ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

Διπλωματική εργασία

«Μελέτη της παραγωγής βιοϋδρογόνου από ένα αζωτοδεσμευτικό βακτήριο σε διαφορετικά υποστρώματα σακχάρων»

Τσιχλάκη Αλεξάνδρα Αλεξία

Επιβλέπων Καθηγητής: Γανωτάκης Δημήτριος

Ηράκλειο 2024

UNIVERSITY OF CRETE

DEPARTMENT OF CHEMISTRY

DIVISION OF BIOCHEMISTRY

Bachelor thesis

«A study of biohydrogen production by a nitrogen-fixing bacterium under different carbon substrates»

Tsichlaki Alexandra Alexia

Supervisor: Ghanotakis Demetrios

Heraklion 2024

Ευχαριστίες

Καταρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, Δημήτριο Γανωτάκη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, καθώς μου έδωσε τη δυνατότητα να εργαστώ στο εργαστήριό του για την εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον δεύτερο αξιολογητή της πτυχιακής μου, Γεώργιο Τσιώτη, για το χρόνο και την προσοχή που διέθεσε στην ανάγνωση και την αξιολόγηση της εργασίας μου. Ακόμη, οφείλω να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή του τμήματος Βιολογίας, τον Δρ. Κυριάκο Κοτζαμπάση για την φιλοξενία στο εργαστηρίου του και συγκεκριμένα για την χρήση του αερίου χρωματογράφου κατά τη διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας. Οι μετρήσεις που πραγματοποίησα στο εργαστήριο του Δρ. Κοτζαμπάση ήταν ζωτικής σημασίας για την αποτελεσματική ανάπτυξη και ολοκλήρωση της έρευνάς μου.

Φυσικά, δεν θα μπορούσα να παραλείψω τον υποψήφιο διδακτορικό φοιτητή του εργαστηρίου, Ναπολέων Στρατηγάκη, που ήταν πάντα πρόθυμος για οποιαδήποτε βοήθεια ανά πάσα στιγμή! Σε ευχαριστώ Ναπολέων, οι συμβουλές σου και οι συζητήσεις μας ήταν παραπάνω από πολύτιμες για την επίτευξη των αποτελεσμάτων που προσδοκούσα. Ακόμη, ένα ευχαριστώ οφείλω στην μεταπτυχιακό του εργαστηρίου, Αγγελική Τσολακίδη με την οποία συνεργαστήκαμε εντατικά κατά την διάρκεια αυτού του εξάμηνου. Παρά τις δυσκολίες και τα προβλήματα που αντιμετωπίσαμε, η Αγγελική ήταν πάντα εκεί με ένα χαμόγελο στα χείλη και ένα θετικό πνεύμα που μεταδιδόταν σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου. Αγγελική εκτός από την βοήθεια σου σε επιστημονικής φύσεως θέματα με ενέπνευσες με το χαμόγελο και την αισιοδοξία σου.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω τις φίλες μου που με στήριζαν καθ' όλη τη διάρκεια αυτού του απαιτητικού για μένα εξαμήνου. Οι συζητήσεις μας και το κουράγιο που μου δίνατε κάθε φορά που γκρίνιαζα μου έδωσαν δύναμη για να συνεχίσω.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για τη συνεχή τους στήριξη και την αγάπη που μου προσέφεραν καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου. Η αφοσίωσή τους στην εκπαίδευσή μου και η πίστη τους στις δυνατότητές μου με κάνουν να προσπαθώ ακόμα περισσότερο για να πετύχω τους στόχους και τα όνειρα μου!

Εξεταστική επιτροπή

Δημήτριος Γανωτάκης (επιβλέπων καθηγητής)

Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Γεώργιος Τσιώτης

Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε διερεύνηση της επίδρασης μιας σειράς συνθηκών καλλιέργειας στην κυτταρική ανάπτυξη και στην παραγωγή υδρογόνου, από το αζωτοδεσμευτικό βακτήριο *Clostridium pasterianum*. Το βακτήριο αυτό έχει τη δυνατότητα μέσω της διαδικασίας της σκοτεινής ζύμωσης να παράγει βιοϋδρογόνο, ένα φιλικό προς το περιβάλλον καύσιμο, που δύναται να περιορίσει την ατμοσφαιρική ρύπανση.

Αρχικά μελετήθηκε η επίδραση της αρχικής κυτταρικής συγκέντρωσης, αλλά και η ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε θρεπτικά μέσα με διαφορετικές πηγές άνθρακα και αζώτου. Οι παραπάνω παράμετροι είχαν σημαντική επίδραση στην παραγωγή υδρογόνου και στην κυτταρική ανάπτυξη. Στη συνέχεια, μελετήθηκε η ανάπτυξη και η παραγωγή υδρογόνου, χρησιμοποιώντας διαφορετικά υποστρώματα σακχάρων, σε ένα εύρος συγκεντρώσεων. Οι καλλιέργειες του βακτηρίου που αναπτύχθηκαν σε μαννιτόλη, σορβιτόλη, γλυκόζη και φρουκτόζη εμφάνισαν την υψηλότερη παραγωγή υδρογόνου, ακόμα και στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις των σακχάρων, ενώ σε δισακχαρίτες, όπως μαλτόζη και σουκρόζη η παραγωγή ήταν συγκριτικά χαμηλότερη. Παράλληλα, μελετήθηκε και η χρήση υδρολυμένων αποβλήτων τυροκομείων (τυρόγαλα) με υψηλό οργανικό φορτίο ως μέσα καλλιέργειας του βακτηρίου. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, το βακτήριο εμφάνισε τόσο κυτταρική ανάπτυξη, όσο και παραγωγή υδρογόνου σε κοντινά επίπεδα με καλλιέργειες του μάρτυρα.

Από τη μελέτη των παραπάνω, ο ορθολογικός σχεδιασμός παραμέτρων ανάπτυξης μπορεί να βελτιστοποιήσει την παραγωγή βιοϋδρογόνου κατά τη σκοτεινή ζύμωση του βακτηρίου. Επιπλέον, η χρήση βιομηχανικών αποβλήτων όπως το τυρόγαλα ως μέσο καλλιέργειας μπορεί να επιτρέψει την παραγωγή βιοκαυσίμων με μικρότερο οικονομικό κόστος και χαμηλότερο περιβαλλοντικό αποτύπωμα.

Λέξεις κλειδιά: *Clostridium pasteurianum,* αζωτοδεσμευτικά βακτήρια, ανάπτυξη, υδρογόνο, σκοτεινή ζύμωση, πηγή άνθρακα, απόβλητα τυροκομείου

ABSTRACT

In this thesis, the effect of various growth conditions on the cell growth and hydrogen production by the nitrogen-fixing bacterium *Clostridium pasterianum* was investigated. This bacterium has the ability to produce biohydrogen through the process of dark fermentation, which is an environmentally friendly fuel that can help reduce environmental pollution.

Initially, the effect of the inoculum size was studied, as well as the growth of the microorganism in nutrient media with different carbon and nitrogen substrates. The above parameters had a significant effect on hydrogen production and cell growth. Next, the growth and hydrogen production were studied under different sugar substrates, as well as their concentrations. Cultures of the bacterium grown on mannitol, sorbitol, glucose and fructose showed the highest hydrogen production, even at the lowest sugar concentrations, while on disaccharides such as maltose and sucrose, the production was comparatively lower. In addition, hydrolyzed cheese whey with high organic load was used as a growth medium for the bacterium. According to the results, the microorganism showed both cell growth and hydrogen production at close levels to the control cultures.

From the results of this study, it was concluded that the rational design of growth parameters can optimize biohydrogen production during the dark fermentation by the bacterium. Furthermore, the use of industrial wastewaters, such as cheese whey, as a growth media allows the sustainable production of biofuels with lower economic costs.

Key words: *Clostridium pasteurianum,* nitrogen-fixing bacteria, growth, hydrogen, dark fermentation, carbon source, dairy wastewaters

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες i
ΠΕΡΙΛΗΨΗ iii
ABSTRACT iv
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ 1
1.1 Υδρογόνο ως καύσιμο 1
1.2 Πηγές παραγωγής υδρογόνου 2
1.3 Βιολογική παραγωγή υδρογόνου 3
1.3.1 Άμεση Βιοφωτόλυση του νερού: 4
1.3.2 Έμμεση Βιοφωτόλυση του νερού: 4
1.3.3 Φωτοαποικοδόμηση οργανικών ενώσεων από φωτοσυνθετικά βακτήρια: 4
1.3.4 Σκοτεινή ζύμωση (Dark Fermentation): 5
1.3.5 Υβριδικό σύστημα που χρησιμοποιεί ζυμωτικά και φωτοσυνθετικά βακτήρια: 7
1.4 Καθήλωση Αζώτου 8
1.4.1 Βιομηχανική καθήλωση αζώτου: 8
1.4.2 Βιολογική καθήλωση αζώτου: 8
1.5 Ένζυμα που συμβάλλουν στην παραγωγή βιοϋδρογόνου 9
1.5.1 Υδρογονάση 9
1.5.2 Νιτρογενάση 10
1.6 *Clostridium pasteurianum* 12
1.7 Μελέτη συσχέτισης παραγωγής υδρογόνου και καθήλωσης αζώτου 13
1.8 Φάσεις ανάπτυξης μικροοργανισμών. 14
1.9 Χαρακτηριστικά απόβλητων τυροκομείου 16
1.10 Σκοπός διπλωματικής εργασίας 17
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 18
2.1 Συνθήκες Ανάπτυξης Clostridium pasteurianum 18
2.1.1 Θρεπτικά Μέσα 18
2.1.2 Παρασκευή καλλιεργειών 20
2.2 Μετρήσεις παραγόμενου υδρογόνου με αέρια χρωματογραφία (GC-TCD) 21
2.3 Προσδιορισμός κυτταρικής ανάπτυξης με την χρήση φασματοφωτομετρίας ορατού 22
2.4 Παρατήρηση δειγμάτων σε οπτικό μικροσκόπιο 23
2.5 Δείγματα υγρών γαλακτοκομικών αποβλήτων 23
2.5.1 Δειγματοληψία και προκατεργασία των αποβλήτων 23
2.5.2 Ενζυμική υδρόλυση λακτόζης 24
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ 25

3.1 Μελέτη ανάπτυξης του βακτήριού σε καλλιέργειες με διαφορετική αρχική κυτταρική συγκέντρωση 25
3.1.1 Επίδραση αρχικής κυτταρικής συγκέντρωσης στην κυτταρική ανάπτυξη και στην παραγωγή υδρογόνου 26
3.1.2 Μελέτη σχέσης παραγωγής υδρογόνου με την καθήλωση αζώτου σε καλλιέργειες βακτηρίου με διαφορετική αρχική κυτταρική συγκέντρωση 28
3.2 Μελέτη ανάπτυξης του βακτηρίου σε διαφορετικά θρεπτικά μέσα 30
3.2.1 Επίδραση του θρεπτικού μέσου στην κυτταρική ανάπτυξη και στην παραγωγή υδρογόνου 31
3.2.2 Μελέτη σχέσης παραγωγής υδρογόνου με την καθήλωση αζώτου σε καλλιέργειες βακτηρίου σε διαφορετικά θρεπτικά μέσα 34
3.3 Μελέτη ανάπτυξης βακτήριού και παραγωγής βιο-υδρόγονου σε διαφορετική συγκέντρωση σακχάρων 36
3.3.1 Μελέτη ανάπτυξης βακτήριού και παραγωγής βιο-υδρόγονου σε συγκέντρωση σακχάρων 50 mM. 37
3.3.2 Μελέτη ανάπτυξης βακτήριού και παραγωγής βιο-υδρόγονου σε συγκέντρωση σακχάρων 100 mM 39
3.3.3 Μελέτη ανάπτυξης βακτηρίου και παραγωγής βιο-υδρογόνου σε συγκέντρωση σακχάρων 150 mM. 41
3.3.4 Μελέτη ανάπτυξης βακτήριού και παραγωγής βιο-υδρόγονου σε συγκέντρωση σακχάρων 200 mM. 43
3.3.5 Ανάλυση αποτελεσμάτων 44
3.4 Βιοχημικός χαρακτηρισμός αποβλήτων τυροκομείου 49
3.5 Μελέτη ανάπτυξης βακτηριού και παραγωγής βιο-υδρόγονου σε απόβλητα τυροκομείου 51
3.6 Συμπεράσματα 54
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ 56
Βιβλιογραφία 58

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Υδρογόνο ως καύσιμο

Οι υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις, τα σοβαρά περιβαλλοντικά ζητήματα όπως οι εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου και η υπερθέρμανση του πλανήτη καθιστούν επιτακτική την εύρεση καθαρών, ανανεώσιμων και βιώσιμων πηγών ενέργειας. Μεταξύ των διαφόρων καυσίμων, το υδρογόνο (H_2) είναι ένα πολλά υποσχόμενο καύσιμο λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς του σε ενέργεια καθώς εμφανίζει το υψηλότερο ενεργειακό περιεχόμενο ανά μονάδα βάρους από οποιοδήποτε άλλο καύσιμο (119,3 MJ/kg) [1]. Στον *Πίνακα 1* παρουσιάζεται η θερμογόνος δύναμη, δηλαδή η ποσότητα ενέργειας που απελευθερώνεται κατά την καύση διάφορων γνωστών καυσίμων. Το υδρογόνο όπως φαίνεται μπορεί να παρέχει περίπου τρεις φορές περισσότερη ενέργεια από την καύση βενζίνης ανά μονάδα μάζας. Ταυτόχρονα κατά την καύση του παράγονται υδρατμοί ως το μόνο παραπροϊόν καθιστώντας το φιλικό καύσιμο για το περιβάλλον, ενώ παράλληλα μπορεί να μεταφερθεί για οικιακή - βιομηχανική κατανάλωση [2,4]. Το υδρογόνο έχει κάποιες ιδιότητες που το καθιστούν ασφαλέστερο από άλλα καύσιμα που συνήθως χρησιμοποιούνται. Για παράδειγμα, είναι μη τοξικό και επειδή είναι ελαφρύτερο από τον αέρα, διαχέεται γρήγορα στην ατμόσφαιρα όταν απελευθερώνεται. Ωστόσο πρέπει να αναφερθεί ότι η χαμηλότερη ενέργεια ανάφλεξης του σε σύγκριση με τη βενζίνη ή το φυσικό αέριο καθιστούν απαραίτητη την ύπαρξη ανιχνευτή διαρροών σε ένα σύστημα υδρογόνου για την ασφαλή λειτουργία του. Επιπλέον, απαιτούνται ειδικοί ανιχνευτές φλόγας, καθώς η καύση του υδρογόνου συνοδεύεται από σχεδόν αόρατη φλόγα [5].

***Πίνακας 1**: Θερμογόνος δύναμη διαφορετικών καυσίμων σε κανονικές συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης [1].*

Καύσιμο	Θερμογόνος Δύναμη (MJ/kg)
Υδρογόνο	119.93
Μεθάνιο	50.02
Προπάνιο	45.60
Βενζίνη	44.50
Ντίζελ	42.50
Αιθανόλη	27.00
Μεθανόλη	18.50

Επίσης, αντιμετωπίζονται και ορισμένες δυσκολίες στην αποθήκευση του υδρογόνου. Ένας λόγος είναι η χαμηλή ογκομετρική πυκνότητα του, η οποία καθιστά δύσκολη την αποθήκευσή του καθώς και λόγω του ότι είναι το ελαφρύτερο από όλα τα στοιχεία όπως προαναφέρθηκε, συχνά χάνεται εύκολα στην ατμόσφαιρα. Επιπλέον, η πολύ χαμηλή θερμοκρασία βρασμού του υγρού υδρογόνου (-253°C) σημαίνει ότι πρέπει να αποθηκεύεται σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες. Η αποθήκευση του υδρογόνου ως αέριο επίσης απαιτεί τη χρήση υψηλής πίεσης δεξαμενών [4,7]. Αυτές οι συνθήκες είναι απαραίτητες για να μετριαστούν οι ανάγκες για εξαιρετικά ογκώδεις δεξαμενές αποθήκευσης που απαιτεί η χαμηλή του πυκνότητα [4].

Το υδρογόνο ταξινομείται σε τρία διαφορετικά χρώματα: πράσινο, μπλε και γκρι, για να περιγράψει τη φιλικότητα προς το περιβάλλον. Η ταξινόμηση βασίζεται κυρίως σε πηγές πρωτογενούς ενέργειας που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή υδρογόνου. Αναλυτικότερα:

Γκρι υδρογόνο: Παράγεται από ορυκτά καύσιμα, εκπέμποντας αέρια του θερμοκηπίου.

Μπλε υδρογόνο: Παράγεται από ορυκτά καύσιμα, αλλά οι εκπομπές άνθρακα δεσμεύονται και αποθηκεύονται.

Πράσινο Υδρογόνο: Παράγεται με χρήση ανανεώσιμων πηγών ενέργειας, όπως η αιολική ή η ηλιακή ενέργεια, ή μέσω ηλεκτρόλυσης [3].

Η εξοικείωση της βιομηχανίας με το υδρογόνο και ως εκ τούτου η κατασκευή υποδομών με σκοπό την αποθήκευση και μεταφορά του είναι ήδη σε ισχύ. Το μεγαλύτερο μέρος του υδρογόνου σήμερα παράγεται στις πετροχημικές βιομηχανίες και η παραγωγή του γίνεται κυρίως από ορυκτά καύσιμα (άνθρακας, φυσικό αέριο). Το υδρογόνο καταναλώνεται μέσα στην ίδια τη βιομηχανία και δεν πωλείται στην αγορά. Σήμερα χρησιμοποιείται, συνήθως, για τον εξευγενισμό του πετρελαίου και για την παρασκευή λιπασμάτων, πλαστικών, διαλυτών, και άλλων βιομηχανικών προϊόντων [4,5].

1.2 Πηγές παραγωγής υδρογόνου

Δεν υπάρχει αμφιβολία ότι η παραγωγή υδρογόνου από ανανεώσιμες πηγές ενέργειας είναι εξαιρετικά επιθυμητή. Ωστόσο, αυτές οι τεχνολογίες χάνουν την ανταγωνιστικότητά τους όταν ληφθεί υπόψη το κόστος [4]. Για αυτό, σήμερα η πιο διαδεδομένη τεχνολογία παραγωγής υδρογόνου είναι η αναμόρφωση με ατμό φυσικού αερίου, η οποία συνεισφέρει περισσότερο από το 45% της παραγωγής. Εν συνεχεία ακολουθούν η αναμόρφωση πετρελαίου (30%) και η αεριοποίηση άνθρακα (18%) όπως φαίνεται στην *Εικόνα 1* [3]. Ουσιαστικά, περίπου το 95 %

του υδρογόνου παράγεται από ορυκτά καύσιμα και όχι από ανανεώσιμες πηγές ενέργειας με αποτέλεσμα την εκπομπή αεριών του θερμοκηπίου στο περιβάλλον.

***Εικόνα 1**: Ποσοστά πηγών παραγωγής υδρογόνου σήμερα [12].*

Όσον αφορά την παράγωγη υδρογόνου από ανανεώσιμες πηγές, η χρήση βιομάζας έχει βρει κάποια εφαρμογή, αν και ακόμα αντιμετωπίζει τεχνολογικές και οικονομικές προκλήσεις. Οι μέθοδοι ηλεκτρόλυσης και θερμόλυσης συνεχίζουν να αναπτύσσονται και βασίζονται στην αποσύνθεση του νερού για την παραγωγή αερίου υδρογόνου. Αυτές οι μέθοδοι φαίνεται να είναι πιο επικερδείς σε μικρή κλίμακα εφαρμογών [3]. Ταυτόχρονα, η χρήση μικροβιολογικών διεργασιών έχει την δυνατότητα να επιτύχει δύο στόχους: την αξιοποίηση των οργανικών αποβλήτων και την παραγωγή υδρογόνου μέσω βιοχημικής δράσης. Ωστόσο, αυτή η τεχνολογία περιορίζεται προς το παρόν σε έρευνα εργαστηριακής κλίμακας, καθώς η ποσότητα υδρογόνου που παράγεται από τους μικροοργανισμούς είναι χαμηλή και δεν επαρκεί για βιομηχανική παραγωγή [2].

1.3 Βιολογική παραγωγή υδρογόνου

Αναλυτικότερα, οι διεργασίες παραγωγής βιολογικού υδρογόνου από μικροοργανισμούς μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες τις (α) φωτο-εξαρτώμενες και στις (β) φωτο-ανεξάρτητες με βάση το αν οι βιοχημικές αντιδράσεις παραγωγής υδρογόνου απαιτούν φωτεινή ενέργεια. Οι φωτο-εξαρτώμενες διαδικασίες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν περαιτέρω στις εξής:

1.3.1 Άμεση Βιοφωτόλυση του νερού:

Το νερό διασπάται σε αέρια H_2 και O_2 από μικροφύκη υπό αναερόβιες συνθήκες. Η αντίδραση που συμβαίνει φαίνεται παρακάτω:

$$2H_2O + \Phi\omega\tau\varepsilon\iota\nu\acute{\eta}\ E\nu\acute{\varepsilon}\rho\gamma\varepsilon\iota\alpha \rightarrow 2H_2 + O_2 \ (1)$$

1.3.2 Έμμεση Βιοφωτόλυση του νερού:

Το νερό διασπάται σε αέρια H_2 και O_2 από κυανοβακτήρια τα όποια είναι φωτοαυτότροφοι μικροοργανισμοί που επιτελούν την διαδικασία της οξυγονικής φωτοσύνθεσης. Σε αυτή την διαδικασία το υδρογόνο παράγεται τόσο από ένζυμα υδρογονάσης όσο και από ένζυμα νιτρογενάσης. Η βιοφωτόλυση του νερού σε υδρογόνο απαιτεί τις αντιδράσεις 2 και 3 που φαίνονται παρακάτω. Συγκεκριμένα η αντίδραση 2 συμβαίνει κατά την φωτοσύνθεση ενώ η αντίδραση 3 κατά την αναπνοή. Επειδή για την παραγωγή υδρογόνου χρειάζονται να γίνουν δύο αντιδράσεις αυτή η διαδικασία φωτόλυσης ονομάζεται «έμμεση» [2]

$$2H_2O + 6CO_2 + \Phi\omega\tau\varepsilon\iota\nu\acute{\eta}\ E\nu\acute{\varepsilon}\rho\gamma\varepsilon\iota\alpha \rightarrow C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \ (2)$$

$$C_6H_{12}O_6 + 12H_2O + \Phi\omega\tau\varepsilon\iota\nu\acute{\eta}\ E\nu\acute{\varepsilon}\rho\gamma\varepsilon\iota\alpha \rightarrow 12H_2 + 6CO_2 \ (3)$$

1.3.3 Φωτοαποικοδόμηση οργανικών ενώσεων από φωτοσυνθετικά βακτήρια:

Σε αυτή τη κατηγορία η παραγωγή υδρογόνου πραγματοποιείται από μωβ μη θειούχα βακτήρια (PNS) και οφείλεται κυρίως στην παρουσία νιτρογενάσης σε συνθήκες έλλειψης αζώτου, παρουσία φωτός και οργανικών ενώσεων. Αυτά τα βακτήρια διαθέτουν ευέλικτο μεταβολισμό. Ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες όπως οι πηγές άνθρακα, η ένταση του φωτός και τη ποσότητα οξυγόνου, μπορούν να αναπτυχθούν φωτο-αυτοτροφα, φωτοετερότροφα και χημειο-ετερότροφα. Ένα από τα σημαντικά πλεονεκτήματα της συγκεκριμένης μεθόδου είναι ότι ως πηγή άνθρακα μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα εργαστηριακά απόβλητα, αρά και να αξιοποιηθούν [15]. Για παράδειγμα όταν η οργανική ένωση είναι το οξικό οξύ η αντίδραση που συμβαίνει σε αύτη τη κατηγορία παραγωγής βιο-υδρογόνου είναι η εξής [2]:

$$CH_3COOH + 2H_2O + \Phi\omega\tau\varepsilon\iota\nu\acute{\eta}\ E\nu\acute{\varepsilon}\rho\gamma\varepsilon\iota\alpha \rightarrow 4H_2 + 2CO_2 \ (4)$$

Η κυρία φωτο-ανεξάρτητη μέθοδος παραγωγής υδρόγονου είναι η «σκοτεινή ζύμωση» δηλαδή η ζύμωση οργανικών υποστρωμάτων από αναερόβια βακτήρια. Αναλυτικότερα:

1.3.4 Σκοτεινή ζύμωση (Dark Fermentation):

Η σκοτεινή ζύμωση είναι μια μικροβιακή διαδικασία που συμβαίνει απουσία φωτός και οξυγόνου και περιλαμβάνει τη μετατροπή οργανικών ενώσεων σε διάφορα προϊόντα, συμπεριλαμβανομένου του αερίου υδρογόνου. Ορισμένα αναερόβια βακτήρια, όπως τα είδη του γένους *Clostridium,* χρησιμοποιούνται συνήθως στη σκοτεινή ζύμωση για παραγωγή υδρογόνου. Αυτά τα βακτήρια διαθέτουν ένζυμα που μπορούν να διασπάσουν σύνθετες οργανικές ενώσεις σε απλούστερα μόρια, παράγοντας αέριο υδρογόνο ως ένα από τα υποπροϊόντα. Η σκοτεινή ζύμωση μπορεί να χρησιμοποιήσει μια ποικιλία οργανικών υποστρωμάτων, συμπεριλαμβανομένων των σακχάρων, των υδατανθράκων και των οργανικών αποβλήτων. Κοινές πρώτες ύλες περιλαμβάνουν γλυκόζη, σακχαρόζη και άμυλο [6,10].

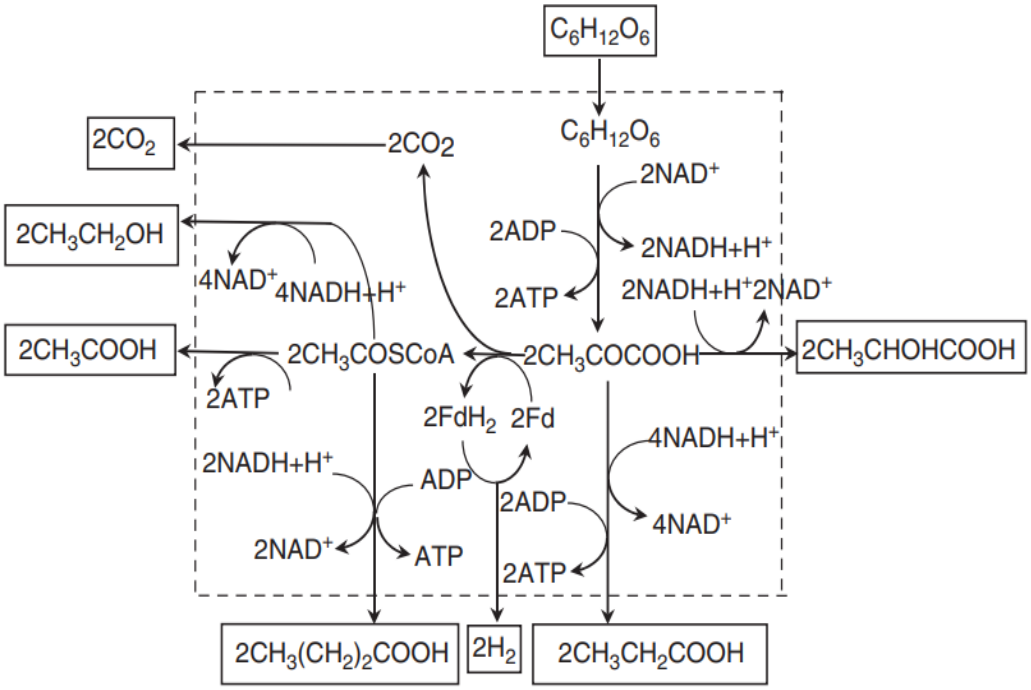
Αναλυτικότερα, όταν τα βακτήρια αναπτύσσονται ετερότροφα, αξιοποιώντας τα οργανικά υποστρώματα, αυτά τα υποστρώματα υφίστανται οξείδωση για να παρέχουν τόσο δομικά στοιχεία όσο και μεταβολική ενέργεια για ανάπτυξη. Η διαδικασία οξείδωσης δημιουργεί ηλεκτρόνια και για να διατηρηθεί η ηλεκτρική ουδετερότητα, αυτά τα ηλεκτρόνια πρέπει να δεσμευτούν από κατάλληλους αποδέκτες. Σε περιβάλλοντα πλούσια σε οξυγόνο, το οξυγόνο χρησιμεύει ως δέκτης ηλεκτρονίων και ανάγεται σε νερό. Ωστόσο, σε περιβάλλοντα με έλλειψη οξυγόνου (ανοξικό), εναλλακτικές ενώσεις όπως τα πρωτόνια, τα οποία ανάγονται για να σχηματίσουν μοριακό υδρογόνο, δρουν ως δέκτες ηλεκτρονίων. Στη σκοτεινή ζύμωση, η γλυκόζη αρχικά μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό μέσω γλυκολυτικών οδών. Στη συνέχεια, το πυροσταφυλικό υφίσταται οξείδωση σε ακετυλο-CoA. Η οξείδωση του πυροσταφυλικού σε ακετυλο-CoA περιλαμβάνει τη μετάβαση της φερρεδοξίνης (Fd) από την οξειδωμένη στην ανοιγμένη της μορφή (5). Η ανηγμένη Fd στη συνέχεια οξειδώνεται από την υδρογονάση, οδηγώντας στη δημιουργία Fd(ox) και στην απελευθέρωση ηλεκτρονίων, παράγοντας τελικά μοριακό υδρογόνο (6). Η συνολική αντίδραση αυτής της διαδικασίας μπορεί να συνοψιστεί ως εξής [2]:

$$Πυροσταφυλικό + CoA + 2Fd(ox) \rightarrow Ακέτυλο - CoA + 2Fd(red) + CO_2 \ (5)$$

$$2H^+ + Fd(red) \rightarrow H_2 + Fd(ox) \ (6)$$

Οι οδοί ζύμωσης που οδηγούν στην παραγωγή υδρογόνου μπορεί να ποικίλλουν, αλλά η κύρια οδός περιλαμβάνει τη ζύμωση σακχάρων σε οργανικά οξέα και την επακόλουθη μετατροπή αυτών των οξέων σε υδρογόνο και διοξείδιο του άνθρακα όπως φάνηκε στις αντιδράσεις (5) και (6). Όπως φαίνεται στην *Εικόνα 2* το πυροσταφυλικό που παράγεται μετά τη ζύμωση από την γλυκόλυση μπορεί να μετατραπεί σε: οξικό οξύ,

προπιονικό οξύ, βουτυρικό οξύ, αιθανόλη και γαλακτικό οξύ. Αύτη η διαδικασία δηλαδή μπορεί να οδηγήσει σε ένα ευρύ φάσμα ενδιάμεσων και παραπροϊόντων (εκ των οποίων μερικά μπορεί να θεωρούνται πολύτιμοι μεταβολίτες), ανάλογα με τις παραμέτρους όπως ο τύπος υποστρώματος, το pH, θερμοκρασία και άλλες συνθήκες του περιβάλλοντος, ενώ δεν εξαρτάται από την παρουσία η όχι φωτός [7,9]. Ταυτόχρονα, ανάλογα με τις οδούς που χρησιμοποιούνται από τους μικροοργανισμούς και τα τελικά προϊόντα, οι αποδόσεις υδρογόνου μπορεί να ποικίλλουν [10]. Η συσσώρευση ενδιάμεσων προϊόντων σε συστήματα μπορεί να αναστείλει τη ζύμωση ωστόσο, υπάρχουν πολύ περιορισμένες πληροφορίες για τη συσχέτιση μεταξύ των μονοπατιών ζύμωσης και της ικανότητας παραγωγής υδρογόνου [8].



Εικόνα 2 *: Μηχανισμός παραγωγής υδρογόνου από την αποικοδόμηση ενός μορίου γλυκόζης κατά την σκοτεινή ζύμωση σε αναερόβια βακτήρια [10].*

Τα προαιρετικά αναερόβια βακτήρια εμφανίζουν θεωρητική μέγιστη απόδοση 2 moles υδρογόνου ανά mole γλυκόζης, ενώ τα αυστηρά αναερόβια βακτήρια 4 moles καθώς σε αυτά δύο επιπλέον moles υδρογόνου μπορούν να παραχθούν από το NADH που παράγεται κατά τη διάρκεια της γλυκόλυσης [10]. Παρόλα αυτά τα προαιρετικά αναερόβια εμφανίζουν χαμηλότερη ευαισθησία στο οξυγόνο και μπορούν να ανακτήσουν τη δραστηριότητα παραγωγής υδρογόνου μετά από τυχαία έκθεση στο οξυγόνο με ταχεία εξάντληση του οξυγόνου στο μέσο. Κατά συνέπεια, ένα προαιρετικό αναερόβιο θεωρείται καταλληλότερο από ένα αυστηρό αναερόβιο για τη διεξαγωγή διεργασιών παραγωγής

υδρογόνου μέσω σκοτεινής ζύμωσης. Για να παραχθεί η μεγαλύτερη θεωρητική απόδοση υδρογόνου (4 mol H_2 ανά mole γλυκόζης) πρέπει η ακετόνη να είναι το τελικό προϊόν της ζύμωσης όπως φαίνεται στις παρακάτω αντιδράσεις;

$$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COOH + 2CO_2 + 4H_2 \quad (7)$$

Αντίθετα, όταν το βουτυρικό είναι το τελικό προϊόν της ζύμωσης, η μέγιστη θεωρητική απόδοση υδρογόνου είναι 2 mol H_2 ανά mole γλυκόζης όπως φαίνεται στην *εξίσωση 8* [10].

$$C_6H_{12}O_6 + H_2O \rightarrow CH_3CH_2H_2COOH + 2CO_2 + 2H_2 \quad (8)$$

Επιπλέον, εκτός του ότι αυτή η θεωρητική απόδοση θεωρείται αρκετά μικρή για να είναι οικονομικά βιώσιμη ως εναλλακτική λύση στις υπάρχουσες χημικές ή ηλεκτροχημικές διεργασίες παραγωγής υδρογόνου, στην πραγματικότητα είναι ακόμα μικρότερη αφού ένα μέρος της γλυκόζης χρειάζεται από τον μικροοργανισμό για την ανάπτυξη του και για την παραγωγή πτητικών λιπαρών οξέων (VFAs) [6, 10]. Ως εκ τούτου, ο απώτερος στόχος είναι η έρευνα για την ανάπτυξη μεθόδων παραγωγής υδρογόνου με μεγαλύτερη απόδοση.

1.3.5 Υβριδικό σύστημα που χρησιμοποιεί ζυμωτικά και φωτοσυνθετικά βακτήρια:

Η λογική της συγκεκριμένης μεθόδου περιλαμβάνει αρχικά την χρήση μη φωτοσυνθετικών- αναερόβιων βακτηρίων που θα μπορούσαν να παράγουν ενδιάμεσα, όπως οργανικά οξέα χαμηλού μοριακού βάρους μέσω αναερόβιας ζύμωση υδατανθράκων (ή οργανικών αποβλήτων), τα οποία στη συνέχεια μετατρέπονται σε υδρογόνο από φωτοσυνθετικά βακτήρια σε έναν φωτο-βιοαντιδραστήρα. Οι συνολικές αντιδράσεις της διαδικασίας μπορούν να παρασταθούν ως εξής:

1ο Στάδιο (Αναερόβια Βακτήρια): $C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COOH + 2CO_2 + 4H_2$ (9)

2ο Στάδιο (Φωτοσυνθετικά Βακτήρια): $2CH_3COOH + 4H_2O \rightarrow 8H_2 + 4CO_2$ (10)

Όπως φαίνεται στις *Εξισώσεις 9,10* η θεωρητική απόδοση της συγκεκριμένης διαδικασίας ανέρχεται στα 12 moles H_2 ανά mole γλυκόζης, 4 φορές μεγαλύτερη δηλαδή από ότι στην σκοτεινή ζύμωση [7].

1.4 Καθήλωση Αζώτου

Η καθήλωση αζώτου είναι μια κρίσιμη διαδικασία στον κύκλο του αζώτου που μετατρέπει το ατμοσφαιρικό άζωτο σε μια μορφή που μπορούν να χρησιμοποιήσουν τα φυτά και άλλοι οργανισμοί. Το άζωτο, ένα ουσιαστικό στοιχείο για τη ζωή, αποτελεί σημαντικό μέρος της ατμόσφαιρας της Γης με τη μορφή διατομικού αερίου αζώτου, αλλά τα περισσότερα φυτά και ζώα δεν μπορούν να χρησιμοποιήσουν απευθείας το άζωτο της ατμόσφαιρας. Η δέσμευση αζώτου παίζει ζωτικό ρόλο στη διατήρηση της διαθεσιμότητας αζώτου για την ανάπτυξη των φυτών και στη συνέχεια για ολόκληρη την τροφική αλυσίδα ενώ παράλληλα, αποτελεί μια βασική πτυχή της βιώσιμης γεωργίας και της ομαλής λειτουργίας των οικοσυστημάτων. Υπάρχουν δύο κύριοι τρόποι με τους οποίους συμβαίνει η καθήλωση αζώτου: α) Βιομηχανική καθήλωση β) Βιολογική καθήλωση [16]. Αναλυτικότερα:

1.4.1 Βιομηχανική καθήλωση αζώτου:

Αυτή η διαδικασία περιλαμβάνει την παραγωγή αμμωνίας και άλλων ενώσεων αζώτου για λιπάσματα και βιομηχανικές εφαρμογές. Η διαδικασία Haber-Bosch, που αναπτύχθηκε το 1910, περιλαμβάνει την αντίδραση αερίου αζώτου και αερίου υδρογόνου για την παραγωγή αμμωνίας υπό υψηλή πίεση και θερμοκρασία (περίπου πίεση 300 ατμοσφαιρών και 500 ^{O}C), χρησιμοποιώντας σίδηρο ως καταλύτη όπως φαίνεται στην *Εξίσωση 11*. Περίπου το 25% του καθηλωμένου αζώτου στην Γη καθηλώνεται με αυτή τη μέθοδο [16].

$$N_2 + 3H_2 \overset{Fe}{\leftrightarrow} 2NH_3 \quad (11)$$

1.4.2 Βιολογική καθήλωση αζώτου:

Αυτή η διαδικασία πραγματοποιείται από ορισμένους μικροοργανισμούς, κυρίως ορισμένα βακτήρια και αρχαία. Αυτοί οι μικροοργανισμοί διαθέτουν ένζυμα νιτρογενάσης που μπορούν να σπάσουν τον ισχυρό τριπλό δεσμό μεταξύ των ατόμων αζώτου σε N_2 και να το μετατρέψουν σε αμμωνία (NH_3). Η πιο γνωστή ομάδα βακτηρίων που δεσμεύουν το άζωτο είναι τα συμβιωτικά βακτήρια τα οποία σχηματίζουν ριζικά φυμάτια στις ρίζες των ψυχανθών φυτών (π.χ. σόγια, μπιζέλια και τριφύλλι). Αυτά τα βακτήρια σχηματίζουν μια αμοιβαία σχέση με το φυτό ξενιστή, παρέχοντάς του σταθερό άζωτο και, σε αντάλλαγμα, λαμβάνουν σάκχαρα ως πηγή ενέργειας [17]. Η καθήλωση αζώτου από αζωτοδεσμευτικούς μικροοργανισμούς διαδραματίζει σημαντικό ρόλο για τον μεταβολισμό όλων των ανωτέρων οργανισμών, καθώς η ετήσια ποσότητα άζωτου που καθηλώνεται από αυτά έχει υπολογιστεί στα 10^{11} kg, ποσότητα που αντιστοιχεί περίπου στο 60% του νεοκαθηλωμένου άζωτου στην Γη [16].

1.5 Ένζυμα που συμβάλλουν στην παραγωγή βιοϋδρογόνου

1.5.1 Υδρογονάση

Η υδρογονάση είναι ένα ένζυμο που καταλύει την αναστρέψιμη μετατροπή του μοριακού υδρογόνου (H_2) σε πρωτόνια (H^+) και ηλεκτρόνια (e^-), μια από τις πιο θεμελιώδους αντιδράσεις οξειδοαναγωγής:

$$2H^+ + 2e^- \leftrightarrow H_2 \quad (12)$$

Αυτή η ενζυμική αντίδραση είναι ζωτικής σημασίας στα βιολογικά συστήματα τόσο για την παραγωγή όσο και για την κατανάλωση του αερίου υδρογόνου. Η διερεύνηση των υδρογονασών και η λεπτομερής κατανόηση των ενζυμικών τους αντιδράσεων μπορεί να προσφέρει μια δομική και λειτουργική βάση για τη χημική ανάπτυξη «τεχνητών υδρογονασών», τη μελλοντική χρήση προσαρμοσμένων βιολογικών συστημάτων για την παραγωγή υδρογόνου. Υπάρχουν δύο κύριοι τύποι αυτών των ενζύμων: οι [Fe]-υδρογονάσες και [NiFe]-υδρογονάσες οπού η διαφορά τους έγκειται στον μεταλλικό συμπαράγοντα που βρίσκεται στα ενεργά τους κέντρα [12]. Αναλυτικότερα:

[FeFe]-υδρογονάση: Περιέχει ένα μοναδικό σύμπλοκο σιδήρου-θείου που ονομάζεται κέντρο [FeFe]. Βρίσκεται σε ορισμένα βακτήρια και πράσινα φύκια και συχνά εμπλέκεται στην παραγωγή υδρογόνου κατά τις διαδικασίες αναερόβιας ζύμωσης [13]. Σε διάφορα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια όπως το *Clostridium pasteurinaum* έχουν βρεθεί κάποιοι πιο εξειδικευμένοι τύπου τέτοιων υδρογονασών όπως για παράδειγμα [20]:

Πολυμερείς [FeFe]-υδρογονάσες: Αυτού του τύπου υδρογονάσες καταλύουν την παραγωγή αερίου υδρογόνου χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το NADH [42].

Τριμερείς διχαλωτές [FeFe]-υδρογονάσες: Αυτές αποτελούνται από τρείς υπομονάδες, όπου κάθε υπομονάδα περιέχει συστάδες σιδήρου-θείου και καταλυτικές θέσεις που εμπλέκονται στη μεταφορά ηλεκτρονίων και στην παραγωγή υδρογόνου. Συγκεκριμένα, αυτά τα ένζυμα χρησιμοποιούν έναν μοναδικό μηχανισμό που ονομάζεται διχοτόμηση ηλεκτρονίων, ο οποίος τους επιτρέπει να συνδέουν την οξείδωση ενός δότη ηλεκτρονίων με τη αναγωγή δύο δεκτών ηλεκτρονίων. Αυτή η διαδικασία έχει αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός ενδιάμεσου υψηλής ενέργειας που μπορεί να οδηγήσει στην πραγματοποίηση ενδεργονικών αντιδράσεων. Η διχοτόμηση ηλεκτρονίων επιτρέπει στο ένζυμο να παράγει υδρογόνο ενώ παράλληλα διατηρεί την ενέργεια από τις αντιδράσεις οξειδοαναγωγής [41].

[NiFe]-υδρογονάση: Περιέχει μια ενεργή θέση νικελίου-σιδήρου. Βρίσκεται σε διάφορα βακτήρια, αρχαία και μερικούς ευκαρυώτες. Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο τόσο στην παραγωγή όσο και στην κατανάλωση υδρογόνου ενώ ταυτόχρονα συμμετέχει σε διάφορες μεταβολικές οδούς, συμπεριλαμβανομένης της αναερόβιας αναπνοής και της δέσμευσης αζώτου. Οι υδρογονάσες [NiFe] χωρίζονται σε δύο υποκατηγορίες: «ευαίσθητες σε οξυγόνο» και «ανεκτικές σε οξυγόνο» με τις τελευταίες να διατηρούν την ικανότητα οξείδωσης του υδρογόνου ακόμη και υπό αερόβιες συνθήκες περιβάλλοντος. Επιπλέον, είναι γνωστό ότι μικρά διατομικά μόρια, όπως CO, NO και CN^- , δρουν επίσης ως αναστολείς αυτών των υδρογονασών [13]. Τέλος επισημαίνεται ότι οι υδρογονάσες [NiFe] είναι συχνά λιγότερο δραστικές από τις υδρογονάσες [FeFe] στην παραγωγή μοριακού υδρογόνου, με τις τελευταίες να έχουν την ικανότητα, κάθε μόριο ενζύμου να μπορεί να παράγει έως και 10^4 μόρια H_2 ανά δευτερόλεπτο σε θερμοκρασία δωματίου [14].

1.5.2 Νιτρογενάση

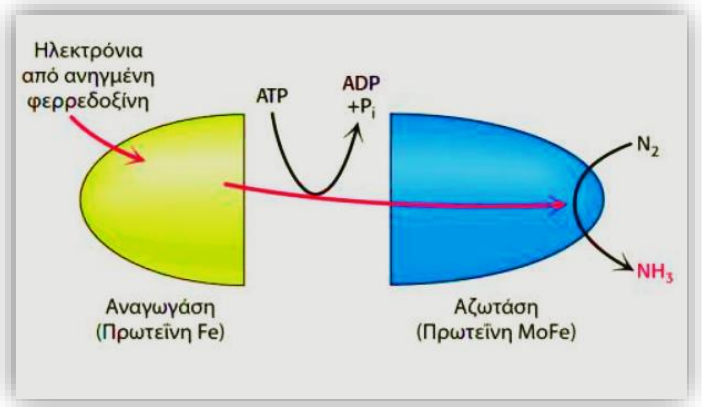
Η νιτρογενάση είναι ένα άλλο σημαντικό ένζυμο που εμπλέκεται σε βιολογικές διεργασίες και ειδικότερα στον κύκλο του αζώτου. Είναι υπεύθυνη για τη μετατροπή του ατμοσφαιρικού αζώτου (N_2) σε αμμωνία (NH_3), μια μορφή αζώτου που μπορεί να χρησιμοποιηθεί από φυτά και άλλους οργανισμούς. Η δέσμευση αζώτου που πραγματοποιείται από τη νιτρογενάση είναι ζωτικής σημασίας για τη διάθεση του αζώτου για τη σύνθεση αμινοξέων, νουκλεοτιδίων και άλλων βασικών βιομορίων. Η νιτρογενάση βρίσκεται σε ορισμένα βακτήρια, αρχαία και ορισμένους τύπους κυανοβακτηρίων. Επίσης, αυτό το ένζυμο είναι πολύ ευαίσθητο στο οξυγόνο, αφού αναστέλλεται ακόμη και από χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου [14]. Έτσι οι μικροοργανισμοί που είναι υποχρεωτικά αερόβιοι ή προαιρετικά αερόβιοι, θα πρέπει να διαθέτουν μηχανισμούς που θα τους επιτρέπουν να ρυθμίζουν την ποσότητα οξυγόνου για να προστατεύσουν την νιτρογενάση.

Η νιτρογενάση είναι ένα σύνθετο ενζυμικό σύμπλοκο με πολλαπλά οξειδοαναγωγικά κέντρα και αποτελείται συνήθως από δύο κύριες πρωτεΐνες: την πρωτεΐνη σιδήρου (αναγωγάση) και την πρωτεΐνη μολυβδαινίου-σιδήρου (αζωτάση). Η πρωτεΐνη Fe δρα ως φορέας ηλεκτρονίων που έχουν υψηλό αναγωγικό δυναμικό, μεταφέροντας ηλεκτρόνια από την ανηγμένη φερεδοξίνη στην πρωτεΐνη MoFe ενώ η πρωτεΐνη MoFe αποτελεί την θέση καθήλωσης του άζωτου. Η νιτρογενάση καταλύει την αναγωγή του ατμοσφαιρικού αζώτου σε αμμωνία (NH_3) μέσω μιας διαδικασίας πολλαπλών σταδίων. Η αναγωγή του αζώτου σε αμμωνία είναι μια ενεργοβόρα διαδικασία όπου το ATP (τριφωσφορική αδενοσίνη) χρησιμοποιείται για να παρέχει την απαραίτητη ενέργεια για αυτή την αντίδραση όπως

φαίνεται στην *Εξίσωση 13,* όπου για κάθε ηλεκτρόνιο που μεταφέρεται, υδρολύονται δύο μόρια ATP και άρα, τουλάχιστον 16 μόρια ATP υδρολύονται για κάθε μόριο αζώτου που ανάγεται [16, 17].

$$N_2 + 8e^- + 8H^+ + 16\,ATP + 16\,H_2O \rightarrow 2NH_3 + H_2 + 16\,ADP + 16\,P_i \quad (13)$$

Επισημαίνεται ότι δότης ηλεκτρόνιων μπορεί να είναι η φερδοξίνη ή φλαδόξίνη. Στους περισσότερους όμως αζωτοδευσμευτικούς μικροοργανισμούς τα ηλεκτρόνια προέρχονται από την ανοιγμένη φερεδοξίνη, που παράγεται από διάφορες οξειδωτικές διαδικασίες. Τα παραπάνω συνοψίζονται στην *Εικόνα 3*.



Εικόνα 3: *Σχηματική απεικόνιση καθήλωσης και μετατροπής αζώτου σε αμμωνία από την νιτρογενάση. Αυτό το ένζυμο αποτελείται από δυο πρωτεΐνες την αναγωγάση και την αζωτάση [16].*

Επιπλέον από την *Εξίσωση 13* φαίνεται ότι εάν και ο πρωταρχικός στόχος της νιτρογενάσης είναι να μετατρέψει το αέριο άζωτο σε αμμωνία για να υποστηρίξει την ανάπτυξη των φυτών, η απελευθέρωση αερίου υδρογόνου είναι ένα εγγενές μέρος της καταλυτικής δραστηριότητας αυτού του ενζύμου. Άρα η παραγωγή βιολογικού υδρογόνου μπορεί να πραγματοποιηθεί, εκτός από τη γλυκόλυση, και μέσω της καθήλωσης του ατμοσφαιρικού αζώτου. Αξίζει να σημειωθεί ότι η παραγωγή υδρογόνου από τη νιτρογενάση έχει προσελκύσει αρκετό ενδιαφέρον στο πλαίσιο της παραγωγής ανανεώσιμων πηγών ενέργειας και πιο συγκεκριμένα βιοϋδρογόνου. Ορισμένοι ερευνητές αναζητούν τρόπους για να αξιοποιήσουν αυτή τη φυσική ενζυμική διαδικασία για τη βιώσιμη παραγωγή αερίου υδρογόνου ως πηγή καθαρής ενέργειας [17]. Ωστόσο, προκλήσεις όπως για παράδειγμα η ευαισθησία της νιτρογενάσης στο οξυγόνο όπως αναφέρθηκε, καθιστούν αυτόν τον τομέα μελέτης περίπλοκο.

Την ίδια στιγμή, η νιτρογενάση παίζει θεμελιώδη ρόλο στον παγκόσμιο κύκλο αζώτου, συμβάλλοντας στη παροχή αζώτου στους ζωντανούς οργανισμούς. Η μελέτη της νιτρογενάσης

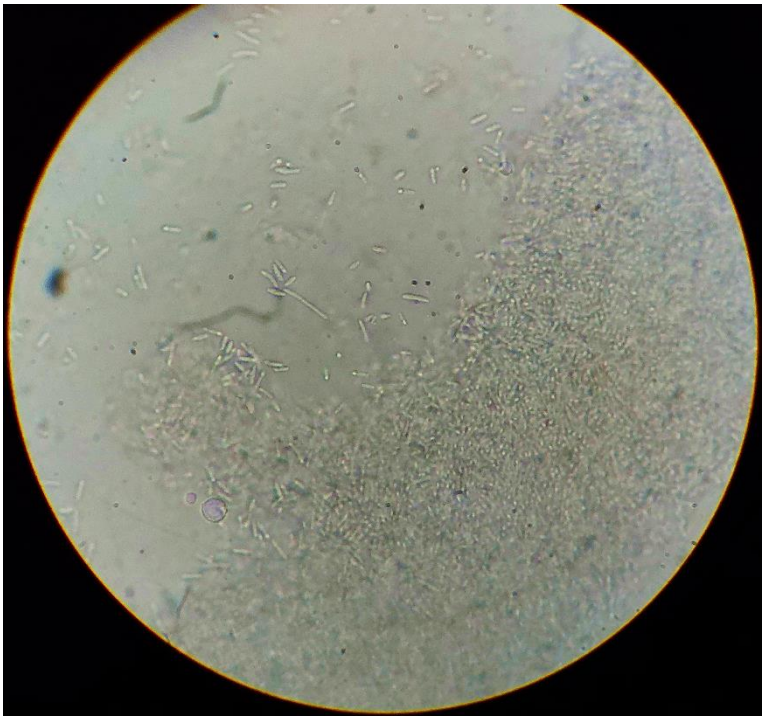
έχει σημαντικές επιπτώσεις στη γεωργία, καθώς εμπλέκεται στη συμβίωση μεταξύ ορισμένων φυτών και βακτηρίων, παρέχοντας έναν φιλικό προς το περιβάλλον τρόπο για την ενίσχυση της γονιμότητας του εδάφους. Συνεπώς η κατανόηση του τρόπου λειτουργίας αυτού του ενζύμου έχει εφαρμογές στη βιοτεχνολογία για την ανάπτυξη καλλιεργειών που δεσμεύουν το άζωτο.

1.6 *Clostridium pasteurianum*

Τα κλωστρίδια συνήθως χρωματίζονται θετικά κατά Gram, τα περισσότερα από αυτά είναι αυστηρά αναερόβια, μη θειικά αναγωγικά βακτήρια σε σχήμα ράβδου, ικανά να σχηματίσουν ενδοσπόρια. Το σχήμα και το μήκος των ράβδων μπορεί να ποικίλλει σημαντικά. Στην *Εικόνα 4* που ακολουθεί φαίνεται η μορφή του βακτηρίου σε μεγέθυνση 100Χ όπως λήφθηκε από το οπτικό μικροσκόπιο. Τα ενδοσπόρια μπορεί να είναι σφαιρικά ή ωοειδή, είναι εξαιρετικά ανθεκτικά στη θερμότητα, τις χημικές ουσίες και ως εκ τούτου μπορούν να επιβιώσουν σε δυσμενές περιβάλλον. Υπό ευνοϊκές συνθήκες, μπορούν πάλι να μετατραπούν σε πλήρως λειτουργικά βακτήρια. Αυτά μπορούν να βρεθούν στο έδαφος, στο νερό και στην εντερική οδό των ζώων, αλλά και των ανθρώπων [18,21]. Διαφορετικά είδη εντός του γένους μπορεί να έχουν διακριτούς ρόλους. Ορισμένα είναι πολύτιμα στο τομέα της ιατρικής και της βιομηχανίας, ενώ άλλα μπορεί να είναι επικίνδυνα για την υγεία του ανθρώπου. Για παράδειγμα το *Clostridium botulinum* μπορεί να παράγει αλλαντοτοξίνη σε τρόφιμα προκαλόντας αλλαντίαση, ενώ το *Clostridium tetani* προκαλεί τέτανο. Παράλληλα το *Clostridium acetobutylicum* χρησιμοποιείται για την παραγωγή ακετόνης, βουτανόλης και αιθανόλης μέσω της ζύμωσης [19].

Ένα άλλο είδος των κλωστρίδιων που έχει θετικό αντίκτυπο στο τομέα της βιοτεχνολογίας και στη παραγωγή αειφόρου ενέργειας, αποτελεί το *Clostridium pasteurianum* με το οποίο ασχολείται η παρούσα πτυχιακή εργασία. Αυτό το είδος έχει βρεθεί ότι μπορεί χρησιμοποιήσει τη γλυκερίνη ως μοναδική πηγή άνθρακα και να τη μετατρέψει σε σημαντικούς μεταβολίτες όπως: βουτανόλη, 1,3-προπανοδιόλη και αιθανόλη [22]. Αναλυτικότερα, είναι ο μόνος μικροοργανισμός που είναι γνωστός ότι μετατρέπει τη γλυκερίνη απευθείας σε βουτανόλη, η οποία επί του παρόντος αποτελεί βιοκαύσιμο υψηλής ενέργειας. Επιπλέον το *C. pasterianum* είναι γνωστό για την ικανότητά του να παράγει αέριο υδρογόνο μέσω σκοτεινής ζύμωσης [23] (βλέπε *Ενότητα 1.3.4*) ενώ παράλληλα αποτελεί ένα αζωτοδεσμευτικό βακτήριο συμβάλλοντας έτσι στον κύκλο του αζώτου, βελτιώνοντας τη γονιμότητα του εδάφους στα γεωργικά συστήματα. Παρόλα αυτά, η γενετική και ο

μεταβολισμός του οργανισμού παραμένουν ελάχιστα κατανοητές. Οι κατάλληλες συνθήκες pH για στελέχη *Clostridium* που παράγουν υδρογόνο κυμαίνονται από pH 4,5 έως pH 9,0 με τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες συνθήκες pH να κυμαίνονται μεταξύ: 6.5–8.0. Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη θερμοκρασία για την παραγωγή υδρογόνου είναι: 35–37 °C για τα μεσόφιλα βακτήρια όπως το *Clostridium pasterianum* [20,21]. Όλα τα παραπάνω επιδεικνύουν την πληθώρα εφαρμογών που παρέχει αυτό το βακτήριο. Η συνεχής έρευνα είναι απαραίτητη για την περαιτέρω διερεύνηση των δυνατοτήτων του, τη βελτιστοποίηση της απόδοσής του και την ανακάλυψη νέων πιθανών εφαρμογών.

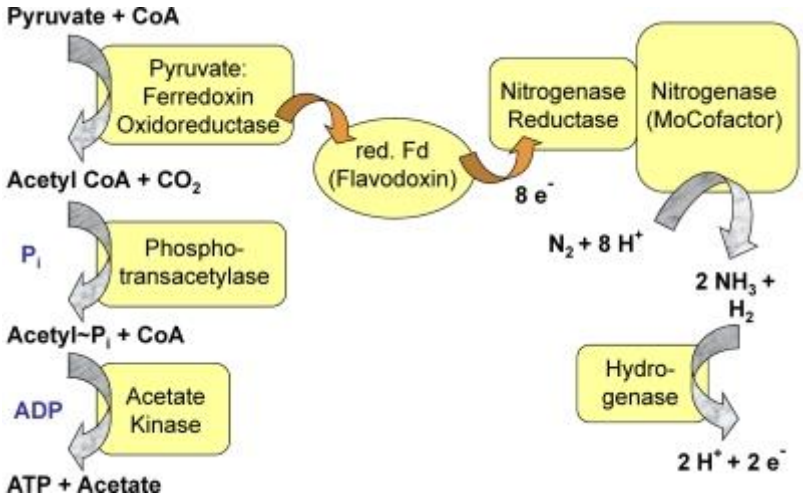


***Εικόνα 4**: Μορφολογικά χαρακτηριστικά του Clostridium pasteurianum κατά την ανάπτυξη του σε θρεπτικό μέσο Burk's Medium, όπως προέκυψε από τη παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο. Η εικόνα λήφθηκε από καλλιέργεια τριών ημέρων. Είναι εμφανές το ραβδοειδές σχήμα των βακτηριακών κυττάρων.*

1.7 Μελέτη συσχέτισης παραγωγής υδρογόνου και καθήλωσης αζώτου

Η παραγωγή υδρογόνου και η δέσμευση αζώτου είναι δύο διαφορετικές, αλλά στενά συνδεδεμένες διαδικασίες που συμβάλλουν στον κύκλο του αζώτου και στον μεταβολισμό των βακτηρίων. Δεν είναι πλήρως γνωστή η ακριβής συσχέτιση μεταξύ αυτών των δύο διαδικασιών για τα περισσότερα βακτήρια. Στην περίπτωση του βακτηρίου *C. pasteurianum*, το οποίο μελετάται σε αυτήν την εργασία, το υδρογόνο που παράγεται κατά την καθήλωση του αζώτου (*Εξίσωση 13*) ανακυκλώνεται μέσω της υδρογονάσης (*Εξίσωση 12*), με σκοπό να ελαχιστοποιηθεί η απώλεια ενέργειας κατά την διαδικασία κατάλυσης της νιτρογενάσης [29].

Αυτό απεικονίζεται με απλό τρόπο στην *Εικόνα 5* όπου φαίνεται η σχέση μεταξύ της αποδόμησης του πυροσταφυλικού, της καθήλωσης του αζώτου και της παραγωγής και πρόσληψης υδρογόνου, όπως συμβαίνει στο *Clostridium pasteurianum.* Επισημαίνεται ότι ποσότητα υδρογόνου μπορεί να παραχθεί ανεξάρτητα από την καθήλωση του αζώτου και από άλλες διαδικασίες, όπως για παράδειγμα ως τελικό προϊόν ζύμωσης. Αυτό το γεγονός καθιστά τη μελέτη συσχέτισης παραγωγής υδρογόνου και καθήλωσης αζώτου αρκετά δύσκολη. Η μελέτη ύπαρξης κάποιας σύνδεσης μεταξύ του μεταβολισμού του αζώτου και των οδών παραγωγής υδρογόνου είναι πιθανό να διερευνήσει τον αντίκτυπο της διαθεσιμότητας αζώτου στην παραγωγή υδρογόνου και να αποκαλύψει νέους ρυθμιστικούς μηχανισμούς που συνδέουν αυτές τις διαδικασίες.



Εικόνα 5*: Σύνδεση μεταξύ παραγωγής υδρογόνου και καθήλωσης αζώτου. Κατά τον καταβολισμό ενός μορίου πυροσταφυλικού απελευθερώνονται ηλεκτρόνια τα οποία συντελούν στην καθήλωση αζώτου από την νιτρόγεναση για την παραγωγή αμμωνίας και υδρογόνου. Στη συνέχεια η υδρογονάση η οποία λειτουργεί αντιστρεπτά μπορεί να μετατρέψει το παραγόμενο υδρογόνο σε πρωτόνια [29].*

1.8 Φάσεις ανάπτυξης μικροοργανισμών.

Η ανάπτυξη κυττάρων μικροοργανισμών σε μια καλλιέργεια αποτελείται από τις εξής φάσεις:

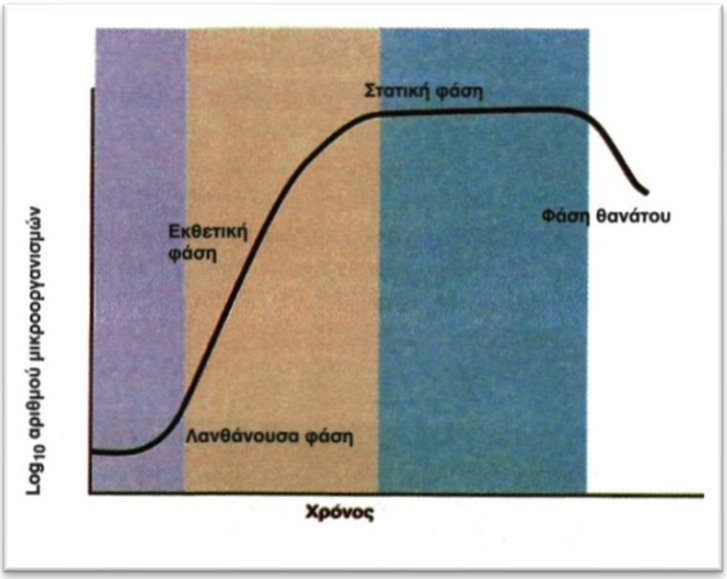
Λανθάνουσα: Κατά τη φάση αυτή ο μικροοργανισμός προσαρμόζεται στο νέο περιβάλλον για αυτό τον λόγο δεν παρατηρείται ιδιαίτερη κυτταρική ανάπτυξη.

Εκθετική: Κατά τη φάση αυτή, ο μικροοργανισμός έχει προσαρμοστεί στο νέο περιβάλλον και για αυτό αυξάνει με εκθετικό ρυθμό τον αριθμό των κυττάρων του μέσω διαίρεσης. Αυτό γίνεται εξαιτίας της ικανότητάς του να χρησιμοποιεί τα θρεπτικά συστατικά που είναι διαθέσιμα στο περιβάλλον ενώ παράλληλα παράγει μεταβολίτες.

Στατική: Κάποια στιγμή, ο μικροοργανισμός φθάνει σε ένα σημείο όπου ο αριθμός των κυττάρων που πεθαίνουν εξισορροπείται με τον αριθμό των νέων κυττάρων που παράγονται. Τα κύτταρα πεθαίνουν επειδή τα θρεπτικά συστατικά εξαντλούνται και οι μεταβολίτες που παράγονται μπορεί να είναι τοξικοί. Κατά τη φάση αυτή, ο ρυθμός ανάπτυξης επιβραδύνεται και ο μικροοργανισμός διατηρεί σταθερό αριθμό κυττάρων.

Φάση Θανάτου: Ο αριθμός των κυττάρων που πεθαίνουν είναι μεγαλύτερος από αυτόν που αναπτύσσονται.

Οι φάσεις που προαναφέρθηκαν φαίνονται στην *Εικόνα 6*. Επισημαίνεται ότι ο χρόνος διάρκειας της κάθε φάσης διαφέρει μεταξύ των μικροοργανισμών, αλλά και των συνθηκών ανάπτυξης [11].



***Εικόνα 6**: Καμπύλη ανάπτυξης μικροοργανισμού σε κλειστή καλλιέργεια [11].*

1.9 Χαρακτηριστικά απόβλητων τυροκομείου

Η διαδικασία παραγωγής του τυριού παράγει τρεις διαφορετικούς τύπους αποβλήτων οι οποίοι αποτελούν τον όρο γάλακτός η αλλιώς τυρόγαλα. Το πρωτογενές τυρόγαλα (cheese whey – CW) που παράγεται κατά την επεξεργασία του γάλακτος για την παραγωγή τυριών, όπως γραβιέρα και φέτα. Στη συνέχεια, προκύπτει το δευτερογενές τυρόγαλα (second cheese whey – SCW), το οποίο παράγεται κατά την επεξεργασία του πρωτογενούς τυρογάλακτος για την παραγωγή τυριών τυρογάλακτος όπως μυζήθρα ή μανούρι. Τέλος, στο τελευταίο στάδιο, παράγεται το μίγμα αποβλήτων (cheese whey wastewater – CWW), το οποίο αποτελείται από νερά πλυσίματος και διάφορα κλάσματα πρωτογενούς και δευτερογενούς τυρογάλακτος. Το βιοχημικό περιεχόμενο κάθε κλάσματος διαφέρει ανάλογα με το στάδιο παραγωγής από το οποίο συλλέγεται [27].

Το τυρόγαλα αποτελεί ένα δύσκολα διαχειρίσιμο απόβλητο καθώς είναι πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά και άρα μπορεί να αποτελέσει εστία ανάπτυξης ανεπιθύμητων μικροοργανισμών [28]. Για αυτό τον σκοπό κρίνεται απαραίτητη η συνεχής έρευνα για την εύρεση νέων, πιο βιώσιμων μεθόδων διαχείρισης των απορριμμάτων τυροκομείων, αλλά και ακόμη καλύτερα, η αξιοποίηση τους για την παραγωγή ενέργειας. Τα προηγούμενα αποσκοπούν τόσο την προστασία του περιβάλλοντος όσο και την εξοικονόμηση και για αυτό αποτελούν αντικείμενο της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

1.10 Σκοπός διπλωματικής εργασίας

Η παρούσα διπλωματική εργασία έχει ως σκοπό να παράσχει πολύτιμες γνώσεις για τη δυναμική ανάπτυξης, τις προτιμήσεις υποστρώματος και τις πιθανές εφαρμογές του βακτηρίου *Clostridium pasterianum*, με την ελπίδα να θέσει τις βάσεις για περαιτέρω έρευνα στην ανάπτυξη βιώσιμων και φιλικών προς το περιβάλλον διαδικασιών παραγωγής βιοϋδρογόνου.

Για την επίτευξη αυτού του στόχου, δημιουργήθηκαν καλλιεργείες του βακτηρίου σε διαφορετικές συνθήκες, στις οποίες γινόταν λήψη μετρήσεων οπτικής πυκνότητας και ποσότητας υδρογόνου για τις πρώτες ημέρες ανάπτυξης του. Επιπλέον, σε κάποιες από αυτές τις καλλιέργειες έγιναν μετρήσεις της ποσότητας του αζώτου για την διερεύνηση της σχέσης της παραγωγής βιολογικού υδρογόνου με την καθήλωση του αζώτου. Όλα τα προηγούμενα στοχεύουν στο να αποσαφηνιστούν τα μεταβολικά μονοπάτια του βακτηρίου και οι συνθήκες υπό τις οποίες η παραγωγή υδρογόνου είναι βέλτιστη.

Τέλος, κύριο στόχο της παρούσας εργασίας αποτελεί η διερεύνηση για το εάν το *Clostridium pasteurianum* μπορεί να συμβάλει στην αειφόρο αξιοποίηση αποβλήτων τυροκομείου, με το να αναπτύσσεται σε αυτά, παράγοντας βιοϋδρογόνο το οποίο αποτελεί ένα πολύτιμο ενεργειακά προϊόν.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Συνθήκες Ανάπτυξης *Clostridium pasteurianum*

2.1.1 Θρεπτικά Μέσα

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε ένα βακτήριο του γένους των κλωστριδίων και συγκεκριμένα το είδος «*pasteurianum*» το οποίο αναπτύχθηκε σε συμβατικά θρεπτικά μέσα. Ο μικροοργανισμός απομονώθηκε από το χώμα και χαρακτηρίσθηκε γενετικά και μορφολογικά σε άλλες μελέτες του εργαστηρίου. Για την ανάπτυξη του βακτηρίου χρησιμοποιήθηκε το υγρό θρεπτικό μέσο Burk's Medium ενώ παράλληλα διερευνήθηκε και η ανάπτυξη του και σε άλλα υγρά θρεπτικά μέσα όπως τα εξής: YEMB (Yeast Extract Mannitol Broth), YESB (Yeast Extract Sucrose Broth), M3 και Jensen's. Επισημαίνεται ότι το θρεπτικό μέσο YESB αποτελεί τροποποίηση του θρεπτικού μέσου YEMB όπου αντί για το σάκχαρο μαννιτόλη περιλαμβάνει τη σουκρόζη ως κύρια πηγή άνθρακα. Επιπλέον, στα πειράματα ανάπτυξης βακτηρίου σε διαφορετική συγκέντρωση σακχάρων όπου χρησιμοποιήθηκε Burk's Medium αντί για μαννιτόλη, προστέθηκε η κατάλληλη ποσότητα από το εκάστοτε σάκχαρο.

Γενικά τα θρεπτικά μέσα πρέπει να περιέχουν πηγή άνθρακα, πηγή αζώτου και άλλα ανόργανα ιόντα. Οι πηγές αζώτου περιλαμβάνουν αμμωνία, νιτρικά, αλλά και αμινοξέα ή πεπτίδια. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων, όπως το *Clostridium pasteurianum*, είναι ότι έχουν τη δυνατότητα να καθηλώνουν το ατμοσφαιρικό άζωτο σε αφομοιώσιμες μορφές. Επομένως, αυτοί οι οργανισμοί μπορούν να επιβιώσουν και να αναπτυχθούν και σε θρεπτικά μέσα που δεν περιέχουν άλλες πηγές αζώτου εκτός του μοριακού αζώτου [32]. Στα πειράματα της εργασίας, όλες οι καλλιέργειες του μικροοργανισμού αναπτύχθηκαν σε κλειστό σύστημα, υπό κορεσμένη ατμόσφαιρα αζώτου. Αυτό εξυπηρέτησε στην απομάκρυνση του οξυγόνου, το οποίο είναι καταστροφικό για τη νιτρογενάση και την υδρογονάση. Έτσι εξασφαλίστηκαν οι συνθήκες τόσο για την καθήλωση του αζώτου, όσο και για την παραγωγή υδρογόνου.

Παρακάτω παρατίθενται τα συστατικά που περιέχει το κάθε θρεπτικό αλλά και το pH στο οποίο ρυθμίζονται. Μεταξύ των επιμέρους συστατικών που περιέχονται στα θρεπτικά μέσα, το Na_2MoO_4 αυξάνει τη δέσμευση του αζώτου, το NaCl διατηρεί την ωσμωτική ισορροπία των μέσων ενώ το ασβέστιο και το μαγνήσιο παρέχουν κατιόντα απαραίτητα για την ανάπτυξη του βακτηρίου [30]. Επίσης το yeast extract χρησιμεύει ως πηγή αμινοξέων, περιέχει σύμπλεγμα βιταμινών B και αυξητικούς παράγοντες, δημιουργώντας ένα δυναμικό οξείδωσης [31].

Πίνακας 2: *Συστατικά θρεπτικού μέσου Burk's Medium.*

Burk's Medium	
Συστατικά	**Ποσότητα (g L^{-1})**
$MgSO_4 \bullet 7H_2O$	0.41
K_2HPO_4	0.8
$KHPO_4$	0.2
$CaSO_4$	0.13
$FeCl_3 \bullet 6H_2O$	0.00242
Na_2MoO_4	0.000297
Μαννιτόλη	20

Το pH ρυθμίζεται στο 7.1 με την χρήση HCl

Πίνακας 3: *Συστατικά θρεπτικού μέσου YEMB*

YEMB (Yeast Extract Mannitol Broth)	
Συστατικά	**Ποσότητα (g L^{-1})**
Yeast extract	1
Μαννιτόλη	10
K_2HPO_4	0.5
$MgSO_4 \bullet 7H_2O$	0.2
NaCl	0.1
$CaCO_3$	1

Το pH ρυθμίζεται στο 6.8 με την χρήση HCl ή KOH

Πίνακας 4: *Συστατικά θρεπτικού μέσου YESB*

YESB (Yeast Extract Sucrose Broth)	
Συστατικά	**Ποσότητα (g L^{-1})**
Yeast extract	1
Σουκρόζη	10
K_2HPO_4	0.9790
$KHPO_4$	0.1859
$MgSO_4 \bullet 7H_2O$	0.2
NaCl	0.1
$CaCO_3$	0.5

Το pH ρυθμίζεται στο 7.5 με την χρήση HCl ή KOH

Πίνακας 5: *: Συστατικά θρεπτικού μέσου M3*

M3 Medium	
Συστατικά	**Ποσότητα (g L^{-1})**
Σουκρόζη	10
K_2HPO_4	1.0
$MgSO_4 \bullet 7H_2O$	0.5
$NaCl$	0.2
$CaCO_3$	20.0
$FeSO4 \bullet 7H_2O$	1.0

Το pH ρυθμίζεται στο 7.2 με την χρήση HCl ή KOH

Πίνακας 6: *: Συστατικά θρεπτικού μέσου Jensen's Medium*

Jensen's Medium	
Συστατικά	**Ποσότητα (g L^{-1})**
Σουκρόζη	20
K_2HPO_4	1.0
$MgSO_4 \bullet 7H_2O$	0.5
$FeSO_4$	0.1
$CaCO_3$	2.0
$FeSO4 \bullet 7H_2O$	1.0
Na_2MoO_4	0.005
$NaCl$	0.5

Το pH ρυθμίζεται στο 7.0 με την χρήση HCl ή KOH

2.1.2 Παρασκευή καλλιεργειών

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε υγρές καλλιέργειες των κυττάρων του στελέχους *Clostridium pasteurianum*. Σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκαν γυάλινα μπουκαλάκια χωρητικότητας 120 mL, στα οποία προστέθηκαν 50 mL θρεπτικού μέσου. Τα δείγματα εμβολιάστηκαν με το βακτήριο μεταφέροντας μια γνωστή ποσότητα από μητρικές καλλιέργειες στα μπουκαλάκια. Τα μπουκαλάκια σφραγίστηκαν ερμητικά με butyl septa και μεταλλικά δακτυλίδια, δημιουργώντας ένα κλειστό σύστημα, όπως φαίνεται στην *Εικόνα 7*. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε απαέρωση με αέριο άζωτο για 2 λεπτά ανά μπουκαλάκι και έπειτα τα μπουκαλάκια τοποθετήθηκαν σε οριζόντιο περιστροφικό αναδευτήρα στα 140 rpm στους 32°C για 6-7 ημέρες (αναλόγως το πείραμα). Επισημαίνεται ότι τα θρεπτικά μέσα αλλά

και τα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν πριν από κάθε διαδικασία παρασκευής των πειραματικών καλλιεργειών αποστειρώνονταν σε αυτόκαυστο στους 120°C για 20 λεπτά για την αποφυγή επιμολύνσεων.

***Εικόνα 7**: Μπουκαλάκι (serum bottle) το οποίο κλείνει αεροστεγώς ώστε να αναπτυχθεί ο μικροοργανισμός, επιτρέποντας την μέτρηση του παραγόμενου αερίου στον κενό χώρο πάνω από την καλλιέργεια [I].*

2.2 Μετρήσεις παραγόμενου υδρογόνου με αέρια χρωματογραφία (GC-TCD)

Η παραγωγή υδρογόνου μετρούταν σε αέριο χρωματογράφο με ανιχνευτή θερμικής αγωγιμότητας (GC – TCD) με το όργανο Shimadzu GC 2010 Plus, στο Τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης. Χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής θερμικής αγωγιμότητας (TCD) και τριχοειδής στήλη Vici Metronics MC (Poulsbo, USA) μήκους 30 m, διαμέτρου 0,53 mm και στατικής φάσης πάχους 20 μm. Για να διαχωριστούν τα αερία χρησιμοποιήθηκε Αργό (Ar) ως το φέρον αέριο, με πίεση 5 bar. Η θερμοκρασία του φούρνου που βρισκόταν η στήλη ήταν 120°C, του ανιχνευτή TCD στους 200°C ενώ του injector στους 180°C. Η μέτρηση υδρογόνου από τις καλλιέργειες πραγματοποιείται τρυπώντας τα seprta με σύριγγα ινσουλίνης χωρητικότητας 500 μL ενώ ποσότητα που λαμβάνεται από τις καλλιέργειες ώστε να γίνει ένεση στον χρωματογράφο είναι 200 μL. Οι παράμετροι του οργάνου παρατίθενται στον πίνακα που ακολουθεί:

***Πίνακας 7**: Παράμετροι χειρισμού αέριου χρωματογράφου με ανιχνευτή TCD.*

Παράμετροι Χειρισμού GC-TCD	
Φέρον αέριο	Αργό
Θερμοκρασία injector	180.0 °C
Πίεση	59.8 kPa
Ολική ροή	42.8 mL/min
Purge ρόη	Κλειστή
Θερμοκρασία στήλης	60.0 °C

Θερμοκρασία ανιχνευτή	200.0 °C
Ροή makeup αερίου	8.0 mL/min

Προκειμένου να προσδιοριστεί η ποσότητα του H_2 που παράγεται, χρησιμοποιήθηκε μια πρότυπη καμπύλη, κατά την οποία πραγματοποιήθηκαν ενέσεις γνωστής ποσότητας καθαρού H_2 στον αέριο χρωματογράφο. Ανάλογα, δημιουργήθηκαν πρότυπες καμπύλες για τις ποσότητες του N_2 και O_2. Όσον αφορά τις μετρήσεις της ποσότητας του O_2 χρησιμοποιήθηκαν ως απόδειξη ότι η απαέρωση του θρεπτικού μέσου ήταν αποτελεσματική. Οι εξισώσεις που προέκυψαν, χρησιμοποιήθηκαν για να προσδιοριστούν οι ποσότητες του H_2 και του N_2 σε mL L^{-1} που παρήγαγε η κάθε βακτηριακή καλλιέργεια και παρατίθενται παρακάτω:

<u>Ποσότητα H_2 για τιμές εμβαδού κορυφής χρωματογραφήματος μικρότερες από 10^6:</u>

$$H_2(mL\ L^{-1}culture^{-1}) = \frac{Εμβαδόν\ Κορυφής - 3013.8249}{18631.9517} \quad (15)$$

<u>Ποσότητα H_2 για τιμές εμβαδού κορυφής χρωματογραφήματος μεγαλύτερες από 10^6:</u>

$$H_2\ (mL\ L^{-1}culture^{-1}) = \frac{Εμβαδόν\ Κορυφής - 143969.9912}{165614.47492} \quad (16)$$

<u>Ποσότητα N_2:</u>

$$N_2\ (mL\ L^{-1}culture^{-1}) = \frac{Εμβαδόν\ Κορυφής - 1957.07224}{1669.90256} \quad (15)$$

2.3 Προσδιορισμός κυτταρικής ανάπτυξης με την χρήση φασματοφωτομετρίας ορατού

Η μέτρηση της βακτηριακής ανάπτυξης χρησιμοποιώντας την ορατή φασματοφωτομετρία, που συχνά αναφέρεται ως μέτρηση οπτικής πυκνότητας (OD), είναι μια κοινή και εύκολη μέθοδος στη μικροβιολογία. Αναλυτικότερα αυτή η μέθοδος μετρά τον βαθμό σκέδασης φωτός (600 nm) που προκαλείται από την παρουσία σωματιδίων σε διάλυμα ή μέσο καλλιέργειας [26]. Οι βακτηριακές καλλιέργειες σκεδάζουν φως και η ποσότητα του φωτός που σκεδάζεται είναι ανάλογη με την πυκνότητα των βακτηριακών κυττάρων στην

καλλιέργεια. Αυτό μετριέται ως οπτική πυκνότητα. Ο νόμος Beer-Lambert ισχύει μόνο για διαλύματα στα οποία τα μόρια της διαλυμένης ουσίας είναι ομοιόμορφα κατανεμημένα σε όλο τον διαλύτη, ενώ δεν ισχύει για εναιωρήματα σωματιδίων όπως μικροβιακά κύτταρα. Αυτά αντί να απορροφούν το φως το διασκορπίζουν, γι' αυτό και εκφράζεται ως O.D (οπτική πυκνότητα) αντί για A (απορρόφηση). Όσο περισσότεροι μικροοργανισμοί υπάρχουν στο διάλυμα, τόσο περισσότερο φως διασκορπίζεται από αυτά [24].

Επιλέγονται τα 600 nm ειδικά για τη μέτρηση της βακτηριακής O.D επειδή είναι το γνωστό μήκος κύματος που είναι ασφαλές και δεν είναι επιβλαβές για τα βακτήρια σε σύγκριση με άλλα μήκη κύματος UV. Επιπλέον, άλλα μήκη κύματος μπορούν να σκεδάσουν το φως όταν συναντήσουν DNA, RNA ή πρωτεΐνες. Επίσης, σε αυτό το μήκος κύματος η απορρόφηση σε μικροβιακά είδη και οργανική διαλυμένη ύλη στο νερό είναι πολύ μικρή και μόνο η σκέδαση παίζει βασικό ρόλο [25].

Για την μέτρηση οπτικής πυκνότητας OD χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο υπεριώδους - ορατού Shimazdu UV – 2700 ενώ για το blank χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο χωρίς κύτταρα. Τέλος χρησιμοποιήθηκαν πλαστικές κυψελίδες αφού το μήκος κύματος μέτρησης αντιστοιχεί στο ορατό.

2.4 Παρατήρηση δειγμάτων σε οπτικό μικροσκόπιο

Για την παρατήρηση των δειγμάτων καλλιεργειών χρησιμοποιήθηκε το οπτικό μικροσκόπιο Nikon SC Binocular Microscope. Χρησιμοποιήθηκε ένας ελαιοβυθιζόμενος αντικειμενικός φακός μεγέθυνσης 100X, και η συνολική μεγέθυνση στην οποία παρατηρήθηκαν τα δείγματα ήταν στα 1000X. Μερικά από τα δείγματα παρατηρούνταν στο μικροσκόπιο σε περιπτώσεις που χρειαζόταν να διακριβωθεί εάν η καλλιέργεια έχει μολυνθεί από κάποιον άλλο μικροοργανισμό.

2.5 Δείγματα υγρών γαλακτοκομικών αποβλήτων

2.5.1 Δειγματοληψία και προκατεργασία των αποβλήτων

Τα δείγματα αποβλήτων τυροκομείων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή ήταν ορός γάλακτος (τυρόγαλα) και προμηθεύτηκαν από ένα τοπικό τυροκομείο στον νομό Ρεθύμνου στην Κρήτη. Πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία από το δευτερογενές στάδιο παραγωγής, όπου παρασκευάζεται το τυρί ανθότυρος. Όλα τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20°C. Η ανάλυση των φυσικοχημικών παραμέτρων πραγματοποιήθηκε από τα συνεργαζόμενα

εργαστήρια «ΧΗΜΙΚΟΤΕΧΝΙΚΗ» στον νομό Ρεθύμνου, στην Κρήτη, χρησιμοποιώντας τεχνικές που βασίζονται σε πρωτόκολλα της APHA.

Πριν τη χρήση τους στα πειράματα, ήταν απαραίτητη η προκατεργασία τους. Αρχικά, τα δείγματα τυρογάλακτος υπέστησαν αποστείρωση σε αυτόκαυστο για 20 λεπτά, με σκοπό την αποφυγή ανάπτυξης μικροβιακών επιμολύνσεων από το περιβάλλον και τη φυσική μικροχλωρίδα του γάλακτος. Μετά την αποστείρωση παρατηρήθηκε ο σχηματισμός στερεών συσσωματωμάτων, λόγω μετουσίωσης των πρωτεϊνών του γάλακτος. Καθώς τα στερεά αυτά θα προκαλούσαν σημαντικές παρεμποδίσεις στις μετρήσεις οπτικής πυκνότητας, πραγματοποιήθηκε απομάκρυνσή τους. Για αυτό το σκοπό, τα δείγματα φυγοκεντρίθηκαν στα 5000x*g* για 10 min και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε απόχυση για συλλογή του υπερκείμενου υγρού.

2.5.2 Ενζυμική υδρόλυση λακτόζης

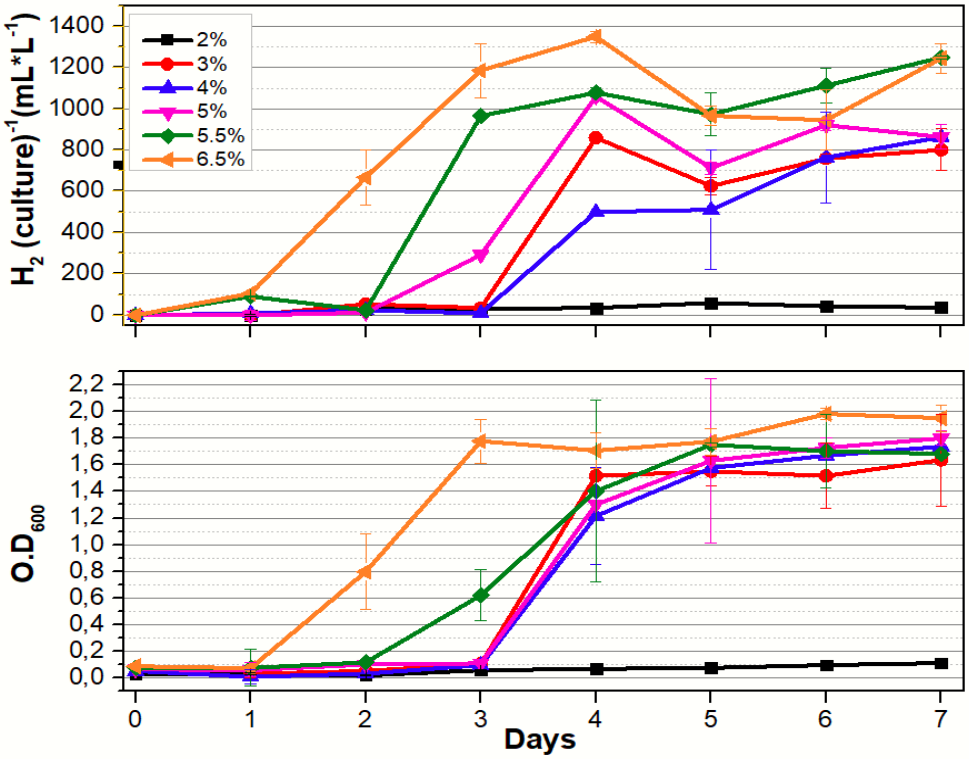
Στα πειράματα που μελετήθηκε η ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε τυρόγαλα, στο οποίο είχε πραγματοποιηθεί υδρόλυση της λακτόζης. Η υδρόλυση πραγματοποιήθηκε ενζυμικά με το εμπορικά διαθέσιμο σκεύασμα Lamberts Lactase Complex 350mg (9000FCC). Χρησιμοποιήθηκαν 39 mg σκευάσματος/100 mL τυρογάλακτος, ποσότητα που αντιστοιχεί σε ενεργότητα ενζύμου 10 U/mL. Η ενζυμική υδρόλυση πραγματοποιήθηκε σε pH=4,5 και έλαβε χώρα σε κωνικές φιάλες χωρητικότητας 250 mL, με όγκο δείγματος 100 mL σε incubator σταθερής θερμοκρασίας στους 55 °C για 4,5 h, υπό οριζόντια ανάδευση στα 80 rpm, εξασφαλίζοντας της πλήρη υδρόλυση της λακτόζης. Έπειτα, συλλέχθηκε το υδρολυμένο τυρόγαλα, το pH ρυθμίστηκε στο 7,5 και πραγματοποιήθηκαν οι κατάλληλες αραιώσεις με απιονισμένο νερό ή με το θρεπτικό μέσο Burk's medium, όπως περιγράφονται και στην αντίστοιχη πειραματική σειρά. Τα δείγματα αποστειρώθηκαν ξανά για την αποφυγή τυχών επιμολύνσεων, αλλά και για την αδρανοποίηση του ενζύμου. Η καλλιέργεια του βακτηρίου στο υδρολυμένο τυρόγαλα πραγματοποιήθηκε σε κλειστό σύστημα στα γυάλινα μπουκαλάκια, ακολουθώντας με την ίδια διαδικασία με παραπάνω.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Μελέτη ανάπτυξης του βακτήριού σε καλλιέργειες με διαφορετική αρχική κυτταρική συγκέντρωση

Όπως προαναφέρθηκε στην *Ενότητα 2.1.2,* τα δείγματα εμβολιάστηκαν με το βακτήριο μεταφέροντας μια γνωστή ποσότητα από μητρικές καλλιέργειες στα μπουκαλάκια με το θρεπτικό. Στις ακόλουθες πειραματικές σειρές, πρωταρχικός στόχος είναι η μελέτη της επίδρασής της ποσότητας εμβολιασμού της μητρικής καλλιέργειας στην κυτταρική ανάπτυξη, αλλά και στην παραγωγή υδρογόνου για τις πρώτες 7 ημέρες ανάπτυξης του βακτηρίου. Το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης του μικροοργανισμού στις σειρές αυτές ήταν το Burk's Medium. Ταυτόχρονα, μελετήθηκε η σχέση παραγωγής υδρογόνου με την καθήλωση αζώτου στις εν λόγω συνθήκες. Οι πιο συχνές ποσότητες εμβολιασμού για καλλιέργειες *Clostridium* σύμφωνα με την βιβλιογραφία, μπορεί να κυμαίνονται από 1% έως 5% (v/v) ή περισσότερο [33]. Ωστόσο, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι αυτές οι τιμές παρέχουν γενικές κατευθυντήριες γραμμές και μπορεί να χρειαστεί να βελτιστοποιηθούν με βάση τα ειδικά χαρακτηριστικά του στελέχους *Clostridium* και τις πειραματικές συνθήκες. Αυτός είναι και ο στόχος της μελέτης της συγκεκριμένης ενότητας, να προσδιοριστεί δηλαδή η βέλτιστη ποσότητα μητρικής καλλιέργειας που πρέπει να προστίθεται σε κάθε δείγμα, για την πραγματοποίηση των επόμενων πειραμάτων. Για αυτόν τον σκοπό λήφθηκαν ποσότητες μητρικής καλλιέργειας ώστε η συγκέντρωση της στα δείγματα να είναι: 2%, 3%, 4%, 5%, 5.5% και 6.5% v/v. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα διαγράμματα που ακολουθούν:

3.1.1 Επίδραση αρχικής κυτταρικής συγκέντρωσης στην κυτταρική ανάπτυξη και στην παραγωγή υδρογόνου



Εικόνα 8: *Καμπύλη ανάπτυξης Clostridium pasteurianum σε καλλιέργειες Burk's Medium που διέφεραν ως προς την αρχική κυτταρική συγκέντρωση. Συγκεκριμένα αναπαριστώνται οι τιμές οπτικής πυκνότητας στα 600 nm και η ποσότητα του υδρογόνου σε mL L^{-1} $culture^{-1}$ που παράγεται για τις πρώτες 7 ήμερες ανάπτυξης του βακτηρίου. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε τριπλέτα δειγμάτων και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση.*

Από το παραπάνω διάγραμμα είναι εμφανής ότι στην συνθήκη που η συγκέντρωση της μητρικής στο θρεπτικό ήταν 2% (χαμηλότερη συγκέντρωση) δεν υπήρξε καμία ανάπτυξη αφού όλες τις ημέρες δεν παράγεται καθόλου υδρογόνο και οι τιμές του O.D προσεγγίζουν το μηδέν. Συνεπώς αναμένεται ότι για συγκέντρωση μικρότερη από 2% ο κυτταρικός πληθυσμός δεν επαρκεί ώστε το βακτήριο να αναπτυχθεί και να παράγει υδρογόνο. Τη $2^{η}$ μέρα ανάπτυξης φαίνεται ότι υπάρχει κυτταρική ανάπτυξη και παραγωγή υδρογόνου μόνο στη συνθήκη που η συγκέντρωση της μητρικής στο θρεπτικό ήταν 6.5% (υψηλότερη συγκέντρωση) ενώ τη $3^{η}$ μέρα ακολουθεί και η συνθήκη με 5.5% συγκέντρωση. Άρα παρατηρείται, όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα μητρικής εμβολιασμού των δειγμάτων τόσο πιο γρήγορη είναι η κυτταρική ανάπτυξη αλλά και η παραγωγή σε βιοϋδρογόνο. Από την $4^{η}$ μέρα και μετά φαίνεται το βακτήριο να αναπτύσσεται και στις υπόλοιπες συνθήκες. Την $4^{η}$ μέρα της καμπύλης υπάρχει μια πτώση στις τιμές του υδρογόνου και από την $5^{η}$ μέρα και μετά μια μικρή άνοδος. Όσον

αφορά την οπτική πυκνότητα για τις συνθήκες 3%, 4% και 5% αυξάνεται απότομα από την 3η στη 4η μέρα και τις υπόλοιπες 3 μέρες της καμπύλης υπάρχει μια μικρή ανοδική αύξηση για όλες τις συνθήκες (εκτός τη 2% που δεν υπήρξε καμία ανάπτυξη). Από την *Εικόνα 7* συμπεραίνεται ότι όσο μεγαλύτερη είναι η αρχική κυτταρική συγκέντρωση της μητρικής καλλιέργειας, τόσο μεγαλύτερη ποσότητα υδρογόνου παράγεται αλλά και με πιο ταχύ ρυθμό κάτι που είναι αναμενόμενο, αφού τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται με εκθετικό τρόπο. Ωστόσο, στις συνθήκες οπού η αρχική κυτταρική συγκέντρωση ήταν 5.5% και 6.5%, παρατηρείται ότι εάν και η ανάπτυξη προηγείται για την περίπτωση 6.5%, την 7η ημέρα καλλιέργειας η συγκέντρωση του υδρογόνου είναι ιδία και στις δύο αυτές περιπτώσεις.

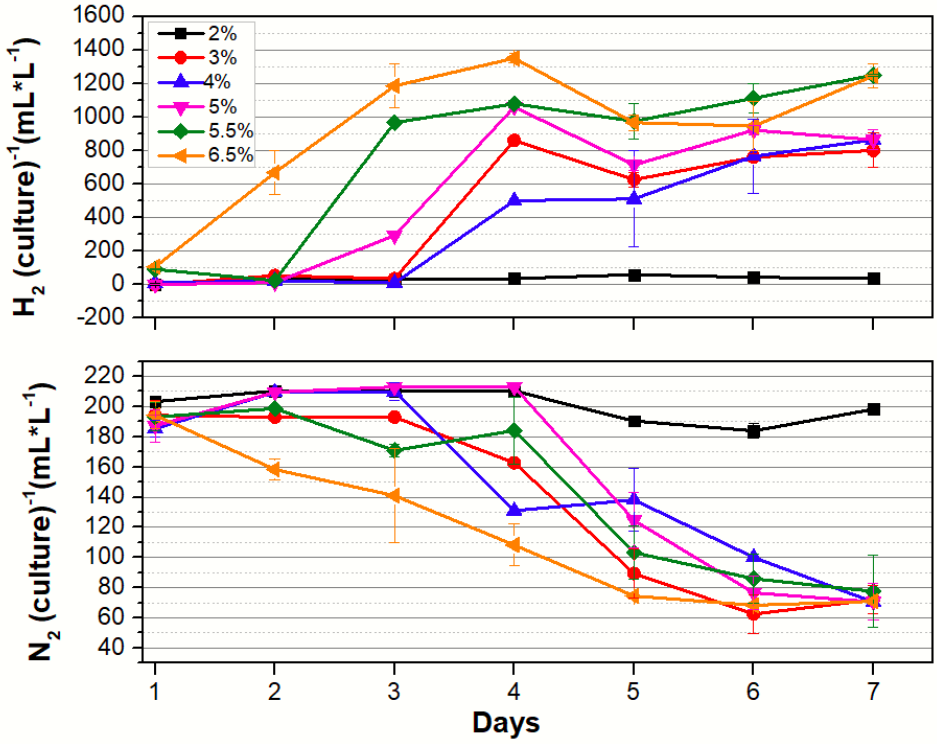
Επιπλέον για την ανάπτυξη του βακτηρίου καθοριστικό παράγοντα δεν αποτελεί μόνο η ποσότητα της μητρικής που εισάγεται, αλλά και η τιμή της οπτικής της πυκνότητας. Για την κατασκευή του Διαγράμματος της *Εικόνας 8* η μητρική καλλιέργεια που χρησιμοποιήθηκε είχε O.D=1.358. Με τον νόμο της αραίωσης μπορεί να βρεθεί η οπτική πυκνότητα που αντιστοιχεί σε κάθε συνθήκη για την ημέρα μηδέν. Οι τιμές παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα. Τα αποτελέσματα της εν λόγω πειραματικής σειράς ήταν καθοριστικά για τον σχεδιασμό των επόμενων πειραμάτων. Πιο συγκεκριμένα σε κάθε πείραμα επιδιωκόταν η οπτική πυκνότητα της μητρικής στο θρεπτικό να είναι πάνω από 0.065 (συγκέντρωση 5%) ώστε να εξασφαλιστεί η επαρκής κυτταρική ανάπτυξη και παραγωγή βιοϋδρογόνου.

Πίνακας 8*: Η κάθε καλλιέργεια ανάλογα με την ποσότητα εμβολιασμού σε μητρική καλλιέργεια αντιστοιχίζεται με την οπτική πυκνότητα που έχει η καλλιέργεια την ημέρα μηδέν της ανάπτυξης.*

Ποσότητα μητρικής καλλιέργειας	**$O.D_{600}$ ημέρα 0**
2%	0.027
3%	0.040
4%	0.052
5%	0.065
5.5%	0.077
6.5%	0.089

3.1.2 Μελέτη σχέσης παραγωγής υδρογόνου με την καθήλωση αζώτου σε καλλιέργειες βακτηρίου με διαφορετική αρχική κυτταρική συγκέντρωση

Η καθήλωση αζώτου και η παραγωγή υδρογόνου είναι δύο διακριτές αλλά στενά συνδεδεμένες διαδικασίες που παίζουν ρόλο στον κύκλο του αζώτου και στον μεταβολισμό των βακτηρίων. Η διασύνδεση μεταξύ παραγωγής υδρογόνου και δέσμευσης αζώτου δεν είναι πλήρως κατανοητή σε όλα τα βακτήρια. Όπως αναφέρεται στην *Ενότητα 1.5.1* για το βακτήριο *Clostridium pasteurianum* με το οποίο ασχολείται η παρούσα εργασία, θεωρείται ότι η υδρογονάση ανακυκλώνει το υδρογόνο που παράγεται στη καθήλωση του αζώτου, ελαχιστοποιώντας έτσι την απώλεια ενέργειας κατά την δράση της νιτρογενάσης. Επειδή όμως ποσότητα υδρογόνου μπορεί να παραχθεί ανεξάρτητα από την καθήλωση του αζώτου και από άλλες διαδικασίες όπως για παράδειγμα ως τελικό προϊόν ζύμωσης, η μελέτη της συσχέτισης παραγωγής υδρογόνου και καθήλωσης αζώτου καθίσταται αρκετά δύσκολη. Στην *Εικόνα 9* που ακολουθεί, παρουσιάζονται οι ποσότητες υδρογόνου και αζώτου για τις 7 πρώτες μέρες ανάπτυξης του βακτηρίου, σε θρεπτικό μέσο Burk's Medium, για διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις μητρικής καλλιέργειας στο θρεπτικό μέσο (2%, 3%, 4%, 5%, 5.5% και 6.5% v/v).



Εικόνα 9:*: Καμπύλη ανάπτυξης Clostridium pasteurianum σε καλλιέργειες Burk's Medium που διέφεραν ως προς την αρχική κυτταρική συγκέντρωση. Συγκεκριμένα αναπαριστώνται οι ποσότητες υδρογόνου και αζώτου που μετρήθηκαν στη καλλιέργεια για τις πρώτες 7 ήμερες ανάπτυξης του βακτηρίου σε mL L^{-1} culture $^{-1}$. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε τριπλέτα δειγμάτων και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση.*

Όσον αφορά την συνθήκη 2% στην οποία αναφέρθηκε ότι δεν υπήρξε ανάπτυξη του βακτηρίου, αλλά και ούτε παραγωγή υδρογόνου, παρατηρείται και η ποσότητα του αζώτου να παραμένει πρακτικά σταθερή όλες της ήμερες της καμπύλης. Αυτό συμβαίνει επειδή σε αυτές τις καλλιέργειες, δεν υπάρχουν βακτήρια και αρά ούτε τα ένζυμα υδρογονάσης και νιτρογενάσης για να καταλύσουν την παραγωγή υδρογόνου και καθήλωση αζώτου αντίστοιχα. Επειδή όμως σε όλες τις συνθήκες που το βακτήριο έχει αναπτυχθεί, η ποσότητα του άζωτου φθίνει με το πέρασμα των ημέρων μπορεί να επιβεβαιωθεί ότι το *C.pasteurianum* κατατάσσεται στα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια.

Επιπλέον, οι ποσότητες υδρογόνου φαίνεται να φτάνουν στο μέγιστο τη $4^{η}$ μέρα ανάπτυξης, από την $4^{η}$ στην $5^{η}$ μέρα ως επί το πλείστων να μειώνονται και μετά πάλι να αυξάνονται. Όπως αναφέρθηκε στην *Ενότητα 1.4.2* κατά τη καθήλωση αζώτου από τα βακτήρια πραγματοποιείται παραγωγή βιολογικού υδρογόνου (*Εξίσωση 14*). Συνεπώς θα μπορεί να υποτεθεί ότι η αύξηση του υδρογόνου τις πρώτες μέρες οφείλεται στη σκοτεινή ζύμωση, δηλαδή τη διάσπαση της πηγής άνθρακα που περιέχεται στο θρεπτικό σε απλούστερα μόρια, παράγοντας αέριο υδρογόνο ως ένα από τα υποπροϊόντα. Από την $5^{η}$ στην $7^{η}$ ημέρα το υδρογόνο αυξάνεται πάλι ελαφρώς, αυτό μπορεί να οφείλεται στο υδρογόνο που παράγεται από την αυξημένη καθήλωση του αζώτου και την δράση της νιτρογενάσης. Ενδιαφέρον αποτελεί ότι σε όλες τις συνθήκες που το βακτήριο αναπτύχθηκε, την τελευταία μέρα ανάπτυξης έχουν παραπλήσιες ποσότητες αζώτου, ενώ δεν συμβαίνει το ίδιο για τις τιμές του υδρογόνου.

Σε όλες τις υπόλοιπες συνθήκες όπου το βακτήριο αναπτύχθηκε, φαίνεται η ποσότητα του αζώτου να μειώνεται, χωρίς όμως να εντοπίζεται κάποια απόλυτη σχέση μεταξύ του ρυθμού παραγωγής υδρογόνου και του ρυθμού καθήλωσης αζώτου. Αναλυτικότερα, στη συνθήκη με τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα μητρικής καλλιέργειας παρατηρείται και η πιο ραγδαία μείωση στις τιμές του αζώτου. Σε αυτή την συνθήκη μάλιστα, ο ρυθμός αύξησης του υδρογόνου σχεδόν ταυτίζεται και ακολουθεί τον ρυθμό μείωσης του αζώτου, για τις πρώτες 4 μέρες της καλλιέργειας. Γενικότερα, σε πολλές από τις τιμές φαίνεται ότι με την αύξηση του υδρογόνου να υπάρχει αντίστοιχη μείωση στο άζωτο χωρίς όμως αυτό να είναι ο κανόνας. Το ίδιο παρατηρείται κατά τη συσχέτιση του ρυθμό κυτταρικής ανάπτυξης της *Εικόνας 8* και του ρυθμού καθήλωσης αζώτου της *Εικόνας 9*. Συγκεκριμένα, αναμενόταν ότι με την αύξηση του βακτηριακού πληθυσμού θα υπήρχε αντίστοιχη μείωση στην ποσότητα του αζώτου, καθώς το άζωτο είναι απαραίτητο για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό του βακτηρίου.

Έχει αναφερθεί ότι επειδή τα ένζυμα υδρογονάσης και νιτρογενάσης είναι ευαίσθητα στη παρουσία οξυγόνου, διαθέτουν μηχανισμούς που θα τους επιτρέπουν να ρυθμίζουν την

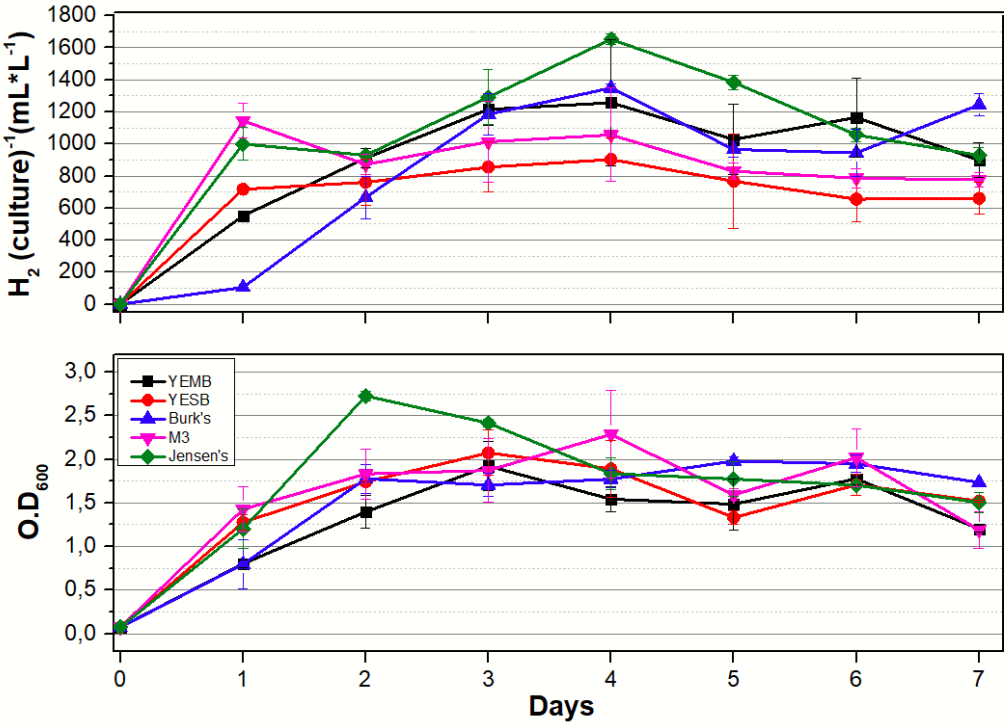
ποσότητα οξυγόνου για να προστατευτούν. Πιο συγκεκριμένα, το οξυγόνο προκαλεί την οξείδωση των μετάλλων του ενεργού κέντρου των ενζύμων [38]. Τα πειράματα εκτελέστηκαν σε αναερόβιες συνθήκες αλλά επειδή τα septum από τα μπουκάλια τρυπιόντουσαν καθημερινά επί 7 ημέρες με βελόνα είναι πιθανό μικρή ποσότητα από το οξυγόνο της ατμόσφαιράς να εισαγόταν στις καλλιέργειες. Σε αυτή τη περίπτωση θα υπάρχει ενεργοποίηση τέτοιων μηχανισμών που μπορεί να οδηγούν σε διαφοροποίηση της τελικής ποσότητας υδρογόνου και αζώτου.

Συμπερασματικά, όσον αφορά τη καμπύλη ανάπτυξης του βακτηρίου σε καλλιέργειες με διαφορετική αρχική κυτταρική συγκέντρωση, φαίνεται ότι η ποσότητα εμβολιασμού των καλλιεργειών είναι μια κρίσιμη παράμετρος που μπορεί να επηρεάσει την κυτταρική ανάπτυξη και την απόδοση σε υδρογόνο. Σε καλλιέργειες του *Clostridium pasteurianum* η ποσότητα του αζώτου μειώνεται όσο περνάνε οι μέρες, αφού το ένζυμο της νιτρογενάσης που βρίσκεται στα αζωτοδεμευτικά βακτήρια, καταλύει τη μετατροπή του ατμοσφαιρικού αζώτου σε αμμωνία και υδρογόνο. Επιπλέον λόγω της πολυπλοκότητας του μεταβολισμού του βακτηρίου δεν υπάρχει απόλυτη συσχέτιση μεταξύ του ρυθμού παραγωγής υδρογόνου και του ρυθμού καθήλωσης αζώτου. Η κατανόηση των περίπλοκων σχέσεων μεταξύ αυτών των δύο μεταβολικών διαδικασιών στα βακτήρια είναι ένα θέμα συνεχιζόμενης έρευνας και έχει άμεση εφαρμογή στη βιοτεχνολογία αφού το βιοϋδρογόνο που παράγεται αποτελεί καθαρή και ανανεώσιμη πηγή ενέργειας.

3.2 Μελέτη ανάπτυξης του βακτηρίου σε διαφορετικά θρεπτικά μέσα

Στις ακόλουθες πειραματικές σειρές θα εξεταστεί ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η παραγωγή υδρογόνου και η καθήλωση αζώτου που συμβαίνει κατά την ανάπτυξη του *Clostridium pasteurianum* σε διαφορετικά υγρά θρεπτικά μέσα. Παράλληλα, θα διερευνηθεί η ύπαρξη διασύνδεσης μεταξύ παραγωγής υδρογόνου και δέσμευσης αζώτου. Τα θρεπτικά ανάπτυξης που επιλέχθηκαν είναι τα εξής: Burk's Medium, YESB (Yeast Extract Sucrose Broth), YEM (Yeast Extract Mannitol Broth), M3 και Jensen's Medium. Τα συστατικά που περιέχονται σε κάθε μέσο έχουν προαναφερθεί στην *Ενότητα 2.1.1.* Σκοπός της παρούσας πειραματικής ενότητας είναι η διερεύνηση της συμπεριφοράς του βακτηρίου στα προαναφερόμενα θρεπτικά, ώστε να γίνει η ορθότερή επιλογή θρεπτικού μέσου για την πραγματοποίησή των πειραμάτων που θα συζητηθούν στις επόμενες ενότητες.

3.2.1 Επίδραση του θρεπτικού μέσου στην κυτταρική ανάπτυξη και στην παραγωγή υδρογόνου



***Εικόνα 10**: Καμπύλη ανάπτυξης Clostridium pasteurianum σε διαφορετικά θρεπτικά μέσα. Συγκεκριμένα αναπαριστώνται οι τιμές οπτικής πυκνότητας στα 600 nm και η ποσότητα του υδρογόνου σε mL L^{-1} $culture^{-1}$ που παράγεται για τις πρώτες 7 ημέρες ανάπτυξης του βακτηρίου. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε τριπλέτα δειγμάτων και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση.*

Με μια πρώτη ματιά στην *Εικόνα 10* διαπιστώνεται ότι το Jensen's Medium είναι το θρεπτικό μέσο όπου παρατηρείται η υψηλότερη παραγωγή υδρογόνου, αλλά και η μεγαλύτερη κυτταρική ανάπτυξη, ωστόσο αυτά τα δύο δεν παρατηρούνται την ίδια μέρα όπως θα ήταν αναμενόμενο. Η μέγιστη τιμή οπτικής πυκνότητας παρατηρείται την 2η μέρα της καμπύλης ενώ η μεγίστη ποσότητα υδρογόνου την 4η. Αυτό μπορεί να συμβαίνει γιατί ο μικροοργανισμός χρειάζεται κάποιο χρονικό διάστημα για να προσαρμοστεί στο περιβάλλον, να ρυθμίσει τον μεταβολισμό του και τελικά να παράξει υδρογόνο. Το ίδιο παρατηρείται στο θρεπτικό μέσο Burk's Medium. Επιπλέον σε αυτές τις δύο περιπτώσεις, το υδρογόνο αυξάνεται σταδιακά από την ημέρα μηδέν μέχρι τη 4η ημέρας της καμπύλης, ενώ για τον YEMB αυτό συμβαίνει μέχρι την 3η ημέρα καλλιέργειας. Για τα άλλα δύο θρεπτικά YESB και M3, η μεγίστη παραγωγή σε υδρογόνο συμβαίνει από την ημέρα μηδέν έως την 1η ημέρα ανάπτυξης. Και ενώ τις επόμενες μέρες το βακτήριο φαίνεται να συνεχίζει να αναπτύσσεται σε αυτά τα δύο μέσα, έχει

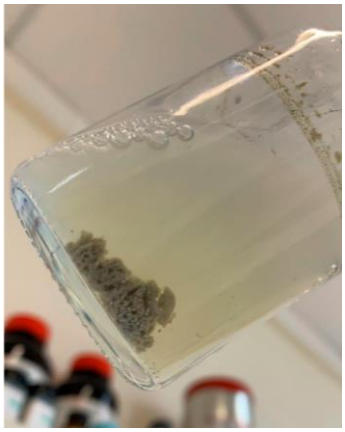
σταματήσει την παραγωγή υδρογόνου, αφού η τιμή του υδρογόνου στην καλλιέργεια παραμένει σχεδόν σταθερή.

Τη δεύτερη υψηλότερη παραγωγή υδρογόνου εμφάνισε το YEMB στη συνέχεια ακολουθεί Burk's με το YEMB έπειτα το M3 και τέλος το YESB. Για τα θρεπτικά M3, YEMB και YESB η τιμή του υδρογόνου πλησιάζει την μέγιστη από την 1η κιόλας μέρα της καλλιέργειας, ενώ ο κυτταρικός πληθυσμός φαίνεται να αυξάνεται έως τη 3η μέρα της καλλιέργειας για το YEMB και YESB και ως τη 4η για το M3, ενώ μετά ακολουθεί μια σχεδόν πτωτική τάση. Συνεπώς, για τις τρεις αυτές συνθήκες συμπεραίνεται ότι το βακτήριο μπορεί να ενεργοποιεί άμεσα τις αντιδράσεις του μεταβολισμού, που δίνουν ως παραπροϊόν το υδρογόνο και να συνεχίζει να αναπτύσσεται παράλληλα.

Όπως φαίνονται στους πίνακες της *Ενότητας 2.1.1* το Jensen's, το YESB και το M3 έχουν ως πηγή άνθρακα σουκρόζη ενώ το Burk's και το YEMB μαννιτόλη. Οι καλλιέργειές που αναπτυχθήκαν σε YEMB και Burk's έχουν αρκετά παρόμοια συμπεριφορά όλες της ήμερες του διαγράμματος, δίνοντας παραπλήσιες τιμές υδρογόνου και O.D. Το ίδιο συμβαίνει για τα θρεπτικά M3 και YESB. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί λόγω της ύπαρξής του ίδιου υποστρώματος άνθρακα και άρα ώθησης του μεταβολισμού του βακτηρίου προς μια κοινή κατεύθυνση, δίνοντας παραπλήσιες ποσότητες παραπροϊόντων όπως το υδρογόνο. Στην *Ενότητα 3.3.5* προκειτο να εξηγηθεί ο λόγος που το βακτήριο προτιμάει υποστρώματα μονοσακχαριτών όπως η μαννιτόλη σε σχέση με δισακχαρίτες όπως η σουκρόζη. Ωστόσο το Jensen's φαίνεται να έχει διαφορετική συμπεριφορά από τα άλλα δύο θρεπτικά που έχουν ως πηγή άνθρακα σουκρόζη. Ένα από τα συστατικά του Jensen's Medium είναι το Na_2MoO_4 το οποίο δεν περιέχεται στα αλλά δύο θρεπτικά μέσα. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, το μολυβδαινικό νάτριο συμβάλει στην αύξηση της ποσότητας του αζώτου που καθηλώνεται από το βακτήριο, αφού το μολυβδαίνιο αποτελεί συμπαράγοντα που βρίσκεται στην ενεργό θέση του ενζύμου της νιτρογενάσης. [30, 16]. Επειδή όπως αναφέρθηκε στην *Ενότητα 3.1.1,* κατά την καταλυτική δράση της νιτρογενάσης των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων, εκτός από την καθήλωση του αζώτου, συμβαίνει και απελευθέρωση αερίου υδρογόνου ως παραπροϊόν, μπορεί να υποτεθεί ότι το Na_2MoO_4 με το να αυξάνει την δέσμευσή αζώτου, έχει ως απόρροια την αύξηση της ποσότητας του υδρογόνου που παράγεται. Ωστόσο χρειάζεται περεταίρω διερεύνηση για να εξαχθούν πιο ασφαλή συμπεράσματα.

Επιπλέον για τα θρεπτικά M3, YESB και YEMB παρατηρείται μια συνεχής αυξομείωση των τιμών οπτικής πυκνότητάς, κυρίως τις τελευταίες ημέρες ανάπτυξης. Αυτό οφείλεται σε ένα τεχνικό πρόβλημα που δημιουργείται από ένα συστατικό που περιέχουν, και συγκεκριμένα το $CaCO_3$. Αυτό το αντιδραστήριο παραμένει αδιάλυτο στα υγρά θρεπτικά μέσα, αυξάνει

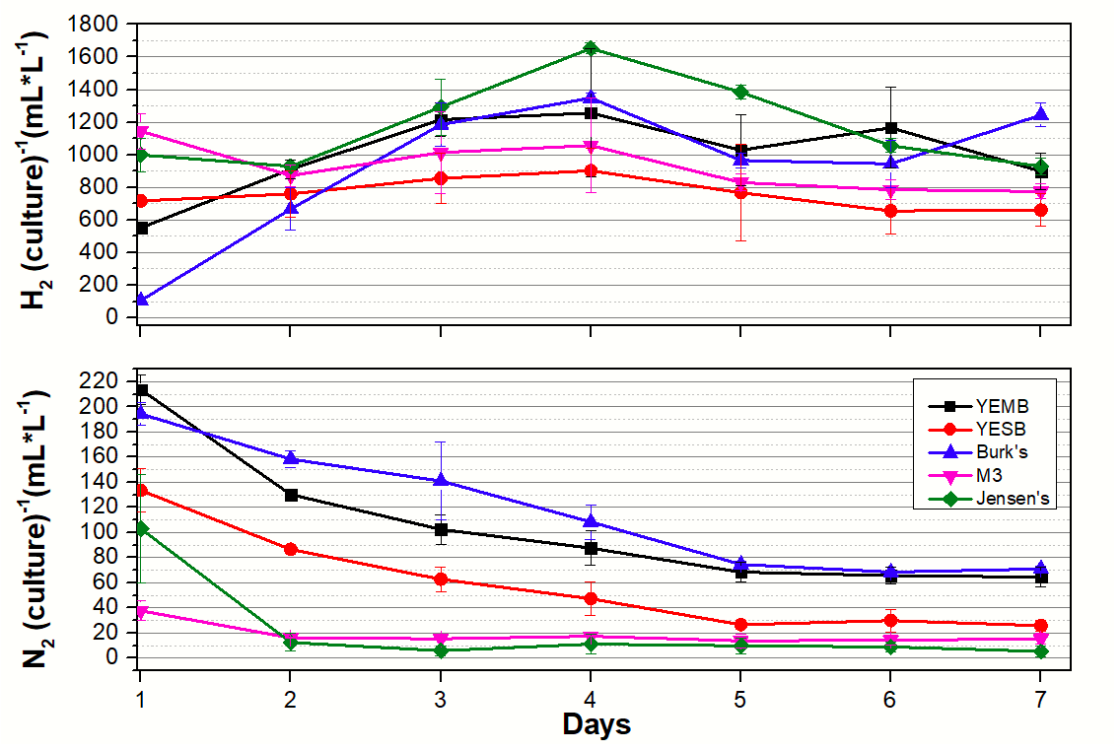
αρκετά τη θολερότητα των δειγμάτων και δημιούργει σφάλμα στις μετρήσεις οπτικής πυκνότητας. Επιπλέον σε αυτά τα μέσα όπως και στο Jensen's Medium, τα βακτηριακά κύτταρα δημιουργούν μεγάλα συσσωματώματα, όπως απεικονίζεται στην *Εικόνα 11*. Πριν την λήψη δείγματος από κάθε καλλιέργεια, γινόταν καλή ανακίνηση του serum bottle ώστε να σπάσουν αυτές οι δομές και τα κύτταρα να απελευθερωθούν σε όλη την καλλιέργεια. Παρόλα αυτά, η πλήρης αποσυσσωμάτωση των κυττάρων δεν ήταν πάντα εφικτή, δίνοντας έτσι μικρότερες τιμές σε O.D. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και στις καλλιέργειες Burk's Medium αλλά σε μικρότερο βαθμό, πιθανόν επειδή είναι το μόνο που δεν περιέχει το αντιδραστήριο $CaCO_3$.



***Εικόνα 11**: Συσσωματώματα κυττάρων της βακτηριακής καλλιέργειας σε θρεπτικό μέσο M3, την 7η ημέρα επώασης [34].*

Συνεπώς η υψηλότερη ποσότητα σε υδρογόνο επιτυγχάνεται κατά την ανάπτυξη του *Clostridium pasteurianum* σε Jensen's Medium. Ωστόσο σαν θρεπτικό μέσο ανάπτυξης για την πραγματοποίηση των ακόλουθων πειραμάτων επιλέχθηκε το Burk's Medium Αυτή η επιλογή έγινε κυρίως για τους τεχνικούς λόγους που προαναφέρθηκαν. Ταυτόχρονα όπως φάνηκε στην *Εικόνα 10,* η ανάπτυξη του *C. pasteurianum* σε θρεπτικό μέσο Burk's δίνει μεγάλη απόδοση σε υδρογόνο, αφού αυτό συγκαταλέγεται στην $2^{η}$ υψηλότερη θέση ως προς την παραγωγή υδρογόνου ανάμεσα στα 5 θρεπτικά μέσα που διερευνήθηκαν.

3.2.2 Μελέτη σχέσης παραγωγής υδρογόνου με την καθήλωση αζώτου σε καλλιέργειες βακτηρίου σε διαφορετικά θρεπτικά μέσα



***Εικόνα 12**: Καμπύλη ανάπτυξης Clostridium pasteurianum σε διαφορετικά θρεπτικά μέσα. Συγκεκριμένα αναπαριστώνται οι ποσότητες υδρογόνου και αζώτου που μετρήθηκαν στη καλλιέργεια για τις πρώτες 7 ήμερες ανάπτυξης του βακτηρίου mL L^{-1} culture $^{-1}$. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε τριπλέτα δειγμάτων και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση.*

Στις ακόλουθες πειραματικές σειρές, διερευνάται η καθήλωση του άζωτου που πραγματοποιείται από το *Clostridium pasteurianum,* σε 5 διαφορετικά θρεπτικά μέσα για τις πρώτες 7 ήμερες ανάπτυξης του, ενώ παράλληλα μελετάται η ύπαρξη κάποιας σχέσης μεταξύ της δέσμευσης αζώτου και παραγωγής υδρογόνου. Αναλυτικότερα στην *Εικόνα 12* φαίνεται ότι ανεξάρτητα το θρεπτικό μέσο η συγκέντρωση του άζωτου μειώνεται από την 1^{η} εώς την 5^{η} μέρα και μετά σταθεροποιείται.

Το θρεπτικό μέσο στο οποίο καθηλώνεται η μεγαλύτερη ποσότητα αζώτου είναι το Jensen's, στην συνέχεια ακολουθεί το M3, έπειτα το YESB, το YEMB και τέλος το Burk's. Από το διάγραμμα της *Εικόνας 10* προκύπτει η εξής σειρά των θρεπτικών κατά αύξουσα τιμή οπτικής πυκνότητας: YEMB, Burk's, YESB, M3, Jensen's, Παρατηρείται δηλαδή, ότι η σειρά των θρεπτικών κατά αυξανόμενη οπτική πυκνότητα σχεδόν ταυτίζεται με την σειρά των θρεπτικών κατά αυξανόμενη ποσότητα δέσμευσης αζώτου. Αυτό συμβαίνει επειδή με την

αύξηση του βακτηριακού πληθυσμού υπάρχει αντίστοιχη μείωση στην ποσότητα του αζώτου, καθώς το άζωτο είναι απαραίτητο για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό του βακτηρίου.

Επιπρόσθετα, παρατηρείται ομοιότητα και στον τρόπο μείωσης του αζώτου. Δηλαδή στα θρεπτικά Jensen's και M3 η ποσότητα του αζώτου φθίνει απότομα από την $1^η$ στη $2^η$ μέρα και τις επόμενες μέρες φαίνεται να παραμένει σταθερή. Για τα θρεπτικά μέσα που έχουν ως πηγή άνθρακα σουκρόζη (Jensen's, YESB, Burk's) η συγκέντρωση του αζώτου μειώνεται με πιο σταδιακό ρυθμό από την $1^η$ έως τη $5^η$ ημέρα ανάπτυξης και έπειτα σταθεροποιείται.

Επιπλέον όπως αναφέρθηκε στην *Ενότητα 2.1.1* ένα από τα συστατικά που περιέχεται στο Jensen's Medium είναι το Na_2MoO_4 το οποίο σύμφωνα με την βιβλιογραφία το συμβάλει στην αύξηση της ποσότητας του αζώτου που καθηλώνεται. Το Jensen's όντως είναι το θρεπτικό μέσο στο οποίο παρατηρείται η μεγαλύτερη δέσμευση αζώτου. Ωστόσο, ενώ και στο το Burk's περιέχεται Na_2MoO_4 η ποσότητα αζώτου που καθηλώνεται είναι η μικρότερη σε σχέση με τα υπόλοιπα θρεπτικά μέσα. Σε αυτό θα μπορούσε να οφείλεται η αρκετά μικρότερη συγκέντρωση του μολυβδαινικού νατρίου στο Burk's (0.000297 g L^{-1}) από ότι στο Jensen's (0.005 g L^{-1}). Ωστόσο χρειάζονται παραπάνω δεδομένα για να εξαχθούν πιο ασφαλή συμπεράσματα.

Η δέσμευση αζώτου και η παραγωγή υδρογόνου στο *Clostridium* συνδέονται στενά, καθώς συχνά αποτελούν μέρος των ίδιων μεταβολικών οδών. Ωστόσο, παρατηρώντας τώρα τον ρυθμό παραγωγής υδρογόνου και τον ρυθμού καθήλωσης αζώτου του διαγράμματος της *Εικόνας 12,* παρατηρείται ότι η σειρά των θρεπτικών κατά αυξανόμενη ποσότητα παραγωγής υδρογόνου δεν ταυτίζεται με την σειρά των θρεπτικών κατά αυξανόμενη ποσότητα δέσμευσης αζώτου. Όπως έχει προαναφερθεί τα είδη *Clostridium* είναι γνωστά για την ικανότητά τους να παράγουν αέριο υδρογόνο μέσω της ζύμωσης διαφόρων υποστρωμάτων. Παράλληλα μπορούν να καθηλώνουν το άζωτο μετατρέποντας το ατμοσφαιρικό άζωτο σε αμμωνία και υδρογόνο. Αναλόγως τις ανάγκες του μικροοργανισμού, μερική ποσότητα από το παραγόμενο υδρογόνο μπορεί να μετατραπεί σε πρωτόνια. Συνεπώς, η πολυπλοκότητα του μεταβολισμού του βακτηρίου δεν επιτρέπει την αποκάλυψη κάποιας σχέσης, μεταξύ δέσμευσης αζώτου και παραγωγής υδρογόνου στις παρούσες πειραματικές σειρές.

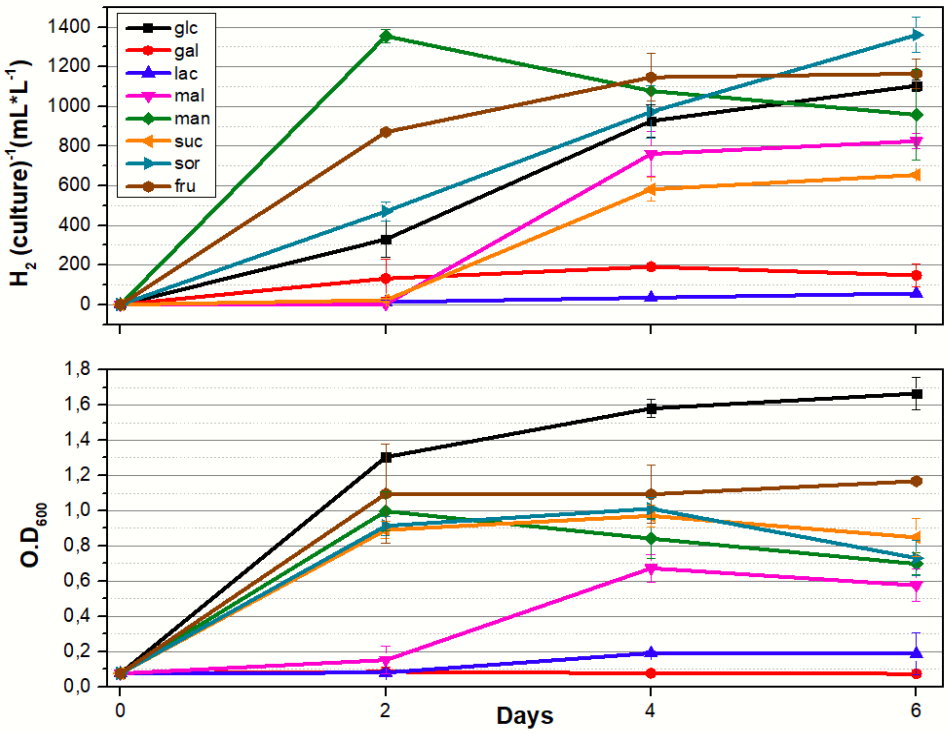
Συμπερασματικά, όσον αφορά την μελέτη ανάπτυξης του βακτηρίου σε διαφορετικά θρεπτικά μέσα, το Jensen's medium καθίσταται το θρεπτικό μέσο στο οποίο όταν αναπτύσσεται το *Clostridium pasteurianum* παράγεται η υψηλότερη ποσότητα υδρογόνου και παρατηρείται η μεγαλύτερη κυτταρική ανάπτυξη. Όσον αφορά την ποσότητα αζώτου, παρατηρείται υψηλότερη καθήλωση στα θρεπτικά μέσα που το βακτήριο παρουσίασε υψηλότερες τιμές οπτικής πυκνότητας. Τέλος λόγω της πολυπλοκότητας του μεταβολισμού

του βακτηρίου δεν παρατηρείται κάποια απόλυτη συσχέτιση μεταξύ του ρυθμού παραγωγής υδρογόνου και του ρυθμού καθήλωσης αζώτου παρόλο που αυτές είναι δυο στενά συνδεδεμένες διαδικασίες.

3.3 Μελέτη ανάπτυξης βακτήριού και παραγωγής βιο-υδρόγονου σε διαφορετική συγκέντρωση σακχάρων

Σε αυτήν την ενότητα επρόκειτο να διερευνηθεί η επίδραση 8 διαφορετικών υποστρωμάτων σακχάρων, σε 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις, στην ανάπτυξη και στην παραγωγή υδρογόνου, στο βακτήριο *Clostridium pasteurianum.* Αναλυτικότερα τα σάκχαρα που μελετήθηκαν είναι τα εξής: γλυκόζη, γαλακτόζη, λακτόζη, φρουκτόζη, μαλτόζη, μαννιτόλη, σορβιτόλη και σουκρόζη, ενώ η συγκέντρωση αυτών των σακχάρων που επιλέχθηκε είναι: 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM. Για τον σκοπό αυτό δημιουργήθηκαν καλλιέργειες του βακτηρίου σε Burk's Medium, στις οποίες πραγματοποιούνταν μετρήσεις υδρογόνου και οπτικής πυκνότητας κατά την $2^η$, $4^η$ και $6^η$ ήμερα της καλλιέργειας. Επισημαίνεται ότι για την παρασκευή του Burk's Medium ακολουθήθηκε η ανάμειξη των συστατικών του *Πίνακα 2* με την διαφορά ότι αντί για μαννιτόλη προστέθηκε η κατάλληλη ποσότητα από το εκάστοτε σάκχαρο.

3.3.1 Μελέτη ανάπτυξης βακτήριού και παραγωγής βιο-υδρόγονου σε συγκέντρωση σακχάρων 50 mM.



***Εικόνα 13**: Καμπύλη ανάπτυξης Clostridium pasteurianum σε Burk's Medium σε διαφορετικά υποστρώματα σακχάρων τα οποία βρίσκονται σε συγκέντρωση 50 mM Συγκεκριμένα αναπαριστώνται οι τιμές οπτικής πυκνότητας στα 600 nm και η ποσότητα του υδρογόνου σε mL L^{-1} culture^{-1} που παράγεται ανά 2 ημέρες για τις πρώτες 6 ήμερες ανάπτυξης του βακτηρίου. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε τριπλέτα δειγμάτων και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση.*

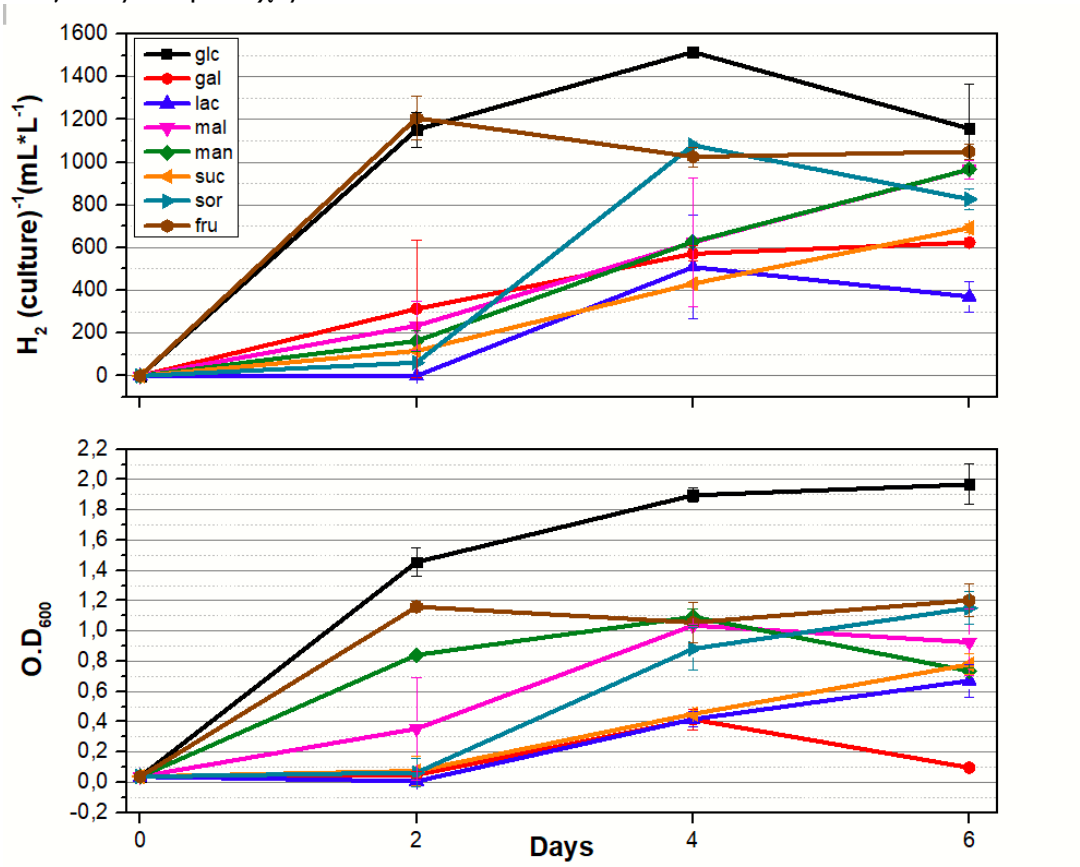
Όπως φαίνεται στην *Εικόνα 13* η σειρά των υποστρωμάτων άνθρακα κατά αυξανόμενη ποσότητα παραγωγής υδρογόνου είναι η εξής: γαλακτόζη, λακτόζη, σουκρόζη, μαλτόζη, γλυκόζη, φρουκτόζη, σορβιτόλη, μαννιτόλη. Όσον αφορά τον τρόπο που παράγεται το υδρογόνο (όχι η ποσότητα του), η σουκρόζη, λακτόζη, η γαλακτόζη, η μαλτόζη και η φρουκτόζη φαίνεται να έχουν παρόμοια συμπεριφορά, δηλαδή η ποσότητα του υδρογόνου αυξάνεται απότομα από την 2^{η} στην 4^{η} ημέρα της καλλιέργειας και μετά σταθεροποιείται. Για τη γλυκόζη το υδρογόνο αυξάνεται απότομα από την 2^{η} στην 4^{η} και συνεχίζει να αυξάνεται μέχρι την 6^{η} ημέρα, με χαμηλότερο όμως ρυθμό. Εντελώς αντίθετη συμπεριφορά φαίνεται να υπάρχει όταν το βακτήριο αναπτύσσεται σε μαννιτόλη. Σε αυτήν την περίπτωση το βακτήριο έχει παράξει όλη τη ποσότητα του υδρογόνου έως την 2^{η} μέρα ανάπτυξης. Τις επόμενες μέρες η ποσότητα του υδρογόνου φθίνει ελαφρώς είτε λόγω διαρροών ή είτε λόγω της ικανότητας της υδρογονάσης να λειτουργεί αντιστρεπτά και άρα να καταλύει την αναστρέψιμη μετατροπή του μοριακού υδρογόνου σε πρωτόνια (H^+) και ηλεκτρόνια όπως φάνηκε στην *Εξίσωση 13*.

Όσον αφορά τις μετρήσεις κυτταρικής ανάπτυξης, η σειρά των υποστρωμάτων άνθρακα κατά αυξανόμενη οπτική πυκνότητα είναι η εξής: λακτόζη, γαλακτόζη, μαλτόζη, σουκρόζη, μαννιτόλη, σορβιτόλη, φρουκτόζη, γλυκόζη. Στην *Εικόνα 12* φαίνεται ότι σε πολλές περιπτώσεις ο τρόπος μεταβολής της ποσότητας υδρογόνου ταυτίζεται με τον τρόπο που μεταβάλλεται το O.D και άρα και ο κυτταρικός πληθυσμός. Αυτό είναι κάτι αναμενόμενο αφού με τον πολλαπλασιασμό των βακτηρίων, αυξάνεται ο αριθμός των ενζύμων υδρογονάσης και άρα και η παραγωγή σε υδρογόνο. Κάτι τέτοιο παρουσιάζεται αρκετά έντονα όταν το βακτήριο αναπτύσσεται σε μαλτόζη.

Σε κάποιες βέβαια περιπτώσεις η αύξηση της κυτταρικής ανάπτυξης μεταξύ των ημέρων, δεν ακολουθείται από αντίστοιχη αύξηση σε υδρογόνο. Σε αυτές τις περιπτώσεις μπορεί να θεωρηθεί ότι το βακτήριο μπορεί να αναπτύσσεται αρκετά, αλλά να ρυθμίζει έτσι τον μεταβολισμό του που να παράγεται λιγότερο υδρογόνο ως παραπροϊόν. Για αυτόν τον λόγο μάλιστα στην *Εικόνα 13* η σειρά των υποστρωμάτων άνθρακα κατά αυξανόμενη ποσότητα παραγωγής υδρογόνου, δεν ταυτίζεται με την σειρά των υποστρωμάτων κατά αυξανόμενη οπτική πυκνότητα. Για παράδειγμα, όταν υπόστρωμα ανάπτυξης του *C. pasteurianum* είναι η γλυκόζη, φαίνεται να παρατηρείται η μεγαλύτερη κυτταρική ανάπτυξη, ενώ η παραγωγή σε υδρογόνο που εξασφαλίζει το συγκεκριμένο σάκχαρο είναι μόλις $4^{η}$ μεγαλύτερη. Το ίδιο συμβαίνει και για το υπόστρωμα σουκρόζης. Στη περίπτωση της σουκρόζης τα κύτταρα, ενώ έχουν πολλαπλασιαστεί έως την $2^{η}$ ημέρα ανάπτυξης, δεν έχουν παράξει καθόλου υδρογόνο. Ωστόσο, από την $2^{η}$ στην $4^{η}$ ημέρα πραγματοποιείται αύξηση της ποσότητας υδρογόνου, ενώ η κυτταρική αύξηση έχει σταματήσει. Συνεπώς σε αυτή την συνθήκη ο μικροοργανισμός αφού πολλαπλασιαστεί ξεκινάει την παραγωγή σε υδρογόνο. Στη περίπτωση της σορβιτόλης, η κυτταρική ανάπτυξη συμβαίνει κατά τις 2 πρώτες ημέρες ανάπτυξης, αλλά η παραγωγή σε υδρογόνο συνεχίζει ακόμη και μέχρι την $6^{η}$ ημέρα ανάπτυξης.

Μπορεί βεβαία να συμβαίνει και το αντίθετο, δηλαδή ενώ το βακτήριο έχει χαμηλή ανάπτυξη, να ρυθμίζει έτσι τον μεταβολισμό του που να παράγεται ως κύριο παραπροϊόν το υδρογόνο, δίνοντας υψηλότερες τιμές υδρογόνου από ότι οπτικής πυκνότητάς. Αυτό για παράδειγμα φαίνεται αρκετά έντονα τις 2 πρώτες ημέρες ανάπτυξης του βακτηρίου σε υπόστρωμα μαννιτόλης όπου το υδρογόνο αυξάνεται με πολύ πιο έντονο ρυθμό από ότι τα ίδια τα κύτταρα. Το ίδιο παρατηρείται για το υπόστρωμα της γαλακτόζης για όλες της ημέρες της καλλιέργειας.

3.3.2 Μελέτη ανάπτυξης βακτήριού και παραγωγής βιο-υδρόγονου σε συγκέντρωση σακχάρων 100 mM.

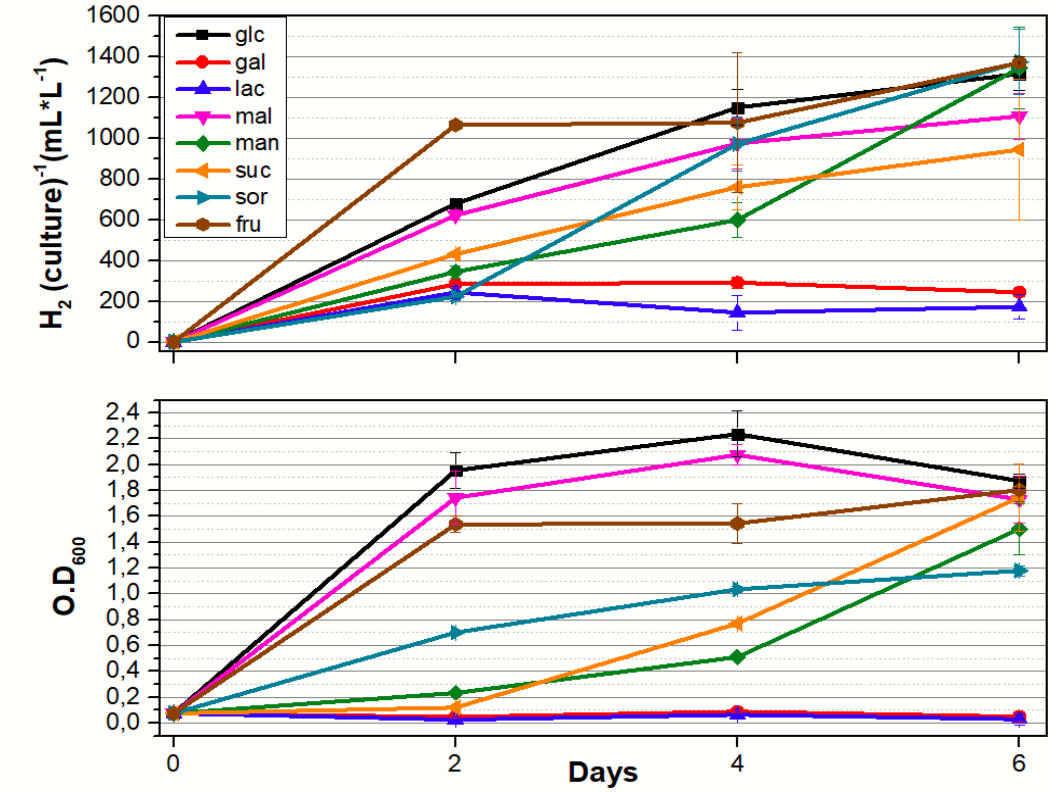


***Εικόνα 14**: Καμπύλη ανάπτυξης Clostridium pasteurianum σε Burk's Medium σε διαφορετικά υποστρώματα σακχάρων τα οποία βρίσκονται σε συγκέντρωση 100 mM. Συγκεκριμένα αναπαριστώνται οι τιμές οπτικής πυκνότητας στα 600 nm και η ποσότητα του υδρογόνου σε mL L^{-1} $culture^{-1}$ που παράγεται ανά 2 ημέρες για τις πρώτες 6 ήμερες ανάπτυξης του βακτηρίου. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε τριπλέτα δειγμάτων και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση.*

Για την συνθήκη όπου η συγκέντρωση των σακχάρων ήταν 100 mM, η σειρά των υποστρωμάτων άνθρακα κατά αυξανόμενη ποσότητα παραγωγής υδρογόνου είναι η εξής: λακτόζη, γαλακτόζη, σουκρόζη, μαννιτόλη ≈ μαλτόζη, σορβιτόλη, φρουκτόζη και γλυκόζη. Σε αυτή τη περίπτωση φαίνεται ότι η ποσότητα του υδρογόνου αυξάνεται από την $1^{η}$ στην $6^{η}$ ήμερα για τα σάκχαρα: μαννιτόλη, μαλτόζη, σουκρόζη και γαλακτόζη. Για τα σάκχαρα: γλυκόζη και σορβιτόλη παρατηρείται επίσης παρόμοια συμπεριφορά στον τρόπο μεταβολής της ποσότητας του υδρογόνου. Δηλαδή αυτή αυξάνεται απότομα από την ημέρα μηδέν έως τη $2^{η}$. Από την $2^{η}$ στην $4^{η}$ ημέρα συνεχίζει να αυξάνεται με πιο αργό ρυθμό και από την $4^{η}$ στην $6^{η}$ φαίνεται να μειώνεται. Όσον αφορά την καλλιέργεια του βακτηρίου σε φρουκτόζη, σε συγκέντρωση 100 mM, παραγωγή υδρογόνου παρατηρείται έως την $2^{η}$ ημέρα ανάπτυξης και μάλιστα με πολύ υψηλό ρυθμό.

Όσον αφορά τον ρυθμό παραγωγής υδρογόνου, σε σχέση με τον ρυθμό κυτταρικής ανάπτυξης, φαίνεται αυτοί οι δυο ρυθμοί να είναι παραπλήσιοι ως επί το πλείστων όταν το βακτήριο αναπτύσσεται σε υπόστρωμα σουκρόζης και φρουκτόζης Το ίδιο παρατηρείται και για τις 4 πρώτες ημέρες ανάπτυξης του βακτηρίου σε υποστρώματα λακτόζης, γλυκόζης και σορβιτόλης. Σε αυτές τις συνθήκες, τις 2 τελευταίες μέρες της καμπύλης, ενώ η κυτταρική ανάπτυξη συνεχίζει, η ποσότητα σε υδρογόνο μειώνεται. Αυτή η πτώση μπορεί να οφείλεται σε διαρροές αερίου από το septum, αλλά και στην αντιστροφή δράση του ενζύμου υδρογονάσης, η οποία μετατρέπει το παραγόμενο μοριακό υδρογόνο σε πρωτόνια και ηλεκτρόνια. Στην περίπτωσή της μαλτόζης παρατηρείται η αντίθετη συμπεριφορά κατά τις 2 τελευταίες μέρες ανάπτυξης, δηλαδή ενώ η κυτταρική ανάπτυξη έχει σταματήσει, το C.*pasteurianum* συνεχίζει να ρυθμίζει τον μεταβολισμό του προς τη παραγωγή βιοϋδρογόνου. Το ίδιο παρατηρείται και στην περίπτωση της μαννίτολης, από την $4^{η}$ στην $6^{η}$ ημέρα ανάπτυξης. Για αυτό το σάκχαρο τις 2 πρώτες ημέρες της καλλιέργειας υπάρχει μεγάλη κυτταρική ανάπτυξη, αλλά λιγότερη παραγωγή υδρόγονου, ενώ τις 2 επόμενές μέρες παρατηρείται αύξηση και στις δύο προαναφερθέντες ποσότητες.

3.3.3 Μελέτη ανάπτυξης βακτηρίου και παραγωγής βιο-υδρογόνου σε συγκέντρωση σακχάρων 150 mM.



Εικόνα 15: *Καμπύλη ανάπτυξης Clostridium pasteurianum σε Burk's Medium σε διαφορετικά υποστρώματα σακχάρων τα οποία βρίσκονται σε συγκέντρωση 150 mM. Συγκεκριμένα αναπαριστώνται οι τιμές οπτικής πυκνότητας στα 600 nm και η ποσότητα του υδρογόνου σε mL L^{-1} $culture^{-1}$ που παράγεται ανά 2 ημέρες για τις πρώτες 6 ήμερες ανάπτυξης του βακτηρίου. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε τριπλέτα δειγμάτων και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση.*

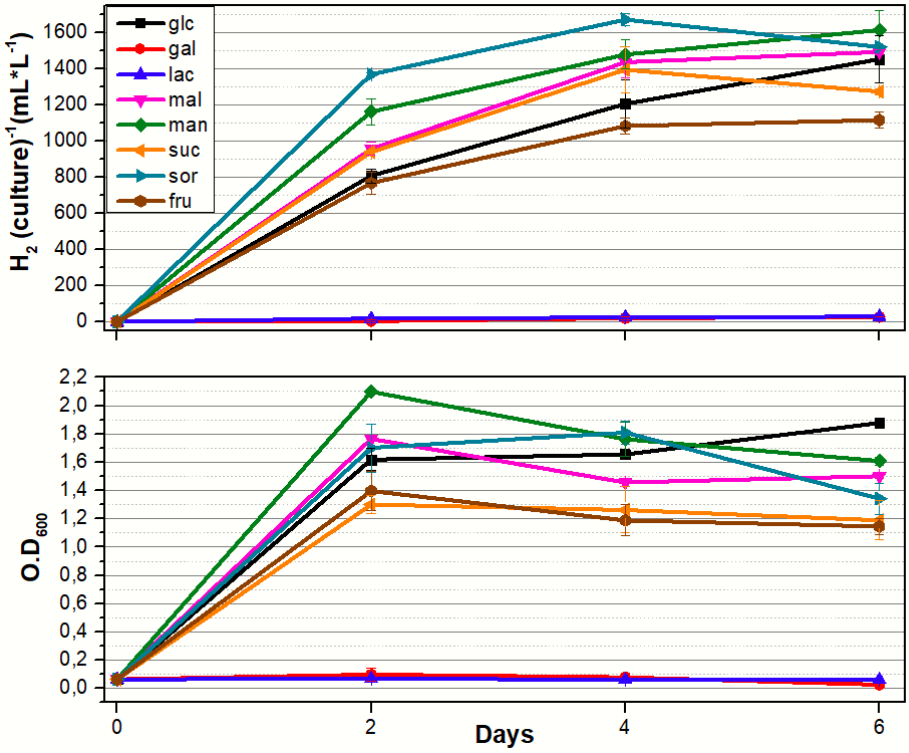
Στην περίπτωση που η συγκέντρωση των σακχάρων ήταν 150 mM, φαίνεται ότι το βακτήριο παρήγαγε παραπλήσιες ποσότητες υδρογόνου (περίπου 1370 mL*L^{-1}) για τα εξής υποστρώματα σακχάρων: φρουκτόζη, μαννιτόλη, σορβιτόλη και γλυκόζη. Αυτά μάλιστα παρήγαγαν και την υψηλότερη ποσότητα σε υδρογόνο που καταγράφηκε στις εν λόγω συνθήκες. Αμέσως μετά υψηλή απόδοση σε υδρογόνο έδωσε η μαλτόζη και λίγο μικρότερη η σουκρόζη. Τέλος, λιγότερα αποδοτικά κρίνονται τα υποστρώματα γαλακτόζης και λακτόζης όπου η ποσότητα του υδρογόνου έφτασε μόλις τα 291 mL*L^{-1} και 243 mL*L^{-1} αντίστοιχα. Επιπλέον σε όλα τα υποστρώματα άνθρακα φαίνεται ότι η ποσότητα του υδρογόνου αυξάνεται με το πέρασμα των ημέρων, με την $6^{η}$ ημέρα να έχει επιτευχθεί η μεγαλύτερη συγκέντρωση στη καλλιέργεια. Εξαίρεση αποτελούν τα σάκχαρα γαλακτόζη και λακτόζη, όπου το υδρογόνο φτάνει μια μέγιστή τιμή από την $2^{η}$ κιόλας ημέρα της καλλιέργειας. Στην γαλακτόζη αυτή η τιμή παραμένει σχεδόν σταθερή για τις υπόλοιπές ημέρες, ενώ στην λακτόζη ακολουθεί μια

μικρή μείωση από την 2η στη 4η ημέρα και μια μικρή αύξηση από την 4η στη 6η ημέρα. Το πιθανότερο είναι αυτή η πτώση να οφείλεται σε διαρροές αερίου από το septum.

Σχετικά τώρα με τις τιμές της οπτικής πυκνότητας, από τα δύο μέρη του διαγράμματος της *Εικόνας 15* φαίνεται ότι με την αύξηση του κυτταρικού πληθυσμού, υπάρχει αντίστοιχη αύξηση στην ποσότητα υδρογόνου που παράγεται, όταν το βακτήριο αναπτύσσεται σε υπόστρωμα μαννιτόλης και φρουκτόζης. Για τη σορβίτολη, ενώ η αύξηση της ποσότητας υδρογόνου και της κυτταρικής ανάπτυξης έως την 2η ημέρα είναι αντίστοιχες, μετά τη 2η ημέρα η παραγωγή του υδρογόνου αυξάνεται με μεγαλύτερο ρυθμό από την οπτική πυκνότητα. Συνεπώς σε αυτή την συνθήκη φαίνεται οι αντιδράσεις του μεταβολισμού να ωθούνται περισσότερο προς την παραγωγή βιοϋδρογονου. Για την σουκρόζη, τα πράγματα είναι πιο περίπλοκα αφού τις πρώτες δύο ημέρες ανάπτυξης, για μικρή κυτταρική ανάπτυξη υπάρχει μεγάλη παραγωγή υδρογόνου, από την 2η στη 4η ημέρα, παρατηρείται αντίστοιχη αύξηση στην ποσότητα υδρογόνου και στον κυτταρικό πληθυσμό, και τέλος από την 4η στην 6η ημέρα, υπάρχει μεγαλύτερη αύξηση στη ποσότητα του υδρογόνου από ότι στα κύτταρα που παράγονται.

Όταν το βακτήριο αναπτύσσεται σε θρεπτικό μέσο που έχει ως υπόστρωμα άνθρακα γλυκόζη και μαλτόζη σε συγκέντρωση 150 mM, φαίνεται ότι η κυτταρικός πολλαπλασιασμός τις 2 πρώτες ημέρες ανάπτυξης είναι ο μεγαλύτερος που σημειώνεται στις εν λόγω συνθήκες. Για αυτές τις 2 ημέρες, μαζί με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό συμβαίνει και παραγωγή υδρογόνου, με χαμηλότερο όμως ρυθμό. Αντίθετα, τις 2 επόμενες ημέρες της καλλιέργειας ο ρυθμός κυτταρικής ανάπτυξης είναι μικρότερος από ότι η παραγωγή υδρογόνου για αυτά τα 2 υποστρώματα άνθρακα. Τέλος το παράδοξο είναι, ότι ενώ τις 2 τελευταίες ημέρες της ανάπτυξης οι καλλιέργειες φαίνεται να βρίσκονται στην φάση θανάτου, η ποσότητα σε υδρογόνο στην καλλιέργεια συνεχίζει να αυξάνεται. Συνεπώς, επειδή η ανάπτυξή του βακτηρίου σε αυτές τις συνθήκες ήταν αρκετά υψηλή, η πιο λογική εξήγηση για την πτώση της τιμής του O.D είναι να οφείλεται στη δημιουργία των βακτηριακών συσσωμάτων όπως επεξηγήθηκε στην *Ενότητα 3.2.1*.

3.3.4 Μελέτη ανάπτυξης βακτήριού και παραγωγής βιο-υδρόγονου σε συγκέντρωση σακχάρων 200 mM.



Εικόνα 16: *Καμπύλη ανάπτυξης Clostridium pasteurianum σε Burk's Medium σε διαφορετικά υποστρώματα σακχάρων τα οποία βρίσκονται σε συγκέντρωση 2.0%. Συγκεκριμένα αναπαριστώνται οι τιμές οπτικής πυκνότητας στα 600 nm και η ποσότητα του υδρογόνου σε mL L^{-1} $culture^{-1}$ που παράγεται ανά 2 ημέρες για τις πρώτες 6 ήμερες ανάπτυξης του βακτηρίου. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε τριπλέτα δειγμάτων και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση.*

Αναφορικά με την συνθήκη που η συγκέντρωση των σακχάρων ήταν 200 mM, φαίνεται ο ρυθμός παραγωγής υδρογόνου να είναι ο μεγαλύτερός για τις 2 πρώτες ημέρες της καλλιέργειας, ανεξάρτητα της πηγής άνθρακα, ενώ το ίδιο συμβαίνει και με τον ρυθμό μεταβολής της οπτικής πυκνότητας. Φαίνεται λοιπόν ότι με την αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος, το βακτήριο πολλαπλασιάζεται πιο γρήγορα. Από την $2^η$ έως την $4^η$ ήμερα για όλες τις συνθήκες, η ποσότητα του υδρογόνου συνεχίζει να αυξάνεται με μικρότερο ρυθμό ενώ ο κυτταρικός πληθυσμός παρατηρείται είτε να παραμένει σταθερός είτε να μειώνεται ελαφρώς. Συμπεραίνεται λοιπόν, ότι ενώ ο μικροοργανισμός έχει σταματήσει να αναπτύσσεται περαιτέρω, συνεχίζει να παράγει υδρογόνο. Για τα υποστρώματα γλυκόζης, φρουκτόζης και γαλακτόζης η παραγωγή υδρογόνου συνεχίζεται έως και την $6^η$ ημέρα ανάπτυξης. Περισσότερο αποδοτικό για την παραγωγή υδρογόνου υπόστρωμά για την συγκέντρωση 200 mM φαίνεται να είναι η σορβιτόλη, έπειτά η μαννιτολη, ενώ στην συνέχει ακολουθεί η μαλτόζη, η σουκρόζη, η γλυκόζη, η φρουκτόζη, η λακτόζη και τέλος η γαλακτόζη.

3.3.5 Ανάλυση αποτελεσμάτων

Στα διαγράμματα που παρουσιάστηκαν στην παρούσα ενότητα, φαίνεται ότι σε πολλές περιπτώσεις ο τρόπος μεταβολής της ποσότητας υδρογόνου σχετίζεται με τον τρόπο που μεταβάλλεται το O.D και άρα και ο κυτταρικός πληθυσμός. Αυτό είναι κάτι που αναμένεται, αφού με τον πολλαπλασιασμό των βακτηρίων, αυξάνεται ο αριθμός των ενζύμων υδρογονάσης και άρα και η παραγωγή σε υδρογόνο.

Παρόλα αυτά, σε κάποιες συνθήκες παρατηρήθηκε ο κυτταρικός πληθυσμός να αυξάνεται πιο γρήγορα και περισσότερο από ότι η παραγωγή σε υδρογόνο. Αυτό μπορεί να οφείλεται στον γεγονός ότι το βακτήριο, κατά την σκοτεινή ζύμωση χρησιμοποιεί μεταβολικούς οδούς, που οι αποδόσεις σε υδρογόνο να είναι χαμηλές (βλέπε *Εικόνα 2*). Επιπλέον σε άλλες περιπτώσεις παρατηρήθηκε ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός να προηγείται της παραγωγής υδρογόνου. Τέλος, ένας άλλος λόγος που δικαιολογεί την αυξημένη κυτταρική ανάπτυξη σε σχέση με την παραγωγή υδρογόνου, κυρίως της τελευταίες μέρες της ανάπτυξης του βακτηρίου, είναι η αντίστροφη δράση της υδρογονάσης. Αυτό το ένζυμο έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να λειτουργεί αντιστρεπτά και άρα να καταλύει τη μετατροπή του μοριακού υδρογόνου σε πρωτόνια (H^+) και ηλεκτρόνια, καταναλώνοντας το [29]. Αντίθετα, σε κάποιες περιπτώσεις παρατηρήθηκε ο κυτταρικός πληθυσμός να αυξάνεται με πιο αργό ρυθμό και λιγότερο από ότι η παραγωγή σε υδρογόνο. Αυτό μπορεί να συμβεί επειδή το βακτήριο ρυθμίζει έτσι τον μεταβολισμό του, που να παράγεται ως κύριο παραπροϊόν το υδρογόνο.

Επιπλέον φαίνεται να υπάρχει και κάποια σύνδεση μεταξύ της συγκέντρωσης των σακχάρων και τον ρυθμό παραγωγής υδρογόνου. Πιο συγκεκριμένα στα διαγράμματα της ενότητας που παρατέθηκαν υπάρχει μια τάση όπου φαίνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης των σακχάρων, ο μέγιστός ρυθμός παραγωγής υδρογόνου μετατοπίζεται προς τις αρχικές ημέρες ανάπτυξης. Αυτό είναι λογικό καθώς με την αύξηση της συγκέντρωσης του σακχάρου στο θρεπτικό, το βακτήριο αναπτύσσεται πιο γρήγορα, παράγοντας μεγαλύτερες ποσότητες υδρογόνου σε μικρότερο χρονικό διάστημα.

Αναφορικά τώρα με τα επιμέρους σάκχαρα, δεν φαίνεται να υπάρχει κάποιο συγκεκριμένο υπόστρωμα άνθρακα που να δίνει για όλες τις συγκεντρώσεις την υψηλότερη παράγωγη σε υδρογόνο. Ωστόσο στα διαγράμματα που παρατεθήκαν, παρατηρείται ότι η σορβιτόλη είναι ένα υπόστρωμα που δίνει υψηλή απόδοση σε υδρογόνο. Συγκεκριμένα, οι καλλιέργειες του βακτηρίου σε αυτό το σάκχαρο, σε συγκεντρώσεις 50, 150 και 200 mM εμφάνισαν την μεγαλύτερη ποσότητα σε υδρογόνο, συγκριτικά με τα υπόλοιπά σάκχαρα.

Επιπλέον σε όλες τις συγκεντρώσεις των σακχάρων, λιγότερα αποδοτικά ως προς την ανάπτυξη και τη παραγωγή σε υδρογόνο διαπιστώθηκε να είναι η γαλακτόζη και η λακτόζη.

Ταυτόχρονα η υψηλότερη τιμή υδρογόνου που καταγράφηκε στις παρούσες πειραματικές σειρές ήταν 1672 mL L^{-1} $culture^{-1}$, όταν το βακτήριο αναπτύχθηκε σε υπόστρωμα σορβιτόλης συγκέντρωσης 200 mM. Ωστόσο, για τη διερεύνηση του ποια συνθήκη είναι αποδοτικότερη ως προς την παράγωγη υδρογόνου, δεν αρκεί μόνο το να δίνει την υψηλότερη τιμή υδρογόνου, αλλά πρέπει να ληφθεί υπόψιν και η συγκέντρωση του σακχάρου στη καλλιέργεια. Έτσι για τη σύγκριση και την ορθολογικότερη ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων, υπολογίστηκε ένας νέος λόγος, όπου η μεγαλύτερη τιμή υδρογόνου που καταγράφηκε για την κάθε συνθήκη διαιρέθηκε με την συγκέντρωση των σακχάρων που είχαν στην εν λόγω συνθήκη. Ουσιαστικά αυτός ο λόγος αποτελεί ένα δείκτη απόδοσης σε υδρογόνο. Οι τιμές αυτές παρουσιάζονται στον *Πίνακα 9.*

***Πίνακας 9**: Παρουσιάζεται ο λόγος της μεγαλύτερης τιμής υδρογόνου που καταγράφηκε για την κάθε συνθήκη ως προς τη συγκέντρωση των σακχάρων που είχαν στην εν λόγω συνθήκη. Αυτός ο λόγος είναι δείκτης αποδοτικότητας σε παράγωγη υδρογόνου αναλόγως τη συγκέντρωση του σακχάρου. Επειδή οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε τριπλέτα δειγμάτων τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση.*

Σάκχαρο	**$[H_2]_{max}$/[Σακχάρου]**			
	50 mM	100 mM	150 mM	200 mM
Γλυκόζη	*22.10 ± 0.55*	*15.15 ± 0.15*	*8.78 ± 0.56*	*7.27 ± 0.65*
Γαλακτόζη	*3.82 ± 0.17*	*6.24 ± 0.20*	*1.94 ± 0.17*	*0.13 ± 0.01*
Λακτόζη	*1.13 ± 0.11*	*7.09 ± 2.41*	*1.62 ± 0.20*	*0.14 ± 0.03*
Μαλτόζη	*16.50 ± 0.79*	*9.66 ± 0.44*	*7.40 ± 0.75*	*7.47 ± 0.07*
Μαννιτόλη	*27.10 ± 0.71*	*9.67 ± 0.22*	*8.97 ± 1.33*	*8.07 ± 0.98*
Σουκρόζη	*15.10 ± 0.24*	*6.25 ± 0.31*	*6.30 ± 2.31*	*6.97 ± 0.63*
Σορβιτόλη	*27.22 ± 1.75*	*10.79 ± 0.22*	*9.17 ± 1.07*	*8.36 ± 0.17*
Φρουκτόζη	*23.30 ± 1.52*	*12.07 ± 1.01*	*9.15 ± 0.07*	*5.58 ± 0.21*

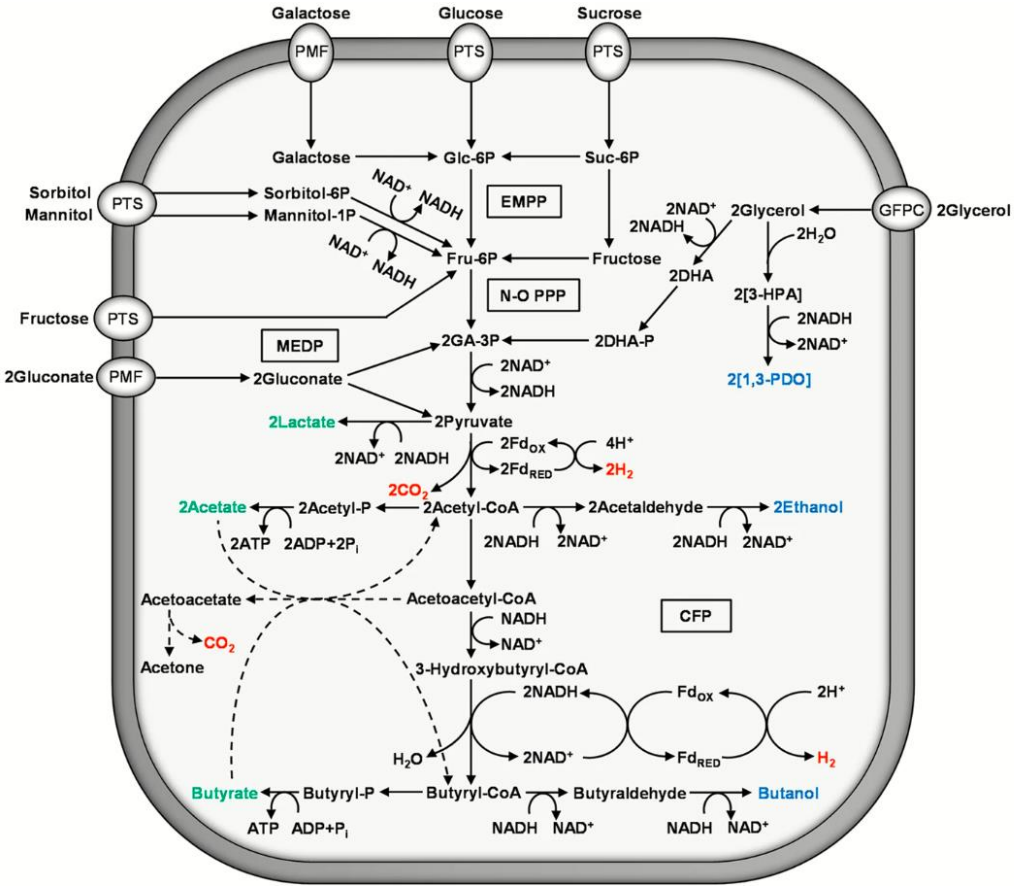
Συνεπώς, από τον παραπάνω πίνακα προκύπτει ότι μέγιστη απόδοση υδρογόνου για τις διάφορες συγκεντρώσεις των υποστρωμάτων: σορβίτόλη (50 mM), μαννιτόλη (50 mM), φρουκτόζη (50 mM), γλυκόζη (50 mM), σουκρόζη (50 mM), μαλτόζη (50 mM), λακτόζη (100 mM) και τέλος γαλακτόζη (100 mM). Στις παρενθέσεις αναφέρεται η συγκέντρωση που

προέκυψε η μεγίστη απόδοση για το κάθε υπόστρωμα ξεχωριστά. Ειδικότερα τώρα, για τα υποστρώματα σορβίτόλη, μαννιτόλη, φρουκτόζη, γλυκόζη, μαλτόζη φαίνεται ότι η αύξηση της συγκέντρωσης περεταίρω από 50 mM έχει ως αποτέλεσμα την πτώση του λόγου απόδοσης σε υδρογόνο. Επισημαίνεται ότι σε αυτές τις συνθήκες, ενώ με την αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος παρατηρήθηκε ως επί το πλείστων αύξηση της παραγωγής σε υδρογόνο, αυτή η αύξηση δεν ήταν όσο «αποδοτική» όσο στη συνθήκη 50 mM. Σχετικά με τα σάκχαρα: σουκρόζη, λακτόζη, μαλτόζη παρατηρείται ότι με αύξηση της συγκέντρωσης από 50 mM σε 100 mM αυξάνεται και ο λόγος απόδοσης υδρογόνου, ενώ με περαιτέρω αύξηση της αυτός μειώνεται. Ο λόγος που η περεταίρω αύξηση της συγκέντρωσης οδηγεί σε χαμηλότερη απόδοση υδρογόνου, πιθανόν να οφείλεται σε ωσμωτικά φαινόμενα. Συγκεκριμένα συμβαίνει κορεσμός των θρεπτικών μέσων, με αποτέλεσμα να δυσχεραίνεται η ανάπτυξη και η παραγωγή υδρογόνου.

Ενδιαφέρον αποτελεί η διερεύνηση της επίδρασης της πηγής μονοσακχαρίτη και δισακχαρίτη στην παραγωγή υδρογόνου. Πιο συγκεκριμένα από τα σάκχαρα που χρησιμοποιήθηκαν, η γλυκόζη, η φρούκτόζη, η γαλακτόζη, η σορβιτόλη και η μαννίτολη είναι μονοσακχαρίτες ενώ η λακτόζη, η σουκρόζη και η μαλτόζη κατατάσσονται στους δισακχαρίτες. Ανατρέχοντας λοιπόν στην κατάταξη των επιμέρους συνθηκών κατά φθίνουσα απόδοση σε υδρογόνο που παρατέθηκε στη προηγουμένη παράγραφο, υποδεικνύεται ότι οι δισακχαρίτες βρίσκονται στο τέλος της κατάταξης μαζί με τη γαλακτόζη που αποτελεί όμως μονοσακχαρίτη. Σχετικά με αυτό, οι δισακχαρίτες πρέπει να διασπαστούν στους μονοσακχαρίτες που τους αποτελούν προτού χρησιμοποιηθούν ως πηγή άνθρακα [40]. Αυτή η αντίδραση για να πραγματοποιηθεί προϋποθέτει την διάθεσή συγκεκριμένων ενζύμων για την διάσπαση του γλυκόζιτικου δεσμού των δισακχαριτών. Πιο συγκεκριμένα οι μονοσακχαρίτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν απευθείας στη γλυκόλυση: το αρχικό στάδιο της κυτταρικής αναπνοής, που οδηγεί στην παραγωγή ATP. Οι δισακχαρίτες από την άλλη πλευρά, πρέπει να διασπαστούν σε μονοσακχαρίτες πριν εισέλθουν στη γλυκόλυση [16]. Αυτό το πρόσθετο βήμα απαιτεί ενέργεια, και για αυτό η συνολική ενεργειακή απόδοση που προσφέρουν οι δισακχαρίτες μπορεί να είναι χαμηλότερη. Επιπλέον, οι μονοσακχαρίτες είναι μικρότερα και απλούστερα μόρια, γεγονός που καθιστά ευκολότερη τη μεταφορά των βακτηρίων στο κύτταρο. Τα βακτήρια έχουν συγκεκριμένα συστήματα μεταφοράς μεγάλης ποικιλομορφίας όσον αφορά τη δομή, τον μηχανισμό και την ειδικότητα του υποστρώματος. Όσο πιο απλό είναι το σάκχαρο, τόσο πιο αποτελεσματική είναι η διαδικασία πρόσληψης [36]. Συνεπώς σε όλους του λογούς που προαναφέρθηκαν επαφίεται η χαμηλότερη απόδοση σε

υδρογόνο στις συνθήκες ανάπτυξης του *Clostridium pasteurianum* σε υποστρώματα δισακχαριτών σε σχέση με μονοσακχαριτών.

Ωστόσο, σχετικά με το υπόστρωμα της γαλακτόζης, φαίνεται να δίνει αντίστοιχα χαμηλή απόδοση σε υδρογόνο, παρόλο που δεν κατατάσσεται στην κατηγόρια των δισακχαριτών. Συνεπώς, το βακτήριο μπορεί να μην έχει το πλήρες σύνολο ενζύμων που είναι απαραίτητα για τον καταβολισμό και τη χρήση της γαλακτόζης. Ο μεταβολισμός της γαλακτόζης περιλαμβάνει ενζυμικά στάδια και εάν κάποιο από αυτά τα βήματα λείπει, ή είναι δυσλειτουργικό, το βακτήριο δεν θα μπορεί να χρησιμοποιήσει τη γαλακτόζη για ανάπτυξη, όπως συμβαίνει με τα υπόλοιπα υποστρώματα. Επιπλέον, εάν και η γαλακτόζη αποτελεί το άλλο ισομερές της γλυκόζης, είναι πιθανό το βακτήριο να μην διαθέτει τους απαραίτητους μηχανισμούς μεταφοράς για την αποτελεσματική μεταφορά της γαλακτόζης στο κύτταρο, ενώ με την γλυκόζη φαίνεται να μην υπάρχει τέτοιο πρόβλημα. Αυτό οφείλεται στο ότι οι μηχανισμοί αυτοί είναι πολύ επιλεκτικοί [16,36]. Πιο συγκεκριμένα σύμφωνα με την βιβλιογραφία για το βακτήριο *C.pasteurianum* η μεταφορά των εξής σακχάρων: γλυκόζη, φρουκτόζη, μαννιτόλη, σουκρόζη και σορβιτόλη γίνεται με τη φωσφωρυλίωση τους μεσώ του μηχανισμού δράσης της φωσφοτρανσφεράσης. Αντίθετα για τη μεταφορά της γαλακτόζης απαιτούνται μεταφορείς που χρησιμοποιούν τη βαθμίδωση συγκέντρωσης πρωτονίων όπως απεικονίζεται και στην *Εικόνα 17* [40]. Συνεπώς, αυτός ο τρόπος μεταφοράς για το *Clostridium pasteurianum* πιθανόν να μην είναι όσο αποδοτικός όσο ο μηχανισμός μεταφοράς του συστήματός της τρανσφεράσης. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο επιπλέον ενεργειακό κόστος που απαιτείται για τη μετατροπή της σε 6-φωσφορική γλυκόζη, συγκριτικά με τους άλλους μονοσακχαρίτες για τα οποίους η μεταφορά και η φωφορυλίωση συντελούνται σε 1 στάδιο. Επιπλέον, η χαμηλή ανάπτυξη του βακτηρίου σε αυτό το υπόστρωμα μπορεί να οφείλεται και στην έλλειψη του καταλλήλου ενζύμου, ή στη χαμηλή δράση του για τη πραγματοποίηση αυτής την αντίδρασης.



Εικόνα 17: *Αντιδράσεις μεταβολισμού του Clostridium pasteurianum για την διάσπαση διαφόρων πηγών άνθρακα όπως προέκυψε κατόπιν γονιδιωματικής ανάλυσης. PTS: σύστημα φωσφοτρανσφεράσης, PMF: κινητήρια δύναμη πρωτονίων [40].*

Συγκριτικά τώρα με δεδομένα της βιβλιογραφίας, το *C. pasteurianum* μεταβολίζει εύκολα τη γλυκόζη, τη φρουκτόζη, τη μαννιτόλη, τη σορβιτόλη και τη σακχαρόζη, ενώ τα σάκχαρα που μεταβολίζονται με μειωμένο ρυθμό περιλαμβάνουν γαλακτόζη και λακτόζη [20]. Αυτά τα δεδομένα συνάδουν και με τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας. Σχετικά με τους μονοσακχαρίτες, η γλυκόζη είναι ο πιο συχνά χρησιμοποιημένος υδατάνθρακας για παράγωγη βιοϋδρογόνου από κλωστρίδια, δίνει υψηλές αποδόσεις υδρογόνου σε πολλά βακτήρια καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί άμεσα από τους μικροοργανισμούς με λιγότερα μεταβολικά μονοπάτια [20]. Παρόλα αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι τα ισομερή: σορβιτολή και μαννιτόλη δίνουν υψηλότερη απόδοση σε υδρογόνο από ότι τα ισομερή: γλυκόζη και φρουκτόζη. Στην *Εικόνα 17* φαίνεται ότι η γλυκόζη, η σορβιτόλη και η μαννιτόλη χρησιμοποιούν τον ίδιο αριθμό μεταβολικών ενδιαμέσων (μέχρι την 6-φωφωρική φουκτόζη) αλλά στην περίπτωση των δύο τελευταίων παράγεται 1 επιπλέον μόριο NADH κάτι που δεν συμβαίνει κατά τον μεταβολισμό της γλυκόζης και της φρουκτόζης. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, τα μεταβολικά μονοπάτια που παράγουν NADH είναι προτιμότερα για την παραγωγή υδρογόνου [20]. Στην *Ενότητα 1.5.1* αναφέρθηκε ότι η παραγωγή υδρογόνου μπορεί

να συμβεί από την οξείδωση της Φερρεδοξίνης ($Fd_{(red)}$) από την [FeFe]-υδρογονάση, από τις πολυμερείς [FeFe]-υδρογονάσες που χρησιμοποιούν NADH για την παραγωγή υδρογόνου, αλλά και από τριμερείς διχαλωτές [FeFe]-υδρογονάσες οι οποίες για την παραγωγή υδρογόνου χρειάζονται NADH και $Fd_{(red)}$. Συνεπώς έτσι θα μπορούσε να αιτιολογηθεί, η αυξημένη παραγωγή υδρογόνου από τα ισομερή υποστρώματα σορβιτόλης και μαννιτόλης. Τα αποτελέσματα του *Πίνακα 9* δείχνουν ότι το βακτήριο παρουσιάζει αντίστοιχη συμπεριφορά για ισομερή σάκχαρα (με εξαίρεση τη γαλακτόζη) για όλες τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν. Όσον αφορά την φρουκτόζη, αυτή χρησιμοποιεί ένα λιγότερο μεταβολικό μονοπάτι (μέχρι το πυροσταφυλικό) από τα προηγούμενα σάκχαρα αλλά παρόλα αυτά δίνει παραπλήσια απόδοση με την γλυκόζη. Σχετικά με τα υποστρώματα δισακχαρίτων, η σουκρόζη κατά την διάσπαση της δίνει 1 μόριο γλυκόζης και 1 μόριο φρουκτόζης, η μαλτόζη δυο μόρια γλυκόζης ενώ η λακτόζη 1 μόριο γλυκόζης και 1 μόριο γαλακτόζης. Φαίνεται δηλαδή ότι οι δισακχαρίτες δίνουν απόδοση σε υδρογόνο που είναι αντίστοιχη της απόδοσης των μονομερών τους.

3.4 Βιοχημικός χαρακτηρισμός αποβλήτων τυροκομείου

Για την επιτυχή και στοχευμένη ανάπτυξη του βακτηρίου, τα απόβλητα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη του *Clostridium pasteurianum* υποβλήθηκαν σε βιοχημική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε από τα συνεργαζόμενα εργαστήρια «ΧΗΜΙΚΟΤΕΧΝΙΚΗ» στην Κρήτη, χρησιμοποιώντας τεχνικές που βασίζονται σε πρωτόκολλα της APHA. Τα αποτελέσματα αυτών των αναλύσεων παρουσιάζονται στον *Πίνακα 9.*

Πίνακας 10: *Αποτελέσματα βιοχημικών αναλύσεων του δευτερογενούς τυρογάλακτος που χρησιμοποιήθηκε, για την ανάπτυξη του Clostridium pasteurianum.*

Παράμετρος	Συγκεντρώσεις
BOD	26000 mg/L
COD	69800 mg/L
BOD/COD	0,37
Total nitrogen	1300 mg/L
Kjeldahl nitrogen	1080 mg/L
Total phosphorous	340 mg/L
pH	6,1
Αλάτι	2,40 % w/v

Νάτριο	9600 mg/L
Λίπη και έλαια	0,06 % w/v
Πρωτεΐνες	0,68 % w/v
Υδατάνθρακες	8,05 % w/v
Λακτόζη	8,05 % w/v
Γαλακτόζη	-
Γλυκόζη	-

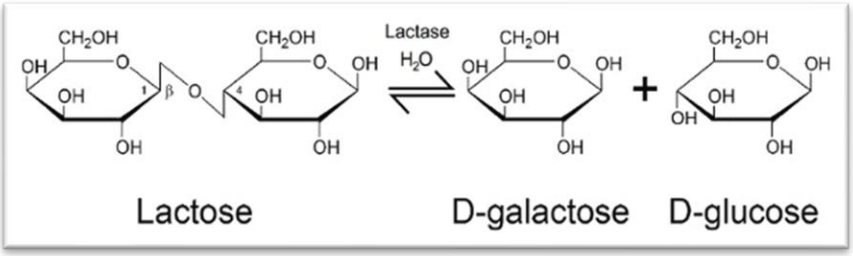
Με τον όρο BOD (βιοχημικά απαιτούμενο οξυγόνο) περιγράφεται η ποσότητα του οξυγόνου που καταναλώνεται από τους μικροοργανισμούς στη διαδικασία αποσύνθεσης οργανικών ουσιών στο νερό, ενώ το χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (COD) εκφράζει την ποσότητα οξυγόνου που απαιτείται για την πλήρη οξείδωση των οργανικών ουσιών στα υδατικά απόβλητα μέσω οξειδωτικών μέσων. Σύμφωνα με τα πρωτόκολλα της Ευρωπαϊκής Ένωσης, το ανώτατο όριο για την ασφαλή απόρριψη των αποβλήτων στη φύση είναι 25 mg L^{-1} BOD και 125 mg L^{-1} για το COD, δηλαδή τιμές που είναι αρκετά χαμηλότερες σε σχέση με αυτές που παρουσιάζονται για τα απόβλητα τυροκομείου που μελετήθηκαν. Επιπλέον ο λόγος BOD/COD σε εύρος 0.3-0.5 δείχνει ότι τα απόβλητα περιέχουν ενώσεις οι οποίες απαιτούν κατάλληλα προσαρμοσμένους μικροοργανισμούς για να βιοαποικοδομηθούν [39]. Συνεπώς, από τον παραπάνω πίνακα προκύπτει ότι δευτερογενές τυρόγαλα που χρησιμοποιήθηκε πληροί τα κριτήρια για να υποστεί βιοαποικοδόμηση από το βακτήριο *Clostridium pasteurianum.*

Επιπλέον, οι τιμές του ολικού αζώτου και του αζώτου κατά Kjeldahl είναι υψηλές. Η πρώτη παράμετρος αναφέρεται στις διάφορες μορφές αζώτου, οργανικές και ανόργανες. Η δεύτερη παράμετρος αναφέρεται στο ποσοστό του οργανικού αζώτου, κυρίως των πρωτεϊνών, που υπάρχει σε ένα δείγμα. Ταυτόχρονα, η υψηλή περιεκτικότητα σε φώσφορο, καθιστά επικίνδυνη την απόρριψη τους στο περιβάλλον καθώς μπορεί να υπάρξει ανάπτυξη ευτροφισμού [35]. Ωστόσο, επειδή αυτά τα συστατικά αποτελούν πλούσια πηγή θρεπτικών συστατικών για το *Clostridium pasteurianum*, δίνεται η ικανότητα στο βακτήριο να αναπτύσσεται μέσα σε αυτά.

Αναφορικά με τη τιμή του pH του ορού γάλακτος, αυτή βρίσκεται μέσα στο επιθυμητό εύρος για την ανάπτυξη του βακτηρίου. Συγκεκριμένα στην *Ενότητα* αναφέρθηκε ότι οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες συνθήκες pH για στελέχη *Clostridium* που παράγουν υδρογόνο κυμαίνονται μεταξύ: 6.5–8.0. Τέλος, όσον αφορά τους υδατάνθρακες, το τυρόγαλα που αναλύθηκε φαίνεται να αποτελείται αποκλειστικά από λακτόζη και μάλιστα σε αρκετά μεγάλη περιεκτικότητα, αποτελώντας έτσι τον κύριο ρυπαντή του τυρογάλακτος.

3.5 Μελέτη ανάπτυξης βακτηριού και παραγωγής βιο-υδρόγονου σε απόβλητα τυροκομείου

Στις ακόλουθες πειραματικές σειρές διερευνάται η ανάπτυξη του *Clostridium pasteurianum* σε απόβλητα τυροκομείου και συγκεκριμένα σε δευτερογενές τυρόγαλα (second cheese whey – SCW), τα οποία αραιώθηκαν είτε σε θρεπτικό μέσο Burk's Medium χωρίς μαννιτόλη, είτε σε απιονισμένο νερό σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Επισημαίνεται ότι το τυρόγαλα που χρησιμοποιήθηκε, είχε υποστεί προηγουμένως ενζυμική υδρόλυση λακτόζης με την προσθήκη του ενζύμου λακτάσης, η οποία διασπάει αυτό το σάκχαρο σε γλυκόζη και γαλακτόζη [36], όπως αναλύεται στην *Ενότητα 2.5.2*. Η αντίδραση της υδρόλυσης φαίνεται στην *Εικόνα 18*. Αυτό το στάδιο ήταν απαραίτητο για την ανάπτυξη του βακτηρίου, καθώς όπως αποδείχθηκε στην προηγούμενη ενότητα, η λακτόζη η οποία είναι η μόνη πηγή άνθρακα που περιέχει το τυρόγαλα (*Πίνακας 10*), δεν αποτελεί κατάλληλο υπόστρωμά για την ανάπτυξη του *Clostridium pasteurianum.* Σημαντικό είναι να αναφερθεί, ότι σε προηγούμενες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν από μέλη του εργαστήριου, είχε αποδειχθεί ότι το βακτήριο δεν μπορεί να αναπτυχθεί σε ακατέργαστο ορό γάλακτος.



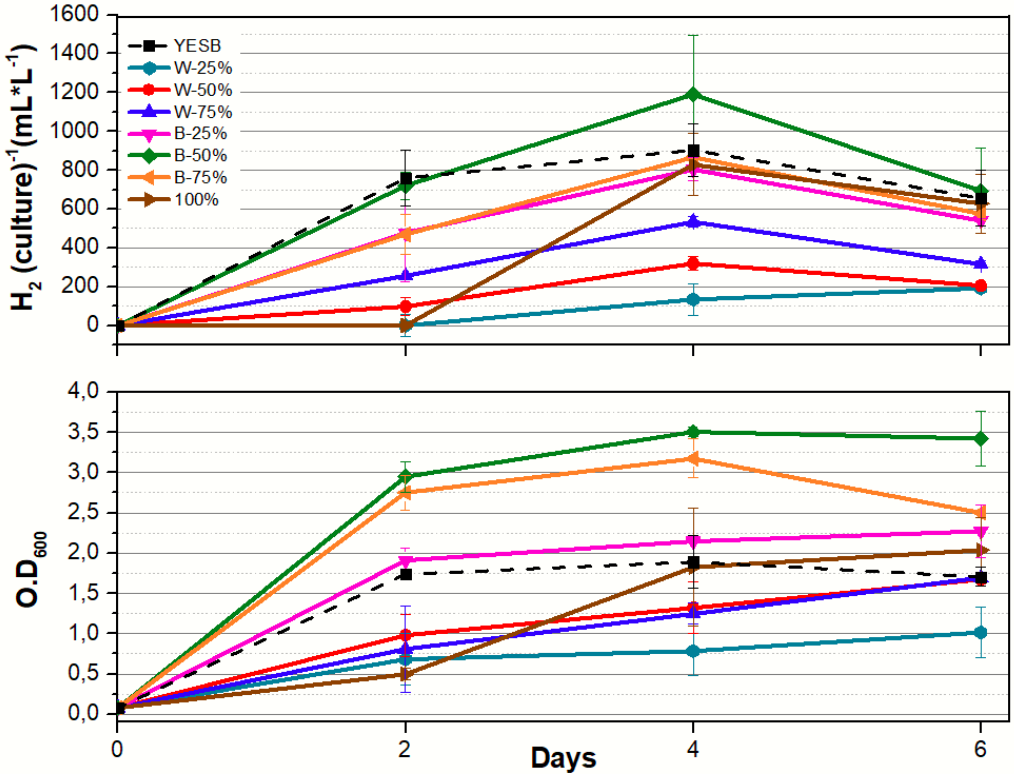
Εικόνα 18*: Ενζυμική αντίδραση υδρόλυσης λακτόζης σε D- γαλακτόζη και D-γλυκόζη όπως συμβαίνει από το ένζυμο λακτάση [36].*

Ειδικότερα, μελετήθηκε ένα εύρος αραιώσεων που περιλάμβανε συγκέντρωση αποβλήτων 25-100% του συνολικού όγκου καλλιέργειας, με τα ποσοστά να αντιπροσωπεύουν το ποσοστό των αποβλήτων, ενώ το υπόλοιπο μέρος είχε συμπληρωθεί με απιονισμένο νερό ή Burk's Medium. Για τον σκοπό αυτό, δημιουργήθηκαν καλλιέργειες του βακτηρίου στις οποίες πραγματοποιόντουσαν μετρήσεις υδρογόνου και οπτικής πυκνότητας κατά την $2^η$, $4^η$ και $6^η$ ήμερα της καλλιέργειας.

Η παραγωγή υδρογόνου μέσω της αξιοποίησης αποβλήτων από βακτήρια και συγκεκριμένα του *Clostridium pasteurianum*, μπορεί να θεωρηθεί εναλλακτικός τρόπος παραγωγής καθαρής ενέργειας, καθώς το υδρογόνο οπώς έχει προαναφερθεί αποτελεί μια ανανεώσιμη πηγή ενέργειας. Στόχος της συγκεκριμένης πειραματικής σειράς είναι να

προτείνει μια λύση, για την επεξεργασία και διαχείριση των απόβλητων τυροκομείου, μετατρέποντας τα οργανικά απόβλητα σε πολύτιμα ενεργειακά προϊόντα.

Στο διάγραμμά που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν, τα οποία συγκρίνονται με την συνθήκη ανάπτυξης του βακτηρίου σε θρεπτικό μέσο YESB. Ο λόγος που επιλέχθηκε το συγκεκριμένο θρεπτικό ως μαρτυράς, είναι επειδή περιέχει yeast extract (*Πίνακας 3*), το οποίο είναι πλούσιο σε οργανικό άζωτο, όπως άλλωστε και ο ορός γάλακτος.



Εικόνα 19: *Καμπύλη ανάπτυξης Clostridium pasteurianum σε υδρολυμένο δευτερογενές τυρόγαλα (second cheese whey – SCW), τα οποίο αραιώθηκε σε θρεπτικό μέσο Burk's Medium (χωρίς μαννιτόλη) και νερό σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Με «W» συμβολίζονται οι συνθήκες που η αραίωση έγινε σε νερό και με «B» οι συνθήκες που η αραίωση έγινε σε Burk's ενώ τα ποσοστά που ακολουθούν αντιπροσωπεύουν τη περιεκτικότητα σε απόβλητα. Με διακεκομμένες γραμμές φαίνεται η συνθήκη του μάρτυρα. Συγκεκριμένα αναπαριστώνται οι τιμές οπτικής πυκνότητας στα 600 nm και η ποσότητα του υδρογόνου σε mL L^{-1} $culture^{-1}$ που παράγεται ανά 2 ημέρες για τις πρώτες 6 ήμερες ανάπτυξης του βακτηρίου. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε τριπλέτα δειγμάτων και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση.*

Με μια πρώτη ματιά στην *Εικόνα 19* διαπιστώνεται ότι το βακτήριο αναπτύσσεται περισσότερο σε τυρόγαλα το όποιο είναι αραιωμένο σε Burk's Medium χωρίς μαννιτόλη από ότι σε νερό. Αυτό είναι λογικό καθώς το Burk's περιέχει κάποια συστατικά απαραίτητα για την ανάπτυξη του βακτηρίου π.χ ανόργανα άλατα τα οποία δεν περιέχονται στο υπερκάθαρο

νερό. Πιο συγκεκριμένα στις συνθήκη όπου τα απόβλητα τυροκομείου αραιώθηκαν σε Burk's σε αραίωση 1:1 (B-50%) παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη κυτταρική ανάπτυξη και παραγωγή σε υδρογόνο, ακόμη και από την συνθήκη του μάρτυρα. Οι άλλες δυο συνθήκες αραίωσης σε Burk's (75% και 25%), η περίπτωση που το τυρόγαλα δεν αραιώθηκε καθόλου (100%) και η συνθήκη του μάρτυρα (YESB) έδωσαν παραπλήσιες ποσότητες σε υδρογόνο, και συγκεκριμένα την 2η μεγαλύτερη που παρατηρήθηκε στις παρούσες πειραματικές σειρές (περίπου 830 $mL*L^{-1}$), κατά την 4η ημέρα ανάπτυξης. Όσον αφορά τις τιμές οπτικής πυκνότητάς του βακτηρίου σε αυτές τις συνθήκες, δεν είναι όσο παραπλήσιες όσο η ποσότητα σε υδρογόνο. Μεγαλύτερος κυτταρικός πολλαπλασιασμός έχει επέλθει στη συνθήκη που το τυρόγαλα αραιώθηκε σε 25% Burk's (B-75%), έπειτα ακολουθεί η συνθήκη που το τυρόγαλα αραιώθηκε 75% Burk's (B-25%) και τέλος η περίπτωση που το τυρόγαλα δεν αραιώθηκε καθόλου (100%). Δηλαδή παρόλο που το βακτήριο δεν πολλαπλασιάζεται το ίδιο σε αυτές τις τρεις συνθήκες, ρυθμίζει έτσι τον μεταβολισμό του, που η ποσότητα σε υδρογόνο που παράγεται είναι παραπλήσια. Επιπλέον παρατηρείται ότι σε όλες τις συνθήκες ανάπτυξης σε αραιωμένο τυρόγαλα με Burk's, υπάρχει μεγαλύτερη κυτταρική ανάπτυξη από ότι στην συνθήκη του μάρτυρα.

Για ποιον λόγο όμως η μεγαλύτερη παραγωγή σε υδρογόνο προκύπτει όταν τα απόβλητα τυροκομείου αραιώθηκαν σε Burk's σε αραίωση 1:1 (B-50%); Η πιθανότερη εξήγηση είναι ότι σε αυτή την αραίωση η καλλιέργεια αποκτάει συγκέντρωση αλατότητας που είναι η ευνοϊκότερη για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Στην συνθήκη B-75% η αλατότητα είναι υψηλότερη, πιθανώς αναστέλλοντας ελαφρώς την ανάπτυξη του βακτηρίου, ενώ στην συνθήκη B-25% επειδή μειώνεται η συγκέντρωση του ορού γάλακτός, μειώνεται η πηγή άνθρακα που είναι διαθέσιμη και άρα και η ανάπτυξη του *C. pasteurianum*. Συγκριτικά τώρα με την συνθήκη του μαρτύρα, αυτή εμφανίζει χαμηλότερη παραγωγή σε υδρογόνο, πιθανόν επειδή το βακτήριο προτιμάει τη γλυκόζη ως πηγή άνθρακα που περιέχεται στο τυρόγαλα, σε σχέση με την σουκρόζη που περιέχεται στο YESB, κάτι που επιβεβαιώθηκε στην προηγούμενη ενότητα. Επιπλέον λογικό θα ήταν, τα υπόλοιπα θρεπτικά συστατικά των τυροκομικών αποβλήτων π,χ μορφές αζώτου και φωσφόρου να συντελούν στην περαιτέρω ανάπτυξη του βακτήριού, με αποτέλεσμα την μεγάλη παραγωγή σε υδρογόνο.

Επιπρόσθετα, ακόμα καλύτερη είναι η ανάπτυξη του *C. pasteurianum* σε 100% τυρόγαλα από ότι στις συνθήκες που ο ορός γάλακτος έχει αραιωθεί σε νερό. Παράλληλα φαίνεται ότι με την αύξηση της ποσότητας του νερού στο μέσο ανάπτυξης, τόσο λιγότερο αναπτύσσεται ο μικροοργανισμός και άρα τόσο λιγότερη ποσότητα υδρογόνου παράγεται. Αυτό συμβαίνει επειδή με την μείωση της περιεκτικότητας του μέσου ανάπτυξης σε ορό

γάλακτός, μειώνεται και η διαθεσιμότητα του σε θρεπτικά συστατικά, τα οποία είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού.

Όσον άφορα τώρα τον ρυθμό μεταβολής του υδρογόνου, φαίνεται αυτός να σημειώνει αύξηση έως και την 4η ημέρα της καλλιέργειας, ανεξαρτήτως τη συνθήκη ανάπτυξης. Για την περίπτωση μάλιστα που το βακτήριο αναπτύχθηκε σε τυρόγαλα χωρίς αραίωση (100%), έως την 2η ημέρα δεν έχει παραχθεί καθόλου υδρογόνο, ενώ από την 2η στην 4η ημέρα σημειώνεται ο μεγαλύτερος ρυθμός αύξησης στη ποσότητα του υδρογόνου για τις εν λόγω συνθήκες. Συμπεραίνεται λοιπόν ότι όταν το βακτήριο αναπτύσσεται σε μη-αραιωμένο τυρόγαλα (100%), η λανθάνουσα φάση επικρατεί περισσότερο, δηλαδή ο μικροοργανισμός χρειάζεται περισσότερο χρόνο για να προσαρμοστεί στο νέο περιβάλλον, πιθανόν λόγω της υψηλής αλατότητας. Ωστόσο, αφού ο μικροοργανισμός προσαρμοστεί ο ρυθμός που φαίνεται να πολλαπλασιάζεται είναι πολύ υψηλός. Από την 4η έως την 6η ημέρα ανάπτυξής, οι τιμές του υδρογόνου σημειώνουν πτωτική τάση για όλες τις συνθήκες εκτός από αυτήν που το τυρόγαλα αραιώθηκε σε 75% νερό (W-25%), οπού στην οποία φαίνεται το υδρογόνο να μένει πρακτικά σταθερό.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας ενότητας δείχνουν ότι τα αποβλήτα τυροκομείων μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υπόστρωμα για την παραγωγή βιοϋδρογόνου από το βακτήριο *C. pasterianum*. Έτσι, αποδείχθηκε ότι το συγκεκριμένο βακτήριο έχει τη δυνατότητα να αξιοποιεί ένα δύσκολα διαχειρίσιμο απόβλητο όπως το τυρόγαλα, με το να αξιοποιεί τα θρεπτικά του συστατικά και να παράγει υψηλές ποσότητες υδρογόνου, το οποίο αποτελεί ένα βιο-καύσιμο υψηλής ενέργειας. Επιπρόσθετα στις παραπάνω πειραματικές σειρές αναφέρθηκε, ότι στη συνθήκη όπου τα απόβλητα τυροκομείου αραιώθηκαν σε Burk's σε αραίωση 1:1 (B-50%), παρατηρήθηκε αρκετά μεγαλύτερη παραγωγή σε υδρογόνο, από ότι στην συνθήκη του μάρτυρα καθώς και από τη συνθήκη που χρησιμοποιήθηκε σκέτο τυρόγαλα (περίπου 30% μεγαλύτερη). Τέλος, η ποσότητα σε υδρογόνο που παράγεται όταν το *Clostridium pasteurianum* αναπτύσσεται σε συμβατικά θρεπτικά μέσα, είναι εξίσου υψηλή με την συνθήκη ανάπτυξής σε δευτερογενές τυρόγαλα, κατόπιν ενζυμικής υδρόλυσης λακτόζης.

3.6 Συμπεράσματα

Η παρούσα διατριβή επικεντρώνεται στη μελέτη διαφόρων συνθηκών που επηρεάζουν την ανάπτυξη, την παραγωγή βιοϋδρογόνου και την καθήλωση αζώτου, αλλά και πιθανές εφαρμογές του βακτηρίου *Clostridium pasterianum*. Οι παραπάνω συνθήκες περιλαμβάνουν

την αρχική κυτταρική συγκέντρωση, μια σειρά διαφορετικών υποστρωμάτων άνθρακα, καθώς και η συγκέντρωση αυτών. Από τα παραπάνω αποτελέσματα αποδείχθηκε ότι η ποσότητα εμβολιασμού των καλλιεργειών είναι μια κρίσιμη παράμετρος που μπορεί να επηρεάσει τον ρυθμό ανάπτυξης, καθώς και την παραγωγή υδρογόνου.

Αρχικά, τα πειράματα έδειξαν ότι με την αύξηση της αρχικής κυτταρικής συγκέντρωσης της μητρικής καλλιέργειας, αυξανόταν και η ποσότητα υδρογόνου που παραγόταν, αλλά και με πιο ταχύ ρυθμό. Όσον αφορά την ανάπτυξη του βακτηρίου σε διαφορετικά θρεπτικά μέσα, το Jensen's Medium καθίσταται το θρεπτικό μέσο στο οποίο παράγεται η υψηλότερη ποσότητα υδρογόνου και παρατηρείται η μεγαλύτερη κυτταρική ανάπτυξη.

Στις πειραματικές σειρές που διερευνήθηκε η καθήλωση αζώτου, επιβεβαιώθηκε ότι το *Clostridium pasterianum* ανήκει στα αζωτοδεσμευτικα βακτήρια. Ταυτόχρονα, λόγω της πολυπλοκότητας του μεταβολισμού του βακτηρίου δεν παρατηρήθηκε κάποια απόλυτη συσχέτιση μεταξύ του ρυθμού παραγωγής υδρογόνου και του ρυθμού καθήλωσης αζώτου παρόλο που αυτές είναι δυο στενά συνδεδεμένες διαδικασίες. Ωστόσο, παρατηρήθηκε σε πολλές περιπτώσεις η αύξηση της οπτικής πυκνότητας να συνοδεύεται από αντίστοιχη καθήλωση στην ποσότητα του αζώτου, αφού με την αύξηση του βακτηριακού πληθυσμού, υπάρχει αντίστοιχη μείωση στην ποσότητα του αζώτου, καθώς το άζωτο είναι απαραίτητο για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό του βακτηρίου.

Στη συνέχεια ακολούθησε η μελέτη επίδρασης της πηγής άνθρακα σε διάφορες συγκεντρώσεις. Πιο συγκεκριμένα, προέκυψε η ακόλουθη σειρά υποστρωμάτων άνθρακα κατά φθίνουσα απόδοση σε υδρογόνο: σορβιτόλη (50 mM), μαννιτόλη (50 mM), φρουκτόζη (50 mM), γλυκόζη (50 mM), σουκρόζη (100 mM), μαλτόζη (50 mM), λακτόζη (100 mM) και γαλακτόζη (100 mM). Στις παρενθέσεις αναφέρεται η συγκέντρωση κατά την οποία προέκυψε η μεγίστη απόδοση, για το κάθε υπόστρωμα ξεχωριστά. Από αυτή την κατάταξη είναι φανερό, ότι κατά την ανάπτυξη του βακτήριου σε υποστρώματα μονοσακχαριτών δύναται να παράξει υψηλότερη ποσότητα βιοϋδρογόνου, σε σχέση με τα υποστρώματα δισακχαριτών. Αυτό είναι απορία του επιπρόσθετού ενεργειακού κόστους που προκαλεί η ανάγκη διάσπασής των δισακχαριτών, για την αξιοποίηση τους από τα βακτηριακά κύτταρα. Παράλληλα, βρέθηκε ότι όταν το βακτήριο αναπτύσσεται στα ισομερή σορβιτόλης και μαννιτολής παράγεται μεγαλύτερη ποσότητα υδρογόνου σε σχέση με τα ισομερή γλυκόζης και φρουκτόζης. Υποτέθηκε ότι αυτή η παραπάνω ποσότητα οφείλεται στην παραγωγή ενός επιπλέον μορίου NADH κατά τον καταβολισμό της μαννιτόλης και της σορβιτόλης.

Τέλος, η διερεύνηση της παραγωγής υδρογόνου από το *Clostridium pasteurianum* σε απόβλητα τυροκομείου, έδειξε ότι αυτό το βακτήριο μπορεί να αξιοποιήσει τα θρεπτικά συστατικά του τυρογάλακτος, ένα απόβλητο με υψηλό ρυπαντικό φορτίο όπως αποδείχθηκε από την βιοχημική του ανάλυση, και να παράγει βιοϋδρογόνο σε υψηλές ποσότητες. Επιπλέον, τα αποτελέσματα της ερευνάς υποδεικνύουν έναν νέο τρόπο επεξεργασίας του δευτερογενούς τυρογάλακτος για την μεγιστοποίηση της παραγωγής υδρογόνου. Συγκεκριμένα αυτός ο τρόπος περιλαμβάνει την αραίωση του ορού γάλακτος σε Burk's Medium σε αραίωση 1:1. Αυτά τα αποτελέσματα ανοίγουν νέες προοπτικές για την πιθανή εφαρμογή του βακτηρίου, στην επεξεργασία απορριμμάτων και την παραγωγή βιοϋδρογόνου με τη χρήση βιομηχανικών υποπροϊόντων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία επικεντρώνεται στην εύρεση των βέλτιστων συνθηκών ανάπτυξης του *Clostridium pasteurianum* με σκοπό την μέγιστη παραγωγή βιοϋδρογόνου και την αξιοποίηση βιομηχανικών αποβλήτων. Η ικανότητα του βακτηρίου να παράγει βιολογικό υδρογόνο σε μεγάλη ποσότητα, χωρίς κάποια γενετική τροποποίηση, αποτελεί πλεονέκτημα του μικροοργανισμού, καθώς το βιοϋδρογόνο είναι ένα υψηλά ενεργειακό καύσιμο με χαμηλό περιβαλλοντικό αποτύπωμα. Η καλλιέργεια του βακτηρίου σε μεγάλη κλίμακα θα μπορούσε να παράγει υδρογόνο σε μεγάλη ποσότητα, ώστε να χρησιμοποιηθεί για θέρμανση και κίνηση. Αυτή η προσέγγιση θα μείωνε την εξάρτηση από τις συμβατικές πηγές ενέργειας που προκαλούν αρνητικές επιπτώσεις στο περιβάλλον και την υγεία.

Όσον αφορά την ποσότητα εμβολιασμού των καλλιεργειών, αυτή αποτελεί μια κρίσιμη παράμετρο που μπορεί να επηρεάσει την κυτταρική ανάπτυξη και την απόδοση σε υδρογόνο. Ενδιαφέρον θα αποτελούσε, η διερεύνηση της ανάπτυξης του βακτηρίου σε ακόμα μεγαλύτερες περιεκτικότητες, ώστε να προσδιοριστεί η μεγίστη συγκέντρωση της μητρικής καλλιέργειας για την παραγωγή της υψηλότερης ποσότητας υδρογόνου που μπορεί να παραχθεί. Επιπρόσθετα, το *Clostridium pasteurianum,* αποτελεί τον μοναδικό μικροοργανισμό που είναι γνωστός για την μετατροπή της γλυκερίνης απευθείας σε βουτανόλη, η οποία επί του παρόντος αποτελεί βιοκαύσιμο υψηλής ενέργειας. Από όλα τα παραπάνω, κρίνεται απαραίτητη η περεταίρω μελέτη του βακτηρίου ώστε να αποσαφηνιστούν και άλλες συνθήκες που

επηρεάζουν την ανάπτυξη και την παραγωγή βιοϋδρογόνου, όπως το pH και η θερμοκρασία. Επιπλέον ενδιαφέρον παρουσιάζει και η μελέτη καλλιέργειας του βακτηρίου σε μεγαλύτερους όγκους, έτσι ώστε να προσομοιαστούν περισσότερο οι συνθήκες μεγάλης κλίμακας που λαμβάνουν χώρα σε βιομηχανική κλίμακα.

Ακόμη, στη παρούσα εργασία αποδείχθηκε ότι κατά την ανάπτυξη του *C. pasteurianum* σε δευτερόγενες τυρόγαλα, μπορεί να παραχθεί βιοϋδρογόνο σε υψηλές ποσότητες. Ταυτόχρονα, αναπτύχθηκε και ένας νέο τρόπος επεξεργασίας του δευτερογενούς τυρογάλακτος για τη μεγιστοποίηση της παραγωγής σε υδρογόνο. Διπλό είναι το όφελος κατά την ανάπτυξη του βακτηρίου σε απόβλητα πλούσια σε οργανικό φορτίο, ως αντικατάσταση των συμβατικών θρεπτικών μέσων. Σε αυτή τη περίπτωση ο μικροοργανισμός εκτός από το να συμβάλει στη παραγωγή αξιοποιήσιμων προϊόντων, μετατρέποντας τα οργανικά απόβλητα σε πολύτιμα ενεργειακά προϊόντα, δύναται να αποτελέσει και χρήσιμο εργαλείο βιοαποικοδόμησης. Για αυτό τον λόγο, μελλοντικό σκοπό της ομάδας του εργαστηρίου αποτελεί, η βιοχημική ανάλυση του τυρογάλακτος κατόπιν της ζυμωτικής τους κατεργασίας από το βακτήριο, ώστε να προσδιοριστεί εάν και κατά ποσό αποτελεσματική ήταν η βιοαποκατάσταση αυτών των ρύπων. Ενδιαφέρον θα αποτελούσε η διερεύνηση για ανάπτυξη του βακτηρίου και σε αλλά βιομηχανικά υποπροϊόντα. Παράλληλα όλα τα παραπάνω καταδεικνύουν την αναγκαιότητα για την διεξαγωγή οικονομικών αναλύσεων, που θα εντοπίσουν οικονομικά αποδοτικές στρατηγικές και τεχνολογίες για εφαρμογές μεγάλης κλίμακας.

Βιβλιογραφία

1) Farias, C. B., Barreiros, R. C., da Silva, M. F., Casazza, A. A., Converti, A., & Sarubbo, L. A. (2022). Use of hydrogen as fuel: A trend of the 21st century. *Energies*, *15*(1), 311. https://doi.org/10.3390/en15010311

2) DAS, D., & VEZIROGLU, T. (2008). Advances in biological hydrogen production processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, *33*(21), 6046–6057. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.07.098

3) Ji, M., & Wang, J. (2021). Review and comparison of various hydrogen production methods based on costs and Life Cycle Impact Assessment Indicators. *International Journal of Hydrogen Energy*, *46*(78), 38612–38635. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.09.142

4) Schüth, F. (2009). Challenges in hydrogen storage. *The European Physical Journal Special Topics*, *176*(1), 155–166. https://doi.org/10.1140/epjst/e2009-01155-x

5) Φραντζής Δ. (2022). *Το υδρογόνο και η χρήση του ως καύσιμο στις μεταφορές.* Διατμηματικό πρόγραμμα μεταπτυχιακών σπουδών «Συστήματα Αυτοματισμού». Εθνικό Μετσόβιο Πανεπιστήμιο.

6) Akhlaghi, N., & Najafpour-Darzi, G. (2020). A comprehensive review on Biological Hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, *45*(43), 22492-22512. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.06.182

7) Barrera-Quintero, V., Davila-Gomez, J. A., Rizo Acosta, P., Hernandez-Rojas, M. E., & Baez-Pimiento, S. (2017). Gompertz equation's first and second derivatives for kinetics analysis of batch dark fermentation on bio-hydrogen production. *European Journal of Engineering Research and Science*, *2*(11), 18-22. https://doi.org/10.24018/ejers.2017.2.11.509

8) REN, N., LI, J., LI, B., WANG, Y., & LIU, S. (2006). Biohydrogen production from molasses by anaerobic fermentation with a pilot-scale bioreactor system. *International Journal of Hydrogen Energy*, *31*(15), 2147-2157. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2006.02.011

9) Qu, X., Zeng, H., Gao, Y., Mo, T., & Li, Y. (2022). Bio-hydrogen production by dark anaerobic fermentation of organic wastewater. *Frontiers in Chemistry*, *10*, 1-16. https://doi.org/10.3389/fchem.2022.978907

10) Vardar-Schara, G., Maeda, T., & Wood, T. K. (2007). Metabolically engineered bacteria for producing hydrogen via fermentation. Microbial Biotechnology, 1(2), 107–125. https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2007.00009.x

11) Αλεπόρου Β., Αργυροκαστρίτσης Α.,Κοσμητοπούλου Α., Πιαλόγλου Π., *Βιολογία* (Γ΄ Γενικού Λυκείου - Ομάδας Προσανατολισμού Θετικών Σπουδών & Σπουδών Υγείας). Εκδόσεις Διόφαντος.

12) Srivastava, M., Srivastava, N., & Singh, R. (2022). Hydrogen Production by Utilizing Bio-Processing Techniques . In *Bioenergy research: Biomass Waste to energy,* CleanEnergy Production Technologies (pp. 169–213), SPRINGER. https://doi.org/10.1007/978-981-16-1862-8_1

13) Ogata, H., Lubitz, W., & Higuchi, Y. (2016). Structure and function of [NiFe] hydrogenases. *Journal of Biochemistry*, *160*(5), 251–258. https://doi.org/10.1093/jb/mvw048

14) Lubitz, W., Ogata, H., Rüdiger, O., & Reijerse, E. (2014). Hydrogenases. *Chemical Reviews*, *114*(8), 4081–4148. https://doi.org/10.1021/cr4005814

15) Touloupakis, E., Chatziathanasiou, A., Ghanotakis, D. F., Carlozzi, P., & Pecorini, I. (2022). Hydrogen production by immobilized rhodopseudomonas sp.. cells in calcium alginate beads. *Energies*, *15*(22), 8355;. https://doi.org/10.3390/en15228355

16) Berg J.M, Tymoczko J.l, Gatto G.J, Stryer L. *Βιοχημεία,* 9η έκδοση. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης. (Κεφάλαιο 13,24).

17) Mus, F., Crook, M. B., Garcia, K., Garcia Costas, A., Geddes, B. A., Kouri, E. D., Paramasivan, P., Ryu, M.-H., Oldroyd, G. E., Poole, P. S., Udvardi, M. K., Voigt, C. A., Ané, J.-M., & Peters, J. W. (2016). Symbiotic nitrogen fixation and the challenges to its extension to nonlegumes. *Applied and Environmental Microbiology*, *82*(13), 3698–3710. https://doi.org/10.1128/aem.01055-16

18) Brasca, M., Morandi, S., & Silvetti, T. (2022). Clostridium spp.. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 431–438. https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.22989-2

19) University of Texas Medical Branch at Galveston. (1996). Chapter 18 Clostridia: Sporeforming Anaerobic Bacilli. In Medical Microbiology. 4th edition. essay.

20) Wang, J., & Yin, Y. (2021). Clostridium species for fermentative hydrogen production: An overview. International Journal of Hydrogen Energy, 46(70), 34599–34625. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.08.052

21) Supratim Mukherjee, Dimitri Stamatis, Cindy Tianqing Li, Galina Ovchinnikova, Jon Bertsch, Jagadish Chandrabose Sundaramurthi, Mahathi Kandimalla, Paul A. Nicolopoulos, Alessandro Favognano, I-Min A. Chen , Nikos C. Kyrpides and T.B.K. Reddy. Twenty-five years of Genomes OnLine Database (GOLD): data updates and new features in v.9**.** Nucl. Acids Res. (2022) doi: doi.org/10.1093/nar/gkac974

22) Sarchami, T., Johnson, E., & Rehmann, L. (2016). Optimization of fermentation conditio favoring butanol production from glycerol by clostridium pasteurianum DSM 525.BioresourceTechnology, 208, 73–80. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.062

23) Srivastava, N., Srivastava, M., Kushwaha, D., Gupta, V. K., Manikanta, A., Ramteke, P. W., & Mishra, P. K. (2017). Efficient dark fermentative hydrogen production from enzyme hydrolyzed rice straw by clostridium pasteurianum (MTCC116). *Bioresource Technology*, *238*, 552–558. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.077

24) Mira, P., Yeh, P., & Hall, B. G. (2022). Estimating microbial population data from optical density. PLOS ONE, 17(10). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0276040

25) Diaz, S. O., & Viplav, A. (2023). Unlocking OD600 assay and bacterial culture growth: 4 facts and 4 tips: Byonoy Journal. Compact Microplate Reader | Absorbance 96. https://byonoy.com/journal/od600-4facts-4tips-bacterial-culture-growth/

26) Beal, J., Farny, N.G., Haddock-Angelli, T. et al (2020). Robust estimation of bacterial cell count from optical density. Commun Biol 3, 512. https://doi.org/10.1038/s42003-020-01127-5

27) Prazeres, A. R., Luz, S., Fernandes, F., & Jerónimo, E. (2020). Cheese wastewater treatment by acid and basic precipitation: Application of H2SO4, HNO3, hcl, ca(oh)2 and naoh. Journal of Environmental Chemical Engineering, 8(2), 103556. https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.103556

28) Χατζοπούλου Μ. (2021). *Μελέτη της ανάπτυξης μικροφυκών σε απόβλητα τυροκομείων με υψηλή αλατότητα.*, Τμήμα Χημεία, Πανεπιστήμιο Κρήτης: Ηράκλειο, Κρήτη.

29) Bothe, H., Schmitz, O., Yates, M. G., & Newton, W. E. (2010). Nitrogen fixation and hydrogen metabolism in cyanobacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 74(4), 529–551. https://doi.org/10.1128/mmbr.00033-10

30) Jensen's Medium M710. HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. A-516, Swastik Disha Business Park,Via Vadhani Ind. Est., LBS Marg, Mumbai-400086, India. (2015) https://exodocientifica.com.br/_technical-data/M710.pdf (Πρόσβαση 17/1/2023)

31) Yeast Mannitol Broth M716. HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. A-516, Swastik Disha Business Park,Via Vadhani Ind. Est., LBS Marg, Mumbai-400086, India. (2015) https://exodocientifica.com.br/_technical-data/M716.pdf (Πρόσβαση 17/1/2023)

32) Burks Medium M707. HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. A-516, Swastik Disha Business Park,Via Vadhani Ind. Est., LBS Marg, Mumbai-400086, India. (2015) https://exodocientifica.com.br/_technical-data/M707.pdf (Πρόσβαση 17/1/2023)

33) Gurkok, S. (2021). Important parameters necessary in the bioreactor for the mass production of biosurfactants. Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science, 347–365. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-823380-1.00020-4

34) Σταμοβλάση – Σπυροπούλου Φ. (2023). *Μελέτη ανάπτυξης του βακτηρίου Bradyrhizobium sp. για την καθήλωση N_2 και παραγωγή H_2.*, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης: Ηράκλειο Κρήτης.

35) Γουμενάκη Μ. (2023). *Διερεύνηση συνθηκών καλλιέργειας για την παραγωγή βιομάζας υψηλής διατροφικής αξίας από το μικροφύκος Chlorella σε απόβλητα τυροκομείων χαμηλής και υψηλής αλατότητας.,* Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης: Ηράκλειο Κρήτης.

36) Leksmono, C. S., Manzoni, C., Tomkins, J. E., Lucchesi, W., Cottrell, G., & Lewis, P. A. (2018). Measuring lactase enzymatic activity in the teaching lab. Journal of Visualized Experiments, (138). https://doi.org/10.3791/54377

37) Jeckelmann, J.-M., & Erni, B. (2020). Transporters of glucose and other carbohydrates in bacteria. Pflügers Archiv - European Journal of Physiology, 472(9), 1129–1153. https://doi.org/10.1007/s00424-020-02379-

38) Xuan, J.; He, L.; Wen, W.; Feng, Y. Hydrogenase and Nitrogenase: Key Catalysts in Biohydrogen Production. Molecules 2023, 28, 1392. https://doi.org/10.3390/molecules2803139

39) Jin Chung, W., Shim, J., & Ravindran, B. (2022). Characterization of cheese processed wastewater and treatment using calcium nanoparticles synthesised by Senna auriculata l flower extract. Journal of King Saud University - Science, 34(2), 101793. https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101793

40) Pyne, M. E., Liu, X., Moo-Young, M., Chung, D. A., & Chou, C. P. (2016). Genome-directed analysis of prophage excision, host defence systems, and central fermentative metabolism in clostridium pasteurianum. Scientific Reports, 6(1). https://doi.org/10.1038/srep26228

41) Katsyv, A., Kumar, A., Saura, P., Pöverlein, M. C., Freibert, S. A., T. Stripp, S., Jain, S., Gamiz-Hernandez, A. P., Kaila, V. R., Müller, V., & Schuller, J. M. (2023). Molecular basis of the electron bifurcation mechanism in the [FEFE]-hydrogenase complex HydABC. Journal of the American Chemical Society, 145(10), 5696–5709. https://doi.org/10.1021/jacs.2c11683

42) Schuchmann, K., Chowdhury, N. P., & Müller, V. (2018). Complex multimeric [Fe-Fe] hydrogenases: Biochemistry, physiology and new opportunities for the Hydrogen Economy. Frontiers in Microbiology, 9. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02911

URL [I] https://www.dwk.com/wheaton-serum-bottle-clear-50-ml-223745