of aviation fuel sulfur content on climate and human health,” *Atmos. Chem. Phys*, vol. 16, pp. 10521–10541, 2016, doi: 10.5194/acp-16-10521-2016.

- [17] J. Licki, A. Pawelec, Z. Zimek, and S. Witman-Zajac, "Electron beam treatment of simulated marine diesel exhaust gases," *Nukleonika*, vol. 60, no. 3, pp. 689–695, 2015, doi: 10.1515/NUKA-2015-0098.
- [18] D. Boniek, D. Figueiredo, A. F. B. dos Santos, and M. A. de Resende Stoianoff, "Biodesulfurization: a mini review about the immediate search for the future technology," *Clean Technologies and Environmental Policy* 2014 17:1, vol. 17, no. 1, pp. 29–37, Jul. 2014, doi: 10.1007/S10098-014-0812-X.
- [19] M. Haghghi and S. Gooneh-Farahani, "Insights to the oxidative desulfurization process of fossil fuels over organic and inorganic heterogeneous catalysts: advantages and issues," *Environmental Science and Pollution Research* 2020 27:32, vol. 27, no. 32, pp. 39923–39945, Aug. 2020, doi: 10.1007/S11356-020-10310-4.
- [20] D. Bose, "Design Parameters for a Hydro desulfurization (HDS) Unit for Petroleum Naphtha at 3500 Barrels per Day", *Worlds Scientific News*, 2015.
- [21] V. Chandra Srivastava, "An evaluation of desulfurization technologies for sulfur removal from liquid fuels," *RSC Adv*, vol. 2, no. 3, pp. 759–783, Jan. 2012, doi: 10.1039/C1RA00309G.
- [22] S. J. Varjani, "Microbial degradation of petroleum hydrocarbons," *Bioresour Technol*, vol. 223, pp. 277–286, 2017, doi: 10.1016/j.biortech.2016.10.037.
- [23] B. Saha, S. Vedachalam, and A. K. Dalai, "Review on recent advances in adsorptive desulfurization," *Fuel Processing Technology*, vol. 214, p. 106685, Apr. 2021, doi: 10.1016/J.FUPROC.2020.106685.
- [24] K. ONODERA-YAMADA, M. MORIMOTO, and Y. TANI, "Degradation of dibenzothiophene by sulfate-reducing bacteria cultured in the presence of only nitrogen gas," *J Biosci Bioeng*, vol. 91, no. 1, pp. 91–93, 2001, doi: 10.1263/JBB.91.91.
- [25] I. Martínez, M. El-Said Mohamed, V. E. Santos, J. L. García, F. García-Ochoa, and E. Díaz, "Metabolic and process engineering for biodesulfurization in Gram-negative bacteria," *J Biotechnol*, vol. 262, pp. 47–55, Nov. 2017, doi: 10.1016/J.JBIOTEC.2017.09.004.
- [26] B. L. McFarland, D. J. Boron, W. Deever, J. A. Meyer, A. R. Johnson, and R. M. Atlas, "Biocatalytic Sulfur Removal from Fuels: Applicability for Producing Low Sulfur Gasoline," vol. 24, no. 2, pp. 99–147, 2008, doi: 10.1080/10408419891294208.
- [27] L. Wang, G. Ji, and S. Huang, "Contribution of the Kodama and 4S pathways to the dibenzothiophene biodegradation in different coastal wetlands under different C/N ratios," *J Environ Sci (China)*, vol. 76, pp. 217–226, Feb. 2019, doi: 10.1016/J.JES.2018.04.029.
- [28] N. Gupta, P. K. Roychoudhury, and J. K. Deb, "Biotechnology of desulfurization of diesel: prospects and challenges," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 66, no. 4, pp. 356–366, Jan. 2005, doi: 10.1007/S00253-004-1755-7.
- [29] Z. A. Irani, M. R. Mehrnia, F. Yazdian, M. Soheily, G. Mohebali, and B. Rasekh, "Analysis of petroleum biodesulfurization in an airlift bioreactor using response surface methodology," *Bioresour Technol*, vol. 102, no. 22, pp. 10585–10591, 2011:
- [30] P. A. Çelik, D. Aksoy, S. Koca, H. Koca, and A. Çabuk, "The approach of biodesulfurization for clean coal technologies: a review," *International Journal of Environmental Science and*

- Technology* 2019 16:4, vol. 16, no. 4, pp. 2115–2132, Jan. 2019, doi: 10.1007/S13762-019-02232-7.
- [31] M. Sohrabi, H. Kamyab, and F. Huyop, “Bacterial Desulfurization of Organic Sulfur Compounds Exist in Fossil Fuels”, *Journal Of Pure And Applied Microbiology*, vol.6, no.2, pp. 717-729 2012.
- [32] J. P. M. Sousa, P. Ferreira, R. P. P. Neves, M. J. Ramos, and P. A. Fernandes, “The bacterial 4S pathway – an economical alternative for crude oil desulphurization that reduces CO₂ emissions,” *Green Chemistry*, vol. 22, no. 22, pp. 7604–7621, Nov. 2020, doi: 10.1039/D0GC02055A.
- [33] R. S. Malani, A. H. Batghare, J. B. Bhasarkar, and V. S. Moholkar, “Kinetic modelling and process engineering aspects of biodesulfurization of liquid fuels: Review and analysis,” *Bioresour Technol Rep*, vol. 14, p. 100668, Jun. 2021, doi: 10.1016/J.BITEB.2021.100668.
- [34] J. J. Kilbane and S. le Borgne, “Petroleum biorefining: the selective removal of sulfur, nitrogen, and metals,” vol:151, pp.29-65, 2004.
- [35] I. Martínez, J. L. García, and E. Díaz, “Genetic Engineering for Removal of Sulfur from Fuel Aromatic Heterocycles,” *Consequences of Microbial Interactions with Hydrocarbons, Oils, and Lipids: Production of Fuels and Chemicals*, pp. 183–204, 2017, doi: 10.1007/978-3-319-50436-0_206.
- [36] C. S. Piddington, B. R. Kovacevich, and J. Rambosek, “Sequence and Molecular Characterization of a DNA Region Encoding the Dibenzothiophene Desulfurization Operon of *Rhodococcus* sp. Strain IGTS8,” *Appl Environ Microbiol*, vol. 61, no. 2, pp. 468–475, 1995.
- [37] J. J. Kilbane, “Microbial biocatalyst developments to upgrade fossil fuels,” *Curr Opin Biotechnol*, vol. 17, no. 3, pp. 305–314, Jun. 2006, doi: 10.1016/J.COPBIO.2006.04.005.
- [38] S. Abbad-Andaloussi, C. Lagnel, M. Warzywoda, and F. Monot, “Multi-criteria comparison of resting cell activities of bacterial strains selected for biodesulfurization of petroleum compounds,” *Enzyme Microb Technol*, vol. 32, no. 3–4, pp. 446–454, Mar. 2003, doi: 10.1016/S0141-0229(02)00320-4.
- [39] B. L. McFarland, “Biodesulfurization,” *Curr Opin Microbiol*, vol. 2, no. 3, pp. 257–264, 1999, doi: 10.1016/S1369-5274(99)80045-9.
- [40] A. Abin-Fuentes, M. E. S. Mohamed, D. I. C. Wang, and K. L. J. Prather, “Exploring the Mechanism of Biocatalyst Inhibition in Microbial Desulfurization,” *Appl Environ Microbiol*, vol. 79, no. 24, p. 7807, Dec. 2013, doi: 10.1128/AEM.02696-13.
- [41] M. E. Gallardo, A. Ferrandez, V. de Lorenzo, J. L. Garcia, and E. Diaz, “Designing recombinant *Pseudomonas* strains to enhance biodesulfurization,” *J Bacteriol*, vol. 179, no. 22, pp. 7156–7160, 1997, doi: 10.1128/JB.179.22.7156-7160.1997.
- [42] K. I. Noda, K. Watanabe, and K. Maruhashi, “Recombinant *Pseudomonas putida* carrying both the *dsz* and *hcu* genes can desulfurize dibenzothiophene in n-tetradecane,” *Biotechnology Letters* 2003 25:14, vol. 25, no. 14, pp. 1147–1150, Jul. 2003, doi: 10.1023/A:1024521313249.
- [43] Y. Tanaka, O. Yoshikawa, K. Maruhashi, and R. Kurane, “The *cbs* mutant strain of *Rhodococcus erythropolis* KA2-5-1 expresses high levels of *Dsz* enzymes in the presence of

- sulfate," *Archives of Microbiology* 2002 178:5, vol. 178, no. 5, pp. 351–357, 2002, doi: 10.1007/S00203-002-0466-7.
- [44] C. H. D. Olmo, V. E. Santos, A. Alcon, and F. Garcia-Ochoa, "Production of a *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 biocatalyst for DBT biodesulfurization: Influence of operational conditions," *Biochem Eng J*, vol. 22, no. 3, pp. 229–237, Feb. 2005, doi: 10.1016/J.BEJ.2004.09.015.
- [45] M. Hokmabadi, S. Khosravinia, M. A. Mahdavi, and R. Gheshlaghi, "Enhancing the biodesulfurization capacity of *Rhodococcus* sp. FUM94 in a biphasic system through optimization of operational factors," *J Appl Microbiol*, vol. 132, no. 5, pp. 3461–3475, May 2022, doi: 10.1111/JAM.15442.
- [46] M. J. Hajipour, B. Rasekh, B. Memari, J. Raheb, and M. Saadati, "The enhancement of biodesulfurization activity in a novel indigenous engineered *Pseudomonas putida*," *Iranian Biomedical Journal*, vol. 13(4), pp. 207-13, 2009.
- [47] K.J. Kayser, L. Cleveland, H.-S. Park, J.-H. Kwak, A. Kolhatkar, J.J. Kilbane, "Isolation and characterization of a moderate thermophile, *Mycobacterium phlei* GTIS10, capable of dibenzothiophene desulfurization" *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 59, pp. 737–745, 2002, doi: 10.1007/s00253-002-1030-8
- [48] T. Ohshiro, K. Suzuki, and Y. Izumi, "Regulation of dibenzothiophene degrading enzyme activity of *Rhodococcus erythropolis* D-1," *J Ferment Bioeng*, vol. 81, no. 2, pp. 121–124, Jan. 1996, doi: 10.1016/0922-338X(96)87588-X.
- [49] F. Kargi and J. M. Robinson, "Microbial oxidation of dibenzothiophene by the thermophilic organism *Sulfolobus acidocaldarius*," *Biotechnol Bioeng*, vol. 26, no. 7, pp. 687–690, 1984, doi: 10.1002/BIT.260260709.
- [50] G. Gün, Y. Yürüm, and G. Dinler Doğanay, "Revisiting the biodesulfurization capability of hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* P2 revealed DBT consumption by the organism in an oil/water two-phase liquid system at high temperatures," *Turk J Chem*, vol. 39, no. 2, pp. 255–266, 2015, doi: 10.3906/KIM-1407-52.
- [51] S. Escobar, A. Rodriguez, E. Gomez, A. Alcon, V. E. Santos, and F. Garcia-Ochoa, "Influence of oxygen transfer on *Pseudomonas putida* effects on growth rate and biodesulfurization capacity," *Bioprocess Biosyst Eng*, vol. 39, no. 4, pp. 545–554, Apr. 2016, doi: 10.1007/S00449-016-1536-6.
- [52] E. Gomez, A. Alcon, S. Escobar, V. E. Santos, and F. Garcia-Ochoa, "Effect of fluiddynamic conditions on growth rate and biodesulfurization capacity of *Rhodococcus erythropolis* IGTS8," *Biochem Eng J*, vol. 99, pp. 138–146, Jul. 2015, doi: 10.1016/J.BEJ.2015.03.023.
- [53] H. N. Nassar, S. F. Deriase, and N. S. El-Gendy, "Statistical optimization of biomass production and biodesulfurization activity of *Rhodococcus erythropolis* HN2," <https://doi.org/10.1080/10916466.2017.1373129>, vol. 35, no. 20, pp. 1951–1959, Oct. 2017, doi: 10.1080/10916466.2017.1373129.
- [54] M.-D. Wang, W. Li, D.-H. Wang, and Y. Shi, "Desulfurization of dibenzothiophene by a newly isolated *Corynebacterium* sp. ZD-1 in aqueous phase," *J Environ Sci (China)*, vol. 16, no. 6, pp. 1011–5, 2004.

- [55] A. M. Dehkordi, D. Arabian, H. Najafi, and F. Farhadi, "BIODESULFURIZATION OF SIMULATED LIGHT FUEL OIL BY A NATIVE ISOLATED BACTERIA BACILLUS CEREUS HN," *Journal of Petroleum Science and Technology*, vol. 4, no. 1, pp. 31–40, Mar. 2014, doi: 10.22078/JPST.2014.332.
- [56] H. K. Goindi, V. S. Saini, P. S. Verma, and D. K. Adhikari, "Dibenzothiophene desulfurization in hydrocarbon environment by Staphylococcus sp. resting cells," *Biotechnology Letters* 2002 24:10, vol. 24, no. 10, pp. 779–781, 2002, doi: 10.1023/A:1015520019724.
- [57] J. R. van der Ploeg, E. Eichhorn, and T. Leisinger, "Sulfonate-sulfur metabolism and its regulation in Escherichia coli," *Arch Microbiol*, vol. 176, no. 1–2, pp. 1–8, 2001, doi: 10.1007/S002030100298.
- [58] W. Li, Y. Zhang, M. D. Wang, and Y. Shi, "Biodesulfurization of dibenzothiophene and other organic sulfur compounds by a newly isolated Microbacterium strain ZD-M2," *FEMS Microbiol Lett*, vol. 247, no. 1, pp. 45–50, Jun. 2005, doi: 10.1016/J.FEMSLE.2005.04.025.
- [59] S. Maghsoudi, M. Vossoughi, A. Kheiriloom, E. Tanaka, and S. Katoh, "Biodesulfurization of hydrocarbons and diesel fuels by Rhodococcus sp. strain P32C1," *Biochem Eng J*, vol. 8, no. 2, pp. 151–156, Sep. 2001, doi: 10.1016/S1369-703X(01)00097-3.
- [60] C. Jiang, H. Liu, Y. Xie, and J. Chen, "Isolation of Soil Bacteria Species for Degrading Dibenzothiophene," *Chinese Journal of Chemical Engineering*, vol. 10, no. 4, pp. 420–426, 2002.
- [61] J. Konishi, H. Okada, K. Hirasawa, Y. Ishii, and K. Maruhashi, "Comparison of the substrate specificity of the two bacterial desulfurization systems," *Biotechnology Letters* 2002 24:22, vol. 24, no. 22, pp. 1863–1867, Nov. 2002, doi: 10.1023/A:1020957516297.
- [62] L. Mingfang, G. Zhongxuan, X. Jianmin, L. Huizhou, and C. Jiayong, "Microbial desulfurization of model and straight-run diesel oils," *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, vol. 78, no. 8, pp. 873–876, Aug. 2003, doi: 10.1002/JCTB.862.
- [63] O. Martzoukou *et al.*, "The interplay between sulfur metabolism and desulfurization profile in Rhodococcus: Unraveling the role of the transsulfuration pathway," *mBio*, vol. 13, no. 4, Feb. 2022, doi: 10.1101/2022.02.14.480474.
- [64] M. Konishi, M. Kishimoto, T. Omasa, Y. Katakura, S. Shioya, and H. Ohtake, "Effect of sulfur sources on specific desulfurization activity of Rhodococcus erythropolis KA2-5-1 in exponential fed-batch culture," *J Biosci Bioeng*, vol. 99, no. 3, pp. 259–263, 2005, doi: 10.1263/jbb.99.259.
- [65] C. H. del Olmo, A. Alcon, V. E. Santos, and F. Garcia-Ochoa, "Modeling the production of a Rhodococcus erythropolis IGTS8 biocatalyst for DBT biodesulfurization: Influence of media composition," *Enzyme Microb Technol*, vol. 37, no. 2, pp. 157–166, 2005.
- [66] G. Prasoulas *et al.*, "Biodesulfurization of dibenzothiophene and its alkylated derivatives in a two-phase bubble column bioreactor by resting cells of rhodococcus erythropolis igts8," *Processes*, vol. 9, no. 11, Nov. 2021, doi: 10.3390/pr9112064.
- [67] H. Yan *et al.*, "Increase in desulfurization activity of Rhodococcus erythropolis KA2-5-1 using ethanol feeding," *J Biosci Bioeng*, vol. 89, no. 4, pp. 361–366, Jan. 2000, doi: 10.1016/S1389-1723(00)88959-8.