



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗΣ ΑΕΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΚΑΙΡΟΠΟΙΗΣΗ ΓΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟΦΟΙΤΩΝ ΑΕΙ (ΠΕΓΑ)

«Οι σύγχρονες τεχνικές βιο-ανάλυσης στην υγεία, τη γεωργία, το περιβάλλον και τη διατροφή»

**ΕΝΟΤΗΤΑ 2 - Σύγχρονες τεχνικές βιοανάλυσης στη γεωργία και το
περιβάλλον**

Διάλεξη 21.5.2014

ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΣΤΗΝ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΤΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

1. Η χρήση των μικροοργανισμών στην βιοαποκατάσταση ρυπασμένων οικοσυστημάτων

Τα τελευταία 50 έτη η έκρηξη στην βιομηχανική παραγωγή συνθετικών χημικών ουσιών οδήγησε σε μια σημαντική επιβάρυνση των φυσικών πόρων σε οργανικούς και ανόργανους ρύπους με απρόβλεπτες συνέπειες για το περιβάλλον και τους οργανισμούς που διαβιούν σε αυτό όσο και για την υγεία των ανθρώπων. Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί τα τελευταία έτη έχουν δείξει ότι οι μικροοργανισμοί είναι υπεύθυνοι σε πολύ σημαντικό βαθμό για την απομάκρυνση ή αποτοξικοποίηση των ρύπων από το περιβάλλον. Η ικανότητα των μικροοργανισμών να αποδομούν και να μετατρέπουν διάφορες μορφές ρύπων είναι αποτέλεσμα της πλαστικότητας του γενετικού τους υλικού που τους επιτρέπει να προσαρμόζονται ταχύτατα τα ενζυμικά τους συστήματα ώστε να μπορούν να μετατρέπουν τους ρύπους σε λιγότερο τοξικές μορφές και παράλληλα να χρησιμοποιούν αυτά τα προϊόντα μεταβολισμού ως πηγές ενέργειας για την αύξηση και ανάπτυξη τους. Έτσι ως απάντηση στις συμβατικές μεθόδους απορρύπανσης όπως είναι οι θερμικές, φυσικές και χημικές αναπτύχθηκαν βιολογικές μέθοδοι απορρύπανσης ή αποκατάστασης ρυπασμένων οικοσυστημάτων.

Ως **Βιολογική Απορρύπανση** ορίζεται η χρήση της μεταβολικής ικανότητας μικροοργανισμών ή φυτών για την απορρύπανση και αποκατάσταση ρυπασμένων εδαφών, υδροφόρων συστημάτων και λοιπών οικοσυστημάτων. Η βιολογική απορρύπανση έχει να αντιμετωπίσει σημαντικά προβλήματα στην εφαρμογή της τα οποία είναι απαραίτητο να ξεπεράσει για να έχουμε επιτυχημένη αποκατάσταση του ρυπασμένου περιβάλλοντος. Ποια είναι αυτά τα προβλήματα;

- **Ετερογένεια Αποβλήτων:** Συνήθως οργανικά και ανόργανα απόβλητα έχουν διαχυθεί ανομοιογενώς στο έδαφος. Οι ρύποι μπορεί να βρίσκονται σε αέρια, υγρή ή στερεή μορφή, να βρίσκονται διαλυμένοι στο εδαφικό διάλυμα ή προσροφημένοι στα εδαφικά κolloειδή (χαμηλή διαθεσιμότητα)
- **Συγκέντρωση Ρύπων:** Οι ρύποι στο έδαφος μπορεί να βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις ώστε να μην μπορούν να υποστηρίξουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών ή την ενεργοποίηση των καταβολικών ενζυμικών μηχανισμών ή σε ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις που μπορεί να είναι τοξικές για ορισμένους μικροοργανισμούς

- **Υπολειμματικότητα ή Τοξικότητα Ρύπων:** Πολλοί ρύποι είναι ανθεκτικοί στην βιοαποδόμηση ή απαιτείται συνδυασμένη δράση πολλών μικροοργανισμών για τον μεταβολισμό τους
- **Ιδανικές Συνθήκες Μικροβιακής Ανάπτυξης:** Βιοαποδόμηση των ρύπων θα πραγματοποιηθεί μόνο σε συνθήκες ευνοϊκές για την ανάπτυξη της μικροβιακής κοινότητας. Η εφαρμογή και διατήρηση ιδανικών συνθηκών ανάπτυξης για την μικροβιακή κοινότητα είναι δύσκολη

Πλεονεκτήματα Βιολογικής Απορρύπανσης

- Χαμηλό κόστος εφαρμογής σε σχέση με συμβατικές μεθόδους
- Περιβαλλοντικά φιλική μέθοδος
- Οδηγεί σε πλήρη απομάκρυνση των ρύπων

Μειονεκτήματα Βιολογικής Απορρύπανσης

- Για αποτελεσματική απορρύπανση απαιτείται η βελτιστοποίηση των θρεπτικών και περιβαλλοντικών συνθηκών που συνήθως απαιτεί σημαντική εργασία, χρόνο και κόστος
- Οι ενδογενείς μικροοργανισμοί ίσως να προτιμούν να χρησιμοποιούν άλλα πιο άμεσα διαθέσιμα υποστρώματα για την αύξηση και ανάπτυξη τους με αποτέλεσμα να μεταβολίζουν τους ρύπους με αργό ρυθμό. Συνεπώς, οι μικροοργανισμοί θα πρέπει να χρησιμοποιούν τους ρύπους για την αύξηση και ανάπτυξη τους αποκομίζοντας ενέργεια από την διάσπαση τους
- Το φυσικό ρυπασμένο περιβάλλον ίσως να περιέχει σημαντικό αριθμό άλλων τοξικών ρύπων ή μίγματα ρύπων που δεν μπορούν να αποδομηθούν βιολογικά αλλά πιθανόν να είναι και τοξικοί για την μικροβιακή κοινότητα

Ποιες είναι οι βασικές στρατηγικές της Βιολογικής Απορρύπανσης:

- Βιολογική Ενεργοποίηση (Biostimulation):
- Βιολογικός Εμπλουτισμός (Bioaugmentation)
- Προσθήκη εξωγενών καταβολικών ενζύμων

➤ Φυτική Απορρύπανση (Phytoremediation)

Βιολογική Ενεργοποίηση: Η ενεργοποίηση της ενδογενούς μικροβιακής κοινότητας τους εδάφους ώστε να μεγιστοποιηθεί η αποδομητική της ικανότητα. Η εφαρμογή περιλαμβάνει προσθήκη θρεπτικών συστατικών, βελτιστοποίηση του αερισμού και διατήρηση της θερμοκρασίας και υγρασίας σε ιδανικά επίπεδα ώστε να δημιουργηθούν ιδανικές συνθήκες για την αύξηση και ανάπτυξη των ενδογενών μικροοργανισμών. Η βιολογική ενεργοποίηση αποτελεί την πιο συχνά εφαρμοζόμενη στρατηγική και για να εφαρμοστεί απαιτείται ως προϋπόθεση η ύπαρξη στο ρυπασμένο περιβάλλον μικροοργανισμών που έχουν την ικανότητα να αποδομούν τους ρύπους και να τους χρησιμοποιούν για αύξηση και ανάπτυξη τους. Προτιμάται για την απορρύπανση περιοχών που έχουν εκτεθεί σε πολλαπλές χρήσεις και συνεπώς περιέχουν μίγμα διαφόρων ρύπων. Σε τέτοιες περιοχές οι ρύποι βρίσκονται συνήθως σε συγκεντρώσεις από μέτριες ως υψηλές και δεν υπάρχει πίεση χρόνου για αποκατάσταση των ρυπασμένων υλικών.

Βιολογικός Εμπλουτισμός: Προσθήκη εξωγενών μικροοργανισμών με αυξημένη και εξειδικευμένη καταβολική ικανότητα με στόχο την επιτάχυνση της αποδόμησης των ρύπων. Η προσθήκη καταβολικών μικροοργανισμών χρησιμοποιείται είτε ως επικουρική μέθοδος ώστε να βοηθήσει την αποδομητική δραστηριότητα της ενδογενούς μικροβιακής κοινότητας είτε ως αυτοδύναμη μέθοδος με την προσθήκη σημαντικού πληθυσμού μικροοργανισμών που θα πρέπει να ανταγωνισθούν με την ενδογενή μικροβιακή κοινότητα για χώρο και υποστρώματα. Για να ακολουθηθεί η στρατηγική του βιολογικού εμπλουτισμού απαιτείται α) Η συγκέντρωση των ρύπων είναι πολύ υψηλή, β) υπάρχει πίεση χρόνου για να επιτύχουμε άμεση αποκατάσταση της ρυπασμένης περιοχής, γ) Οι ρύποι είναι ιδιαίτερα τοξικοί, υπολειμματικοί ή ανθεκτικοί στην βιολογική αποδόμηση και δ) υπάρχει διαπιστωμένη απουσία ενδογενών μικροοργανισμών που μπορούν να επιφέρουν διάσπαση των ρύπων. Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούμε για τον βιολογικό εμπλουτισμό ρυπασμένων περιοχών συνήθως είναι είτε ενδογενείς μικροοργανισμοί οι οποίοι έχουν απομονωθεί από το ρυπασμένο έδαφος είτε εξωγενείς μικροοργανισμοί ή κοινότητες (consortia) μικροοργανισμών που έχουν απομονωθεί από άλλο έδαφος ή περιβάλλον. Γενικότερα τα απαραίτητα χαρακτηριστικά που πρέπει να έχει ένας μικροοργανισμός για να μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μεθόδους βιολογικού εμπλουτισμού είναι:

- Γρήγορη δράση
- Μικρή υπολειμματικότητα στο έδαφος
- Κινητικοί στο έδαφος
- Ανθεκτικοί σε αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες
- Χαμηλό κόστος μαζικής παραγωγής και εφαρμογής τους
- Ευρύ φάσμα αποδομητικής ικανότητας

Εφαρμογή Καταβολικών Ενζύμων: Η εφαρμογή ζωντανών μικροοργανισμών για την αποκατάσταση ρυπασμένων περιοχών όπως αναφέρθηκε παρουσιάζει αρκετά προβλήματα σε επίπεδο εφαρμογής που πηγάζουν κυρίως από το γεγονός ότι θα πρέπει να δημιουργήσουμε βέλτιστες συνθήκες στο ρυπασμένο περιβάλλον για την μεγιστοποίηση της μεταβολικής δραστηριότητας των μικροοργανισμών (ενδογενών και εξωγενών) και την επιβίωση τους. Τα παραπάνω προβλήματα εφαρμογής που παρουσιάζουν οι βιολογικές μέθοδοι απορρύπανσης όπου προστίθενται αυτούσιοι μικροοργανισμοί μπορούν να λυθούν με την εφαρμογή ενζύμων. Ένζυμα με εξειδικευμένη καταβολική δράση στην αποδόμηση οργανικών ρύπων έχουν απομονωθεί από πλήθος μικροοργανισμών και η πειραματική εφαρμογή τους για την απορρύπανση εδαφών έχει παρουσιάσει ικανοποιητικά αποτελέσματα. Τα ένζυμα θα πρέπει να εφαρμοστούν ως σκευάσματα που θα επιτρέπουν την επαφή τους με τους ρύπους που στοχεύουν αλλά παράλληλα να προστατεύονται από την δράση πρωτεασών που βρίσκονται σε αφθονία στο περιβάλλον και προκαλούν άμεση πρωτεόλυση και αδρανοποίηση των ενζύμων σε ελεύθερη μορφή. Σήμερα λοιπόν η συγκεκριμένη στρατηγική πάσχει από τεχνολογία συσκευασίας και εφαρμογής των ενζύμων. Με την ταχύτατη ανάπτυξη της νανοτεχνολογίας έχουν γίνει σημαντικά βήματα προς αυτή την κατεύθυνση ώστε να γίνει πλήρως εφικτή η εφαρμογή καταβολικών ενζύμων για την αποκατάσταση ρυπασμένων οικοσυστημάτων.

Κατηγορίες ρύπων: Με βάση την χημική τους δομή οι ρύποι διαχωρίζονται σε οργανικοί και ανόργανοι. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι πολυαρωματικοί υδρογονάνθρακες (συστατικά του πετρελαίου), πολυχλωριωμένα διφαινύλια, πολυχλωριωμένες διβενζοδιοξίνες, χλωροφαινόλες, γεωργικά φάρμακα,

νιτροαρωματικά μόρια όπως το TNT, χλωροαλκάνια και χλωροαλκένια. Στην δεύτερη κατηγορία ανήκουν τα νιτρικά, φωσφορικά, βαρέα μέταλλα και ραδιονουκείδια.

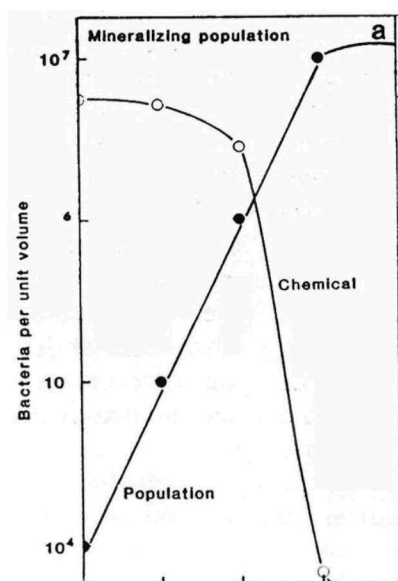
Βιολογική απορρύπανση οργανικών ρύπων

Το πρώτο πράγμα που θα πρέπει να γνωρίζουμε είναι με ποιους τρόπους ή μηχανισμούς οι μικροοργανισμοί μεταβολίζουν ή αποδομούν τους οργανικούς ρύπους στο περιβάλλον. Δύο είναι οι κύριοι μηχανισμοί:

α) Καταβολισμός ή ανοργανοποίηση

β) Συμμεταβολισμός

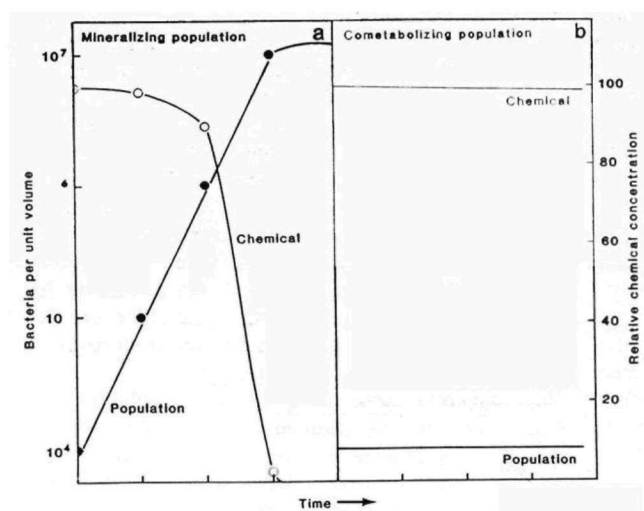
Στο **καταβολισμό** οι μικροοργανισμοί μεταβολίζουν τους οργανικούς ρύπους και χρησιμοποιούν την ενέργεια που παράγεται για την αύξηση και ανάπτυξη τους



Όταν μικροοργανισμοί καταβολίζουν έναν οργανικό ρύπο η αποδόμηση του ρύπου όπως φαίνεται στο παραπάνω σχήμα συνοδεύεται από αντίστοιχη αύξηση του πληθυσμού του μικροοργανισμού μέχρι να εξαντληθεί η ποσότητα του ρύπου που είναι διαθέσιμη. Τα κύρια χαρακτηριστικά του καταβολισμού είναι α) Ταχύτατος ρυθμός αποδόμησης των ξενοβιοτικών ουσιών, β) Η ενέργεια που παράγεται κατά την διάρκεια του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών ουσιών χρησιμοποιείται άμεσα από

τους μικροοργανισμούς για την αύξηση και ανάπτυξη τους, γ) Οι μικροοργανισμοί συνεχίζουν να μεταβολίζουν τις ξενοβιοτικές ουσίες ως βασικό υπόστρωμα ακόμη και παρουσία εύκολα διαθέσιμων εναλλακτικών πηγών C ή N, δ) Ο καταβολισμός οδηγεί στην παραγωγή απλούστερων μορίων που μπορούν να μεταβολισθούν παραπέρα από τους μικροοργανισμούς προς $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$, ε) Οι μικροοργανισμοί κατέχουν εξειδικευμένα ενζυμικά συστήματα για την αποδόμηση των συγκεκριμένων ξενοβιοτικών ουσιών.

Από την άλλη μεριά στο συμμεταβολισμό οι μικροοργανισμοί έχουν ενζυμικά συστήματα ευρέως φάσματος τα οποία χρησιμοποιούνται για τον μεταβολισμό διαφόρων φυσικών υποστρωμάτων αλλά ταυτόχρονα μπορούν να μεταβολίζουν και ξενοβιοτικές ουσίες στο περιβάλλον.



Τα κύρια χαρακτηριστικά του συμμεταβολισμού είναι: α) Βραδύς μεταβολισμός με σταθερό ρυθμό αποδόμησης, β) Οι μικροοργανισμοί δεν αποκομίζουν ενεργειακό όφελος από την αποδόμηση των ξενοβιοτικών ουσιών για την ανάπτυξη τους, γ) Παρουσία εναλλακτικών πηγών C ή N αναστέλλεται ο μεταβολισμός των ξενοβιοτικών ουσιών, δ) Ο συμμεταβολισμός οδηγεί στην παραγωγή προϊόντων μεταβολισμού που δεν μπορούν να μεταβολισθούν παραπέρα από τους μικροοργανισμούς, ε) Οι μικροοργανισμοί κατέχουν ενζυμικά συστήματα ευρέως φάσματος.

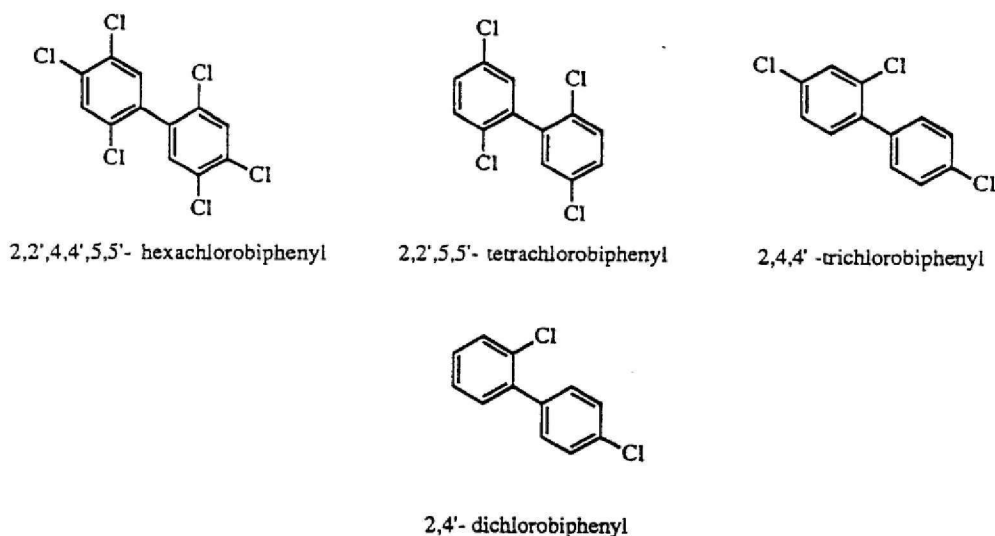
Γενικότερα στον συμμεταβολισμό παρατηρούνται βραδύς ρυθμοί αποδόμησης των οργανικών ρύπων χωρίς παράλληλη αύξηση του πληθυσμού των μικροοργανισμών

που συµεταβολίζουν τους ρύπους (Σχήµα Παραπάνω Δεξιά σε αντιπαραβολή µε τον καταβολισµό Αριστερά).

Γενικότερα οι µικροοργανισµοί που καταβολίζουν οργανικούς ρύπους και αποκοµίζουν ενέργεια για την αύξηση και ανάπτυξη τους ακολουθούν συγκεκριµένα µονοπάτια µεταβολισµού ιδιαίτερα όταν µιλάµε για οργανικούς ρύπους που περιέχουν αρωµατικούς δακτυλίους στο µόριο τους όπως είναι οι πολυαρωµατικοί υδρογονάνθρακες και τα πολυχλωριωµένα διφαινόλια.



Πολυαρωµατικοί Υδρογονάνθρακες (PAHs)

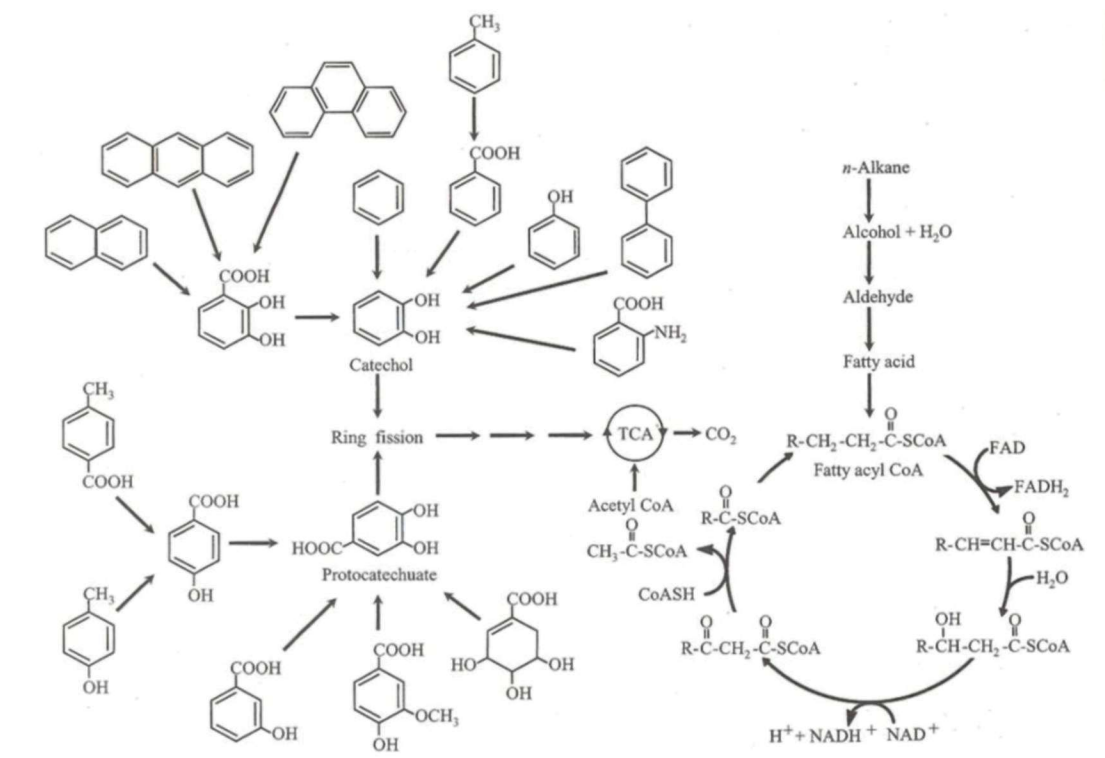


Πολυχλωριωµένα διφαινόλια (PCBs)

Γενικότερα ισχύει ότι όσο περισσότερους αρωµατικούς δακτυλίους και υποκαταστάτες Cl ή NO₂ έχουν οι αρωµατικοί δακτύλοι ενός οργανικού ρύπου τόσο πιο ανθεκτικοί στην µικροβιακή αποδόµηση ο οργανικός ρύπος. Η ανθεκτικότητα αυτή οφείλεται στο ότι η διάσπαση δεσµών C-C, C-Cl είναι ενεργειακά 'φτωχοί' για τους µικροοργανισµούς σε αντίθεση µε τους εστερικούς ή καρβοξυεστερικούς

δεσμούς που είναι 'πλούσιοι' ενεργειακά και διασπώνται πολύ πιο εύκολα από τους μικροοργανισμούς.

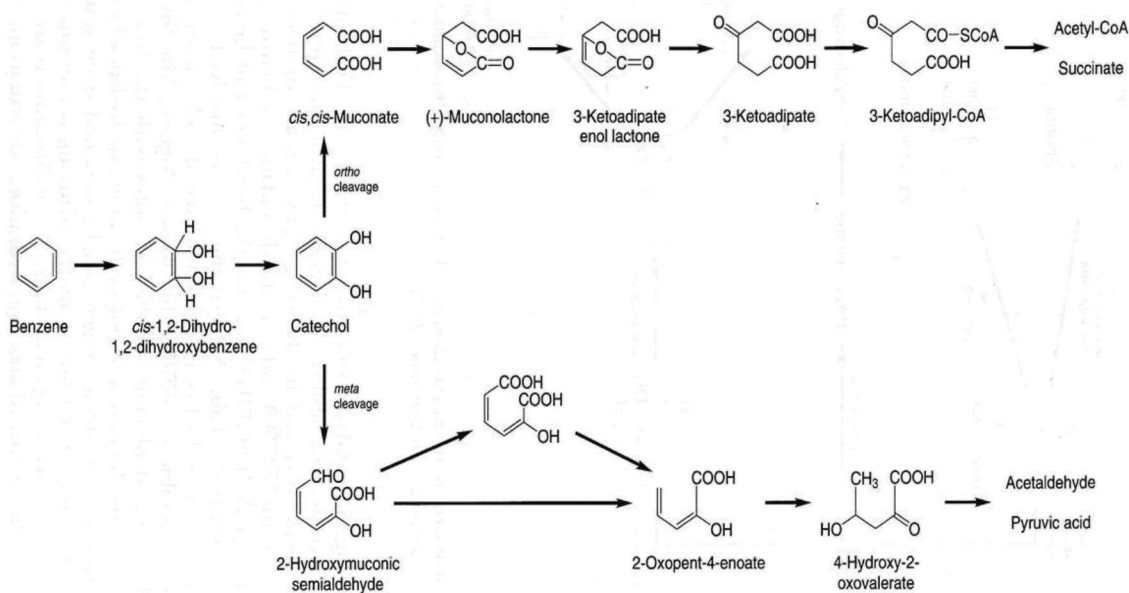
Ένας βασικός κανόνας που διέπει τον μικροβιακό μεταβολισμό των αρωματικών οργανικών ρύπων που αποτελούν και τους σημαντικότερους περιβαλλοντικούς ρύπους είναι ότι τα τελικά προϊόντα μεταβολισμού τους είναι απλούστερα μόρια όπως πυρροβικό οξύ και ακεταλδεΐδη τα οποία ενσωματώνονται άμεσα στον μεταβολισμό των μικροοργανισμών όπως στον κύκλο του krebs (δείτε το παρακάτω σχήμα)



Τα μονοπάτια μικροβιακού μεταβολισμού των αρωματικών οργανικών ρύπων διαχωρίζονται σε δύο βασικά στάδια: Το ανώτερο και το κατώτερο μονοπάτι. Στο ανώτερο μονοπάτι συμμετέχουν κυρίως ένζυμα που είναι εξειδικευμένα στον μεταβολισμό του κάθε διαφορετικού οργανικού ρύπου και το τελικό προϊόν μεταβολισμού του ανώτερου μονοπατιού είναι σχεδόν πάντα μια κατεχόλη που αποτελείται από ένα βενζολικό δακτύλιο με δύο OH υποκαταστάτες σε διπλανές θέσεις (1,2 ή 2,3). Με την παραγωγή της κατεχόλης ξεκινά το κατώτερο μονοπάτι που μπορεί να ακολουθήσει δύο διαφορετικές οδούς: ορθο- ή το μέτα-μονοπάτι ανάλογα με το αν η διάσπαση του αρωματικού δακτυλίου ξεκινά από την *όρθο* ή την

μέτα θέση του δακτυλίου. Χαρακτηριστικά παρουσιάζονται τα όρθο και μέτα μονοπάτια μεταβολισμού του βενζολίου.

Το ανώτερο μονοπάτι μεταβολισμού του βενζολίου περιλαμβάνει την δράση μιας διοξυγενάσης, ενζύμων που έχουν συνήθως χαμηλή εξειδίκευση, και προσθέτουν δύο άτομα OH στον αρωματικό δακτύλιο οδηγώντας στην παραγωγή κατεχόλης από την οποία ξεκινούν είτε το όρθο είτε το μέτα μονοπάτι μεταβολισμού προς τελική παραγωγή ακετύλοCoA, ηλεκτρικού οξέος, ακεταλδεΐδης ή πυροβικού οξέος που αποτελούν πρόδρομες ουσίες σε διάφορες βασικές διεργασίες του κυρίως ενεργειακού μεταβολισμού των μικροοργανισμών.



Μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούμε στην βιοαποκατάσταση

Οι δύο πολυπληθέστερες και βασικότερες ομάδες μικροοργανισμών που παίζουν σημαντικό ρόλο στην αποδόμηση οργανικών ρύπων είναι οι μύκητες και τα βακτήρια. Η επιλογή του είδους των μικροοργανισμών που θα χρησιμοποιηθούν εξαρτάται από πολλές παραμέτρους όπως είναι το είδος του ρύπου που πρέπει να απομακρυνθεί και η παρουσία ή όχι και άλλων ρύπων. Σαν γενικότερη αρχή οι μύκητες παρουσιάζουν μια χαμηλότερη εξειδίκευση στην αποδόμηση οργανικών ρύπων αλλά εμφανίζουν σχετικά βραδείς ρυθμούς αποδόμησης. Αντίθετα τα βακτήρια λόγω και της πλαστικότητας του γενετικού τους υλικού παρουσιάζουν

υψηλή εξειδίκευση στην αποδόμηση οργανικών ρύπων η οποία πραγματοποιείται συνήθως σε ταχύτατους ρυθμούς αποδόμησης.

ΜΥΚΗΤΕΣ: Χαρακτηριστικό παράδειγμα μυκήτων που χρησιμοποιούνται σε στρατηγικές βιολογικής αποκατάστασης είναι οι μύκητες λευκής σήψης. Πρόκειται κυρίως για σαπρότροφους βασιδιομύκητες που αναπτύσσονται επί νεκρής οργανικής ύλης σε συνθήκες υγρασίας προκαλώντας μια χαρακτηριστική λευκή σήψη (φωτογραφία παρακάτω)



Ονομάζονται και λιγνινολυτικοί μύκητες λόγω της ικανότητας τους να διασπούν την λιγνίνη που αποτελεί το πιο πολύπλοκο δομικά φυσικό πολυμερές. Παρόλα αυτά το βασικό υπόστρωμα ανάπτυξης των μυκήτων λευκής σήψης είναι η κυτταρίνη και ημικυτταρίνη και ως δευτερογενές υπόστρωμα χρησιμοποιούν την λιγνίνη. Οι μύκητες λευκής σήψης έχουν χρησιμοποιηθεί σε στρατηγικές βιολογικής απορρύπανσης λόγω των ενζυμικών συστημάτων τους που τους καθιστούν επί της αρχής ιδανικούς για την αποκατάσταση ρυπασμένων οικυσυστημάτων ή λοιπών περιβαλλοντικών υποστρωμάτων

- 1) **Εξωκυτταρικά ένζυμα:** ο ρύπος δεν χρειάζεται να εισέλθει στον μικροοργανισμό και επίσης υπάρχει δυνατότητα αποδόμησης και ρύπων που βρίσκονται προσροφημένοι και δη προστατευμένοι στα εδαφικά κολλοειδή
- 2) **Χαμηλής Εξειδίκευσης ένζυμα:** τα ένζυμα αυτά έχουν την ικανότητα μεταβολισμού της λιγνίνης, ενός πολύπλοκου πολυμερούς. Η ικανότητα τους αυτή να καταδεικνύει το ευρύ φάσμα δράσης των ενζύμων αυτών των μυκήτων.

Το λιγνινολυτικό ενζυμικό σύστημα των μυκήτων λευκής σήψης αποτελείται από τρία κυρίως ένζυμα:

- **Λιγνινο-υπεροξειδάσες (LiP):** Παρουσία H_2O_2 Οξειδώνουν μη φαινολικά τμήματα της λιγνίνης αφαιρώντας ένα ηλεκτρόνιο και σχηματίζοντας κατιονικές ρίζες που διασπώνται χημικά
- **Μαγγάνιο-υπεροξειδάσες (MnP):** Παρουσία H_2O_2 οξειδώνουν Mn^{+2} σε Mn^{+3} το οποίο οξειδώνει φαινολικά τμήματα της λιγνίνης προς φαινοξικές ρίζες με αποτέλεσμα την διάσπαση των ουσιών
- **Λακκάσες (Lac):** Είναι Cu-οξειδάσες που χρησιμοποιούν μοριακό O_2 για την οξείδωση κυρίως φαινολικών ενώσεων προς φαινοξικές ρίζες

Οι περισσότεροι μύκητες λευκής σήψης παράγουν ένα ή δύο εκ των παραπάνω ενζύμων αν και υπάρχουν και μύκητες που ανήκουν στο γένος *Phlebia* και έχουν την ικανότητα να παράγουν και τα τρία ένζυμα που αναφέρονται παραπάνω. Έτσι για παράδειγμα ο μύκητας *Pleurotus ostreatus*, ο γνωστός εδώδιμος μύκητας, αποτελεί έναν από τους πιο αποτελεσματικούς μύκητες λευκής σήψης στην αποδόμηση οργανικών ρύπων παράγοντας κυρίως εξαρτώμενη του Mn Υπεροξειδάσες και Λακκάσες.

Παρά τα ιδανικά χαρακτηριστικά που αρχικά καθιέρωσαν τους μύκητες λευκής σήψης ως βασικά εργαλεία σε μελλοντικές στρατηγικές βιολογικής αποκατάστασης ρυπασμένων περιβαλλοντικών υποστρωμάτων, η εφαρμογή τους παρουσιάζει αρκετά προβλήματα όπως

1. Περιορισμένη γνώση της φυσιολογίας και λειτουργίας των λιγνολυτικών ενζυμικών συστημάτων των μυκήτων
2. Αργή δράση και χαμηλή ικανότητα ανταγωνισμού με την ενδογενή μικροβιακή κοινότητα

ΒΑΚΤΗΡΙΑ: Σημαντικός αριθμός βακτηρίων έχουν απομονωθεί από ρυπασμένα εδάφη που έχουν την ικανότητα να αποδομούν γεωργικά φάρμακα, πετρέλαια, πολυχλωριωμένες φαινόλες, πολυχλωριωμένα διφαινύλια κτλ. Η χρήση βακτηρίων στην βιολογική απορρύπανση αποτελεί σημαντική μέθοδο ιδιαίτερα μέσω ενεργοποίησης της ενδογενούς μικροχλωρίδας με την δημιουργία βέλτιστων συνθηκών ανάπτυξης (βιολογική ενεργοποίηση). Η προσθήκη βακτηρίων στο έδαφος

για την βιολογική απορρύπανση εδαφών έχει δοκιμασθεί σε πλήθος περιπτώσεων με αντικρουόμενα αποτελέσματα. Η αποτυχία του βιολογικού εμπλουτισμού με την χρήση βακτηρίων σε πολλές περιπτώσεις έχει αποδοθεί

- 1) Στην μειωμένη ικανότητα των εξωγενών βακτηρίων να ανταγωνιστούν με την ενδογενή μικροβιακή κοινότητα για χώρο και θρεπτικά στοιχεία
- 2) Στην υψηλή εξειδίκευση των ενζυμικών συστημάτων που κατέχουν με αποτέλεσμα να περιορίζεται η χρήση του σε περιπτώσεις όπου το ρυπαντικό φορτίο περιλαμβάνει ένα συγκεκριμένο στενό φάσμα οργανικών ρύπων που τα συγκεκριμένα βακτήρια μπορούν εξειδικευμένα να αποδομήσουν ενώ δεν μπορούν να ανταποκριθούν σε περιπτώσεις όπου η ρύπανση που έχει προκληθεί περιλαμβάνει μίγμα διαφορετικής χημικής δομής οργανικών ρύπων.

Βιολογική απορρύπανση ανόργανων ρύπων

Οι βασικότεροι ανόργανοι ρύποι τους οποίους καλούμαστε να απομακρύνουμε ή να μετατρέψουμε σε λιγότερο τοξικές μορφές με την βοήθεια των μικροοργανισμών είναι οι παρακάτω:

- Ανιόντα όπως νιτρικά και φωσφορικά
- Μέταλλα
- Ραδιονουκλεΐδια

Βιολογική Απομάκρυνση Νιτρικών: Πραγματοποιείται με την διαδικασία της απονιτροποίησης κατά την οποία όπως φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα τα νιτρικά ιόντα, που μπορούν να δημιουργήσουν σημαντικά περιβαλλοντικά προβλήματα (νιτρορύπανση υπόγειων υδροφόρων συστημάτων), ανάγονται υπό αναερόβιες συνθήκες προς NO, N₂O, N₂ (αέρια).



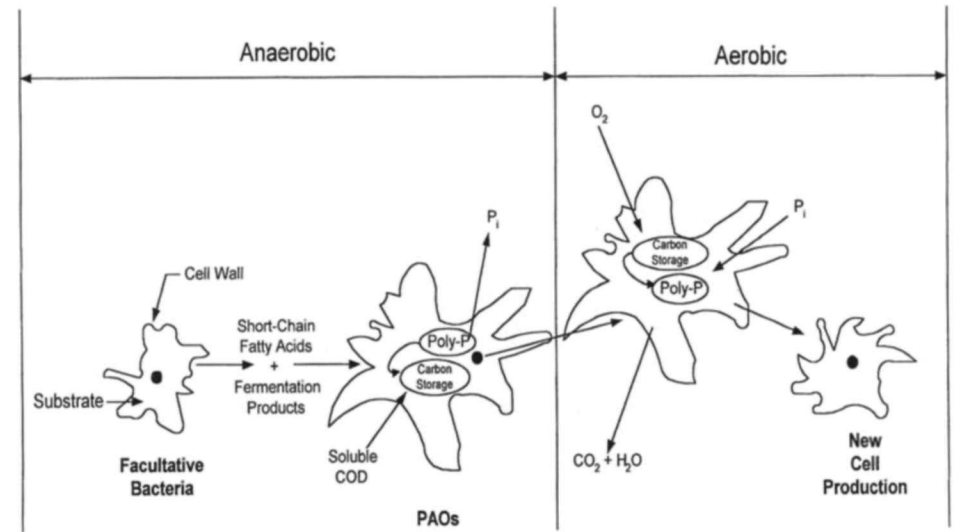
Τα βακτήρια που πραγματοποιούν την απονιτροποίηση είναι προαιρετικά αναερόβιοι μικροοργανισμοί σε συνθήκες χαμής συγκέντρωσης O_2 παράγουν ATP κατά την μεταφορά e^- μέσω της κυτοχρωμικής αλυσίδας από ένα δότη e^- σε NO_3^- . Τα βακτήρια που πραγματοποιούν την απονιτροποίηση κατέχουν συγκεκριμένα ένζυμα όπως 1) Νιτρική αναγωγή (narAB), 2) Νιτρώδη αναγωγή (nirK), 3) Αναγωγή του μονοξειδίου του αζώτου (norCB) και 4) Αναγωγή του υποξειδίου του αζώτου (nosZ).

Η απονιτροποίηση θεωρείται από αγροτικής πλευράς ανεπιθύμητη διότι προκαλεί σημαντικές απώλειες των αζωτούχων λιπασμάτων που εφαρμόζονται για βελτίωση της παραγωγής. Από την άλλη μεριά από περιβαλλοντικής άποψης θεωρείται θετική διεργασία διότι προλαμβάνει την έκλυση υψηλών ποσοτήτων NO_3^- στα υπόγεια υδροφόρα συστήματα.

Παραδοσιακά, η απονιτροποίηση βρίσκει εφαρμογή στην επεξεργασία υγρών αποβλήτων που περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις NO_3^- . Εφαρμογή αναερόβιων ζωνών ή δεξαμενών στην βιολογική επεξεργασία αποβλήτων και προσθήκη οργανικών υποστρωμάτων ως δότες ηλεκτρονίων (μεθανόλη, οξικό οξύ) οδηγούν στην απομάκρυνση NO_3^- από τα υγρά απόβλητα.

Βιολογική Απομάκρυνση Φωσφορικών: Διαδικασία που χρησιμοποιείται στην απομάκρυνση φωσφορικών από υγρά απόβλητα και περιλαμβάνει την πρόσληψη και συσσώρευση από εξειδικευμένα βακτήρια φωσφορικών με την μορφή πολυφωσφορικών κόκκων στο εσωτερικό του κυττάρου ή εξωκυτταρικών πολυμερών.

Τα βακτήρια υπό αερόβιες συνθήκες και παρουσία πηγών C συσσωρεύουν φωσφορικά υπό την μορφή πολυφωσφορικών (ως και 10^4 μονομερή). Υπό αναερόβιες συνθήκες τα βακτήρια υδρολύουν τα πολυφωσφορικά για την παραγωγή ATP (ενέργειας) με παράλληλη ελευθέρωση των φωσφορικών.



Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας συσσώρευσης φωσφορικών από βακτήρια

Η ικανότητα των συγκεκριμένων βακτηρίων βρίσκει εφαρμογή στην απομάκρυνση φωσφορικών από υγρά απόβλητα. Πιο συγκεκριμένα, παρουσία βακτηρίων που συσσωρεύουν φώσφορο και εναλλαγή αερόβιων και αναερόβιων συνθηκών σε συστήματα επεξεργασίας αποβλήτων μπορούν να απομακρυνθούν ($10\text{-}20 \text{ mg L}^{-1}$) φωσφορικά από υγρά απόβλητα. Στο αερόβιο τμήμα τα εξειδικευμένα βακτήρια, που αποτελούν τμήμα της βιομάζας του συστήματος, συσσωρεύουν πολυφωσφορικά ενώ στο αναερόβιο σύστημα τα βακτήρια ελευθερώνουν τα φωσφορικά τα οποία στην συνέχεια μπορούν εύκολα να απομακρυνθούν με χημική καθίζηση.

Βιολογική Απομάκρυνση Μετάλλων: Τα μέταλλα βρίσκονται ελεύθερα στο περιβάλλον και σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις δεν θεωρούνται ρύποι καθώς πολλά από αυτά παίζουν καθοριστικό ρόλο σε βασικές βιοχημικές διεργασίες. Τα μέταλλα θεωρούνται ρύποι όταν βρίσκονται διαθέσιμα στο περιβάλλον σε υπερβολικές ποσότητες ύστερα από ανθρώπινες παρεμβάσεις. Τα μέταλλα είναι κατά συνέπεια χαρακτηριστικό παράδειγμα όπου επιβεβαιώνεται η ρήση ότι *η δόση κάνει το δηλητήριο*. Το μοναδικό μέταλλο που μέχρι σήμερα δεν έχει βρεθεί να συμμετέχει σε κάποιες βιοχημικές διεργασίες είναι ο υδράργυρος (Hg) με συνέπεια να θεωρείται ρύπος προς απομάκρυνση ακόμη και ιδιαίτερα χαμηλές συγκεντρώσεις.

Το βασικότερο πρόβλημα που έχει να αντιμετωπίσει η βιολογική απορρύπανση είναι η ανθεκτικότητα των μετάλλων στην μικροβιακή διάσπαση με συνέπεια οι

μικροοργανισμοί να έχουν αναπτύξει άλλους μηχανισμούς για την απομάκρυνση τους.

Οι βασικότεροι μηχανισμοί με τους οποίους οι μικροοργανισμοί αποτοξικοποιούν ή απομακρύνουν τα μέταλλα από το περιβάλλον είναι οι εξής:

- Βιοπροσρόφηση / Βιοσυσσωρευση
- Αναγωγή
- Κατακρήμνιση
- Μεθυλίωση

Βιοπροσρόφηση/Βιοσυσσωρευση: Η παθητική (βιοπροσρόφηση) ή ενεργητική (βιοσυσσωρευση) προσρόφηση ή απορρόφηση μετάλλων από τους μικροοργανισμούς. Κύρια χαρακτηριστικά του συγκεκριμένου μηχανισμού είναι α) Μπορεί να χρησιμοποιηθεί νεκρή (AlgaSORB®) ή ζωντανή μικροβιακή μάζα και β) παρατηρούνται τεράστιες διαφορές στην ικανότητα προσρόφησης μετάλλων από τους διάφορους μικροοργανισμούς. Οι κύριοι μηχανισμοί με τους οποίους οι μικροοργανισμοί προσροφούν ή συσσωρεύουν μέταλλα είναι:

α) Δημιουργία οργανικών συμπλόκων μεταξύ μετάλλων και εξωκυτταρικών πολυμερών που παράγουν οι μικροοργανισμοί

β) Δέσμευση των κατιόντων μετάλλων στα αρνητικά φορτισμένα συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών όπως τειχικό οξύ (θετικά κατά Gram βακτήρια) και στα στρώματα S (θετικά κατά Gram βακτήρια και Αρχαία)

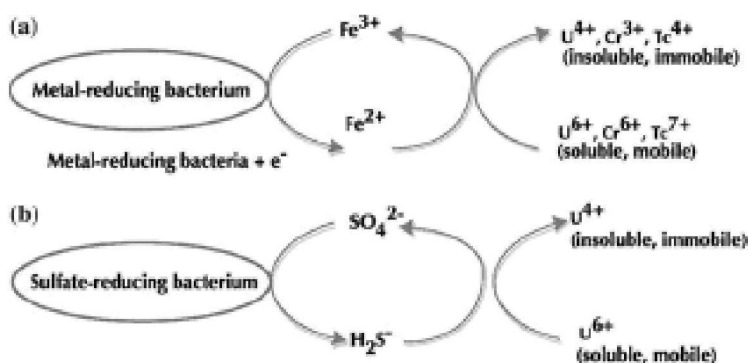
Βασική απαίτηση για εμπορική εκμετάλλευση της συγκεκριμένης ικανότητας των μικροοργανισμών είναι η χρήση φθηνής βιομάζας για την προσρόφηση των μετάλλων όπως α) Μικροβιακή μάζα που παράγεται σε ζυμώσεις, β) Μικροβιακή μάζα από άλγη, γ) Μικροβιακή μάζα από συστήματα επεξεργασίας αποβλήτων.

Αναγωγή: Μικροοργανισμοί έχουν την ικανότητα να ανάγουν μέταλλα και συνήθως αυτό οδηγεί σε μορφές με χαμηλότερη διαλυτότητα και άρα περιορισμένη διαθεσιμότητα των μετάλλων για το περιβάλλον. Οι μικροοργανισμοί αυτοί συνήθως

υπό αναερόβιες συνθήκες και παρουσία κάποιου οργανικού μορίου ως δότη ηλεκτρονίων και πηγή C, χρησιμοποιούν τα μέταλλα (ή οξειδωμένες τους μορφές) ως τερματικούς δέκτες ηλεκτρονίων για την παραγωγή ενέργειας (ATP). Μικροοργανισμοί που συμμετέχουν στην αναγωγή μετάλλων είναι:

A) Θείο-αναγωγικά βακτήρια (*Desulfovibrio* spp.)

B) Μέταλλο-αναγωγικά βακτήρια (*Geobacter* spp.)



Κατακρήμνιση: Στήριζεται στην ικανότητα διαφόρων μικροοργανισμών να μετατρέπουν διαλυτοποιημένες μορφές μετάλλων σε αδιάλυτες μορφές όπως σουλφίδια (MS) ή σύμπλοκα με φωσφορικές ομάδες. Υπό αναερόβιες συνθήκες και παρουσία οργανικών υποστρωμάτων τα θείο-αναγωγικά βακτήρια μετατρέπουν διαλυτά μέταλλα ή διαλυτές μορφές μετάλλων προς αδιάλυτα σουλφίδια (MS).

Μεθυλίωση: Η μεθυλίωση διαφόρων μετάλλων μπορεί να οδηγήσει σε πιο τοξικά παράγωγα (Hg) ή σε πτητικά παράγωγα με χαμηλή τοξικότητα που ελευθερώνονται στον αέρα (Se).

Παραδείγματα μηχανισμών βιολογικής αποτοξικοποίησης για διάφορα μέταλλα

Σελήνιο (Se)

ΑΝΑΓΩΓΗ: Η μετατροπή SeO_4^{2-} , SeO_3^{2-} σε στοιχειακό Se^0 , που είναι δυσδιάλυτο έχει παρατηρηθεί σε διάφορα βακτήρια. Οι δύο πρώτες μορφές είναι ιδιαίτερα τοξικές

ενώ το στοιχειακό σελήνιο όχι. Βακτήρια χρησιμοποιούν το SeO_4^{2-} ως τερματικό δέκτη ηλεκτρονίων, αντίθετα η παραπέρα αναγωγή του SeO_3^{2-} από μικροοργανισμούς είναι μάλλον διεργασία αποτοξικοποίησης και όχι διεργασία παραγωγής ενέργειας.

ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ: Η μικροβιακή μεθυλίωση Se προς πτητικά και λιγότερα τοξικά προϊόντα όπως διμέθυλο σελήνιο (CH_3SeCH_3) έχει παρατηρηθεί σε αρκετά βακτήρια και μύκητες. Το διμέθυλοσελίνιο σχηματίζει στο αέρα οξειδωμένα παράγωγα που δεσμεύονται σε σωματίδια και μεταφέρονται σε μεγάλες αποστάσεις. Το διμέθυλοσελίνιο είναι 700 φορές λιγότερο τοξικό από το SeO_4^{2-} και μετά από εισπνοή στον ανθρώπινο οργανισμό δεν εμφανίζει τοξικότητα σε συγκεντρώσεις ως 8000 ppm.

ΒΙΟΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ: Το βακτήριο *Desulfovibrio desulfuricans* έχει την ικανότητα να ανάγει SeO_3^{2-} σε στοιχειακό Se^0 που αποθηκεύεται υπό μορφή κόκκων στο κυτταρόπλασμα.

Υδράργυρος (Hg)

ΑΝΑΓΩΓΗ: Διάφορα βακτήρια έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν Hg^{+2} προς Hg^0 το οποίο λόγω πτητικότητας ελευθερώνεται στην ατμόσφαιρα με παράλληλη μείωση της τοξικότητας του Hg στο περιβάλλον

ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ: Η μεθυλίωση του υδραργύρου προς αλκυλιωμένο υδράργυρο αποτελεί διεργασία αύξησης της τοξικότητας και της υπολειμματικότητας του. Ο αλκυλιωμένος υδράργυρος εισέρχεται εύκολα σε κλειστές τροφικές αλυσίδες και μπορεί να βιοσυσσωρευτεί στα υψηλότερα επίπεδα της τροφικής αλυσίδας και δη στον άνθρωπο/

Αρσενικό (As)

ΑΝΑΓΩΓΗ: Αναγωγή προς αδιάλυτα σουλφίδια του αρσενικού (As_2S_3) από θείο-αναγωγικά βακτήρια (*Desulfotomaculum auripigmentum*)

ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ: Μικροβιακή μεθυλίωση As προς πτητικά και λιγότερα τοξικά προϊόντα όπως τριμέθυλο-αρσενικό έχει παρατηρηθεί σε αρκετά βακτήρια και μύκητες.

Χρώμιο (Cr)

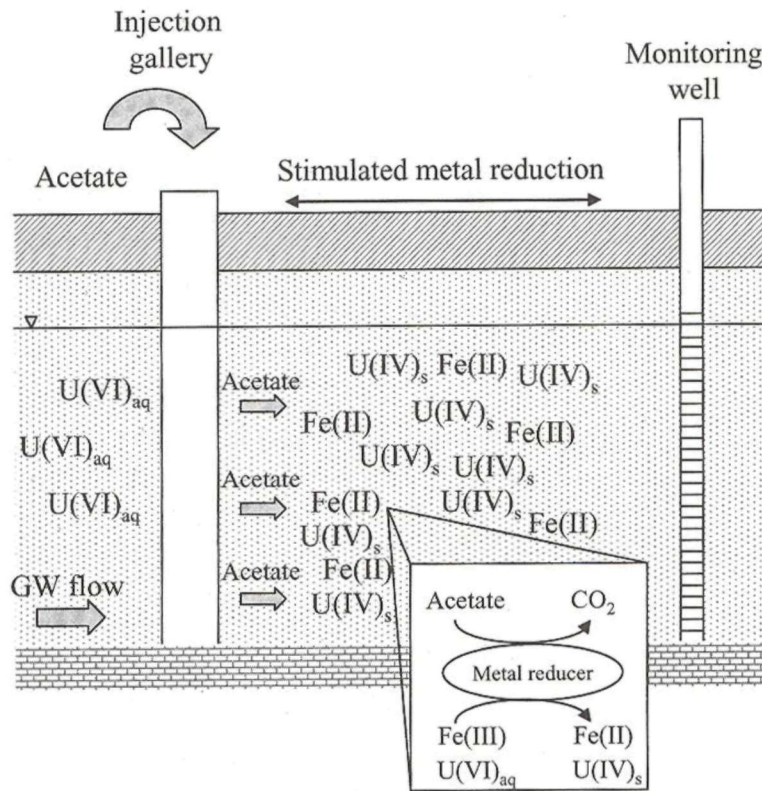
ΑΝΑΓΩΓΗ: Διάφορα βακτήρια έχουν την ικανότητα να ανάγουν το Cr^{+6} σε Cr^{+3} που παρουσιάζει χαμηλότερη τοξικότητα και είναι δυσδιάλυτο. Αερόβια και αναερόβια βακτήρια που παρουσιάζουν ανεκτικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις Cr μπορούν να απομακρύνουν >99% της αρχικής ποσότητας Cr. Χαρακτηριστικά παραδείγματα ρύπανσης από εξασθενές χρώμιο έχουν αναφερθεί κατά την ρύπανση του ποταμού Ασωπού στην Ελλάδα αλλά και στην ταινία EPIN ΜΠΡΟΚΟΒΙΤΖ όπου καταγράφονται οι επιδράσεις της ρύπανσης του υπόγειου υδροφόρου ορίζοντα και του πόσιμου νερού μιας βιομηχανικής περιοχής με εξασθενές χρώμιο.

Βιολογική απομάκρυνση Ραδιονουκλεϊδίων

Μικροοργανισμοί με αυξημένη ανεκτικότητα σε ραδιενέργεια έχουν απομονωθεί από εγκαταστάσεις παραγωγής πυρηνικής ενέργειας, ιζήματα ρυπασμένα με υψηλές συγκεντρώσεις ραδιενεργών ρύπων. Πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το βακτήριο *Deinococcus radiodurans*. Μικροοργανισμοί που απομονώθηκαν από περιοχές ρυπασμένες με ραδιενεργούς ρύπους όπως το παραπάνω βακτήριο αποτελούν τα χρησιμότερα εργαλεία για την βιολογική αποκατάσταση τέτοιων ρυπασμένων οικοσυστημάτων.

Τα δύο βασικά ραδιονουκλεοτίδια που αποτελούν ποσοτικά σημαντικούς περιβαλλοντικούς ρύπους είναι τα Ουράνιο (U) και Τεχνητό (Te) που αποτελεί προϊόν της επεξεργασίας του U. Οι μικροοργανισμοί έχουν την ικανότητα να αποτοξικοποιούν το U^{+6} που αποτελεί και την τοξική μορφή του ουρανίου προς U^{+4} το οποίο είναι λιγότερο τοξικό αλλά και καθίσταται ελάχιστα διαθέσιμο στο περιβάλλον. Η αναγωγή του εξασθενούς ουρανίου σε τετρασθενές πραγματοποιείται από θείο-αναγωγικά βακτήρια του γένους *Geobacter* sp., και *Anaeromixobacter* sp. με αντιδράσεις παρόμοιες με αυτές που περιγράφηκαν για την αναγωγή μετάλλων από

μικροοργανισμούς. Ένα από τα πιο χαρακτηριστικά παραδείγματα επιτυχούς εφαρμογής βιολογικής ενεργοποίησης είναι η βιολογική απομάκρυνση του εξασθενούς ουρανίου από τα υπόγεια νερά περιοχής του Κολοράντο των ΗΠΑ όπου υπήρχε δραστηριότητα εξόρυξης ουρανίου.



Στα υπόγεια υδροφόρα συστήματα της περιοχής διοχετεύτηκε οξικό οξύ ως δότης ηλεκτρονίων μέσω των οποίων τα μέταλλο και θείο-αναγωγικά βακτήρια της ενδογενούς μικροβιακής κοινότητας σε συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης οξυγόνου ανήγαγαν το εξασθενές ουράνιο προς τετρασθενές.

2. Οι μικροοργανισμοί ως βιολογικά εργοστάσια παραγωγής νέων βιοτεχνολογικών προϊόντων

Οι μικροοργανισμοί έχουν την ικανότητα να παράγουν μέσω του μεταβολισμού τους διάφορα προϊόντα τα οποία παρουσιάζουν σημαντικό βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον. Ως τέτοια προϊόντα έχουν αναγνωριστεί

- **Βιολογικές επιφανειοδραστικές ουσίες:** Αποτελούν ουσίες που παράγουν οι μικροοργανισμοί για να μεταβάλουν την πολικότητα της κυτταρικής τους μεμβράνης ώστε να προσκολλούνται και να αποκολλώνται από μικρο-εστίες θρέψης (πχ. Σταγόνες ελαίων). Οι συγκεκριμένες ουσίες χρησιμοποιούνται σε διάφορες βιομηχανίες ώστε να βελτιώνουν την διαλυτότητα ελαιούχων ενώσεων σε νερό ή να σχηματίζουν και να διατηρούν σταθερά γαλακτώματα.
- **Ευλανάσες:** Ένζυμα που παράγουν διάφοροι μικροοργανισμοί και χρησιμοποιούνται από τις χαρτοβιομηχανίες καθώς βελτιώνουν την λεύκανση του χαρτιού περιορίζοντας την χρήση λευκαντικών ουσιών που οδηγούν σε παραγωγή υγρών αποβλήτων με υψηλές συγκεντρώσεις χλωριωμένων αρωματικών ενώσεων.
- **Βιοπλαστικά:** Αποτελούν βιοπολυμερή που έχουν την ικανότητα να συνθέτουν διάφοροι μικροοργανισμοί στο κυτταρόπλασμα τους και παρουσιάζουν χαρακτηριστικά ανάλογα με τα συνθετικά πλαστικά.

Παράλληλα συγκεκριμένες ομάδες μικροοργανισμών έχει βρεθεί ότι παίζουν καθοριστικό ρόλο σε συγκεκριμένες βιομηχανικές διεργασίες και με κατάλληλες βελτιστοποιήσεις μπορούν να οδηγήσουν σε νέα βιοτεχνολογικά προϊόντα που θα αντικαταστήσουν συμβατικά συνθετικά με υψηλό περιβαλλοντικό αποτύπωμα. Τέτοια παραδείγματα είναι

- Η παραγωγή της βιοαιθανόλης που αποτελεί το πιο σημαντικό βιοκαύσιμο με προοπτική βαθμιαίας απεξάρτησης από το πετρέλαιο
- Η βιολογική έκπλυση χαλκού και άλλων πολύτιμων μετάλλων που οδηγεί σε ανάκτηση μεγάλων ποσοστών πολύτιμων μετάλλων όπως ο χαλκός και ο χρυσός περιορίζοντας ταυτόχρονα την παραγωγή ιδιαίτερα επιβαρυσμένων αποβλήτων που παράγονται από τις συμβατικές διεργασίες
- Η βιολογική ανάκτηση πετρελαίου περιλαμβάνει την χρήση της μεταβολικής δραστηριότητας των μικροοργανισμών διαμέσου της παραγωγής

επιφανειοδραστικών ουσιών στα κοιτάσματα πετρελαίου για την βέλτιστη ανάκτηση υπολειμμάτων πετρελαίου που δεν μπορούν να ανακτηθούν με άλλες συμβατικές μεθόδους.

Βιοαιθανόλη

Τα βιοκαύσιμα αποτελούν την ελπίδα της παγκόσμιας αγοράς καυσίμων ώστε να υπάρξει σταδιακή απεξάρτηση από το πετρέλαιο. Τα βασικά βιοκαύσιμα που υπάρχουν σήμερα στην αγορά είναι:

- Βιαέριο (biogas)
- Φυτικά έλαια (βιοντίζελ)
- Βιοαιθανόλη
- Υδρογόνο βιολογικής προέλευσης

Η βιοαιθανόλη παράγεται από την μικροβιακή ζύμωση υδατανθράκων που προέρχονται από βιομάζα που βρίσκεται άφθονη και σε χαμηλό κόστος στην φύση.

Τα βασικά χαρακτηριστικά της βιοαιθανόλης ως καύσιμο είναι

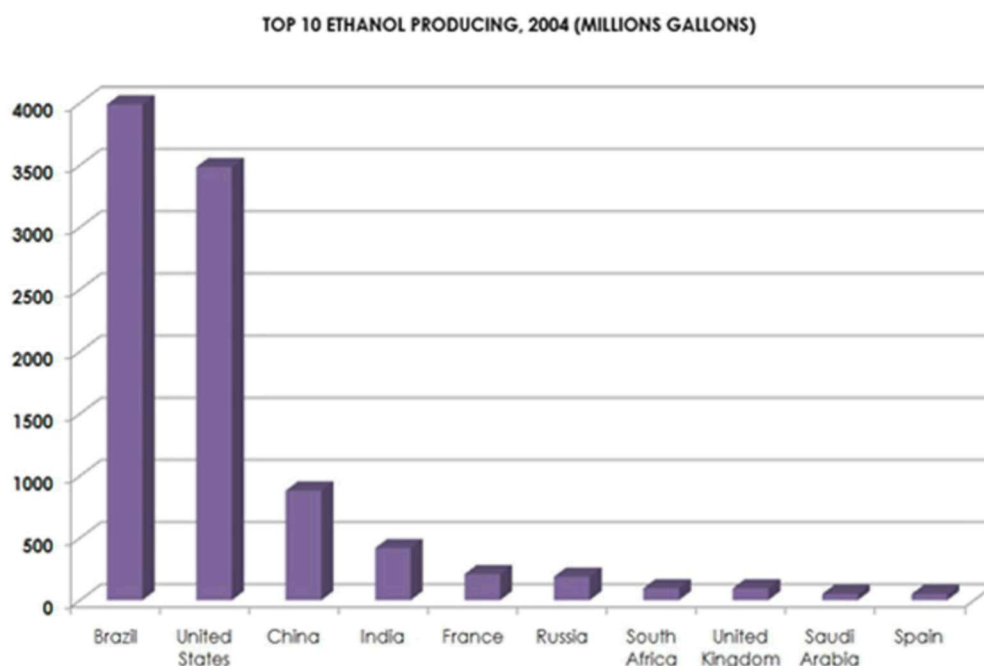
- Υψηλότερη αξιολόγηση σε οκτάνια από το πετρέλαιο που δίνει την δυνατότητα αυξημένης απόδοσης κατά 15%
- Χαμηλότερη ενεργειακή αξία από την βενζίνη (2/3)

Η βιοαιθανόλη χρησιμοποιείται στην πράξη είτε αυτούσια (καθαρότητα 95.5%) σε κατάλληλες μηχανές εσωτερικής καύσης (αυτοκίνητα σε Βραζιλία ή ΗΠΑ) είτε σε μίγματα διαφορετικής σύστασης με βενζίνη όπως φαίνεται και στο πίνακα παρακάτω.

Καύσιμο	Περιεκτικότητα σε αιθανόλη (%)
E85 (N. Αμερική)	85
Βενζίνη (Βραζιλία)	24
E10 (Gazohol) (N. Αμερική)	10
Οξυγονομένο καύσιμο (ΗΠΑ)	7.6
Βιοντίζελ (Σουηδία)	15

Τα βασικά πλεονεκτήματα της βιοαιθανόλης σε σύγκριση με τα υπόλοιπα συμβατικά καύσιμα όπως η βενζίνη είναι α) Με την καύση της παράγονται ελάχιστες ποσότητες CO₂ (φαινόμενο θερμοκηπίου) και χαμηλότερες ποσότητες CO, NO_x σε σύγκριση με την βενζίνη, β) Παράγεται από ανανεώσιμες πηγές (βιομάζα δεν θα μας λείψει ποτέ!), γ) Θα οδηγήσει σε περιορισμό στην χρήση συμβατικών καυσίμων που δημιουργούν περιβαλλοντικά προβλήματα και δ) Μπορεί να περιορίσει σε σημαντικό βαθμό την παγκόσμια ενεργειακή εξάρτηση από το πετρέλαιο (τεχνητές κρίσεις, αύξηση τιμών κ.α.)

Οι κυριότερες χώρες παραγωγής βιοαιθανόλης παγκοσμίως είναι η Βραζιλία και οι ΗΠΑ ενώ η τάση παραγωγής βιοαιθανόλης στην ΕΕ είναι ανοδική τα τελευταία έτη.



Για την παραγωγή της βιοαιθανόλης έχουν χρησιμοποιηθεί διαφορετικές πρώτες ύλες με πιο παραδοσιακές το ζαχαροκάλαμο (Βραζιλία) και το καλαμπόκι (ΗΠΑ). Πλέον έχει γίνει κατανοητό ότι η ανταγωνιστικότητα της βιοαιθανόλης ως προς την βενζίνη και το πετρέλαιο εξαρτάται από την δημιουργία αλυσίδας παραγωγής που θα χρησιμοποιεί ως πρώτη ύλη κутταρινούχα βιομάζα που θα είναι διαθέσιμη σε χαμηλό ή ακόμη και σε μηδενικό κόστος.

Παραγωγή Βιοαιθανόλης από Ζαχαροκάλαμο: Η πετρελαϊκή κρίση τα 1970 και η τεράστια παραγωγή ζαχαροκάλαμου που δεν μπορούσε πλέον να απορροφηθεί σε υψηλές τιμές οδήγησε στην χρήση ζαχαροκάλαμου ως υποστρώματος για παραγωγή βιοαιθανόλης (ProAlcool). Το συγκεκριμένο πρόγραμμα οδήγησε σε δημιουργία νέων θέσεων εργασίας καθώς και σημαντικά κέρδη από την μείωση της εισαγωγής πετρελαίου και την χρήση βιοαιθανόλης. Χαρακτηριστικό είναι ότι την περίοδο 1983-1987 >90% των αυτοκινήτων που πωλήθηκαν στην Βραζιλία χρησιμοποιούσαν σαν καύσιμο αποκλειστικά ένυδρη αιθανόλη. Η βιοαιθανόλη παράγεται στην Βραζιλία από χυμό από ζαχαροκάλαμο που είναι ένα υλικό υψηλής περιεκτικότητας σε σάκχαρα (σουκρόζη, γλυκόζη, φρουκτόζη). Ο χυμός ζαχαροκάλαμου θερμαίνεται στους 110°C ώστε να αποστειρωθεί το υλικό, ακολουθεί συμπύκνωση του υλικού και ζύμωση των σακχάρων από την ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*.

Παραγωγή Βιοαιθανόλης από Καλαμπόκι: Η βιοαιθανόλη παράγεται στην ΗΠΑ από σπόρους καλαμποκιού ή και άλλων δημητριακών χρησιμοποιώντας γενικά υλικά πλούσια σε άμυλο που αποτελείται από μονάδες γλυκόζης ενωμένες α-1,4 (αμυλόζη) ή α-1,6 (αμυλοπεκτίνη) γλυκοσιδικούς δεσμούς. Δύο είναι οι βασικές διαδικασίες παραγωγή αιθανόλης από σπόρους καλαμποκιού:

- Υγρής Άλεσης (Wet-milling process)
- Ξηρής Άλεσης (Dry-milling process)

Η διαδικασία της υγρής άλεσης σε συντομία περιλαμβάνει τα παρακάτω βήματα:

- Οι σπόροι εμβαπτίζονται σε νερό με SO₂ για > 40 h
- Άλεση και διαχωρισμός του αμύλου από τα υπόλοιπα προϊόντα
- Θέρμανση σε υψηλές και χαμηλές θερμοκρασίες για κρυστάλλωση του αμύλου
- Προσθήκη α-αμυλάσης και παραγωγή ολιγοσακχαριδίων από δεξτρίνες
- Προσθήκη γλυκοαμυλάσης και ελευθέρωση γλυκόζης
- Μικροβιακή ζύμωση με *S. cerevisiae* και παραγωγή αιθανόλης μέσω των αντιδράσεων της γλυκόλυσης
- Η βιομάζα της ζύμης διαχωρίζεται από την αιθανόλη με φυγοκέντρωση

- Προσθήκη αραιού διαλύματος θειικού οξέος για περιορισμό της επιμόλυνσης από άλλους μικροοργανισμούς
- Ανακύκλωση της μικροβιακής βιομάζας ως και τρεις φορές την ημέρα για 200 ημέρες

Η διαδικασία της ξηρής άλεσης Οι διαφορές με την διαδικασία υγρής άλεσης είναι ότι α) Οι σπόροι καλαμποκιού αλέθονται σε σωματίδια διαμερισμού 1 mm και β) Τα διάφορα συστατικά των σπόρων δεν διασπώνται πριν την προσθήκη νερού και ενζύμου.

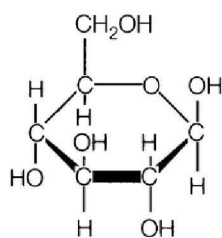
Η αιθανόλη που παράγεται από τις παραπάνω διαδικασίες περιέχει περίπου 4.5% νερό και μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε ως ένυδρη βιοαιθανόλη αυτούσια ως καύσιμο για αυτοκίνητα που χρησιμοποιούν μόνο αιθανόλη, είτε αφού απομακρυνθεί το νερό με μοριακά φίλτρα (άνυδρη αιθανόλη) σε μίγματα με βενζίνη ως καύσιμο κίνησης (E95, Gazohol).

Η μικροβιακή ζύμωση για την παραγωγή βιοαιθανόλης από ζαχαροκάλαμο και καλαμπόκι πραγματοποιείται με τη χρήση κυρίως δύο μικροοργανισμών:

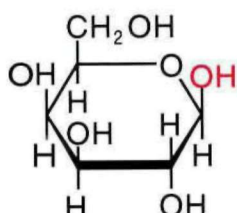
- 1) Τη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* που παραδοσιακά χρησιμοποιείται από την βιομηχανία παραγωγής βιοαιθανόλης για την μετατροπή των σακχάρων σε αιθανόλη. Η συγκεκριμένη ζύμη παρουσιάζει συγκεκριμένα προβλήματα όπως α) Μειωμένη παραγωγή αιθανόλης, β) Ευαισθησία σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης και γ) Χρήση περιορισμένου φάσματος σακχάρων.
- 2) Το βακτήριο *Zymomonas mobilis* παρουσιάζει πλεονεκτήματα σε σχέση με την ζύμη αλλά ακόμη η χρήση του είναι περιορισμένη καθώς τα βακτήρια γενικά ως μικροοργανισμοί παρουσιάζουν χαμηλότερη ανθεκτικότητα σε βιομηχανικές διεργασίες σε σύγκριση με τις ζύμες. Το βακτήριο *Z. mobilis* παρουσιάζει α) αυξημένη παραγωγή αιθανόλης, β) υψηλότερη ανθεκτικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης και γ) ταχύτερη παραγωγή αιθανόλης σε σύγκριση με τη ζύμη *S. cerevisiae*

Η παραγωγή βιοαιθανόλης από ζαχαροκάλαμο και καλαμπόκι δεν μπορεί να καλύψει τις αυξημένες ανάγκες που υπάρχουν στην παγκόσμια αγορά. Έτσι για να καταστεί η παραγωγή βιοαιθανόλης ανταγωνιστική σε σχέση με τα συμβατικά καύσιμα απαιτείται η παραγωγή της να βασίζεται στην χρήση πρώτης ύλης που θα

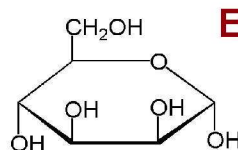
χαρακτηρίζεται από χαμηλό κόστος και υψηλή διαθεσιμότητα. Τέτοιο υλικό είναι η κυτταρινούχα βιομάζα που μπορεί να προέρχεται από φυτική βιομάζα καλλιεργούμενων φυτών μετά την συγκομιδή, υπολείμματα φυτών δασικής προέλευσης, υπολείμματα ενεργειακών φυτών κτλ. Συστατικά η κυτταρινούχα βιομάζα αποτελείται κατά 40-50% από κυτταρίνη (κύριο συστατικό γλυκόζη), 24-25% ημικυτταρίνη (κύρια συστατικά εξόζες όπως γλυκόζη, γαλακτόζη μανόζη (6C) και πεντόζες (5C) όπως ξυλόζη, αραβινόζη), και λιγνίνη 15-20%.



γλυκόζη

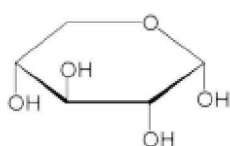


γαλακτόζη

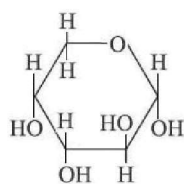


μανόζη

Εξόζες



Ξυλόζη



αραβινόζη

Πεντόζες

Για την παραγωγή βιοαιθανόλης από κυτταρινούχα βιομάζα απαιτείται η διάσπαση της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης στα αντίστοιχα σάκχαρα τα οποία στην συνέχεια θα μετατραπούν σε βιοαιθανόλη από αιθανολογόνους μικροοργανισμούς. Η διαφορά στην περίπτωση βιοαιθανόλης από κυτταρινούχα βιομάζα είναι ότι για την σακχαροποίηση της απαιτείται η διάσπαση β - 1,4 γλυκοσιδικών δεσμών με τους οποίους συνδέονται τα μόρια γλυκόζης στην περίπτωση της κυτταρίνης σε αντίθεση με τους α -1,4 ή α - 1,6 γλυκοσιδικούς δεσμούς μεταξύ μορίων γλυκόζης που απαντώνται στο άμυλο (παραγωγή βιοαιθανόλης από καλαμπόκι) που διασπώνται σχετικά εύκολα σε σχέση με τους β - 1,4 γλυκοσιδικούς δεσμούς.

Γενικότερα η παραγωγή βιοαιθανόλης από βιομάζα απαιτεί τα παρακάτω βήματα:

- Διάσπαση του συμπλέγματος κυτταρίνης – ημικυτταρίνης – λιγνίνης

- Υδρόλυση των βιοπολυμερών κυτταρίνης και ημικυτταρίνης στα συστατικά τους (σάκχαρα με 6C και 5C)
- Μικροβιακή μετατροπή όλων των σακχάρων (εξόζες και πεντόζες) σε αιθανόλη

Τα βασικότερα στάδια βιομηχανικής παραγωγής βιοαιθανόλης από κυτταρινούχα βιομάζα είναι τα παρακάτω:

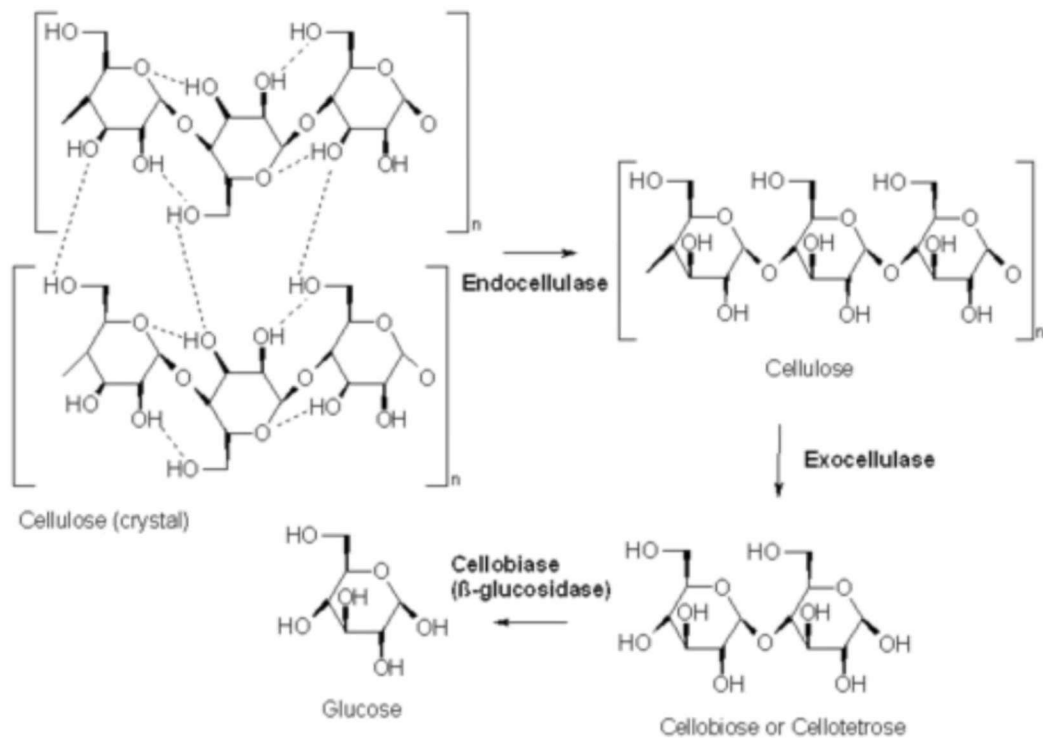
- Προκαταρτική μεταχείριση
- Σακχαροποίηση
- Μικροβιακή Ζύμωση
- Διαχωρισμός αιθανόλης και παραπροϊόντων

Στην **προκαταρτική μεταχείριση** κύριος στόχος είναι η διάσπαση της κρυσταλλικής δομής του συμπλέγματος ημικυτταρίνης - κυτταρίνης – λιγνίνης. Υπάρχουν τρεις μέθοδοι που ακολουθούνται στην προκαταρτική μεταχείριση α) Εφαρμογή αραιού διαλύματος οξέος, β) Εφαρμογή πυκνού διαλύματος οξέος και γ) χρήση ενζύμων. Μεταξύ 1ου (Προκατεργασία) και 2ου σταδίου (Ζακχαροποίηση) συνήθως παρεμβάλλεται ένα στάδιο καθαρισμού και απομάκρυνσης παραπροϊόντων της υδρόλυσης της ημικυτταρίνης όπως ασθενή οξέα, φουρανικά και φαινολικά παράγωγα που συνήθως έχουν ανασταλτική δράση στους αιθανολογόνους μικροοργανισμούς στο 2ο στάδιο

Στην **σακχαροποίηση** κύριος στόχος είναι η πλήρης μετατροπή κυτταρίνης και ημικυτταρίνης στα δομικά τους σάκχαρα. Αυτό το βήμα πραγματοποιείται με την χρήση ενζύμων που υδρολύουν την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη στα συστατικά τους μονομερή δηλαδή γλυκόζη, ξυλόζη, αραβινόζη. Τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται είναι

- Ενδογλυκανάσες: διασπούν τυχαία την κυτταρίνη παράγοντας ολιγοσακχαρίδια μικρότερου μοριακού βάρους
- Εξωγλυκανάσες: δεσμεύονται στα μη-αναγωγικά άκρα των ολιγοσακχαριδίων που προέκυψαν και τα διασπούν προς διμερή κυτταρίνης (cellobiose)
- β-γλυκοσιδάσες: Υδρολύουν cellobiose και άλλα ολιγοσακχαρίδια προς γλυκόζη

- Ημικυτταρινάσες: Διασπούν β-1,4 ξυλάνια (ξυλανάσες) και διάφορες πλευρικές αλυσίδες



Σε βιομηχανικά κλίμακα σήμερα χρησιμοποιούνται μίγματα ενδογλυκανασών, εξωγλυκανασών και β-γλυκοσιδασών που έχουν απομονωθεί από διάφορους μικροοργανισμούς όπως ο μύκητας *Trichoderma reesei*, θερμοφιλα βακτήρια όπως το *Acidothermus cellulolyticus* (ενδογλυκανάση) και μύκητες όπως ο *Aspergillus niger* (β-γλυκοσιδάση). Τα τελευταία έτη με την βοήθεια της βιοτεχνολογίας έχει γίνει πρόοδος στην βελτίωση της δραστηριότητας των κυτταρινασών ώστε να μειωθεί το κόστος χρήσης τους.

Το τρίτο στάδιο περιλαμβάνει την μικροβιακή ζύμωση των σακχάρων που έχουν προκύψει με την βοήθεια κατάλληλων αιθανολογών μικροοργανισμών με βασικότερους από αυτούς να είναι οι α) *Zymomonas mobilis*, β) *E. Coli*, γ) *Klebsiella oxytoca* και δ) *Erwinia chrysanthemi*. Η ζύμη *S. cerevisiae* δεν χρησιμοποιείται λόγω της αδυναμίας της να χρησιμοποιεί και πεντόζες για την παραγωγή αιθανόλης.

Συνολικά ένας αιθανολογόνος μικροοργανισμός που χρησιμοποιείται για την παραγωγή βιοαιθανόλης από κυτταρινούχα βιομάζα θα πρέπει να συγκεντρώνει τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

1. Να χρησιμοποιεί όλο το φάσμα των σακχάρων (πεντόζες και εξόζες) που περιέχονται στην βιομάζα
2. Υψηλή παραγωγή αιθανόλης (>90% θεωρητικής)
3. Ανθεκτικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης (> 40 g/L)
4. Ανθεκτικότητα σε αναστολείς (οξικό οξύ) που παράγονται κατά την υδρόλυση κυτταρίνης και ημικυτταρίνης
5. Βέλτιστη ανάπτυξη σε συνθήκες όξινου pH και υψηλής θερμοκρασίας

Τα τελευταία έτη γίνονται σημαντικές προσπάθειες για την γενετική τροποποίηση γνωστών αιθανολογών μικροοργανισμών ώστε να βελτιστοποιήσουμε την αποτελεσματικότητα της διεργασίας και να περιορίσουμε το κόστος παραγωγής. Προς αυτή την κατεύθυνση έχουν ακολουθηθεί δύο στρατηγικές

A) Ενσωμάτωση στο γονιδίωμα μικροοργανισμών που έχουν την ικανότητα να παράγουν αιθανόλη από εξόζες, νέων μονοπατιών ώστε να χρησιμοποιούν και πεντόζες όπως ξυλόζη και αραβινόζη για την παραγωγή βιοαιθανόλης (*Zymomonas mobilis*, *Saccharomyces cerevisiae*)

B) Βελτίωση της παραγωγικότητας σε αιθανόλη μικροοργανισμών που έχουν την ικανότητα να χρησιμοποιούν εξόζες και πεντόζες (*E. coli*, *K. oxytoca*)

Έτσι σήμερα έχουν δημιουργηθεί και αξιολογηθεί γενετικά τροποποιημένα στελέχη των γνωστών αιθανολογών μικροοργανισμών *S. cerevisiae* και *Z. mobilis* που έχουν την ικανότητα να χρησιμοποιούν και πεντόζες όπως ξυλόζη και αραβινόζη για την παραγωγή βιοαιθανόλης, ικανότητα που δεν παρουσιάζουν τα άγριου τύπου στελέχη των συγκεκριμένων μικροοργανισμών.

Ένα μικροοργανισμός που παρουσιάζει ιδιαίτερη προοπτική ως αιθανολογόνος σε συστήματα παραγωγής με πρώτη ύλη κυτταρινούχα βιομάζα είναι το βακτήριο *Klebsiella oxytoca*. Το συγκεκριμένο βακτήριο παρουσιάζει βέλτιστη ανάπτυξη σε pH <5 και θερμοκρασίας 35°C ενώ παράλληλα μπορεί να χρησιμοποιεί ένα ευρύ φάσμα σακχάρων όπως εξόζες, πεντόζες, αλλά και δισακχαρίδια και τρισακχαρίδια γλυκόζης (κελοβιόζη, κελοτριόζη). Το συγκεκριμένο βακτήριο αποτελεί ιδανική λύση

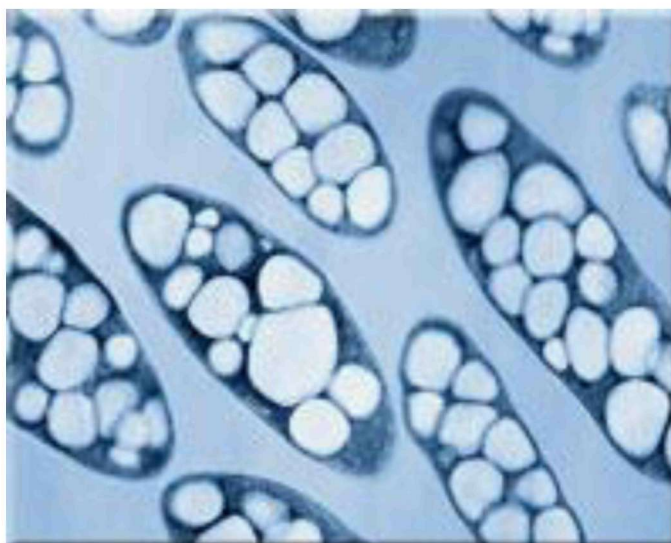
για συστήματα SSF (ταυτόχρονη σακχαροποίηση & ζύμωση) καθώς η χρήση τους θα οδηγήσει σε μείωση της χρήση εξωγλυκανασών (υδρολύουν cellobiose, cellotriose).

Συνολικά για να καταστεί ανταγωνιστική και βιώσιμη η παραγωγή βιοαιθανόλης απαιτούνται συγκεκριμένες βελτιώσεις όπως

- Παραγωγή αποδοτικότερων ενζύμων
- Δημιουργία γενετικά βελτιωμένων μικροοργανισμών
- Βελτίωση τεχνολογιών

Βιοπλαστικά

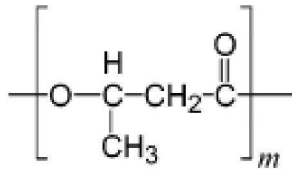
Το 30% των στερεών αστικών αποβλήτων αποτελούνται από συμβατικά πλαστικά που δεν βιοαποδομούνται με συνέπεια την αυξημένη ζήτηση βιοαποδομούμενων πλαστικών. Συγκεκριμένα βακτηριακά στελέχη (πχ. *Pseudomonas oleovorans* στην εικόνα κάτω) έχουν την ικανότητα να συσσωρεύουν σε ενδοκυτταρικούς κόκκους πολυμερή που έχουν ανάλογες ιδιότητες και χαρακτηριστικά με τα συνθετικά πλαστικά



Ανάλογα με το είδος των μονομερών που αποτελούν τις δομικές μονάδες των πολυμερών βιοπλαστικών αυτά διαχωρίζονται

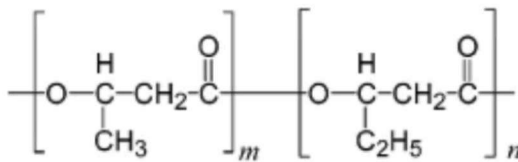
- Πολυμερή που αποτελούνται από μονομερή C4 ή C5 υδροξυ-αλκανοϊκά οξέα
- Πολυμερή που αποτελούνται από μονομερή C6 – C12 υδροξυ-αλκανοϊκά οξέα

Το πρώτο βιοπολυμερές απομονώθηκε από καλλιέργειες του βακτηρίου *Bacillus megaterium* και αποτελούταν από μονάδες 3-Υδροξυβουτυρικού Οξέος (HB). Το πολυμερές PHB παρουσίαζε ποιοτικά προβλήματα κατά την πλαστικοποίηση όπως κρυσταλλική στερεοποίηση, χαμηλή ανθεκτικότητα στην θέρμανση, εύθραυστο κατά την στερεοποίηση και για αυτούς του λόγους εγκαταλείφθηκε η βιομηχανική παραγωγή του



HB

Το περισσότερο γνωστό και διαδεδομένο είναι το ετεροπολυμερές από μονάδες [R]-3-Υδροξυβουτυρικό Οξύ (HB) και [R]-3-Υδροξυβαλερικό Οξύ (HV). Το συγκεκριμένο πολυμερές χρησιμοποιείται σε διάφορες βιομηχανικές εφαρμογές με το εμπορικό όνομα Biopol® και απομονώθηκε για πρώτη φορά από το βακτήριο *Wautersia eutropha* σε καλλιέργειες με πηγή C γλυκόζη και προπιονικό οξύ

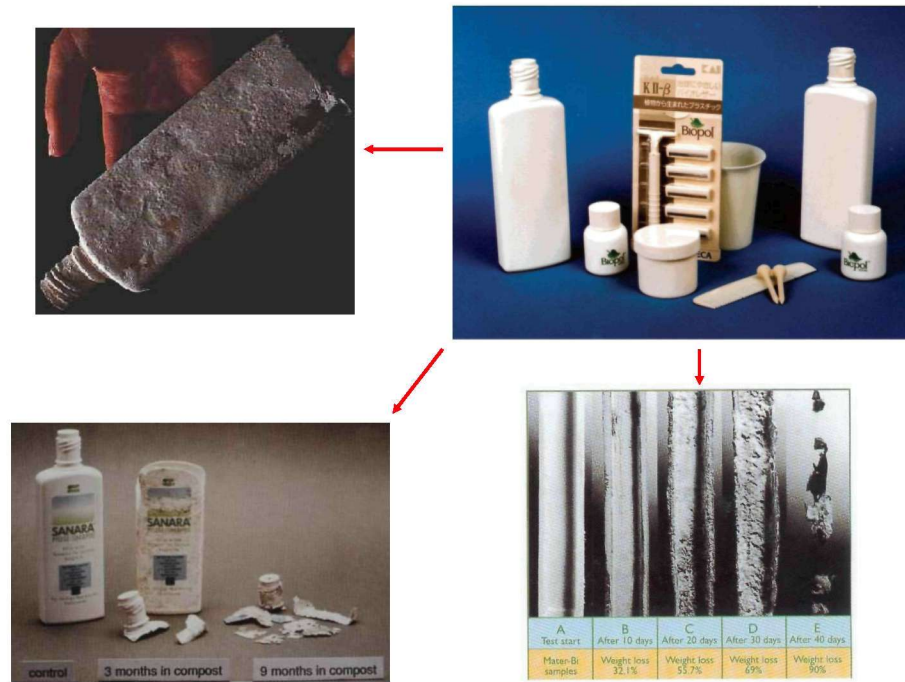


HB

HV

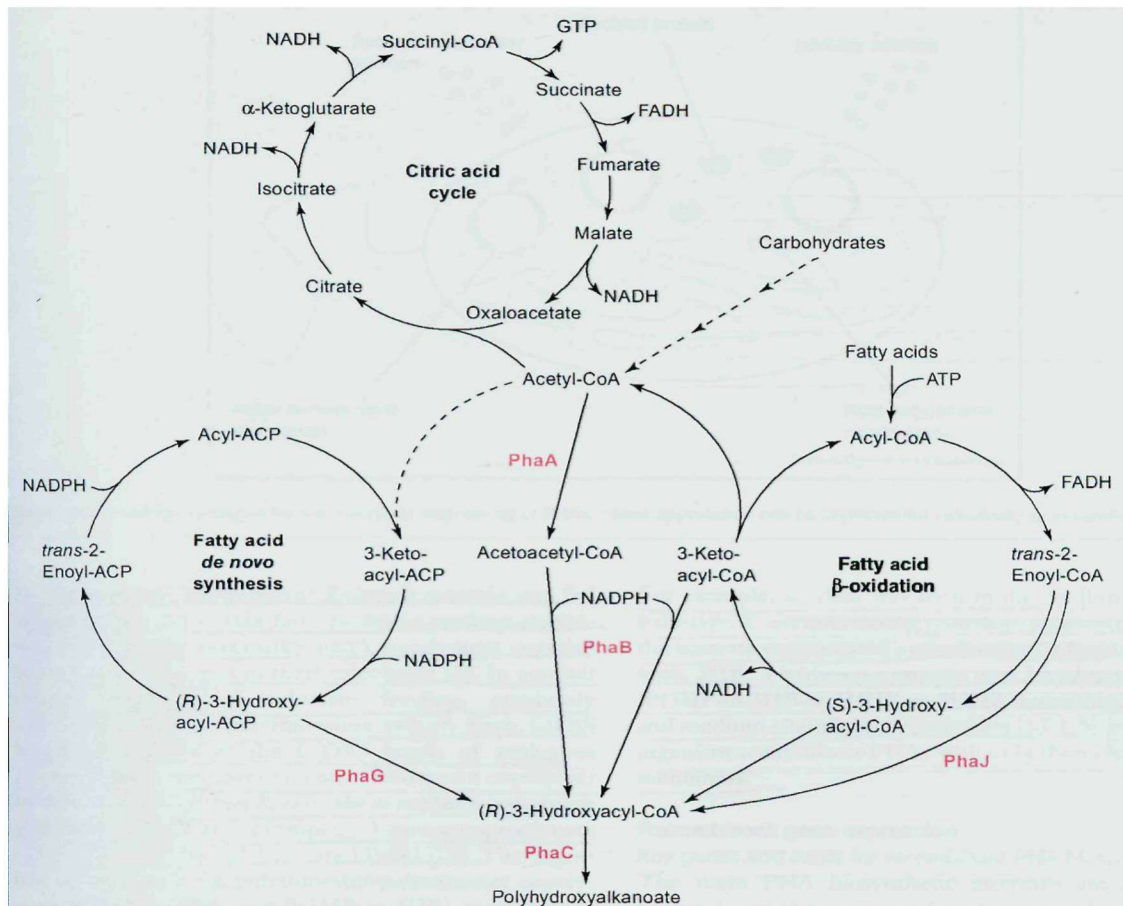
Πλεονεκτήματα των βιοπλαστικών σε σύγκριση με τα συνθετικά πλαστικά

- Είναι βιο-διασπώμενα (φωτογραφία παρακάτω) καθώς έχουν απομονωθεί μικροοργανισμοί που τα διασπούν ενώ και τα ίδια τα βακτήρια που τα συνθέτουν έχουν ένζυμα για να τα αποσυνθέτουν πλήρως
- Παράγονται από ανανεώσιμες πηγές



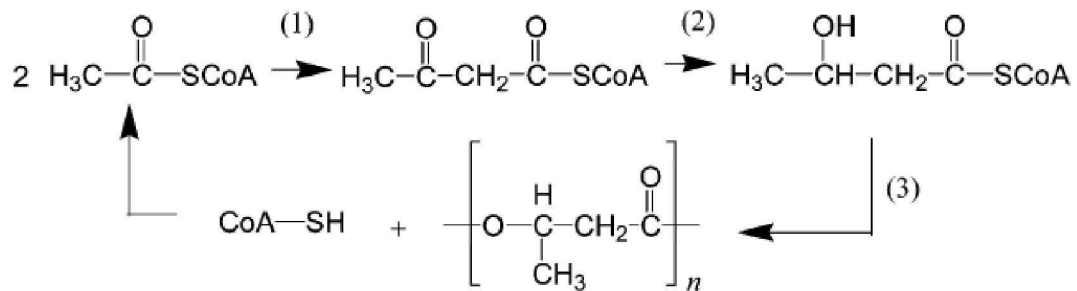
Το ερώτημα όμως είναι γιατί τα συγκεκριμένα βακτήρια συσσωρεύουν τα βιοπολυμερή/βιοπλαστικά στο κυτταρόπλασμα τους. Ο φυσιολογικός ρόλος των βιοπλαστικών είναι πιθανότατα η αποθήκευση C και ενέργειας σε συνθήκες έλλειψης κάποιων βασικών θρεπτικών στοιχείων.

Πως παράγονται τα βιοπλαστικά από τα βακτήρια; Διάφορα βακτήρια έχουν την ικανότητα, σε συνθήκες έλλειψης N, S, P να αναστέλλουν την χρήση των ακετυλο μονάδων στον κύκλο του Krebs (λόγω έλλειψης θρεπτικών) αλλά να τις χρησιμοποιούν για τον σχηματισμό πολυμερών με δομική μονάδα υδροξυ-αλκανοϊκά οξέα (PHAs). Επαναφορά των βακτηρίων σε συνθήκες μη-έλλειψης θρεπτικών οδηγεί σε διάσπαση των πολυμερών στα αντίστοιχα μονομερή για εξοικονόμηση ενέργειας. Ουσιαστικά τα συγκεκριμένα βακτήρια καθοδηγούν τον κυρίως μεταβολισμό τους όπως τον κύκλο του Krebs, την β-οξείδωση λιπαρών οξέων και την βιοσύνθεση λιπαρών οξέων προς την παραγωγή βιοπολυμερών στην κυτταρική τους μάζα. Όπως φαίνεται και στο παρακάτω διάγραμμα όλα τα παραπάνω μονοπάτια μεταβολισμού οδηγούν στην παραγωγή του μονομερούς (R-3-υδροξυ-άκυλCoA) που αποτελεί δομική ύλη για την παραγωγή των βιο-πλαστικών (PHAs)



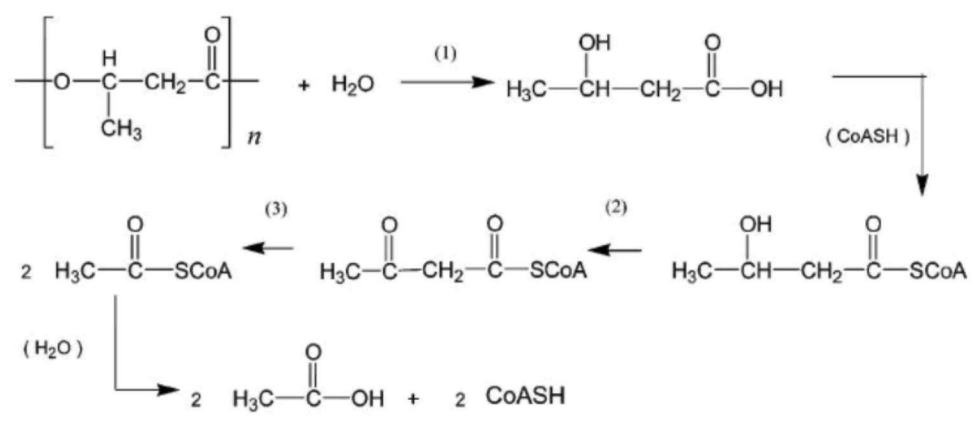
Τα βιοπλαστικά συντίθενται από τους μικροοργανισμούς σε τρία βήματα καθένα από τα οποία ελέγχονται από ένα ένζυμο:

- 1) Κετοθειολάση: καταλύει τον διμερισμό του ακετυλοCoA σε ακετοακετυλοCoA
- 2) Αναγωγή: καταλύει την προσθήκη υδρογόνου στο προϊόν της προηγούμενης αντίδρασης
- 3) Πολυμεράση: πολυμερισμός των μονομερών προϊόντων από την προηγούμενη αντίδραση



Τα ίδια βακτήρια που συνθέτουν βιοπλαστικά έχουν και την ικανότητα να τα αποσυνθέτουν οδηγώντας έτσι στην πλήρη αποσύνθεση στο περιβάλλον συσκευασιών που έχουν κατασκευαστεί από βιοπλαστικά. Η αποσύνθεση των βιοπλαστικών γίνεται σε τρία βήματα που καθένα ελέγχεται από ένα ένζυμο:

- 1) Υδρολάση ή Αποπολυμεράση
- 2) Απουδρογονάση
- 3) Υδρολάση



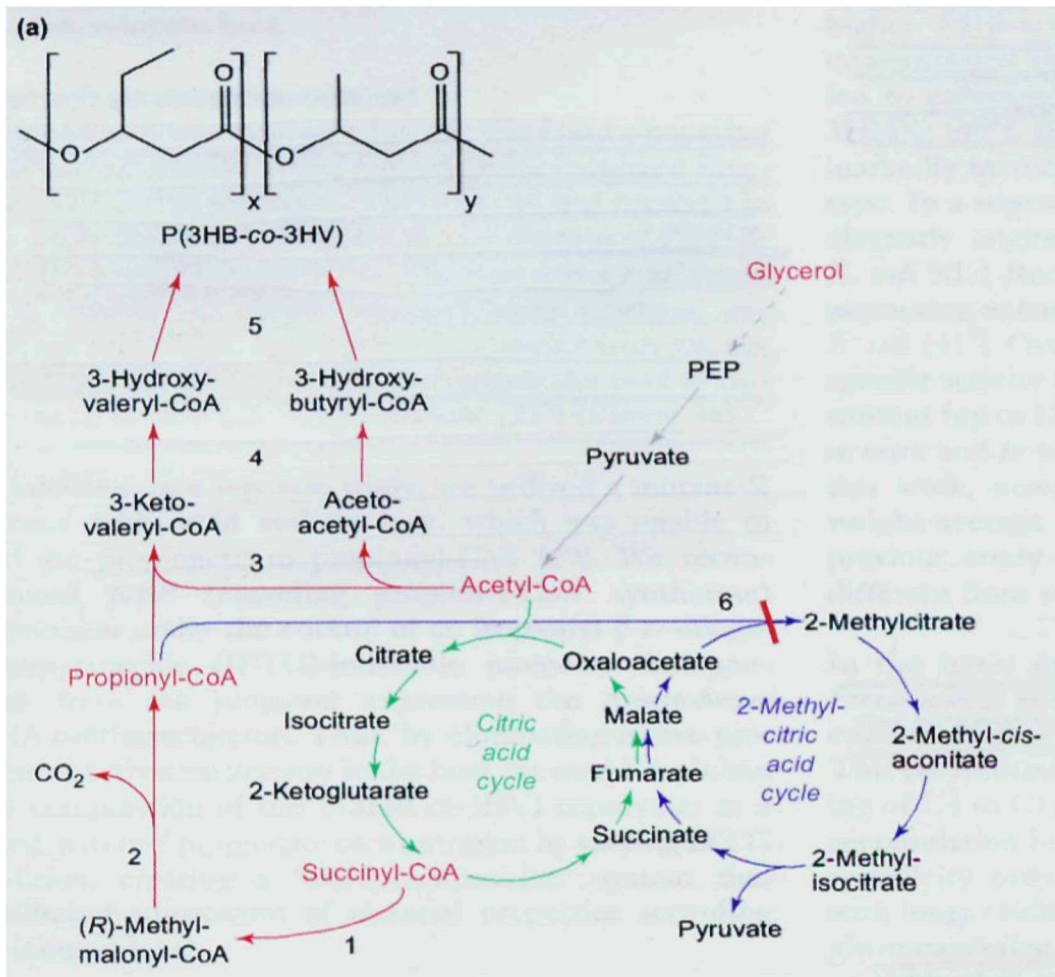
Βακτήρια που συνθέτουν βιοπλαστικά: Περίπου 300 βακτήρια που παράγουν PHAs έχουν απομονωθεί αλλά ελάχιστα έχουν χρησιμοποιηθεί στην πράξη (*W. eutrophus*, *Pseudomonas oleovorans*). Η σύνθεση και δομή των βιο-πλαστικών εξαρτάται κυρίως από τις PHAs πολυμεράσες και το είδος του υδροξυακυλ-CoA που παρέχει την δομική ύλη για την κατασκευή των πολυμερών.

Η παραγωγή βιοπλαστικών ελέγχεται από σειρά χρωμοσωμικών γονιδίων (*pha*) που έχουν διαφορετικό ρόλο:

- *phaC1 & C2*: PHA πολυμεράσες
- *phaZ*: PHA αποπολυμεράσες
- *phaF & phaI*: βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στην μεμβράνη που περικλείει τους κόκκους και συμμετέχουν πιθανότατα στην σχηματική διαμόρφωση των κόκκων

Διάφορες προσεγγίσεις έχουν χρησιμοποιηθεί για την βελτιστοποίηση της παραγωγικότητας των βακτηρίων που παράγουν τα βιοπολυμερή αλλά και την βελτίωση της ποιότητας των βιοπλαστικών που παράγονται. Τέτοιες προσεγγίσεις αποτελούν:

- Επιλογή κατάλληλης πηγής άνθρακα (σε επίπεδο εργαστηρίου) μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή του επιθυμητού PHAs: Με κατάλληλη επιλογή υποστρώματος C (σε εργαστηριακό επίπεδο) μπορούμε να κατευθύνουμε την παραγωγή προς συγκεκριμένης δομής και σύστασης βιοπλαστικά.
Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η καλλιέργεια του βακτηρίου *W. eutropha* με θείο-λιπαρά οξέα ως πηγή C που οδήγησε στην παραγωγή πολύ-3-υδροξυ-S-πρόπυλο-ω-θειοαλκανοϊκά οξέων που παρουσιάζουν επιθυμητά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά
- Προσθήκη ουσιών (ακρυλικό οξύ) που αναστέλλουν την δράση ανταγωνιστικών μεταβολικών μονοπατιών οδηγώντας το μεταβολισμό των βακτηρίων αποκλειστικά προς την παραγωγή PHAs: Σίγηση του γονιδίου που ελέγχει την παραγωγή του ενζύμου συνθέταση του μεθυλοκιτρικού οξέος οδήγησε τον μεταβολισμό του βακτηρίου αποκλειστικά προς την παραγωγή βιοπλαστικών (πολύ-υδροξυβαλερικού οξέος) καθώς όλη η ποσότητα του πρόδρομου μορίου προπιονυλο-CoA χρησιμοποιείται πλέον (ελλείπει εναλλακτικού ανταγωνιστικού μονοπατίου) προς την παραγωγή PHBs (διάγραμμα παρακάτω)



Βιομηχανικές χρήσεις βιοπλαστικών

- Κατασκευή πλαστικών μπουκαλιών σαμπουάν
- Καρδιοχειρουργική για την κατασκευή βαλβίδων καρδιάς καθώς και για αγγειοπλαστική βελτίωση της κυκλοφορίας σε ασθενείς που πάσχουν από κυκλοφορικά προβλήματα
- Παραγωγή χρωμάτων/βαφών (ATO, Ολλανδία)

Σήμερα στην αγορά υπάρχουν το BioPol™ βιολογικό πλαστικό που διατίθεται από την Metabolix και το Nodax™ βιολογικό πλαστικό διατίθεται από την Proctor & Gamble.

Προϋποθέσεις για την βιομηχανική παραγωγή βιοπλαστικών από μικροοργανισμούς

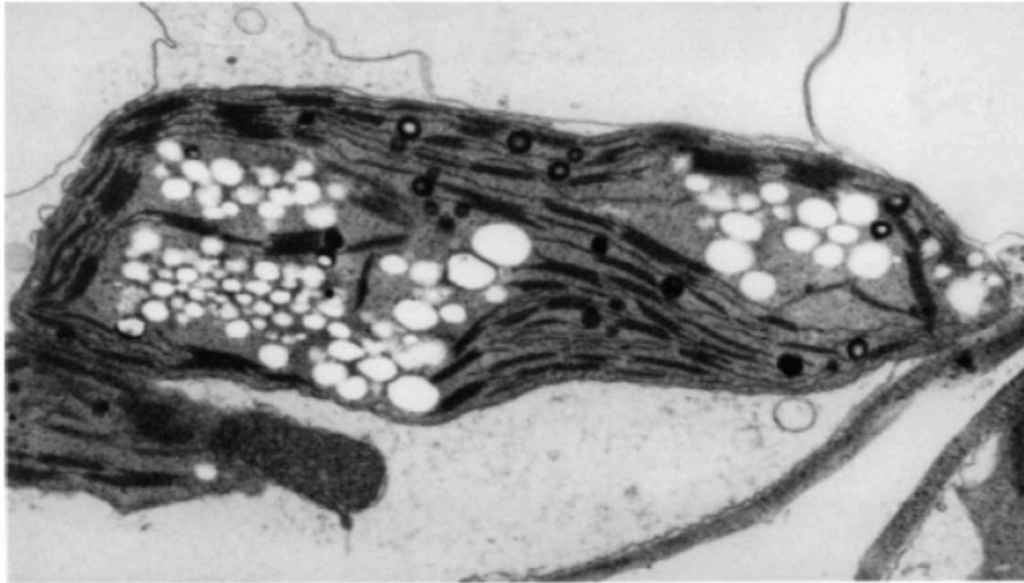
- Χρήση φθινών υποστρωμάτων C για την καλλιέργεια των βακτηρίων
- Υψηλή παραγωγικότητα και αποτελεσματικότητα στην συσσώρευση PHAs (g PHAs που παράγονται ανά g υποστρώματος C)

Σήμερα η παραγωγή βιοπλαστικών αντιμετωπίζει σοβαρά προβλήματα ανταγωνιστικότητας λόγω της ιδιαίτερα υψηλής τιμής κόστους ανά kg προϊόντος σε σχέση με τα συμβατικά συνθετικά πλαστικά. Έτσι το κόστος αγοράς του Biopol® σήμερα είναι 16\$/kg με κατώτερη τιμή στο μέλλον τα 5\$/kg και θα πρέπει να μειωθεί (2 \$/kg) ώστε να καταστεί ανταγωνιστική η παραγωγή τους (τιμή συμβατικών πλαστικών 1\$/kg). Ένα δεύτερο αλλά ιδιαίτερα σημαντικό πρόβλημα είναι η περιορισμένη εμπειρία σε μηχανικές προσεγγίσεις για την παραγωγή βιοπλαστικών σε βιομηχανική κλίμακα.

Ιδανικά βακτήρια που θα καταστήσουν ιδιαίτερα ανταγωνιστική την παραγωγή βιοπλαστικών θα πρέπει να έχουν τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

- Γενετικά τροποποιημένα βακτήρια που θα συσσωρεύουν 70-90% του ξηρού βάρους τους ως βιοπολυμερή
- Θα αναπτύσσονται σε βιοαντιδραστήρες σε υψηλούς πληθυσμούς (150-200 g/L)
- Θα χρησιμοποιούν ως πηγή C φθινές πρώτες ύλες (κυτταρίνη, ημικυτταρίνη, φυτικά έλαια, παραπροϊόντα από επεξεργασία τροφίμων)

Τα τελευταία έτη έχουν δημιουργηθεί γενετικά τροποποιημένα φυτά *Arabidopsis* στα οποία έχουν ενσωματωθεί *pha* πολυμεράσες που δίνουν την ικανότητα στα συγκεκριμένα φυτά να συσσωρεύουν στους χλωροπλάστες τους βιοπλαστικά. (φωτογραφία παρακάτω). Η συγκεκριμένη προοπτική θα μπορούσε να μειώσει δραματικά το κόστος παραγωγής για τα βιοπλαστικά στο 1\$ / kg και να καταστήσει πλήρως ανταγωνιστική την παραγωγή τους σε σχέση με τα συμβατικά πλαστικά.



Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει προσπάθειες για την γενετική βελτίωση βακτηρίων ώστε να αυξήσουμε την αποτελεσματικότητά τους στην παραγωγή βιοπλαστικών. Μεταξύ των διαφόρων βελτιστοποιήσεων που έχουν γίνει αναφέρονται

- Εισαγωγή γονιδίων *rha* σε *E. coli* που αποτελεί ιδανικό δέκτη καθώς είναι ένα βακτήριο – μοντέλο για το οποίο γνωρίζουμε πάρα πολύ καλά την γενετική του
- Ενίσχυση αριθμού των αντιτύπων γονιδίων *rha* σε βακτήρια που παράγουν PHAs
- Εισαγωγή ετερόλογου *rhaC* σε βακτήρια που περιέχουν ήδη *rhaC* με διαφορετικό φάσμα υποστρωμάτων C
- Σίγηση γονιδίων που ευνοούν μειωμένη παραγωγή PHAs
- Τροποποίηση PHAs πολυμεράσης για αυξημένη παραγωγή PHAs
- Ενσωμάτωση *rha* γονιδίων σε βακτήρια που δεν κατέχουν φυσικούς μηχανισμούς παραγωγής PHAs αλλά μπορούν να χρησιμοποιούν φθηνά υποστρώματα C