

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΖΥΜΩΣΗ ΒΙΟΕΛΑΙΟΥ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ
ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ *Saccharomyces cerevisiae*, *Phanerochaete*
chrysosporium και *Pseudomonas putida*

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΔΕΡΜΙΤΖΑΚΗΣ ΒΑΣΙΛΗΣ



ΚΑΛΑΜΑΤΑ

2011

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΖΥΜΩΣΗ ΒΙΟΕΛΑΙΟΥ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ
ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ *Saccharomyces cerevisiae*, *Phanerochaete*
chrysosporium* και *Pseudomonas putida

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΔΕΡΜΙΤΖΑΚΗΣ ΒΑΣΙΛΗΣ

ΚΑΛΑΜΑΤΑ
2011

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ABSTRACT	5
ΣΚΟΠΟΣ	6
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1. Βιομάζα	8
1.1.1. Η βιομάζα ως ανανεώσιμη πηγή ενέργειας	8
1.1.2. Πλεονεκτήματα της βιομάζας	10
1.1.3. Τεχνολογίες μετατροπής της βιομάζας	11
1.2. Βιοκαύσιμα	12
1.2.1. Η βιοαιθανόλη και τα χαρακτηριστικά της	13
1.3. Η μέθοδος της πυρόλυσης για την παραγωγή ελαίου πυρόλυσης	15
1.3.1. Ταχεία πυρόλυση (fast pyrolysis)	18
1.3.2. Βιοέλαιο ή Έλαιο πυρόλυσης	17
1.3.2.1. Ιδιότητες του ελαίου πυρόλυσης	18
1.3.2.2. Εφαρμογές του ελαίου πυρόλυσης	18
1.3.2.3. Πλεονεκτήματα του ελαίου πυρόλυσης	19
1.4. Μικροοργανισμοί ζύμωσης ελαίου πυρόλυσης	20
1.4.1. <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	20
1.4.2. <i>Pseudomonas putida</i>	21
1.4.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	23
2.1. Μικροοργανισμοί	23
2.2. Θρεπτικά υλικά καλλιέργειας των μικροοργανισμών	23
2.3. Συνθήκες ανάπτυξης των μικροοργανισμών	24
2.4. Δείγματα ελαίου πυρόλυσης	24
2.5. Παρακολούθηση της ανάπτυξης των μικροβιακών καλλιεργειών	27
2.6. Πρόκληση τυχαίων μεταλλάξεων στον <i>P. putida</i> με χρήση UV	27
2.7. Απομόνωση DNA του <i>P. chrysosporium</i>	27
2.8. PCR ενίσχυση της περιοχής ITS από το DNA του <i>P. chrysosporium</i>	28
2.9. Πέψεις προϊόντων PCR με ενδονουκλεάσες περιορισμού	28
2.10. Ηλεκτροφορητική ανάλυση DNA	29
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	30
3.1. Πειράματα ανάπτυξης του <i>P. putida</i> σε μη αποστειρωμένο έλαιο πυρόλυσης	30
3.2. Μετάλλαξη των κυττάρων του βακτηρίου <i>P. putida</i> με χρήση UV	32
3.3. Συγκριτική ανάπτυξη του βακτηρίου <i>P. putida</i> παρουσία αποστειρωμένου και μη αποστειρωμένου ελαίου πυρόλυσης	33
3.4. Εμφάνιση άγνωστου μικροοργανισμού	35
3.5. Ανάπτυξη των καλλιεργειών σε νέα δείγματα ελαίου πυρόλυσης	37
3.6. Ανάλυση της ITS περιοχής του DNA του άγνωστου μικροοργανισμού	40
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	41
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	43

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η βιομάζα αποτελεί μια σημαντική, ανεξάντλητη και φιλική προς το περιβάλλον πηγή ενέργειας, η οποία είναι δυνατό να συμβάλλει σημαντικά στην ενεργειακή επάρκεια, αντικαθιστώντας τα συνεχώς εξαντλούμενα αποθέματα ορυκτών καυσίμων (πετρέλαιο, άνθρακας, φυσικό αέριο κ.ά.). Η βιομάζα, αφού μετατραπεί σε αέρια, υγρά ή/και στερεά καύσιμα μέσω θερμοχημικής ή βιοχημικής διεργασίας, μπορεί να αξιοποιηθεί για την κάλυψη ενεργειακών αναγκών (παραγωγή θερμότητας, ψύξης, ηλεκτρισμού).

Η πυρόλυση είναι μια πολλά υποσχόμενη διαδικασία με την οποία μπορούμε να μετατρέψουμε τη βιομάζα στα προαναφερθέντα προϊόντα.

Σκοπός της παρούσης πτυχιακής εργασίας είναι αφενός μεν η βιβλιογραφική ανασκόπηση σχετικά με την τεχνολογία της πυρόλυσης και πιο συγκεκριμένα με την μετατροπή της βιομάζας σε ένα υγρό προϊόν το «βιοέλαιο», το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα μικροβιακής ζύμωσης για την παραγωγή κυρίως αιθανόλης, αφετέρου δε η διερεύνηση της ικανότητας ανάπτυξης τριών μικροοργανισμών παρουσία βιοελαίου, ως μοναδική πηγή άνθρακα. Πιθανή ικανότητα παραγωγής αιθανόλης από τους υπό εξέταση μικροοργανισμούς, μπορεί να χρησιμοποιηθεί περαιτέρω για την παραγωγή βιοκαυσίμων.

Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία είναι το βακτήριο *Pseudomonas putida*, η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* και ο μύκητας *Phanerochaete chrysosporium*. Οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε κατάλληλα τεχνητά θρεπτικά υποστρώματα τα οποία περιείχαν διάφορες ποσότητες βιοελαίου και παρακολούθηθηκε η μικροβιακή ανάπτυξη.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε ένας μικροοργανισμός προερχόμενος από μια καλλιέργεια *P. chrysosporium*, ο οποίος μη γνωρίζοντας αν είναι μια μετάλλαξη του μικροοργανισμού ή απλά μια εργαστηριακή μόλυνση, μελετήθηκε και έδειξε ικανότητα ανάπτυξης σε υψηλά επίπεδα βιοελαίου, καθώς και σε λεβογλουκοζάνη (το κύριο σάκχαρο που εμπεριέχεται στο βιοέλαιο και το οποίο αποδομείται από ορισμένους μόνο μικροοργανισμούς που το χρησιμοποιούν ως πηγή άνθρακα). Η ανάλυση του DNA δείχνει ότι ο οργανισμός δεν έχει καμία ομοιότητα με τον *P. chrysosporium*. Δείγμα του μικροοργανισμού αυτού στάλθηκε για ταυτοποίηση και περεταίρω έρευνα για την ικανότητα παραγωγής αιθανόλης.

ABSTRACT

Biomass is an important, inexhaustible and environmentally friendly energy source, which may contribute significantly to energy efficiency by replacing the continuously depleted fossil fuels (oil, coal, gas e.t.c.). Biomass, once converted into gas, liquids and / or solid fuels through thermochemical or biochemical processes may be exploited as an energy source (heat, cooling and electricity).

Pyrolysis is a promising process that can convert biomass to such products. The purpose of this report is the literature review on the technology of pyrolysis and in particular the conversion of biomass into a liquid product, the "bio-oil"(which can be used as a substrate for microbial fermentation in order to produce ethanol in particular) and to assess the ability of micro-organisms to use bio-oil as a carbon source. Potential ethanol production ability from microorganisms can be further used to produce biofuels.

The organisms investigated in this report are the bacterium *Pseudomonas putida*, the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the fungus *Phanerochaete chrysosporium*. The cultures were grown in the appropriate nutrient medium with a variable percentage of Bio-oil. The cultures were monitored visually, by measuring the colonies (cfu) or using a photometer.

A remarkable find was an organism derived from a primary culture of *P. chrysosporium*. Having not established if it's either a mutation of the organism or a simple case of laboratory contamination, the unidentified organism seems to have the ability to develop in mediums enriched with a substantially higher level of bio-oil, as well as the possibility of development in levogloucozan.

The DNA analysis indicates no resemblance between this organism and *P. chrysosporium*. A sample of this microorganism has been sent for identification and further research on ethanol production capacity.

ΣΚΟΠΟΣ

Η μελέτη αυτή έχει ως σκοπό την ανεύρεση μικροοργανισμών οι οποίοι είναι ικανοί να αναπτυχθούν παρουσία βιοελαίου ως μόνη πηγή άνθρακα. Οι μικροοργανισμοί που μελετήθηκαν είναι το βακτήριο *Pseudomonas putida*, η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* και ο μύκητας *Phanerochaete chrysosporium*. Μακροπρόθεσμος στόχος της μελέτης είναι η παραγωγή αιθανόλης από μικροοργανισμούς που ζυμώνουν το έλαιο πυρόλυσης. Σε μετέπειτα στάδιο αυτοί οι οργανισμοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή βιοκαυσίμων.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο ερευνητικό κέντρο Atrium (Agro technology and Food Science Research Center, Bio-based Products) του πανεπιστημίου Wageningen της Ολλανδίας. Ευχαριστώ θερμά τον επικεφαλής καθηγητή της έρευνας, στην οποία συμμετείχα, Hans Mooibroek καθώς και τον επιβλέποντα καθηγητή μου Jan Springer για την επιστημονική καθοδήγηση και για την αρμονική συνεργασία.

Ευχαριστώ τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Θεόδωρο Βαρζάκα, καθηγητή μου στο ΤΕΙ Καλαμάτας, για τη βοήθεια που μου προσέφερε προκειμένου να επιλέξω το ερευνητικό εργαστήριο στο εξωτερικό, όπου και πραγματοποίησα την πτυχιακή μου εργασία.

Θέλω να ευχαριστήσω επίσης την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου κ. Μαρίνα Παπαδέλλη για την βοήθειά της και την καθοδήγηση που μου έδωσε για την επιτυχή ολοκλήρωση αυτής της πτυχιακής εργασίας.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου και την οικογένειά μου για την συμπαράσταση που έδειξαν.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Βιομάζα

Με τον όρο βιομάζα ορίζεται το σύνολο της ύλης που έχει βιολογική (οργανική) προέλευση, εξαιρουμένων των ορυκτών καυσίμων. Στον όρο βιομάζα δηλαδή, εμπεριέχεται οποιοδήποτε υλικό προέρχεται άμεσα ή έμμεσα από φυτικούς ή ζωικούς ιστούς. Πιο συγκεκριμένα, βιομάζα καλείται το σύνολο των αγροτικών καλλιεργειών και των δασικών εκμεταλλεύσεων, το βιοαποδομήσιμο κλάσμα των αποβλήτων, των υπολοίπων των αγροτικών, δασικών και σχετικών διεργασιών και των βιομηχανικών και αστικών αποβλήτων. Η βιομάζα είναι διαθέσιμη ευρέως και αποτελεί μια καθαρή και ανανεώσιμη πηγή (EC, 2003), η οποία δεν συνεισφέρει στο φαινόμενο του θερμοκηπίου, δεδομένου ότι η ποσότητα του διοξειδίου του άνθρακα που εκλύεται από την καύση της, είναι ίση περίπου με αυτή που προσλαμβάνεται από τα φυτά κατά τις διεργασίες ανάπτυξής της (Φατσικώστας, 2005). Τα υλικά αυτά έχουν τη δυνατότητα, με την κατάλληλη επεξεργασία να συμβάλλουν σημαντικά στην παραγωγή ανανεώσιμης ενέργειας παγκοσμίως. **(Εικόνα 1)**

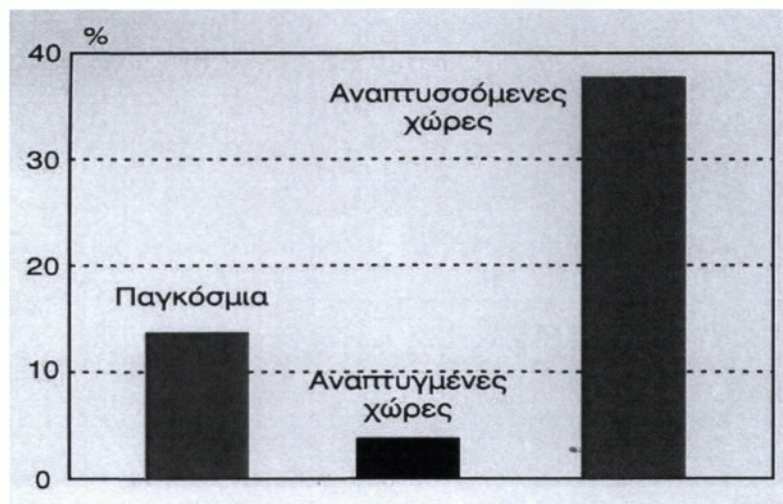


Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση της προέλευσης της βιομάζας.

1.1.1. Η βιομάζα ως ανανεώσιμη πηγή ενέργειας

Η βιομάζα είναι η πιο παλιά και διαδεδομένη ανανεώσιμη πηγή ενέργειας αφού μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως καύσιμο για παραγωγή ενέργειας. Η βιομάζα που παράγεται κάθε χρόνο στον πλανήτη μας υπολογίζεται ότι ανέρχεται σε 172 δισεκατομμύρια τόνους ξηρού υλικού, με ενεργειακό περιεχόμενο δεκαπλάσιο της ενέργειας που καταναλώνεται παγκοσμίως στο

ίδιο διάστημα. Το τεράστιο αυτό ενεργειακό δυναμικό παραμένει κατά το μεγαλύτερο μέρος του ανεκμετάλλευτο, καθώς, σύμφωνα με πρόσφατες εκτιμήσεις, μόνο το 1/7 της παγκόσμιας κατανάλωσης ενέργειας καλύπτεται από τη βιομάζα (Εικόνα 2) και αφορά κυρίως τις παραδοσιακές χρήσεις της (καυσόξυλα κλπ.).



Εικόνα 2. Η συμμετοχή της βιομάζας (%) στην παγκόσμια κατανάλωση ενέργειας.
Πηγή: <http://www.cres.gr/energy-saving/>

Για τις διάφορες τελικές χρήσεις της βιομάζας υιοθετούνται διαφορετικοί όροι. Για παράδειγμα ο όρος "βιοισχύς" περιγράφει τα συστήματα που χρησιμοποιούν πρώτες ύλες βιομάζας αντί των ορυκτών καυσίμων για ηλεκτροπαραγωγή. Επίσης ο όρος "βιοκαύσιμα" αναφέρεται κυρίως στα υγρά καύσιμα μεταφορών που υποκαθιστούν πετρελαϊκά προϊόντα όπως βενζίνη ή ντίζελ. Οι κύριες εφαρμογές της βιομάζας ως καύσιμο είναι για τη θέρμανση θερμοκηπίων, για τη θέρμανση κτηρίων, για την παραγωγή ενέργειας σε γεωργικές βιομηχανίες, σε βιομηχανίες ξύλου αλλά και σε μονάδες βιολογικού καθαρισμού και χώρους υγειονομικής ταφής απορριμμάτων (ΚΑΠΕ, 1996).

1.1.2. Πλεονεκτήματα της βιομάζας

Τα κυριότερα πλεονεκτήματα της βιομάζας θεωρούνται τα ακόλουθα:

- Η βιομάζα είναι ένας ανανεώσιμος πόρος αφού παράγεται φυσικά και με επαναλαμβανόμενο τρόπο στο περιβάλλον. Στη φύση, η βιομάζα παράγεται με την διαδικασία της φωτοσύνθεσης, δηλαδή του σχηματισμού υδατανθράκων από ανόργανα υλικά με την βοήθεια της ενέργειας του ηλιακού φωτός. Αυτοί οι υδατάνθρακες χρησιμοποιούνται στην συνέχεια και για την παραγωγή κυτταρίνης που είναι δομικό υλικό για τα φυτά.
- Η ενεργειακή χρήση της μπορεί να μειώσει αφενός μεν την ανάγκη για εισαγωγές ορυκτών καυσίμων, αφετέρου δε, την εκπομπή βλαβερών ρύπων όπως τα οξείδια του θείου και του άνθρακα.
- Είναι στερεάς μορφής ενέργεια που μπορεί όμως να μετατραπεί σε υγρά ή αέρια καύσιμα.
- Επιτρέπει τη λειτουργία σταθμών παραγωγής ηλεκτρισμού σε διάφορες κλίμακες (από λίγα kW ως αρκετές δεκάδες MW σήμερα).
- Αντίθετα από τους αιολικούς, ηλιακούς και υδροηλεκτρικούς σταθμούς παραγωγής που έχουν διακοπόμενη, μη ελεγχόμενη παραγωγή, η παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας από βιομάζα, πρακτικά μπορεί να προγραμματιστεί όπως και των υπόλοιπων θερμικών μονάδων που λειτουργούν με ορυκτά καύσιμα. Η παραγωγή της εξαρτάται μόνο από την διαθεσιμότητα του βιολογικής προέλευσης καυσίμου.
- Επιπλέον, αντίθετα με τους σταθμούς παραγωγής από άλλους τύπους Ανανεώσιμων Πηγών Ενέργειας (ΑΠΕ), οι σταθμοί χρήσης βιομάζας μπορούν να εγκατασταθούν σε ένα ευρύ φάσμα τοποθεσιών. Μια εφοδιαστική αλυσίδα βιομάζας οργανωμένη γύρω από την παραγωγή ηλεκτρισμού, μπορεί να αναζωογονήσει τις αγροτικές κοινότητες, προσφέροντας σε αγρότες και υλοτόμους ευκαιρίες διαφοροποίησης αλλά και δημιουργώντας καινούργιες θέσεις εργασίας.
- Είναι πηγή διαθέσιμη παγκοσμίως και σχεδόν ομοιόμορφα κατανεμημένη, σε αντίθεση με τα ορυκτά καύσιμα που εντοπίζονται σε περιορισμένες γεωγραφικές περιοχές. Έτσι προσφέρεται για την στήριξη μιας αειφόρου, ισόρροπης και αποκεντρωμένης ανάπτυξης (ΚΑΠΕ, 2006).

1.1.3. Τεχνολογίες μετατροπής της βιομάζας

Οι βασικές τεχνολογικές μέθοδοι μετατροπής της βιομάζας σε ενέργεια και/ή χημικά είναι :

- α) η πυρόλυση και αεριοποίηση,
- β) η ρευστοποίηση (υγροποίηση),
- γ) η υδρόλυση, και
- δ) η χημική επεξεργασία.

Η **πυρόλυση** και η αεριοποίηση αποτελούν μέρος της διαδικασίας της θερμικής καύσης. Η πυρόλυση (καταστρεπτική απόσταξη) γίνεται σε θερμοκρασία μεταξύ 450 και 600 °C, απουσία οξυγόνου, και παράγει ξυλάνθρακα και ένα πτητικό μείγμα (Reed, 1980). Ο ξυλάνθρακας που παράγεται με τη μέθοδο αυτή αποτελεί σημαντική πηγή καυσίμου (π.χ. οικιακή θέρμανση) σε πολλές αναπτυσσόμενες χώρες (Σακκάς, 2002).

Η **αεριοποίηση** της βιομάζας επιτυγχάνεται σε υψηλότερες θερμοκρασίες (> 600 °C) σε σχέση με τη πυρόλυση και παρουσία οξυγόνου (Goldstein, 1980). Το μείγμα που παράγεται κατά τη διάρκεια της αεριοποίησης είναι κυρίως μονοξείδιο του άνθρακα (CO) και υδρογόνο (H₂), αλλά και αέρια, όπως διοξείδιο του άνθρακα (CO₂), μεθάνιο (CH₄), άζωτο (N) και υδρατμοί (Σακκάς, 2002).

Ρευστοποίηση είναι η θερμοχημική μετατροπή της βιομάζας σε ρευστό καύσιμο. Στις περισσότερες περιπτώσεις η ρευστοποίηση αναφέρεται στη παραγωγή υγρού καυσίμου απ' ευθείας από τη φυτική βιομάζα, υπάρχει όμως και η προσέγγιση κατά την οποία η μεθανόλη μπορεί να μετατραπεί σε υγρό καύσιμο. Η προσέγγιση αυτή ονομάζεται «έμμεση» ρευστοποίηση.

Κατά τη μέθοδο της **υδρόλυσης** το ξύλο της βιομάζας διαχωρίζεται στα τρία κύρια συστατικά του, την κυτταρίνη, τις ημικυτταρίνες και την λιγνίνη. Κάθε συστατικό μπορεί να μετατραπεί σε χρήσιμα χημικά, ενέργεια αλλά και τροφή. Η κυτταρίνη για παράδειγμα εκτός από την παραγωγή υλικών όπως η γλυκόζη, πρωτεΐνη κ.α. έχει το μεγάλο πλεονέκτημα ότι μπορεί να χρησιμοποιείται για την παραγωγή αιθυλικής αλκοόλης και άλλων χημικών (Σπανός, n.d). Η υδρόλυση είναι η επιλεκτική μετατροπή των συστατικών των υδρογονανθράκων του ξύλου στα συστατικά τους, τα σάκχαρα. Η αυτό-υδρόλυση είναι μια εξειδικευμένη μορφή προ-μεταχείρισης στην οποία υψηλής πίεσης ατμός ή έκρηξη ατμού χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των ημι-κυτταρινών και της λιγνίνης από την κυτταρίνη (Goldstein, 1981).

Στην παρούσα μελέτη θα ασχοληθούμε με την προσέγγιση της ταχείας πυρόλυσης, που ακολουθείται από την υδρόλυση ή/και τη ζύμωση των σακχάρων που βρίσκονται στο προκύπτον βίο-έλαιο (Brown, 2007).

1.2. Βιοκαύσιμα

Τα βιοκαύσιμα είναι υγρά ή αέρια καύσιμα που παράγονται κυρίως ή αποκλειστικά από βιομάζα και χρησιμοποιούνται ως καύσιμα κυρίως στις μεταφορές. Οι λόγοι που απαιτούν την αντικατάσταση των ορυκτών καυσίμων με βιοκαύσιμα είναι περιβαλλοντικοί -για μείωση των εκπομπών ρύπων- λόγοι στρατηγικής -για εξασφάλιση ασφάλειας τροφοδοσίας- καθώς και οικονομικοί και κοινωνικοί λόγοι (Γερονικολού και Κυρίτσης, 2004).

Έχουν την δυνατότητα να προσφέρουν εξοικονόμηση ενέργειας αλλά και να συμβάλλουν στην αντιμετώπιση του φαινομένου του θερμοκηπίου. Η αύξηση των τιμών των ορυκτών καυσίμων τόσο σε παγκόσμιο όσο και τοπικό επίπεδο (Searchinger *et al.*, 2008) έχουν οδηγήσει την παγκόσμια κοινότητα να στραφεί προς τα βιολογικά καύσιμα (EU, 2008).

Τα υγρά βιοκαύσιμα μπορούν να δημιουργηθούν από διάφορες πηγές βιομάζας μετά από επεξεργασία. Διάφοροι τύποι βιοκαυσίμων μπορούν να παραχθούν, κατάλληλοι για καύσιμα μεταφορών, που μελλοντικά θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν και στην αεροπορία.

Τα κύρια βιοκαύσιμα που είναι διαθέσιμα αυτή τη στιγμή είναι η βιοαιθανόλη, το βιοντίζελ, το βιοαέριο και η βιομεθανόλη. Οι πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή βιοντίζελ είναι οι ελαιούχοι σπόροι, ενώ για την παραγωγή βιοαιθανόλης η πρώτη ύλη προέρχεται από φυτά που είναι πλούσια σε σάκχαρα και άμυλο όπως είναι τα ζαχαρότευτλα και τα ζαχαροκάλαμα. Τα βιοκαύσιμα που δημιουργούνται από τέτοιες βρώσιμες καλλιέργειες, αναφέρονται ως βιοκαύσιμα «**πρώτης γενιάς**» (Taylor, 2008) και παρουσιάζονται στον **Πίνακα 1**.

Η βιομάζα που περιέχει λιγνοκυτταρίνη (κυρίως η βιομάζα από φυτικά κυτταρικά τοιχώματα τα οποία έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε άνθρακα) μπορεί να μετατραπεί σε υγρά βιοκαύσιμα, μέσω βιολογικών διεργασιών (εστεροποίηση και ζύμωση) ή μέσω θερμοχημικής επεξεργασίας όπως η πυρόλυση. Τα εν λόγω βιοκαύσιμα που προέρχονται από καλλιέργειες που είναι μη βρώσιμες, αναφέρονται ως «**δεύτερης γενιάς**» βιοκαύσιμα (**Πίνακας 2**) (Taylor, 2008).

Πίνακας 1. Βιοκαύσιμα πρώτης γενιάς.

Τύπος Βιοκαυσίμου	Ονομασία	Διεργασία
Φυτικό έλαιο	Φυτικό έλαιο	Πίεση, εκχύλιση, διύλιση
Βιοντίζελ	Βιοντίζελ από σπόρους	Μετεστεροποίηση ελαίων
	Βιοντίζελ από απόβλητα ή χρησιμοποιημένα έλαια	Διύλιση, μετεστεροποίηση
Βιοαιθανόλη	Αιθανόλη από ζαχαρώδη φυτά	Ζύμωση, απόσταξη
	Αιθανόλη από αμυλώδη φυτά	Υδρόλυση, ζύμωση, απόσταξη
Βίο-ΕΤΒΕ	ΕΤΒΕ	Ζύμωση, σύνθεση
Βιοαέριο	Συνθετικό φυσικό αέριο από βιοαέριο	Χώνευση, απομάκρυνση CO ₂ -H ₂ O
Βιουδρογόνο	Υδρογόνο από βιοαέριο	Χώνευση, wgs, απομάκρυνση CO ₂ -H ₂ O

Πηγή: Σπανός, n.d.

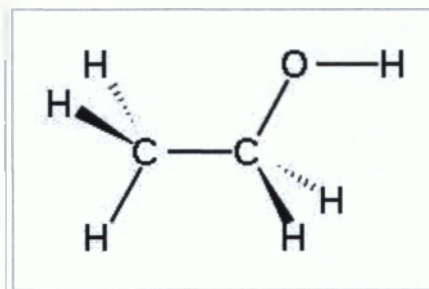
Πίνακας 2. Βιοκαύσιμα δεύτερης γενιάς.

Τύπος Βιοκαυσίμου	Ονομασία	Διεργασία
Συνθετικά βιοκαύσιμα	Fischer-Tropsch Βιοντίζελ	Εξαέρωση, wgs, σύνθεση, HDC
	Αλκοόλη από αέριο σύνθεσης	Εξαέρωση, σύνθεση
	HTU ντίζελ	HTU, HDO, διύλιση
	Ντίζελ πυρόλυσης	Πυρόλυση, HDO, διύλιση
Βιομεθανόλη	Μεθανόλη	Εξαέρωση, wgs, σύνθεση
Βιοαιθανόλη	Αιθανόλη από κυτταρίνη	Υδρόλυση, Ζύμωση, απόσταξη
Βιο-MTBE	MTBE	Σύνθεση
Βιοδιμέθυλαιθέρας	DME	Εξαέρωση, wgs, σύνθεση
Βιουδρογόνο	Υδρογόνο από αέριο σύνθεσης	Εξαέρωση, wgs, απομάκρυνση CO ₂
Βιοαέριο	Φυσικό αέριο από αέριο σύνθεσης	Εξαέρωση, wgs, σύνθεση, απομάκρυνση CO ₂ -H ₂ O
	Συνθετικό φυσικό αέριο	Εξαέρωση

Πηγή: Σπανός, n.d.

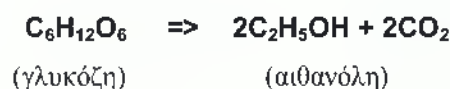
1.2.1. Η βιοαιθανόλη και τα χαρακτηριστικά της

Αιθανόλη ή αιθυλική αλκοόλη (Εικόνα 3) είναι δυο διαφορετικές ονομασίες που χρησιμοποιούνται για ένα ευρέως διαθέσιμο προϊόν που συχνά ονομάζεται “spirit” (πνεύμα) ή αλκοόλ. Η βιοαιθανόλη –που αποτελεί αντικείμενο μελέτης της παρούσης εργασίας- παράγεται από ένα ποικίλο φάσμα γεωργικών πρώτων υλών, οι οποίες διαθέτουν ένα σημαντικό συστατικό, τα σάκχαρα, τα οποία είναι απαραίτητα για την μικροβιακή ζύμωση.



Εικόνα 3. Δομή του μορίου της αιθανόλης. Πηγή: http://en.wikipedia.org/wiki/Ethanol_fuel

Η μικροβιακή ζύμωση είναι μια βιολογική μέθοδος μετατροπής της βιομάζας σε αιθανόλη. Οι ζύμες, όπως ο *Saccharomyces cerevisiae*, είναι οι ασφαλέστεροι και οι πιο αποτελεσματικοί μικροοργανισμοί για τη ζύμωση της γλυκόζης, καθώς και άλλων εξοζών, και για αυτό το λόγο επιλέγονται για την βιομηχανική παραγωγή αιθανόλης. Οι ζύμες μετατρέπουν τις εξόζες σε αιθανόλη και σε διοξείδιο του άνθρακα μέσα από το μονοπάτι της γλυκόλυσης, όπως παρουσιάζεται στην επόμενη αντίδραση:



Με υπόστρωμα τη γλυκόζη, η θεωρητική απόδοση αιθανόλης είναι 0.51 g/g. Συνήθως κατά τη ζύμωση παράγονται και υποπροϊόντα, όπως η γλυκερίνη, με αποτέλεσμα η πραγματική απόδοση να ανέρχεται στο 90-95% της θεωρητικής (Σταράμος, 2009).

Παραδείγματα πρώτων υλών πλούσιες σε σάκχαρα που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή βιοαιθανόλης είναι η μελάσα, το κρασί, το ζαχαροκάλαμο, οι σταφίδες, αλλά και πρώτες ύλες των οποίων το άμυλο μπορεί να μετατραπεί σε σάκχαρα, όπως το καλαμπόκι, το σιτάρι, το ρύζι, οι πατάτες. Τέλος διάφορες κυτταρινούχες πρώτες ύλες όπως π.χ. το ξύλο και το άχυρο χρησιμοποιούνται ως πρώτες ύλες για την παραγωγή βιοαιθανόλης (Boukis, 1995; ACE, 1997).

Όλες αυτές οι πρώτες ύλες θεωρούνται φυσικώς ανανεώσιμες πηγές. Πολλές από αυτές είναι διαθέσιμες σε σημαντικές ποσότητες, ενώ οι κυτταρινούχες είναι διαθέσιμες σήμερα σε ανεξάντλητες ποσότητες. Αυτό είναι ένα πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό που συμβάλει στην αειφόρο ανάπτυξη που επιδιώκεται ιδιαίτερα στις μέρες μας.

Επιπλέον, από τη βιοαιθανόλη μπορεί να εξαχθεί μια ουσία γνωστή ως ETBE (αίθυλο τριτοβουτυλαιθέρας) η οποία χρησιμοποιείται ως πρόσθετο της βενζίνης. Τόσο η βιοαιθανόλη όσο και ο ETBE λόγω του ουσιαστικού περιεχομένου τους σε οξυγόνο (35%

κατ' όγκο) έχουν την ιδιότητα, όταν αναμειγνύονται με βενζίνη σε ποσοστό μόλις 10%, να αυξήσουν σημαντικά τον αριθμό των οκτανίων του καυσίμου (Mc Millan, 1997). Αυτό το χαρακτηριστικό της βιοαιθανόλης την κάνει να υπερτερεί σε σχέση με άλλα υγρά βιοκαύσιμα στην αγορά καυσίμων. Επιπλέον, τόσο η βιοαιθανόλη όσο και ο ETBE, σε τόσο χαμηλό ποσοστό όσο αυτό που μόλις αναφέρθηκε, έχουν την ικανότητα να μειώνουν σημαντικά την παραγωγή ρύπων από την καύση καυσίμων και ως εκ τούτου, έχουν θετικές συνέπειες στο περιβάλλον.

Η μείωση των ρύπων που επιτυγχάνεται με τη χρήση της βιοαιθανόλης είναι σημαντικά υψηλότερη σε σύγκριση με αυτή που επιτυγχάνεται με τη χρήση διαφόρων βελτιωμένων συμβατικών καυσίμων, αλλά και σε σύγκριση με άλλα υγρά καύσιμα τα οποία προέρχονται από ανανεώσιμες πηγές. Κατά συνέπεια, η βιοαιθανόλη δεν είναι απλά ένα ανανεώσιμο καύσιμο, αλλά είναι επίσης ένα καύσιμο στο οποίο ταιριάζει ο χαρακτηρισμός «φιλικό προς το περιβάλλον» (Konioridos, 2003).

1.3. Η μέθοδος της πυρόλυσης για την παραγωγή ελαίου πυρόλυσης

Η διαδικασία της πυρόλυσης χρησιμοποιείτο από παλιά για την παραγωγή ξυλάνθρακα χρησιμοποιώντας φούρνους κυψελών αργίλου. Ο Abraham Gesner το 1861 χρησιμοποίησε την πυρόλυση του άνθρακα στους 427°C για την παραγωγή κηροζίνης (Basu, 2010).

Κατά τη διαδικασία της πυρόλυσης η βιομάζα θερμαίνεται στους 300-650° C (ανάλογα το είδος της πυρόλυσης) και παραμένει σε αυτή τη θερμοκρασία για έναν καθορισμένο χρόνο. Κατά τη διάρκεια της πυρόλυσης παράγεται το βιοέλαιο ή αλλιώς έλαιο πυρόλυσης, το οποίο πέραν των άλλων συστατικών περιέχει σάκχαρα (κυρίως λεβογλουκοζάνη). Τα σάκχαρα αυτά χρησιμοποιούνται ως πρώτη ύλη από μικροοργανισμούς κατά τη διαδικασία της μικροβιακής ζύμωσης για την παραγωγή αιθανόλης (Yu, Zhang, 2002). Αναλυτική περιγραφή του ελαίου πυρόλυσης καθώς και της εφαρμογής του ως βιοκαύσιμο παρατίθεται στη συνέχεια (παράγραφος 1.3.2).

Τα βασικά είδη πυρόλυσης που χρησιμοποιούνται είναι τέσσερα: η αργή πυρόλυση, η πυρόλυση σε κενό, η πυρόλυση σε υπόστρωμα και η ταχεία πυρόλυση. Στη συγκεκριμένη μελέτη η μέθοδος πυρόλυσης με την οποία παρήχθηκε το βιοέλαιο που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματά μας, είναι ένα είδος ταχείας πυρόλυσης η οποία αναλύεται στη συνέχεια.

1.3.1. Ταχεία πυρόλυση (fast pyrolysis)

Η ταχεία πυρόλυση είναι μια διαδικασία κατά την οποία λιγνοκυτταρινούχες πρώτες ύλες (βιομάζα) θερμαίνονται γρήγορα στους 450-600 °C απουσία οξυγόνου. Υπό αυτές τις

συνθήκες, η άμορφη και δύσκολη στη χρήση βιομάζα μετασχηματίζεται σε ένα καθαρό και ομοιόμορφο υγρό, αποκαλούμενο έλαιο πυρόλυσης ή βιοέλαιο. Ενδεικτικά ένας τόνος ξηρού ξύλου, με πυρόλυση αποδίδει (Ελαιουργική, 2007):

- 300 κιλά ξυλάνθρακα
- 140 m³ καύσιμο αέριο
- 14 λίτρα μεθυλικής αλκοόλης
- 53 λίτρα οξικό οξύ
- 8 λίτρα εστέρες
- 3 λίτρα ακετόνη
- 76 λίτρα ελαίου πυρόλυσης
- 12 λίτρα έλαιο κρεοζόλης και
- 30 κιλά πίσσα

Το ενεργειακό περιεχόμενο του ελαίου πυρόλυσης είναι τέσσερις έως πέντε φορές υψηλότερο από το αρχικό στερεό υλικό, το οποίο προσφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα.

Η BTG-BTL (Biomass Technology Group - Biomass to Liquid) είναι μια ανεξάρτητη, ιδιωτική εταιρεία που τα τελευταία 25 χρόνια έχει εξειδικευτεί στη διαδικασία μετατροπής της βιομάζας σε βιοκαύσιμα. Είναι η εταιρεία η οποία προμήθευσε τα δείγματα ελαίου πυρόλυσης για τις ανάγκες του πειράματος της παρούσης εργασίας.

Όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα (Εικόνα 4), η BTG-BTL έχει αναπτύξει μια τεχνολογία ταχείας πυρόλυσης (btg-Fast pyrolysis) που είναι βασισμένη στην εντατική μίξη της βιομάζας με καυτή άμμο, απουσία αέρα, μέσα σε ένα τροποποιημένο περιστρεφόμενο κωνικό αντιδραστήρα. Τα έλαια, ο προσροφητικός άνθρακας και τα αέρια πυρόλυσης είναι τα αρχικά προϊόντα από αυτή τη διαδικασία. Ο ξυλάνθρακας και η άμμος ανακυκλώνονται στο θάλαμο καύσης όπου ο ξυλάνθρακας καίγεται για να θερμάνει εκ νέου την άμμο. Οι ατμοί που απελευθερώνονται από τον αντιδραστήρα ψύχονται γρήγορα στο συμπυκνωτή ο οποίος παράγει έλαιο πυρόλυσης και αέρια. Τα αέρια μετά από θέρμανση στο θάλαμο καύσης, μετατρέπονται σε ατμό όπου μπορεί να χρησιμοποιηθεί για παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας, ξήρανση βιομάζας ή άλλη χρήση (BTG-BTL, 2001-2011a).

Πηγή: <http://www.btg-btl.com/index.php?r=technology>.

Το έλαιο πυρόλυσης προέρχεται από την διαδικασία της ταχείας πυρόλυσης των λιγνοκυτταρινούχων πρώτων υλών (βιομάζας) που περιγράφηκε παραπάνω. Είναι ένα σκούρο καφέ υγρό με χαμηλό ιξώδες, και το υδατοδιαλυτό του κλάσμα περιέχει λιγνίνη, λεβογλουκοζάνη, φορμαλδεΰδη, μυρμηκικό οξύ, οξικό οξύ, ακετόνη κ.ά. Κάτω από τις συνθήκες της ταχείας πυρόλυσης δημιουργούνται οργανικοί ατμοί, αέρια και ξυλάνθρακας. Όλα τα παραπάνω βρίσκονται συμπυκνωμένα στο έλαιο πυρόλυσης. Τυπικά το 50 με 75% κατά βάρος της βιομάζας μετατρέπεται σε έλαιο πυρόλυσης.

O[C@H]1O[C@H](O)[C@H](O)[C@@H](O)[C@H]1O

Πηγή: <http://www.guidechem.com/com-guide21901/pro-show856417.html>

Η λεβογλουκοζάνη εμφανίζεται επίσης και στο έλαιο πυρόλυσης το οποίο προκύπτει από την πυρόλυση της βιομάζας (Sung-Seen *et al.*, 2010). Η υδρόλυση της λεβογλουκοζάνης οδηγεί στην παραγωγή γλυκόζης, έναν υδατάνθρακα που μπορεί να υποστεί μικροβιακή ζύμωση. Κατά συνέπεια λιγνοκυτταρινούχες πρώτες ύλες παρουσιάζουν μεγάλες δυνατότητες ως ανανεώσιμες πρώτες ύλες για την παραγωγή αιθανόλης (Lakshmanan and Hoelscher, 1970).

Στην παρούσα εργασία, συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί εξετάζονται ως προς την ικανότητά τους να αναπτυχθούν σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιέχει ως μοναδική πηγή άνθρακα τη λεβογλουκοζάνη και κατά συνέπεια την πιθανή μελλοντική χρήση αυτών των μικροοργανισμών για την παραγωγή βιοαιθανόλης από το έλαιο πυρόλυσης.

1.3.2.1. Ιδιότητες του ελαίου πυρόλυσης

Το έλαιο πυρόλυσης είναι ένα υγρό, χρώματος σχεδόν μαύρο-καφέ. Η πυκνότητα του υγρού αυτού είναι περίπου 1200 kg/m^3 , η οποία είναι σημαντικά υψηλότερη από αυτή της αρχικής βιομάζας. Το ιξώδες του ποικίλλει από χαμηλό (π.χ. 25 cP) και φτάνει μέχρι και τα 1000 cP ανάλογα με την περιεκτικότητά του σε νερό αλλά και την αρχική πρώτη ύλη από την οποία προήλθε.

Η μέση στοιχειακή σύνθεση του ελαίου πυρόλυσης είναι:

• Άνθρακας:	51%
• Υδρογόνο:	8%
• Οξυγόνο:	40%
• Άζωτο:	0,9%
• Θείο:	0,01%
• Τέφρα:	0,09%

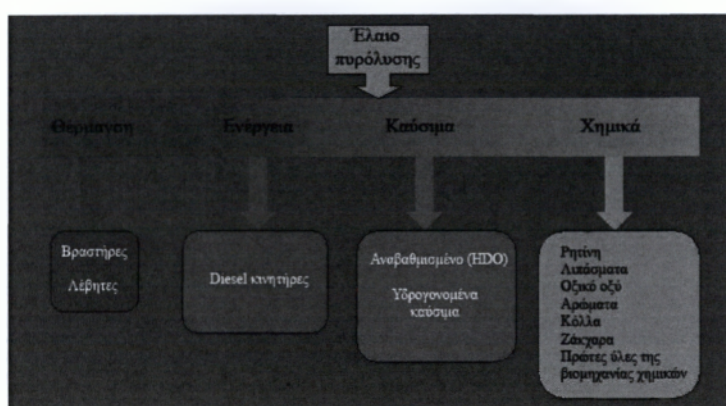
Στη σύσταση της βιομάζας περιλαμβάνονται οργανικά οξέα (όπως το μυρμηκικό και οξικό οξύ), που δίνουν στο έλαιο πυρόλυσης το χαμηλό pH που είναι περίπου 2-4. Το έλαιο πυρόλυσης έχει περιεκτικότητα νερού περίπου 15-35% κατά βάρος, και διαχωρισμός φάσεων εμφανίζεται μόνο εάν η περιεκτικότητα του ελαίου πυρόλυσης σε νερό είναι υψηλότερη από 30-45% κατά βάρος (BTG-BTL, 2001-2011b; Ελαιουργική, 2007).

1.3.2.2. Εφαρμογές του ελαίου πυρόλυσης

Το έλαιο πυρόλυσης μπορεί να αντικαταστήσει τα ήδη υπάρχοντα καύσιμα για την παραγωγή θερμότητας, ενέργειας αλλά και να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή χημικών ουσιών. Οι βραχυπρόθεσμες εφαρμογές είναι αυτές σε λέβητες, σε καυστήρες, αλλά και

στους σταθμούς παραγωγής ηλεκτρικού ρεύματος, ενώ πιο μακροπρόθεσμες εφαρμογές είναι σε στροβίλους και σε μηχανές ντίζελ.

Η εξέλιξη του ελαίου πυρόλυσης σε καύσιμα μεταφορών είναι τεχνικά εφικτό, με περαιτέρω επεξεργασία μέσω της διαδικασίας της υδρόλυσης. Επιπλέον, υπάρχει ένα ευρύ φάσμα χημικών ουσιών που μπορεί να εξαχθεί ή να προέλθει από το έλαιο πυρόλυσης. Ένα σχεδιάγραμμα των παραγόμενων από το έλαιο πυρόλυσης προϊόντων, εμφανίζεται στην **Εικόνα 6**.



Εικόνα 6. Γενικό πλάνο των προϊόντων που παράγονται από το έλαιο πυρόλυσης.

Πηγή: <http://www.btgworld.com/index.php?id=23&rid=8&r=rd>

Προγενέστερη έρευνα έδειξε ότι το έλαιο πυρόλυσης έχει τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί από ζύμες και μύκητες ως πηγή άνθρακα (Prosen, 1993), αλλά επίσης και να χρησιμοποιηθεί, μετά από υδρόλυση, ως πρώτη ύλη για τη ζύμωση από μικροοργανισμούς για την παραγωγή αιθανόλης (Yu and Zhiang, 2003a; 2003b). Ωστόσο, συστατικά όπως η λιγνίνη, οι αλδεΐδες, και τα παράγωγα φουρανίου και φουρφουρόλης, που περιέχονται στο έλαιο πυρόλυσης, έχουν ανασταλτική δράση έναντι των μικροοργανισμών. Επίσης, η λεβογλουκοζάνη, το κύριο σάκχαρο που περιέχεται στο έλαιο πυρόλυσης, δεν μπορεί να ζυμωθεί, παρά μόνο από ορισμένους μικροοργανισμούς (Bennett *et al.*, 2009).

1.3.2.3. Πλεονεκτήματα του ελαίου πυρόλυσης

Η μετατροπή της βιομάζας σε έλαιο πυρόλυσης προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα όπως:

- Ως υγρό βιοκαύσιμο, το έλαιο πυρόλυσης, βρίσκει ευκολότερη εφαρμογή σε σχέση με τα στερεά βιοκαύσιμα.

- Το έλαιο πυρόλυσης αποθηκεύεται και μεταφέρεται εύκολα, άρα η πυρόλυση επιτρέπει την αποσύζευξη μεταξύ της διαθεσιμότητας της βιομάζας και της ζήτησης βιοκαυσίμων.
- Σήμερα, είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί το έλαιο πυρόλυσης στους υπάρχοντες λέβητες πετρελαίου.
- Το έλαιο πυρόλυσης μπορεί να παραχθεί χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη οποιοδήποτε είδος βιομάζας που στην ουσία αποτελούν υπολείμματα (φυτικής ή ζωικής προέλευσης).
- Η εφαρμογή πυρόλυσης της βιομάζας δεν διασπά την τροφική αλυσίδα αφού χρησιμοποιούνται μη βρώσιμα φυτικά υπολείμματα (βιοκαύσιμα δεύτερης γενιάς).
- Η ζήτηση, για ένα οικολογικό και φυσικό βιοκαύσιμο όπως είναι το έλαιο πυρόλυσης, είναι συνεχώς αυξανόμενη.
- Η ανόργανη ύλη που περιέχεται στη βιομάζα και που παραμένει μετά την επεξεργασία αυτής, μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί προς αποφυγή μείωσης του ορυκτού πλούτου.

1.4. Μικροοργανισμοί ζύμωσης ελαίου πυρόλυσης

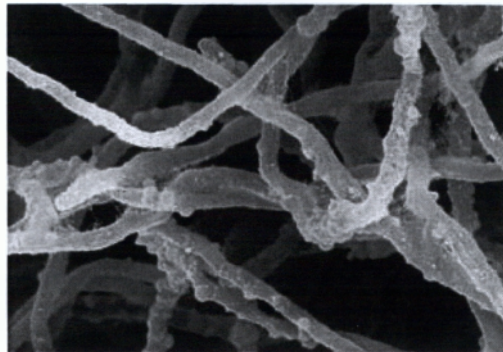
Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως η λεβογλουκοζάνη που περιέχεται στο έλαιο πυρόλυσης μπορεί να ζυμωθεί από κάποιους μικροοργανισμούς προκειμένου να παραχθεί αιθανόλη. Σε αυτήν την πτυχιακή εργασία ερευνάται η ικανότητα ανάπτυξης τριών μικροοργανισμών στο έλαιο πυρόλυσης, το οποίο προέρχεται από καύση ξύλου, χρησιμοποιώντας τη διαδικασία της ταχείας πυρόλυσης. Οι μικροοργανισμοί που επιλέχτηκαν σε αυτό το πείραμα είναι ο μύκητας *Phanerochaete chrysosporium*, το βακτήριο *Pseudomonas putida* και η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*.

1.4.1. *Phanerochaete chrysosporium*

Ο *P. chrysosporium* είναι ένας μύκητας λευκής σήψης (Εικόνα 7). Έχει βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης περίπου 40 °C, που σημαίνει ότι μπορεί να αναπτυχθεί εύκολα ακόμα και μέσα σε σωρούς λιπασμάτων, όπου αναπτύσσονται πολύ υψηλές θερμοκρασίες.

Χρησιμοποιείται ως μοντέλο για την κατανόηση βιολογικών φαινομένων που σχετίζονται με τη φυσιολογία και την ενζυμολογία. Στην παρούσα εργασία επιλέχτηκε λόγω της ικανότητάς του να μεταβολίζει και να αποικοδομεί ένα ευρύ φάσμα χημικών ουσιών,

αλλά κυρίως λόγω της ικανότητάς του να παράγει ένζυμα που αποικοδομούν τη λιγνίνη. (Venkataramanan, Jagjit, 2007).



Εικόνα 7. Κύτταρα του μύκητα *Phanerochaete chrysosporium* όπως φαίνονται σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Πηγή: <http://microbezoo.commtechlab.msu.edu>

1.4.2. *Pseudomonas putida*

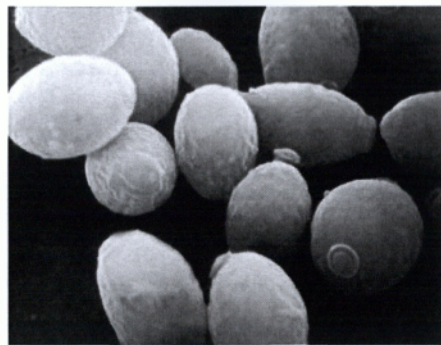
Το *P. putida* είναι ένα Gram αρνητικό ραβδόμορφο βακτήριο (**Εικόνα 8**). Γενικά, οι Ψευδομονάδες απαντούν στο έδαφος και στο νερό, και αναπτύσσονται βέλτιστα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ορισμένα είδη έχουν τη δυνατότητα να αναπτύσσονται παρουσία επικίνδυνων ρύπων και αρωματικών υδρογονανθράκων όπως το τολουόλιο, το βενζόλιο, και το αιθυλοβενζόλιο. Μια άλλη ικανότητα του *P. putida* είναι ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί στις εγκαταστάσεις πετρελαίου για τον καθαρισμό των καυσίμων (από υδρογονάνθρακες όπως το τολουόλιο), αλλά επίσης έχει την ικανότητα να προστατεύει τα φυτά από διάφορα παράσιτα και αλλά επιβλαβή βακτήρια, έτσι ώστε το φυτό να έχει μια ομαλή ανάπτυξη. Το βακτήριο *P. putida* επιλέχτηκε σε αυτή την εργασία λόγω της δυνατότητάς του να αποικοδομεί ένα ευρύ φάσμα αρωματικών ενώσεων (Wackett, 2003).



Εικόνα 8. Κύτταρα του βακτηρίου *Pseudomonas putida* όπως φαίνονται σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Πηγή: <http://microbewiki.kenyon.edu>

1.4.3. *Saccharomyces cerevisiae*

Η ζύμη *S. cerevisiae* είναι ένα είδος ζύμης που πολλαπλασιάζεται με εκβλάστηση (Εικόνα 9). Είναι η πλέον χρησιμοποιούμενη ζύμη, λόγω της χρήσης της από τους αρχαίους χρόνους για την παραγωγή τροφίμων. Πιστεύεται ότι αρχικά απομονώθηκε από τη φλούδα των σταφυλιών. Είναι ένα ιδιαίτερα μελετημένο είδος ευκαρυωτικού οργανισμού τόσο σε επίπεδο μοριακής βιολογίας όσο και σε επίπεδο βιολογίας κυττάρων και είναι ο μικροοργανισμός που βρίσκεται πίσω από την πιο γνωστή μορφή ζύμωσης (Goffeau *et al.*, 1996). Ο μικροοργανισμός αυτός συγκεντρώνει μεγάλο ενδιαφέρον για τη βιομηχανία τροφίμων, ζυμολογία και τη μικροβιολογία τροφίμων λόγω της μεταβολιστικής του δραστηριότητας (οινοποίηση, ζυθοποίηση, αρτοποιία, αλκοολούχα ποτά) (Altmann and Trachsel, 1994)



Εικόνα 9. Κύτταρα *Saccharomyces cerevisiae* όπως εμφανίζονται σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.
Πηγή: www.musee-afrappier.qc.ca

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Η μελέτη αυτή έλαβε χώρα στα εργαστήρια του Ερευνητικού Κέντρου Atrium (Agrotechnology and Food Science Research Center, Biobased Products) του Πανεπιστημίου Wageningen της Ολλανδίας. Οι μελέτες που έγιναν αφορούσαν κυρίως την ικανότητα ζύμωσης του ελαίου πυρόλυσης από συγκεκριμένους μικροοργανισμούς, αλλά και τη μελέτη μίας νέας ζύμης που απομονώθηκε τυχαία κατά τη διάρκεια των πειραμάτων και παρουσίασε ικανότητα ανάπτυξης σε έλαιο πυρόλυσης.

2.1 Μικροοργανισμοί.

Οι μικροοργανισμοί που επιλέχθηκαν για μελέτη στην παρούσα εργασία είναι το βακτήριο *Pseudomonas putida* (στέλεχος KT2440), η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* (η κοινή ζύμη των αρτοποιιών) και ο μύκητας *Phanerochaete chrysosporium* (στέλεχος RP78 από το πανεπιστήμιο της Ουτρέχτης).

2.2 Θρεπτικά υλικά καλλιέργειας των μικροοργανισμών

Για την ανάπτυξη κάθε μικροοργανισμού χρησιμοποιήθηκε το κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα και σε ορισμένες περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκαν και περισσότερα από ένα. Τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα ακόλουθα:

- LB-medium (εκχύλισμα ζύμης 5 g/L, NaCl 10 g/L, τρυπτοφάνη 5 g/L)
- YEM (εκχύλισμα ζύμης 20 g/L, ουρία 6.4 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, γλυκόζη 20 g/L, MgSO_4 1 g/L)
- YPD (εκχύλισμα ζύμης 10 g/L, πεπτόνη 20 g/L, δεξτρόζη 20 g/L)

Η γλυκόζη στα υποστρώματα YEM και YPD αντικαταστάθηκε από έλαιο πυρόλυσης σε συγκεκριμένα πειράματα, οπότε και γίνεται σχετική αναφορά στα αντίστοιχα σημεία.

- Mineral Medium (MM) (Na_2HPO_4 9.65 g/L, KH_2PO_4 1.5 g/L, MgSO_4 0.5 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g/L, έτοιμο διάλυμα ιχνοστοιχείων σε αναλογία 1/100).

Το έτοιμο διάλυμα ιχνοστοιχείων ήταν ένα μείγμα που κυκλοφορεί στο εμπόριο το οποίο περιείχε: 20 g/L FeCl_3 , 10 g/L CaCl_2 , 0.03 g/L CuSO_4 , 0.05 g/L MnCl_2 , 0.1 g/L ZnSO_4 . Το διάλυμα αποστειρώθηκε με μικροβιολογικό φίλτρο (διάμετρο πόρων 0.45 μm).

Στις περιπτώσεις που απαιτούνταν στερεά θρεπτικά υλικά, στα παραπάνω υλικά προστέθηκε 1.5% Άγαρ.

Στα υποστρώματα, σε ορισμένες περιπτώσεις, προστέθηκαν διαφορετικά ποσοστά ελαίου πυρόλυσης τα οποία και περιγράφονται στην ενότητα των αποτελεσμάτων.

Δεδομένου ότι η λεβογλουκοζάνη είναι το κύριο σάκχαρο του ελαίου πυρόλυσης, εξετάστηκε αν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πηγή άνθρακα από τους μικροοργανισμούς, και σε ορισμένες περιπτώσεις προστέθηκε στο θρεπτικό υπόστρωμα λεβογλουκοζάνη του εμπορίου σε συγκέντρωση 20 g/L.

2.3 Συνθήκες ανάπτυξης των μικροοργανισμών

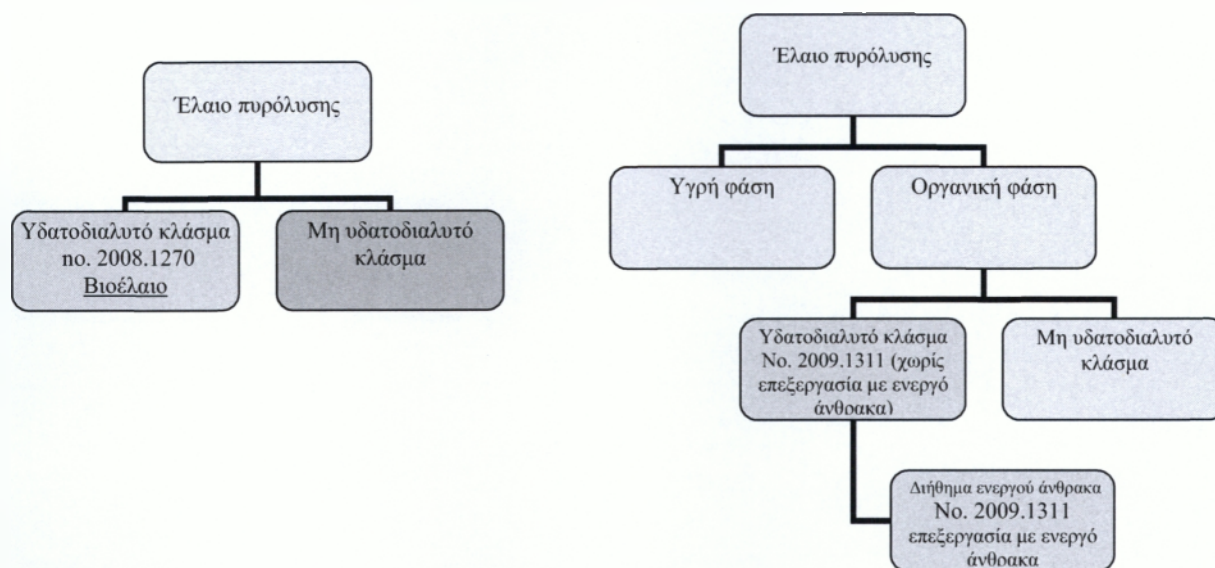
Σε όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν προηγήθηκε προκαλλιέργεια των μικροοργανισμών. Πιο συγκεκριμένα οι *προκαλλιέργειες* δημιουργήθηκαν από τα αποθέματα των μικροοργανισμών, τα οποία υπήρχαν στον καταψύκτη ή σε τρυβλία, με τον ακόλουθο τρόπο: από απόθεμα της ζύμης *S. cerevisiae* που ήταν τοποθετημένο σε καταψύκτη (-80 °C), ελήφθηκε 0.1 ml ως εμβόλιο και προστέθηκε σε 10 ml YPD (σε κωνικές φιάλες των 100 ml). Αμέσως μετά τοποθετήθηκε σε επωαστικό θάλαμο με ανάδευση (250 στροφές/λεπτό) σε θερμοκρασία 30 °C για 24 ώρες. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για το βακτήριο *P. putida*. Για τον μύκητα *P. chrysosporium* η αφετηρία ήταν μια καλλιέργεια-απόθεμα σε τρυβλίο. Ένα μέρος της στερεής αυτής καλλιέργειας τοποθετήθηκε για 15 δευτερόλεπτα σε ένα μπλέντερ μαζί με 25 ml YPD. Από το μείγμα αυτό, μόλις 2 ml χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό 10 ml YPD σε μια κωνική φιάλη των 100 ml για την δημιουργία της προκαλλιέργειας. Ακολούθησε επώαση με ανάδευση (250 στροφές/λεπτό) στους 30 °C για 24 ώρες.

Οι μικροβιακές *καλλιέργειες εργασίας* (που προέκυψαν από τις προκαλλιέργειες) αναπτύχθηκαν σε φιάλες Erlenmeyer των 100 ml που περιείχαν 10 ml από το κατάλληλο θρεπτικό υλικό, χρησιμοποιώντας ως εμβόλιο κατάλληλη ποσότητα της αντίστοιχης προκαλλιέργειας. Η επώαση έγινε και πάλι υπό ανάδευση στους 30 °C για χρονικό διάστημα διαφορετικό, ανάλογα με το πείραμα. Εναλλακτικά οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε Uniplates. Ένα Uniplate είναι μια ακτινοβολημένη θήκη πολυπροπυλενίου 24 «θέσεων» με μέγιστο όγκο κάθε «θέσης» τα 10 ml, που καλύπτεται με έναν λαστιχένιο κάλυμμα (CAP). Στην κάθε «θέση» προστέθηκαν 3 ml θρεπτικού υποστρώματος και 0.1 ml από τον επιλεγμένο μικροοργανισμό.

2.4 Δείγματα ελαίου πυρόλυσης

Τα έλαια πυρόλυσης που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτό το πείραμα παρασκευάστηκαν την ολλανδική εταιρία BTG-BTL στο Enschede της Ολλανδίας. Αυτή η επιχείρηση χρησιμοποιεί τη μέθοδο γρήγορης πυρόλυσης (fast pyrolysis) για να δημιουργήσει έλαια προερχόμενα από καύση ξύλου. Διαφορετικές διαδικασίες εξαγωγής ελαίου πυρόλυσης

εξετάζονται προκειμένου να καταστεί κατάλληλο για διάφορες χρήσεις και στην περίπτωση αυτού του πειράματος να καταστεί κατάλληλο για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών.



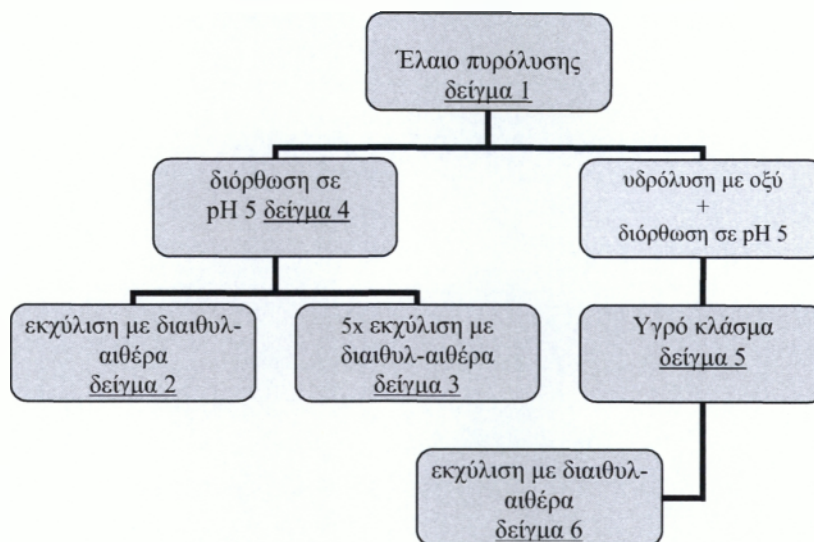
Εικόνα 10. Δείγματα ελαίου πυρόλυσης από την εταιρεία BTG-BTL, που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

Στην **Εικόνα 10** παρουσιάζεται σχηματικά η εξαγωγή ελαίου που οδηγεί στην πρώτη σειρά ελαίων πυρόλυσης που χρησιμοποιούνται σε αυτήν την πτυχιακή εργασία. Στις αναλύσεις του ελαίου πυρόλυσης παρουσιάζονται οι αλλαγές στη σύνθεσή του, αλλά και οι διαφορετικές επεξεργασίες που υφίστανται έτσι ώστε να έχει καλύτερα αποτελέσματα στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών.

Οι αριθμοί αναφέρονται στους αριθμούς παραγωγής της BTG-BTL:

- Υδατοδιαλυτό κλάσμα (βιοέλαιο): υδατοδιαλυτά συστατικά μετά από εκχύλιση του αρχικού ελαίου πυρόλυσης με νερό (αριθ. 2008.1270).
- Υδατοδιαλυτό κλάσμα βιοελαίου (χωρίς επεξεργασία με ενεργό άνθρακα): υδατοδιαλυτά συστατικά μετά από εκχύλιση της οργανικής φάσης του ελαίου πυρόλυσης με νερό (αριθ. 2009.1312).
- Διήθημα βιοελαίου από ενεργό άνθρακα: υδατοδιαλυτά συστατικά από εκχύλιση της οργανικής φάσης του ελαίου πυρόλυσης με νερό, μετά από επεξεργασία με ενεργό άνθρακα (αριθ. 2009.1311).
- Υδρολυμένο βιοέλαιο: το βιοέλαιο υδρολύεται με την προσθήκη διαλύματος θειικού οξέος 2% και με θέρμανση στους 121°C για 20 λεπτά. Στη συνέχεια (και αφού η θερμοκρασία μειωθεί) προστίθεται υδροξείδιο του ασβεστίου έως ότου το pH φτάσει

στο 7. Το υδρολυμένο βιοέλαιο διαχωρίζεται από το ίζημα με τη βοήθεια της φυγοκέντρισης και αποθηκεύεται στους 4 °C.



Εικόνα 11. Δείγματα ελαίου πυρόλυσης από την BTG-BTL που διαχωρίστηκαν στο πανεπιστήμιο του Γκρόνινγκεν.

Η δεύτερη σειρά δειγμάτων ελαίου πυρόλυσης που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία (**Εικόνα 11**) επεξεργάστηκαν στο πανεπιστήμιο του Γκρόνινγκεν και είναι τα ακόλουθα (οι αριθμοί είναι σύμφωνα με το πανεπιστήμιο του Γκρόνινγκεν):

- **Δείγμα 1:** Έλαιο πυρόλυσης από την BTG-BTL (NEO 2009.1247a + NEO2009.1246b): υδατοδιαλυτό κλάσμα που περιέχει σάκχαρα, οργανικά οξέα και φαινολικά συστατικά.
- **Δείγμα 4:** έλαιο πυρόλυσης (δείγμα 1) μετά από διόρθωση του pH στην τιμή 5 με τη χρήση διαλύματος KOH.
- **Δείγμα 2:** δείγμα 4 μετά από εκχύλιση με διαιθυλ-αιθέρα
- **Δείγμα 3:** δείγμα 4 μετά από 5X εκχύλιση με διαιθυλ-αιθέρα
- **Δείγμα 5:** υγρό κλάσμα του υδρολυμένου με οξύ και διορθωμένου pH (στην τιμή 5) βιοελαίου
- **Δείγμα 6:** δείγμα 5 μετά από εκχύλιση με διαιθυλ-αιθέρα

2.5 Παρακολούθηση της ανάπτυξης των μικροβιακών καλλιεργειών

Η παρακολούθηση ανάπτυξης των *S. cerevisiae* και *P. putida*, έγινε με τη χρήση φωτόμετρου, μετρώντας την Οπτική Πυκνότητα στα 600 nm (OD600). Η μέτρηση αυτή υποδεικνύει τον αριθμό των κυττάρων των μικροοργανισμών που βρίσκονται στην καλλιέργεια και έγινε σε προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα.

Εναλλακτικά, δείγματα των καλλιεργειών *S. cerevisiae*, *P. putida* και *P. chrysosporium*, τοποθετήθηκαν μετά από κατάλληλη αραιώση σε τρυβλία Petri που περιείχαν κατάλληλο στερεό θρεπτικό υλικό, και μετά από επώαση στους 30 °C για 24 ώρες καταμετρήθηκε ο αριθμός των αποικιών που σχηματίστηκαν (cfu).

2.6 Πρόκληση τυχαίων μεταλλάξεων στον *P. putida* με χρήση UV

Ένα δείγμα 10 ml από την αρχική καλλιέργεια του *P. putida* τοποθετήθηκε σε ένα αποστειρωμένο γυάλινο τρυβλίο Petri και ακτινοβολήθηκε χρησιμοποιώντας μία συσκευή παραγωγής UV (Stratalinker) η οποία διέθετε λάμπες υπεριώδους φωτός (254 nm). Μετά από κάθε ακτινοβολία ελήφθησαν δείγματα (περίπου 100 μl) και τοποθετήθηκαν σε απόλυτο σκοτάδι για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, τα δείγματα αραιώθηκαν χίλιες φορές, τοποθετήθηκαν σε τρυβλία που περιείχαν LB-άγαρ, και οι αποικίες καταμετρήθηκαν μετά από επώαση 24 ωρών σε 30 °C.

2.7 Απομόνωση DNA του *P. chrysosporium*

Κύτταρα του μικροοργανισμού συλλέχθηκαν με φυγοκέντριση από καλλιέργεια 12 ωρών και παρέμειναν για 24 ώρες στους -80°C. Στη συνέχεια η παγωμένη βιομάζα αλέστηκε σε ένα σκεύος από πορσελάνη το οποίο είχε προψυχθεί με υγρό άζωτο. Το κονίαμα αναμείχθηκε με ένα προθερμασμένο (στους 65 °C) μείγμα ρυθμιστικού διαλύματος/φαινόλης (1:1), αναδεύτηκε ήπια και αμέσως μετά τοποθετήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου. Το ρυθμιστικό διάλυμα περιείχε 1% SDS, 10 mM EDTA, 0.2 M NaAc (pH 5). Ο όγκος του μείγματος ρυθμιστικού διαλύματος/φαινόλης που προστίθετο σε κάθε δείγμα ήταν 2 ml ανά γραμμάριο βιομάζας.

Στη συνέχεια προστέθηκαν 2ml χλωροφόρμιο, αναμείχθηκε καλά και υποβλήθηκε σε φυγοκέντριση (όλα τα βήματα φυγοκέντρισης έγιναν για 15 λεπτά σε 13.000 στροφές/λεπτό). Μετά την φυγοκέντριση η άνω φάση του δείγματος αναμείχθηκε με 2 ml χλωροφόρμιο και υποβλήθηκε ξανά σε φυγοκέντριση. Με την προσθήκη 0.54 ml ισοπροπανόλης το DNA κατακρημνίστηκε από την άνω φάση. Αφού ολοκληρώθηκε το στάδιο αυτό, το μείγμα υποβλήθηκε σε φυγοκέντριση και τοποθετήθηκε στον πάγο για 15 λεπτά.

Το ίζημα που προέκυψε, αφού ξεπλύθηκε 2 φορές με αιθανόλη 70%, αφέθηκε να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά και διαλύθηκε σε 25 μl υπερκάθαρο νερό (ddH₂O).

Για την επεξεργασία με RNase, χρησιμοποιήθηκαν 5 units ενζύμου και η επώαση έγινε για 1 ώρα στους 37 °C. Ακολούθησε προσθήκη 0.1 ml διαλύματος NaAc 2M και 0.54 ml ισοπροπανόλης και παραμονή στον πάγο για 15 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντριση του ιζήματος και ξέπλυμα εις διπλούν με αιθανόλη 70% χωρίς χρήση ανάδευσης (φυγοκέντριση 5 λεπτά μετά από κάθε πλύσιμο). Η αιθανόλη αφαιρέθηκε και το ίζημα τοποθετήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Τέλος το DNA διαλύθηκε σε 25μl ddH₂O και αποθηκεύτηκε στο ψυγείο.

2.8 PCR ενίσχυση της περιοχής ITS από το DNA του *P. chrysosporium*

Προκειμένου να προσδιοριστεί η νουκλεοτιδική αλληλουχία της περιοχής ITS (internal transcribed spacer) στο DNA του *P. chrysosporium*, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές:

PC-ITS-FW (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG)

PC-ITS-RV (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (Johnston and Aust, 1994).

Οι εκκινητές πριν την χρήση τους διαλύθηκαν με ddH₂O σε συγκέντρωση 0.1 nmoles/μl. Ακολούθησε PCR σύμφωνα με το ακόλουθο πρωτόκολλο:

Σε ένα σωληνάριο PCR τοποθετήθηκαν 3μl από το μείγμα DNA (περίπου 10 ng), 1 μl του εκκινητή PC-ITS-FW, 1μl του εκκινητή PC-ITS-RV, 9.5μl ddH₂O, 12.5 μl μείγμα Dream Taq (που περιείχε το απαραίτητο ρυθμιστικό διάλυμα με Mg, dNTPs, και Taq πολυμεράση) και κατόπιν τοποθετήθηκαν στο μηχάνημα PCR Gene Amp.

Μετά από το αρχικό βήμα αποδιάταξης του DNA (στους 94 °C για 5 λεπτά), ακολούθησαν 30 κύκλοι των: 94 °C για 30 δευτερόλεπτα (αποδιάταξη) , 53 °C για 15 δευτερόλεπτα (υβριδοποίηση εκκινητών), 72 °C για 30 δευτερόλεπτα (σύνθεση DNA). Μετά τους 30 κύκλους ακολούθησε το τελικό βήμα που ήταν θέρμανση στους 72 °C για 10 λεπτά και στη συνέχεια ψύξη στους 15 °C.

2.9 Πέψεις προϊόντων PCR με ενδονουκλεάσες περιορισμού

Η πέψη των προϊόντων της PCR από τους υπό μελέτη μικροοργανισμούς έγινε στους 37°C για 2 ώρες, με κατάλληλες ενδονουκλεάσες περιορισμού (Rsa I, Hae III, Taq I και Hinf I). Ακολούθησε ανάλυση των πέψεων σε πήκτωμα αгарόζης.

2.10 Ηλεκτροφορητική ανάλυση DNA

Η απεικόνιση των προϊόντων της PCR (αυτούσια ή μετά από πέψη με ένζυμα περιορισμού) έγινε μετά από ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτώματα αγαρόζης (1%) που περιείχαν βρωμιούχο αιθίδιο. Οι ζώνες του DNA παρατηρήθηκαν με τη χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας (τράπεζα UV) και τα πηκτώματα αγαρόζης φωτογραφήθηκαν με τη χρήση κάμερας.

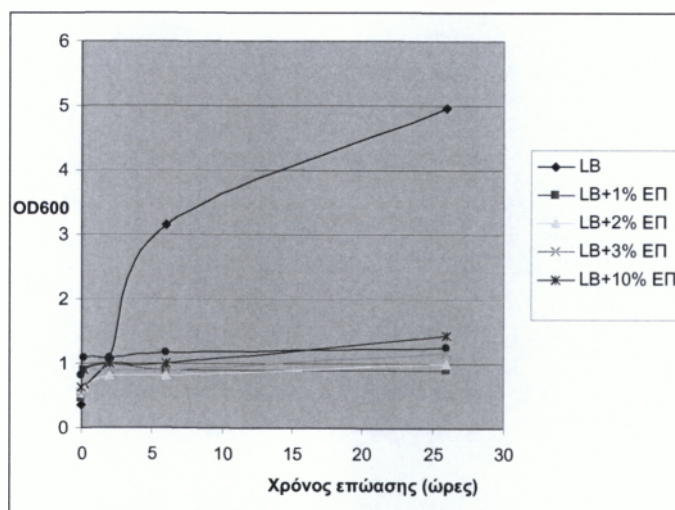
Όταν χρειάστηκε η εξαγωγή του DNA από το πήκτωμα αγαρόζης (για παράδειγμα πριν την πέψη των προϊόντων της PCR) χρησιμοποιήθηκε ένα εμπορικό κιτ εξαγωγής DNA από πήκτωμα αγαρόζης, της εταιρείας Sigma-Aldrich και ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της κατασκευάστριας εταιρείας.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Πειράματα ανάπτυξης του *P. putida* σε μη αποστειρωμένο έλαιο πυρόλυσης

Τα αρχικά πειράματα πραγματοποιήθηκαν για να καθορίσουν την τοξικότητα του ελαίου πυρόλυσης έναντι των επιλεγμένων μικροοργανισμών. Στα υποστρώματα των καλλιιεργειών προστέθηκε έλαιο πυρόλυσης χωρίς να υποστεί αποστείρωση για να μην αλλοιωθεί η χημική του σύνθεση, που θα μπορούσε να συμβεί ως αποτέλεσμα της θερμικής επεξεργασίας ή των αλληλεπιδράσεων στα συστατικά των υποστρωμάτων που θα προκαλούσαν οι υψηλές θερμοκρασίες. Να σημειωθεί ότι στα αρχικά αυτά πειράματα το έλαιο πυρόλυσης που χρησιμοποιήθηκε είναι το υδατοδιαλυτό κλάσμα ελαίου πυρόλυσης (no.2008.1270), το οποίο περιγράφηκε στο κεφάλαιο «υλικά και μέθοδοι». Τα άλλα δυο είδη ελαίου πυρόλυσης (No. 2009.1311 και No. 2009.1311) που απεικονίζονται στην **Εικόνα 10** (κεφάλαιο «υλικά και μέθοδοι»), αποδείχθηκαν τοξικότερα από το αρχικό δείγμα ελαίου πυρόλυσης και για τον λόγο αυτό δεν εκτελέστηκε κανένα πείραμα με αυτά τα είδη.

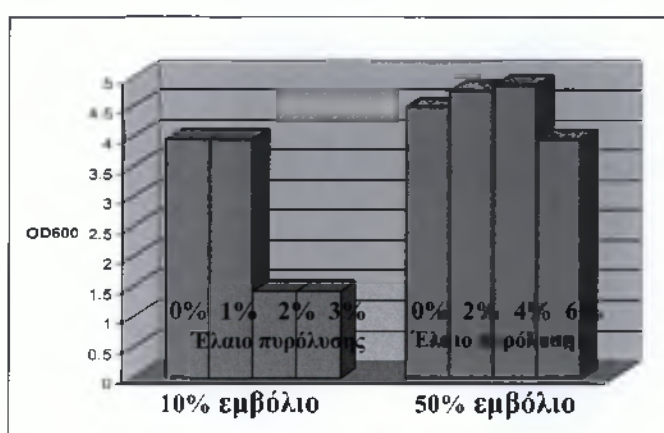
Στην **Εικόνα 12** απεικονίζεται η μεταβολή της οπτικής πυκνότητας (OD_{600}) καλλιέργειας του βακτηρίου *P. putida* που αναπτύχθηκε σε θρεπτικό υλικό LB παρουσία διαφόρων ποσοστών (1-10%) ελαίου πυρόλυσης (με αρχικό εμβόλιο 3.3%). Οι συγκεκριμένες καλλιέργειες έγιναν σε κωνικές φιάλες των 100 ml. Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας γινόταν με τη χρήση φωτομέτρου, κατά τα χρονικά διαστήματα 0, 6 και 26 ωρών ανάπτυξης. Η επώαση έγινε στους 30 °C.



Εικόνα 12. Μεταβολή της OD_{600} κατά την ανάπτυξη του *P. putida* σε LB με αυξανόμενα ποσοστά ελαίου πυρόλυσης. Όπου ΕΠ= έλαιο πυρόλυσης.

Παρατηρήθηκε ότι το βακτήριο *P. putida* έδειξε αδυναμία ανάπτυξης ακόμα και σε πολύ μικρά ποσοστά ελαίου πυρόλυσης όπως αυτό του 1%.

Προκειμένου να διευκρινιστεί εάν μια μεγαλύτερη ποσότητα εμβολίου του *P. putida* είναι σε θέση να αναπτυχτεί σε περιβάλλον με υψηλή τοξικότητα, όπως αυτό του ελαίου πυρόλυσης, δοκιμάστηκαν καλλιέργειες με ποσοστό εμβολίων της τάξεως των 10 και 50%. Στην **Εικόνα 13** παρουσιάζονται οι καλλιέργειες (με ποσότητα εμβολίου 10 και 50%) που πραγματοποιήθηκαν σε Uniplate οι οποίες περιείχαν 3 ml LB μαζί με το ανάλογο ποσοστό εμβολίου αλλά και με ποσοστά ελαίου πυρόλυσης (1-6 %).

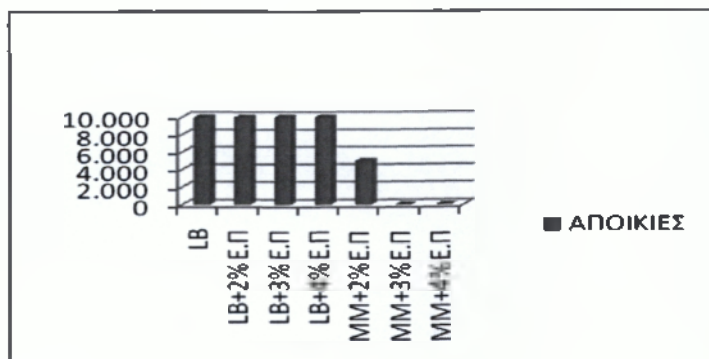


Εικόνα 13. Μέτρηση με φωτόμετρο μετά από 24 ώρη ανάπτυξη των καλλιεργειών *P.putida* σε Uniplate με χρήση LB και με αυξανόμενα ποσοστά ελαίου πυρόλυσης.

Δεδομένου ότι η μέτρηση με φωτόμετρο μπορεί να εμπεριέχει και νεκρά κύτταρα ή υψηλά ποσοστά ελαίου πυρόλυσης, δείγματα των καλλιεργειών εμβολιάστηκαν σε τρυβλία με LB –άγαρ και οι αποικίες που σχηματίσθηκαν καταμετρήθηκαν μετά από 24 ώρες επώασης. Η αρίθμηση των αποικιών από τα τρυβλία καθώς και η μέτρηση με το φωτόμετρο OD₆₀₀ έδειξαν ανάλογα αποτελέσματα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, καλλιέργειες με ποσοστό εμβολίου 10% δεν έχουν την ικανότητα ανάπτυξης σε συγκέντρωση ελαίου πυρόλυσης μεγαλύτερη από 1%, αντίθετα καλλιέργειες με ποσοστό εμβολίου 50% εμφανίζουν ανάπτυξη σε μεγαλύτερη συγκέντρωση ελαίου πυρόλυσης (μέχρι 6 %). Λόγω της μεγάλης απόκλισης που υπήρξε τόσο στο ποσοστό εμβολίου, όσο και στην ικανότητα ανάπτυξης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ελαίου πυρόλυσης, δημιουργήθηκε μια καλλιέργεια *P. putida* με ποσοστό εμβολίου 30%.

Οι καλλιέργειες με ποσοστό εμβολίου 30% (**Εικόνα 14**) πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες των 100 ml που περιείχαν 10 ml LB ή MM μαζί με 3 ml από τον επιλεγμένο

μικροοργανισμό και με ποσοστό ελαίου πυρόλυσης 2-4%. Στην περίπτωση που οι καλλιέργειες περιείχαν MM, κανένα επιπλέον ποσοστό γλυκόζης δεν προστέθηκε.



Εικόνα 14. Καταμέτρηση των αποικιών μετά από 24 ώρη ανάπτυξη των καλλιεργειών *P. putida* με χρήση LB και MM, με αυξανόμενα ποσοστά ελαίου πυρόλυσης (ποσοστό εμβολίου 30%).

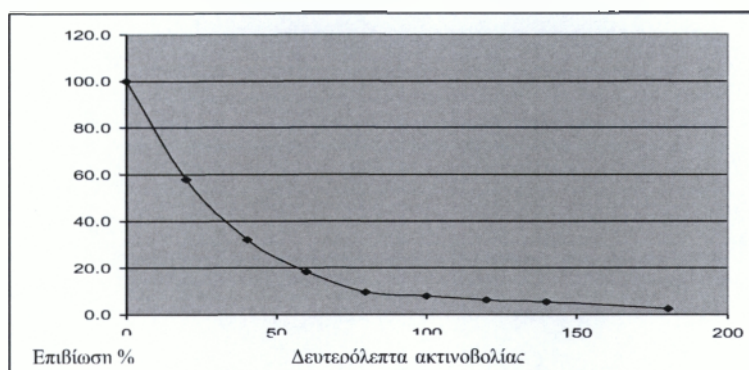
Από τα αποτελέσματα συμπεραίνουμε ότι ο *P. putida* σε καλλιέργειες με ποσοστό εμβολίου 10% δεν έχει την ικανότητα ανάπτυξης σε έλαιο πυρόλυσης συγκέντρωσης μεγαλύτερης από 1%. Αντίθετα οι καλλιέργειες με ποσοστό εμβολίου 30 και 50% δείχνουν μια ικανοποιητική ανάπτυξη (μέχρι και σε συγκέντρωση 6% ελαίου πυρόλυσης), πρέπει όμως να αναζητηθούν τρόποι προκειμένου να επιτευχθεί η ανάπτυξη *P. putida*, αφενός μεν σε μεγαλύτερο ποσοστό ελαίου πυρόλυσης αφετέρου δε, με ποσοστό εμβολίου 10%.

3.2 Μετάλλαξη των κυττάρων του βακτηρίου *P. putida* με χρήση UV

Προκειμένου να βελτιωθεί η ικανότητα του *P. putida* να αναπτύσσεται σε έλαιο πυρόλυσης, πραγματοποιήθηκε μετάλλαξη κυττάρων του μικροοργανισμού με χρήση UV όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο «ωλικά και μέθοδοι». Πρώτο βήμα ήταν ο σχεδιασμός της καμπύλης επιβίωσης του μικροοργανισμού μετά από ακτινοβολία με UV ακτινοβολία (254 nm), που πραγματοποιήθηκε για συνεχώς αυξανόμενους χρόνους, από 0 ως 200 δευτερόλεπτα. Στην **Εικόνα 15** αποτυπώνεται η καμπύλη επιβίωσης του *P. putida*.

Τα ακτινοβολημένα δείγματα στη συνέχεια εμβολιάστηκαν σε τρυβλία που περιείχαν LB-άγαρ. Το ενδιαφέρον εστιάστηκε κυρίως στα δείγματα που είχαν ακτινοβοληθεί για διάστημα 60-120 δευτερολέπτων, που οδήγησε στην επιβίωση του 10% των κυττάρων (Εικόνα 15). Προκειμένου να ελεγχθεί αν τα μεταλλαγμένα πλέον κύτταρα του *P. putida* είχαν διαφορά από τα αρχικά κύτταρα, δημιουργήθηκαν καλλιέργειες με εμβολιασμό i) αρχικών κυττάρων, ii) κυττάρων που είχαν ακτινοβοληθεί για 30 sec, iii) κυττάρων που είχαν ακτινοβοληθεί για 60 sec και τέλος iv) κυττάρων που είχαν ακτινοβοληθεί για 120 sec, σε MM με αυξανόμενα ποσοστά ελαίου πυρόλυσης (**Πίνακας 3**). Μετά από 24 ώρες τα

δείγματα εμβολιάστηκαν σε τρυβλία που περιείχαν LB-άγαρ και οι προκύπτουσες αποικίες καταμετρήθηκαν μετά από 24 ώρες επώασης στους 30°C.



Εικόνα 15. Καμπύλη επιβίωσης μετά από ακτινοβόληση των κυττάρων του *P. putida* με UV ακτινοβολία που πραγματοποιήθηκε για συνεχώς αυξανόμενους χρόνους.

Πίνακας 3. Καταμέτρηση αποικιών από τις καλλιέργειες των ακτινοβολημένων κυττάρων του *P. putida* σε MM με αυξανόμενα ποσοστά ελαίου πυρόλυσης. Όπου ΕΠ= έλαιο πυρόλυσης.

Χρόνος ακτινοβολίας	Υπόστρωμα		
	MM+3% ΕΠ	MM+4% ΕΠ	MM+6% ΕΠ
0 δευτερόλεπτα	> 10000	0	0
30 δευτερόλεπτα	6200	0	0
60 δευτερόλεπτα	2192	0	0
120 δευτερόλεπτα	873	0	0

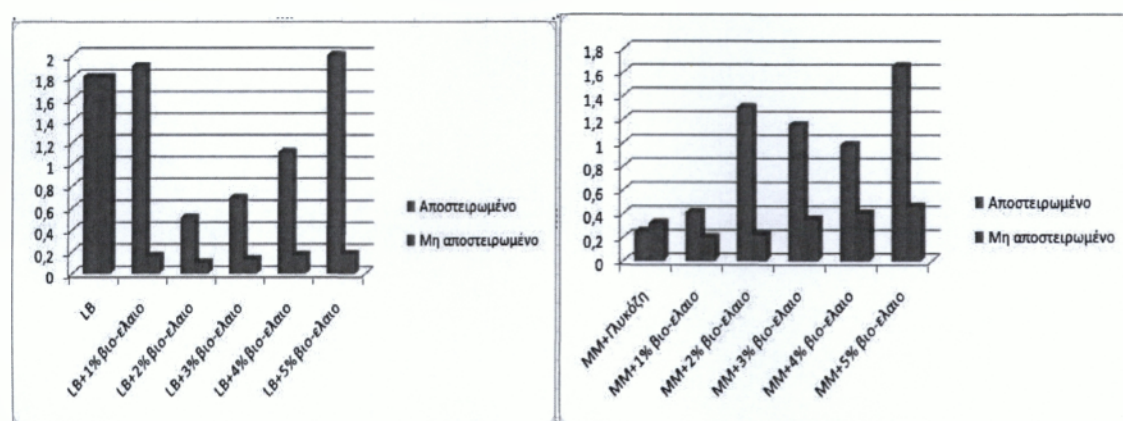
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα η διαδικασία της μετάλλαξης των κυττάρων του *P. putida* με χρήση UV ακτινοβολίας όχι μόνο δεν κατέστησε ικανό τον μικροοργανισμό να αναπτυχτεί σε ποσοστά ελαίου πυρόλυσης πάνω από 3%, αλλά συμπεραίνουμε ότι όσο περισσότερο χρόνο εκθέτουμε τα κύτταρα του *P. putida* σε UV ακτινοβολία, τόσο μικρότερη ανάπτυξη έχουμε. Η μέθοδος κρίθηκε ότι πρέπει να επαναξιολογηθεί ωστόσο η συγκεκριμένη πορεία έρευνας ανεστάλη.

3.3 Συγκριτική ανάπτυξη του βακτηρίου *P. putida* παρουσία αποστειρωμένου και μη αποστειρωμένου ελαίου πυρόλυσης

Στην προηγούμενη παράγραφο αναφέραμε ότι τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με χρήση ελαίου πυρόλυσης το οποίο δεν είχε υποστεί κάποια θερμική επεξεργασία. Ακολούθησε μελέτη της ικανότητας ανάπτυξης του βακτηρίου *P. putida* παρουσία αποστειρωμένου ελαίου πυρόλυσης (121°C για 15 λεπτά) και σύγκριση με έλαιο μη αποστειρωμένο.

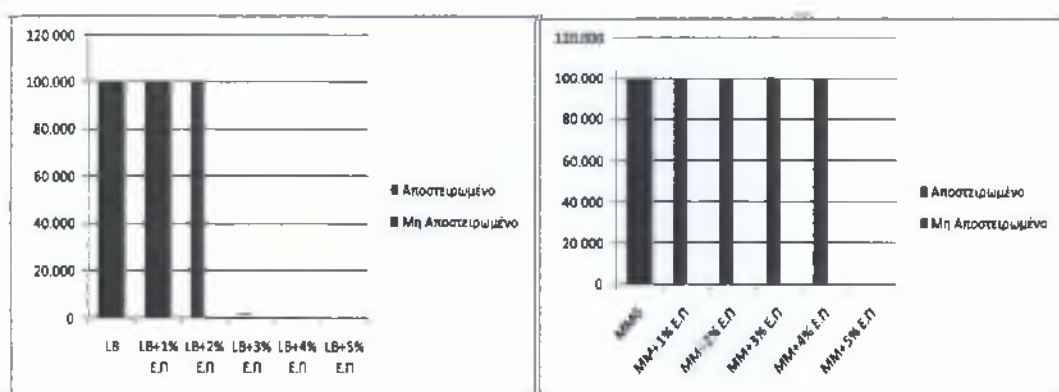
Προγενέστερη έρευνα που διεξήχθη στο εργαστήριο, έδειξε ότι καλλιέργειες του *S. cerevisiae* με χρήση αποστειρωμένου ελαίου πυρόλυσης, αναπτύσσονταν σε έλαιο πυρόλυσης μέχρι και σε ποσοστό 15%. Συγκεκριμένα, ανάπτυξη παρατηρήθηκε μέχρι και σε συγκέντρωση ελαίου πυρόλυσης 15%, χωρίς μεγάλη μείωση της ανάπτυξης μετά από 24 ώρες. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι το έλαιο πυρόλυσης όταν αποστειρωθεί μαζί με το υπόστρωμα της καλλιέργειας, είναι λιγότερο τοξικό για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών.

Οι καλλιέργειες του *P. putida* πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες των 100 ml με LB και MM και με αυξανόμενα ποσοστά ελαίου πυρόλυσης. Η αρίθμηση των κυττάρων έγινε με χρήση φωτόμετρου, μετά από επώαση 24 ωρών στους 30 °C. Τα αποτελέσματα αυτού του πειράματος, απεικονίζονται στην **Εικόνα 16**.



Εικόνα 16. Μέτρηση των κυττάρων του βακτηρίου *P. putida* σε LB και MM με αποστειρωμένο και μη αποστειρωμένο έλαιο πυρόλυσης με χρήση φωτόμετρου OD₆₀₀, μετά από 24 ώρες.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτά, η ανάπτυξη του *P. putida* εμφανίζει μια ανοδική πορεία, όσο αυξάνεται το ποσοστό του ελαίου πυρόλυσης, γεγονός που δεν μπορεί να εξηγηθεί ειδικά στην περίπτωση που η καλλιέργεια περιέχει MM. Για το λόγο αυτό το πείραμα επαναλήφθηκε, αυτή τη φορά όμως, τα δείγματα εμβολιάστηκαν σε τρυβλία που περιείχαν LB-άγαρ, και οι προκύπτουσες αποικίες καταμετρήθηκαν μετά από 24 ώρες (**Εικόνα 17**).



Εικόνα 17. Μέτρηση αποικιών του βακτηρίου *P. putida* σε LB και MM με αυξανόμενα ποσοστά ελαίου πυρόλυσης. Όπου 100.000 = μη μετρήσιμος αριθμός αποικιών.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα από την μέτρηση των κυττάρων με τη χρήση φωτόμετρου και την μέτρηση των αποικιών από τρυβλία (Εικόνες 16 και 17), συμπεραίνουμε ότι η μέτρηση των κυττάρων με φωτόμετρο δεν είναι πολύ αντιπροσωπευτικές για τους λόγους που έχουν προαναφερθεί. Έτσι, σύμφωνα με την μέτρηση των αποικιών από τα τρυβλία, βλέπουμε μια αύξηση της ανάπτυξης του μικροοργανισμού παρουσία αποστειρωμένου ελαίου πυρόλυσης σε σχέση με την ανάπτυξη παρουσία μη αποστειρωμένου ελαίου.

Μέχρι τώρα δεν είναι ακόμα γνωστό ποια είναι η αιτία που μειώνει την τοξικότητα του ελαίου πυρόλυσης μετά από αποστείρωση. Κάποια στοιχεία δείχνουν ότι μια αλλαγή του pH (αυξημένο pH) κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, μπορεί να μειώσει την τοξικότητα ορισμένων συστατικών του ελαίου πυρόλυσης, αλλά αυτό θα πρέπει να εξεταστεί περαιτέρω με συγκεκριμένα πειράματα.

3.4 Εμφάνιση άγνωστου μικροοργανισμού

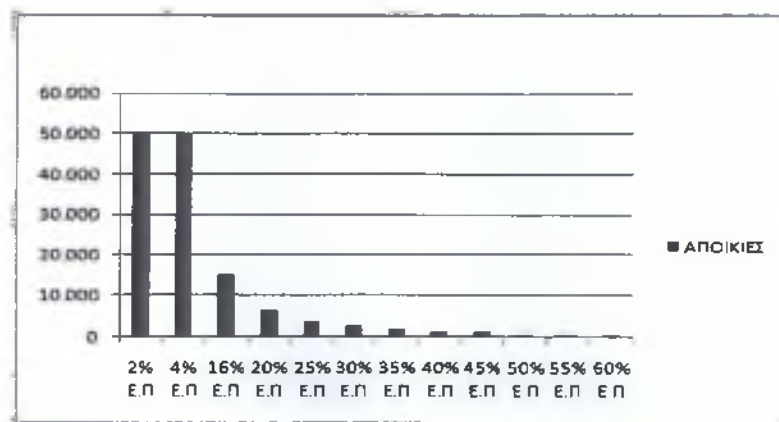
Κατά τη διαδικασία ανανέωσης μιας στερεής καλλιέργειας-απόθεμα του μύκητα *P. chrysosporium* (ένα αποθηκευμένο στους 4 °C τρυβλίο με υλικό YEM-γλυκόζη), ένα μέρος της στερεής αυτής καλλιέργειας τοποθετήθηκε για 15 δευτερόλεπτα σε ένα μπλέντερ μαζί με 25 ml YEM. Από το μείγμα αυτό, μόλις 1 ml χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό σε 10 ml YEM σε μια κωνική φιάλη των 100 ml για την δημιουργία της προκαλλιέργειας του μύκητα. Κατά την ανάπτυξη της καλλιέργειας ένας άγνωστος μικροοργανισμός εμφανίστηκε αντί του *P. chrysosporium*, ο οποίος μικροοργανισμός όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 18**, είχε τα χαρακτηριστικά ζύμης.



Εικόνα 18. Εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο του μικροοργανισμού-μόλυνσης που αναπτύχθηκε από μία αρχική καλλιέργεια *P. chrysosporium*.

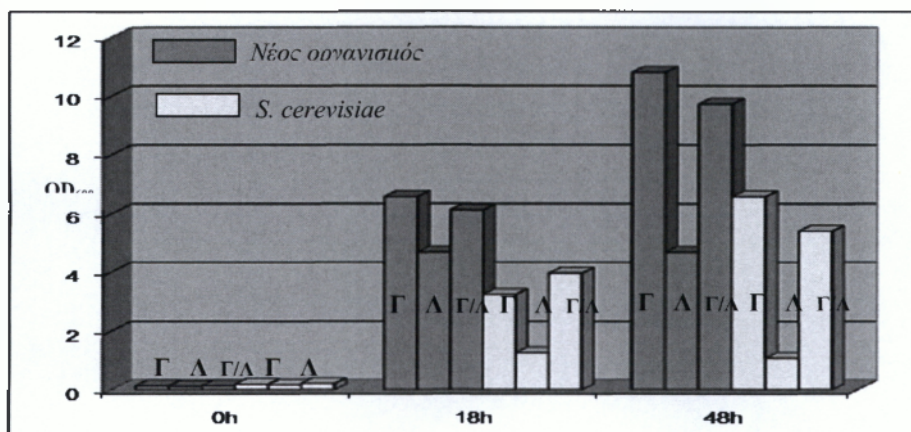
Για την πιθανή περίπτωση μόλυνσης, η διαδικασία επαναλήφθηκε, αυτή τη φορά περνώντας 2 δείγματα από το αρχικό τρυβλίο και εμβολιάζοντας σε 2 κωνικές φιάλες που περιείχαν η μια θρεπτικό υλικό YEM, και η άλλη YPD. Ο μικροοργανισμός αυτός συνέχισε να εμφανίζεται μόνο στην καλλιέργεια σε θρεπτικό υλικό YEM, ενώ στο YPD εμφανιζόταν ο μύκητας *P. chrysosporium* της αρχικής καλλιέργειας-απόθεμα (η διαδικασία επαναλήφθηκε 3 φορές με τα ίδια αποτελέσματα). Ο μικροοργανισμός αυτός, μετά από πειράματα που διεξήχθησαν, έδειξε ότι είναι σε θέση να αναπτύσσεται παρουσία μεγάλης ποσότητας ελαίου πυρόλυσης.

Αυτός ο μικροοργανισμός αναπτύχθηκε σε υπόστρωμα YEM μαζί με αυξανόμενα ποσοστά αποστειρωμένου ελαίου πυρόλυσης (2-60%). Δείγματα από τις προκύπτουσες καλλιέργειες εμβολιάστηκαν σε τρυβλία που περιείχαν YEM-άγαρ και στη συνέχεια, μετά από 24 ώρες επώασης, έγινε καταμέτρηση των αποικιών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **Εικόνα 19**.



Εικόνα 19. Ανάπτυξη του αγνώστου μικροοργανισμού σε YEM, παρουσία αυξανόμενων ποσοστών ελαίου πυρόλυσης (μέθοδος μέτρησης αποικιών). Όπου 50.000 = μη μετρήσιμος αριθμός αποικιών.

Δεδομένου ότι στο υπόστρωμα (YEM) δεν είχε προστεθεί καθόλου γλυκόζη, υποθέσαμε ότι ο άγνωστος οργανισμός είναι ικανός να ζυμώσει το κύριο σάκχαρο του ελαίου πυρόλυσης, τη λεβογλουκοζάνη. Για να μπορούμε όμως να το διατυπώσουμε αυτό με βεβαιότητα, ο μικροοργανισμός καλλιεργήθηκε σε υλικό YEM παρουσία λεβογλουκοζάνης ως μόνη πηγή άνθρακα.

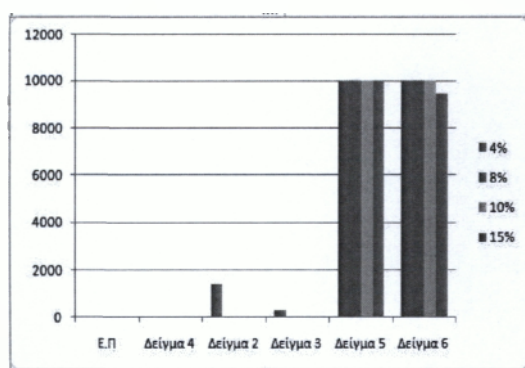


Εικόνα 20. Σύγκριση των κυττάρων μετά από ανάπτυξη του αγνώστου μικροοργανισμού και του *S. cerevisiae* σε YEM με την προσθήκη γλυκόζης (Γ), λεβογλουκοζανης-γλυκόζης σε αναλογία 1:1 (Γ/Λ), και λεβογλουκοζάνης (Λ).

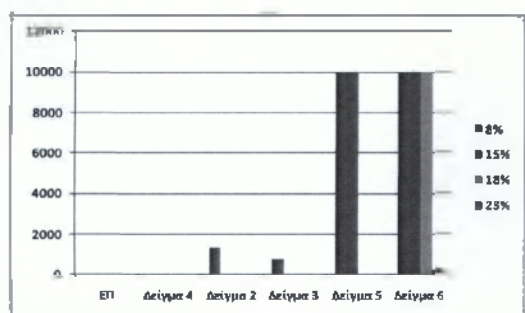
Για τη σύγκριση χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες περιείχαν ως πηγή άνθρακα: i) γλυκόζη (10g/L) και λεβογλουκοζανη (10g/L) (δηλαδή αναλογία 1:1), ή ii) μόνο γλυκόζη (20g/L) ή iii) μόνο λεβογλουκοζάνη (20g/L). Η μέτρηση των κυττάρων έγινε κατά τις χρονικές στιγμές 0, 18 και 48 ώρες, με τη χρήση φωτόμετρου και τα αποτελέσματα εμφανίζονται στην **Εικόνα 20**. Από τα αποτελέσματα βλέπουμε ότι ο άγνωστος μικροοργανισμός παρουσιάζει ενδιαφέρουσα ικανότητα ανάπτυξης ακόμα και στην περίπτωση που ως μόνη πηγή άνθρακα είναι η ουσία λεβογλουκοζάνη.

3.5 Ανάπτυξη των καλλιεργειών σε νέα δείγματα ελαίου πυρόλυσης

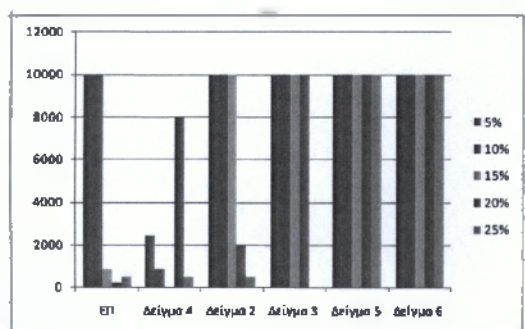
Εκτός από τα αρχικά δείγματα ελαίου πυρόλυσης, νέα δείγματα ελαίου πυρόλυσης παρελήφθησαν από το πανεπιστήμιο του Γκρόνινγκεν (δείγματα 1-6, κεφάλαιο «υλικά και μέθοδοι» παράγραφος 2.4), τα οποία συμπεριελήφθησαν στα πειράματα για τη μελέτη της ικανότητας ανάπτυξης των μικροοργανισμών σε αυτά. Για σύγκριση χρησιμοποιήθηκε επίσης και το αρχικό έλαιο πυρόλυσης (ΕΠ).



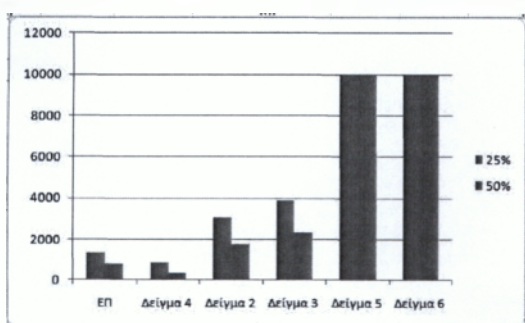
P. putida σε LB και έλαιο πυρόλυσης



P. putida σε YEM και έλαιο πυρόλυσης



S. cerevisiae σε YEM και έλαιο πυρόλυσης



Άγνωστος μικροοργανισμός σε YEM και έλαιο πυρόλυσης

Εικόνα 21. Αποικίες που προέκυψαν στα τρυβλία από τον εμβολιασμό δειγμάτων καλλιιεργειών των μικροοργανισμών *P.putida*, *S. cerevisiae* και άγνωστου μικροοργανισμού που είχαν δημιουργηθεί με 24-ωρη ανάπτυξη των μικροοργανισμών παρουσία ελαίου πυρόλυσης σε διάφορα ποσοστά. Τα δείγματα ελαίου πυρόλυσης 1-6, περιγράφονται στο κεφάλαιο «υλικά και μέθοδοι». Όπου Ε.Π το αρχικό δείγμα ελαίου πυρόλυσης.

Στην **Εικόνα 21** εμφανίζονται τα αποτελέσματα από τα πειράματα ελέγχου της ικανότητας ανάπτυξης των ακόλουθων μικροοργανισμών σε αυτά τα νέα δείγματα ελαίου πυρόλυσης (δείγματα 1-6):

- *P. putida*: Με τη χρήση LB και YEM ως υποστρώματα, παρουσία ελαίου πυρόλυσης.
- *S. cerevisiae*: Με τη χρήση YPD ως υπόστρωμα, παρουσία ελαίου πυρόλυσης.
- Άγνωστος μικροοργανισμός: Με τη χρήση YEM ως υπόστρωμα, παρουσία ελαίου πυρόλυσης.

Για σύγκριση χρησιμοποιήθηκε επίσης και το αρχικό έλαιο πυρόλυσης (ΕΠ). Όλα τα δείγματα ελαίου πυρόλυσης προστέθηκαν αφού πρώτα είχαν αποστειρωθεί με τη χρήση αυτόκαυστου στους 121°C για 15 λεπτά. Σε όλα τα πειράματα οι μικροοργανισμοί αναπτύχθηκαν για 24 ώρες, σε επωαστικό θάλαμο στους 30 °C, και αμέσως μετά εμβολιάστηκαν σε τρυβλία που περιείχαν LB-άγαρ (για το βακτήριο) ή YEM-άγαρ (για τις ζύμες). Μετά από 24 ώρες ανάπτυξης έγινε η καταμέτρηση των αποικιών από τα τρυβλία.

Συνδυάζοντας αυτά τα αποτελέσματα με αυτά των προγενέστερων πειραμάτων μπορούμε να αντλήσουμε τα ακόλουθα αποτελέσματα:

Παλιό δείγμα ελαίου πυρόλυσης και δείγμα 4:

- *P.putida* (σε LB) καμία επίδραση
- *P.putida* (σε YEM) καμία επίδραση
- *S. cerevisiae* μικρή ανάπτυξη, αύξηση με προσθήκη 10-20% Ε.Π
- Νέος οργανισμός μικρή ανάπτυξη, αύξηση με προσθήκη 25% Ε.Π

Δείγμα 2 και δείγμα 3:

- *P. putida* (σε LB) μικρή ανάπτυξη, αύξηση με προσθήκη 4% Ε.Π
- *P. putida* (σε YEM) μικρή ανάπτυξη, αύξηση με προσθήκη 8% Ε.Π
- *S. cerevisiae* θετική επίδραση, αύξηση με προσθήκη 20% Ε.Π
- Νέος οργανισμός ανάπτυξη, αύξηση με προσθήκη 25 % Ε.Π

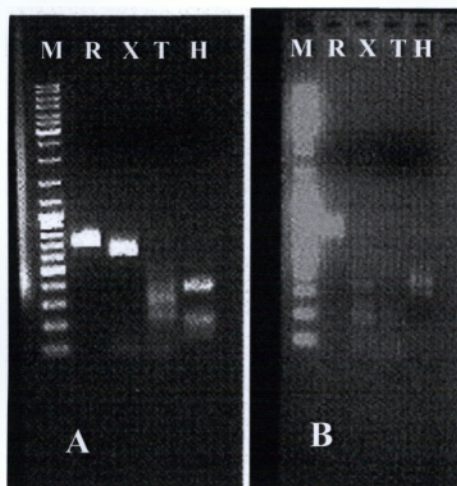
Δείγμα 5 και δείγμα 6:

- *P.putida*(σε LB) θετική επίδραση, αύξηση με την προσθήκη 15% Ε.Π
- *P.putida* (σε YEM) θετική επίδραση, αύξηση με την προσθήκη 18% Ε.Π
- *S. cerevisiae* θετική επίδραση, αύξηση με την προσθήκη 25% Ε.Π
- Νέος οργανισμός, θετική επίδραση, αύξηση με την προσθήκη 50% Ε.Π

Συμπερασματικά καταλήγουμε στο ότι τα δείγματα 5 και 6 φαίνονται να έχουν αισθητά μειωμένη τοξικότητα και ως εκ τούτου είναι πιο εύκολο για τους μικροοργανισμούς να αναπτυχτούν μέσα σε αυτά, και ιδιαίτερα ο *P. putida*, ο οποίος δεν εμφάνιζε ανάπτυξη στο αρχικό δείγμα ελαίου πυρόλυσης σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από 3%.

3.6 Ανάλυση της ITS περιοχής του DNA του άγνωστου μικροοργανισμού

Για να ελεγχθεί εάν ο νέος μικροοργανισμός είναι μια μετάλλαξη από την αρχική καλλιέργεια *P.chrysosporium* ή μια τυχαία εργαστηριακή μόλυνση, μια ανάλυση με ένζυμα περιορισμού πραγματοποιήθηκε στην περιοχή ITS στο DNA και των δύο μικροοργανισμών. Το DNA απομονώθηκε και διενεργήθηκε η PCR όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο «ωλικά και μέθοδοι». Τα προϊόντα της PCR υπέστησαν πέψη με τα ένζυμα Rsa I, Hae III, Taq I και Hinf I. Στην **Εικόνα 22** παρουσιάζονται ξεκάθαρα τα διαφορετικά μεγέθη των προϊόντων πέψεων που προέκυψαν για τους δύο μικροοργανισμούς.



Εικόνα 22.

Ανάλυση των πέψεων των προϊόντων της PCR (περιοχή ITS) με τα ένζυμα Rsa I, Hae III, Taq I και Hinf I, σε πηκτή αгарόζης.

A: *P.chrysosporium*

B: Άγνωστος μικροοργανισμός

M = DNA ladder

R = Ένζυμο Rsa I

X = Ένζυμο HaeIII

T = Ένζυμο Taq I

H = Ένζυμο HinfI

Έτσι ο νέος μικροοργανισμός φαίνεται να μην είναι ο ίδιος με τον *P.chrysosporium* από την καλλιέργεια του οποίου προέκυψε και στάλθηκε για ταυτοποίηση αλλά και για περαιτέρω μελέτη.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Κατά την εξέταση της σύνθεσης του ελαίου πυρόλυσης (το υδατοδιαλυτό μέρος του ελαίου πυρόλυσης), μπορεί να φανταστεί κάποιος τα πλεονεκτήματα και τα πιθανά προβλήματα που μπορούν να προκύψουν εάν το έλαιο πυρόλυσης πρόκειται να χρησιμοποιηθεί ως πρώτη ύλη στη ζύμωση από μικροοργανισμούς. Επιγραμματικά η σύνθεση του ελαίου πυρόλυσης όπως δόθηκε από την εταιρεία BTG-BTL είναι αυτή που παρουσιάζεται στον **Πίνακα 4**.

Πίνακας 4. Σύνθεση του ελαίου πυρόλυσης όπως δόθηκε από την εταιρεία BTG-BTL (% κατά βάρος).

Λεβογλουκοζάνη	30.4	Φορμαλδεϋδη	2.4
Ορυκτό φωσφ. Ασβεστίου	15.4	Φαινόλη	2.1
Οξικό οξύ	10.1	Προπιονικό οξύ	2.0
Μυρμηγκικό οξύ	9.1	Ακετόνη	2.0
Ακεταλδεϋδη	8.5	Μέθυλο –κυκλο- πεντανιο-1	1.9
Φουλφουρική αλκοόλη	5.2	Μυρμιγκικός μεθυλεστερας	1.9
Κατεχόλη	5.0	Υδροκινόνη	1.9
Μεθυλική γλυοξάλη	4.0	Ακετόλη	1.7
Εθανόλη	3.6	Λακτόνη angelica	1.6
Αιθυλοκυτταρίνη	3.2	Συριγγοαλδεϋδη	1.5
1,6-ανυδρογλυκοφουρανοζη	3.1	Μεθανόλη	1.4

Το πλεονέκτημα που μπορούμε προβάλλουμε για το έλαιο πυρόλυσης είναι ότι είναι διαθέσιμο σαν ένα εύκολα μεταφερόμενο υγρό με μια περιεκτικότητα σε σάκχαρα της τάξης του 30%, αλλά κυρίως ότι είναι ένα προϊόν που είναι ανανεώσιμο και «φιλικό προς το περιβάλλον».

Από την άλλη πλευρά όμως σοβαρά είναι και τα προβλήματα που προκύπτουν από τη χρήση του ελαίου πυρόλυσης, ως πρώτη ύλη για τη μικροβιακή ζύμωση. Μερικά από αυτά παρατίθενται παρακάτω:

- τα σάκχαρα παρουσιάζονται αποκλειστικά ως λεβογλουκοζάνη, ένα ανυδροσάκχαρο που μπορεί μόνο να ζυμωθεί από κάποια βακτηρίδια, μύκητες και ζύμες
- τα διάφορα άλλα συστατικά (αρωματικές ουσίες, αλδεϋδες, φουράνιο και παράγωγα φουρφουρολης) που εμπεριέχονται στο έλαιο πυρόλυσης είναι λιγότερο ή περισσότερο τοξικά σε πολλούς μικροοργανισμούς (εάν όχι σε όλους).

Προγενέστερη έρευνα στους μικροοργανισμούς *P. putida*, *S. cerevisiae* και *P. chrysosporium* έδειξε ότι το αρχικό έλαιο πυρόλυσης είναι τοξικό και παρεμποδίζει την ανάπτυξη τους μέσα σε αυτό. Η παραλαβή και η χρήση των νέων δειγμάτων ελαίου πυρόλυσης έδειξε ότι οι προς εξέταση μικροοργανισμοί παρουσιάζουν καλύτερη ανταπόκριση στο να αναπτυχτούν μέσα σε αυτά, σε σχέση με το αρχικό δείγμα ελαίου πυρόλυσης, όμως περαιτέρω έρευνα θα χρειαστεί για να τεκμηριωθούν τα αποτελέσματα αυτά.

Η χρήση διαφορετικών υποστρωμάτων, η μετάλλαξη με τη χρήση UV και τα αυξανόμενα ποσοστά εμβολίου που εξετάστηκαν, είχαν μηδαμινό ή μικρό ποσοστό επιτυχίας. Αν και παρατηρήθηκε μια αύξηση στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών με αυτές τις μεθόδους, περαιτέρω προσπάθειες χρειάζονται ώστε το έλαιο πυρόλυσης να καταστεί κατάλληλο για την ανάπτυξη των συγκεκριμένων μικροοργανισμών.

Η αποστείρωση του ελαίου πυρόλυσης μαζί με το υπόστρωμα, μειώνει αρκετά την τοξικότητά του, αλλά η υδρόλυση και η υδρόλυση μαζί με διεθ- αιθέρα το κατέστησαν ικανό για την ανάπτυξη του *P. putida* (σε συγκέντρωση ελαίου πυρόλυσης 15-20%), του *S. cerevisiae* (σε συγκέντρωση ελαίου πυρόλυσης 25%), και του αγνώστου οργανισμού (σε συγκέντρωση ελαίου πυρόλυση 50%), χρησιμοποιώντας το έλαιο πυρόλυσης ως μοναδική πηγή άνθρακα.

Η συνέχεια του πειράματος θα είναι η ανεύρεση περισσότερων οργανισμών ικανών να ζυμώσουν την λεβογλουκοζάνη, αλλά και η περαιτέρω έρευνα των μικροοργανισμών με την χρήση της HPLC για την πιθανή παραγωγή αιθανόλης.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ελληνική

- Ελαιουργική Α.Ε. (2007). Η Πυρόλυση ως μέθοδος εναλλακτικής επεξεργασίας της βιομάζας. *ANION Περιβαλλοντική ΕΠΕ*.
- Γερονικολού Α. και Κυρίτσης Σ. (2004). Νέες τάσεις στα βιοκαύσιμα. Τμήμα αξιοπ. Φυσικών Πόρων & Γεωργ. Μηχανικής. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Κεφ 1: σελ 54-56.
- ΚΑΠΕ (Κέντρο Ανανεώσιμων Πηγών και Εξοικονόμησης Ενέργειας). (1996). Οδηγός Ανανεώσιμων Πηγών Ενέργειας. Δυνατότητες αξιοποίησης στην Τοπική Αυτοδιοίκηση.
- ΚΑΠΕ (Κέντρο Ανανεώσιμων Πηγών και Εξοικονόμησης Ενέργειας). (2006). Ενεργειακές Καλλιέργειες για την παραγωγή υγρών βιοκαυσίμων στην Ελλάδα.
- Σακκάς Θ.Κ., Murphy J.D. (2002). Η πιθανότητα παραγωγής ενέργειας στην Ελλάδα από βιομάζα-απορρίμματα, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της αεριοποίησης και τη διαδικασία παραγωγής αιθανόλης. Ινστιτούτο Ηλιακής Τεχνολογίας (I.H.T.), 7ο Εθνικό Συνέδριο για τις Ήπιες Μορφές Ενέργειας, Πρακτ. σελ. 197-204.
- Σπανός Κ.Α. (n.d.). Εντατική δασοπονία μικρού περιτροπου χρόνου – Παραγωγή δασικής βιομάζας από φυτείες ταχυαυξών δασοπονικών ειδών, δυνατότητες ενεργειακής και χημικής αξιοποίησης. ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε – Ινστιτούτο Δασικών Ερευνών. Κεφ 6.
- Σταράμος Α. (2009). Άχυρα σιτηρών – Βιοδιύλιση – Υγρό Καύσιμο Μ.Ε.Κ. Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Παραγωγή και Διαχείριση Ενέργειας.
- Φατσικώστας Α. (2005). Καταλυτική αναμόρφωση της αιθανόλης με ατμό για την παραγωγή υδρογόνου για την τροφοδοσία στοιχείων καυσίμου. Διδακτορική διατριβή του τμήματος Χημικών Μηχανικών του Πανεπιστημίου Πατρών. Κεφ 1, 2 :σελ 6.

Ξενόγλωσση

- ACE (American Coalition for Ethanol). (1997). What is Ethanol?
<http://www.ethanol.org/index.php?id=34&parentid=8> . Τελευταία επίσκεψη: 05/05/2011
- Altmann M. and Trachsel H. (1994). The yeast *Saccharomyces cerevisiae* system: A powerful tool to study the mechanism of protein synthesis initiation in eukaryotes. *Biochimie* 76:853-861
- Basu P. (2010). Biomass Gasification and Pyrolysis: Practical Design and Theory. *Academic Pr.*

- Bennett N.M., Helle S.S. and Duff S.J.B. (2009). Extraction and hydrolysis of levoglucosan from pyrolysis oil. *Bioresource Technology* 100:6059-6063.
- Boukis I., Christou M., Sooter Ch., Zafirios Ch. and Vassilatos V. (1995) "The NET European Network: NonTechnical Barriers to the Development of liquid Biofuels in Greece – National Report.
- Brown R. (2007). Hybrid thermochemical/biological processing: Putting the cart before the horse? *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 137: 947-956.
- BTG-BTL. (2001-2011a). Biomass technology group. Fast pyrolysis. <http://www.btgworld.com/index.php?id=22&rid=8&r=rd> Τελευταία επίσκεψη 16/12/2010
- BTG-BTL. (2001-2011b). Biomass technology group. Pyrolysis Oil Applications. <http://www.btgworld.com/index.php?id=23&rid=8&r=rd> Τελευταία επίσκεψη 16/11/2010
- Directive 2003/30/EC of the European Parliament and of the council of 8 May 2003 on the promotion of the use of bio fuels or other renewable fuels for transport.
- EU (2008). Tighten sustainability criteria for biofuels and pull back on targets for RTFO on 30 Sept 2008.
- Goffeau A., Barrell B.G., Bussey H., Davis R.W., Dujon B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel J.D., Jacq C., Johnston M., Louis E.J., Mewes H.W., Murakami Y., Philippsen P., Tettelin H. and Oliver S.G. (1996). Life with 6000 genes. *Science* 274:563–567.
- Goldstein E.S. (1980) New technology for new uses of wood. *TAPPI* 63(2), p. 105-108,
- Goldstein I.S. (1981). Chemicals from cellulose, In *Organic Chemicals from Biomass*. CRC Press, Boca Raton, Florida, σελ. 101-124
- Johnston C.G. and Aust S.D. (1994). Detection of *Phanerochaete chrysosporium* in soil by PCR and restriction enzyme analysis. *Environ Microbiol.* 60:2350-2354.
- Koniordos M. (2003). The Disembeddedness of Environmental Integration Policy – Bioethanol as a Liquid Fuel: A case study from Europe's semi-periphery. 6th ESA CONFERENCE. Murcia. p 2-6
- Lakshmanan C.M., Hoelscher H.E. (1970). Production of Levoglucosan by Pyrolysis of Carbohydrates. Pyrolysis in Hot Inert Gas Stream. *Industrial & Engineering Chemistry Product Research and Development* 9: 57-58
- McMillan, J.D. (1997). Bioethanol Production: Status and Prospects. *Renewable Energy*, 10: 295-302
- Prosen E.M., D.R., Piskorz J., Scott D.S. and Legge R.L. (1993). Microbial Utilization of Levoglucosan in Wood Pyrolysate as a Carbon and Energy Source. *Biotechnology and Bioengineering*, 42: 538-541.

- Reed T.B. (1980) The combustion, pyrolysis, gasification and liquefaction of biomass, Energy from Biomass Conference, Brighton, UK, SERI/TP 14:622-893
- Searchinger T., Heimlich R., Houghton R.A., Dong F., Elobeid A., Fabiosa J., Tokgoz S., Hays D. and Yu T.H. (2008). Use of US croplands for biofuels increases greenhouse gases through emissions from land-use change. *Science* 319, 1238–1240.
- Sung-Seen C., Min-Chul K. and Yun-Ki K. (2010). Influence of silica on formation of levoglucosan from carbohydrates by pyrolysis. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 90:56-62
- Taylor G. (2008). Biofuels and the biorefinary concept. *Energy Policy* 36: 4406-4409
- Venkataramanan S., Jagjit S.Y. (2007). Regulation and heterologous expression of P450 enzyme system components of the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme and Microbial Technology* 43: 205–213.
- Wackett L.P. (2003). *Pseudomonas putida* — A Versatile Biocatalyst. *Nature Biotechnology* 21:136 - 138.
- Yu Z. and Zhang H. (2003a). Ethanol fermentation of acid-hydrolyzed cellulosic pyrolysate with *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology* 90:95-100.
- Yu Z. and Zhang H. (2003b). Pretreatments of cellulose pyrolysate for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia* sp. YZ-1 and *Zymomonas mobilis*. *Biomass and Bioenergy* 24:257-262.
- Yu Z. and Zhang H. (2002). Pretreatment of cellulose pyrolysate for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia* sp. YZ-1 and *Zymomonas mobilis*. *Pergamon* 24:257-262