

**Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών**  
**Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων**  
**Μηχανική Τροφίμων και Εφαρμογές Υπολογιστών**  
**στα Τρόφιμα**

**ΔΗΜΟΥ ΧΑΡΑΛΑΜΠΙΑ**

**«Αξιολόγηση  
της παραγωγής βιοαποδομήσιμων  
πλαστικών μέσω αειφόρων διεργασιών»**



**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΑΘΗΝΑ, 2010**

**Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών**  
**Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων**  
**Μηχανική Τροφίμων και Εφαρμογές Υπολογιστών**  
**στα Τρόφιμα**

*ΔΗΜΟΥ ΧΑΡΑΛΑΜΠΙΑ*

**«Αξιολόγηση  
της παραγωγής βιοαποδομήσιμων  
πλαστικών μέσω αειφόρων διεργασιών»**

*ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ*

*Κουτίνας Αποστόλης, επιβλέπων*

*ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ*

*Κουτίνας Αποστόλης*

*Σταυριανός Γιαννιώτης*

*Σεραφείμ Παπανικολάου*

*ΑΘΗΝΑ, 2010*



### **Ευχαριστίες**

*Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή έγινε στα πλαίσια των ερευνητικών δραστηριοτήτων τριών εργαστηρίων, Σχεδιασμός Βιομηχανιών Τροφίμων Με Την Χρήση Ηλεκτρονικού Υπολογιστή, Βιοτεχνολογίας και Μικροβιολογίας τροφίμων και Μηχανικής Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.*

*Κατά την διάρκεια εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου μελέτης υπήρξαν άνθρωποι που συνεργάστηκα μαζί τους και που χωρίς τις πολύτιμες γνώσεις και συμβουλές τους η ολοκλήρωση της διατριβής μου θα ήταν αδύνατη. Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Ουρανία Καλαντζή για την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την καθηγήτρια κ. Μαρία Γαλιώτου Παναγιώτου, που μου έδωσε την δυνατότητα να εργαστώ στο εργαστήριό της καθώς επίσης και τον καθηγητή κ. Σταυριανό Γιαννιώτη, όχι μόνο για το γεγονός ότι μπόρεσα να εργαστώ στο εργαστήριο Μηχανικής Τροφίμων για την διεκπεραίωση της ερευνητικής δραστηριότητάς μου αλλά και για την καθοδήγησή του κατά την διάρκεια φοίτησής μου στο μεταπτυχιακό. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω και τον καθηγητή κ. Μιχαήλ Κωμαίτη καθώς και τα μέλη του εργαστηρίου Χημείας Τροφίμων που με εξαιρετική προθυμία μου επέτρεψαν την χρήση των οργάνων του εργαστηρίου. Για τους παραπάνω λόγους θα ήθελα να ευχαριστήσω και τον καθηγητή κ. Σεραφείμ Παπανικολάου.*

*Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω και να εκφράσω τη βαθιά εκτίμησή μου στον καθηγητή μου κ. Αποστόλη Κουτίνα για την προθυμία που επέδειξε δίνοντας μου απλόχερα κατευθυντήριες γραμμές και πολύτιμες συμβουλές καθόλη την διάρκεια εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου μελέτης*

*και κατά την διάρκεια φοίτησής μου στο μεταπτυχιακό Μηχανική Τροφίμων  
Και Εφαρμογές Υπολογιστών στα Τρόφιμα, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου  
Αθηνών.*

*Τέλος, θα ήθελα να αναφέρω την αμέριστη συμπαράσταση και βοήθεια  
που μου παρείχε η οικογένειά μου, όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών  
μου.*

***Στους γονείς μου και στην  
αδερφή μου, Χριστίνα.***

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1	Ανανεώσιμες πρώτες ύλες και αειφόρες διεργασίες	18
1.2	Πολύ-υδροξυαλκανοϊκοί εστέρες (ΠΥΑ)	20
1.3	Σκοπιμότητα της μελέτης	21

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΠΥΒ

2.1	Ιστορία του ΠΥΒ	25
2.1.1	Η ανακάλυψη του ΠΥΒ	26
2.1.2	Η ταυτοποίηση και κατάταξη των ΠΥΑ	27
2.1.3	Κλωνοποίηση των ΠΥΑ και βιοσύνθεση γονιδίων	30
2.2	Βιο-αποικοδομήσιμα πλαστικά	30
2.2.1	Ιδιότητες των ΠΥΑ	33
2.2.1.1	Φυσικές και μηχανικές ιδιότητες	33
2.2.1.2	Βιολογικές ιδιότητες	35
2.2.2	Εφαρμογές των ΠΥΑ	37
2.3	Βιομηχανίες παραγωγής ΠΥΒ	38
2.4	Σύνθεση του ΠΥΒ	38
2.4.1	Τρόποι παραγωγής ΠΥΑ	41
2.4.2	Παραγωγή πολύ-υδροξυ-αλκανοϊκών εστέρων μέσω της εφαρμογής της βιοτεχνολογίας στην βιομηχανία	43

2.5	Φτηνές πρώτες ύλες για την παραγωγή βιο-αποδομήσιμων πλαστικών	45
2.5.1	Υδρολύματα αμύλου ή αλεύρων	46
2.5.2	Γλυκερόλη, ως προϊόν της διεργασίας παραγωγής βιοντίζελ	52
2.6	Μέθοδοι διαχωρισμού και ανάκτησης των ΠΥΑ	55

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3**

#### **ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΠΥΒ ΑΠΟ ΣΙΤΑΡΙ ΣΕ ΜΕΓΑΛΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗ ΚΛΙΜΑΚΑ**

3.1	Περίληψη της τεχνολογικής διαδικασίας	61
3.2	Παραγωγή θρεπτικού μέσου για ζυμώσεις από σιτάρι	62
3.2.1	Αποθήκευση σίτου	65
3.2.2	Αποφλοιώση σιταριού	65
3.2.3	Διαχωρισμός ρευμάτων για παραγωγή θρεπτικού μέσου για μικροβιακές ζυμώσεις	66
3.3	Παραγωγή του ΠΥΒ	70
3.4	Απομόνωση και καθαρισμός του ΠΥΒ	71

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4**

#### **ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

4.1	Στόχος και συνοπτική περιγραφή του πειράματος	72
4.2	Πρώτες ύλες που χρησιμοποιήθηκαν στις ζυμώσεις	73
4.3	Μικροοργανισμοί	73
4.4	Παραγωγή εμβολίων για τις ζυμώσεις	74
4.4.1	Εμβόλιο για ζύμωση στερεάς κατάστασης με τον <i>Aspergillus oryzae</i>	74
4.4.2	Εμβόλιο για βακτηριακές ζυμώσεις με τον <i>Cupriavidus</i>	75

	<i>necator</i> DSZM545	
4.5	Περιγραφή ζύμωσης στερεάς κατάστασης	75
4.6	Περιγραφή υδρόλυσης του κραιβάλευρου	75
4.7	Περιγραφή ζυμώσεων βυθού με τον <i>Cupriavidus necator</i> DSZM545	77
4.7.1	Προσαρμογή του <i>Cupriavidus necator</i> DSZM545 στην κατανάλωση της γλυκερόλης	77
4.7.2	Ζυμώσεις βυθού σε διάφορα θρεπτικά μέσα	78

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5**

### **ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ**

5.1	Προσδιορισμός και μέτρηση pH	80
5.2	Ποσοτική ανάλυση της συγκέντρωσης αζώτου στις ελεύθερες αμινομάδες (FAN)	80
5.2.1	Αντιδραστήρια για την μέτρηση FAN	80
5.2.2	Προσδιορισμός FAN	81
5.3	Ζυμώσεις βυθού	82
5.3.1	Προσδιορισμός γλυκερόλης	83
5.3.2	Προσδιορισμός κυτταρικής βιομάζας	84
5.3.3	Ανάλυση ΠΥΒ	84



## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6**

### **ΤΕΧΝΟΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗΣ**

6.1	Σχεδιασμός της διεργασίας παραγωγής ΠΥΒ σε μεγάλη κλίμακα	87
6.2	Στάδια παραγωγής ΠΥΒ	88
6.3	Συνολικό κεφάλαιο επένδυσης	92
6.3.1	Πάγιο κεφάλαιο επένδυσης	92
6.3.2	Κεφάλαιο αρχικής εργασίας	93
6.4	Ανάλυση και εκτίμηση του λειτουργικού κόστους (operating cost)	97
6.5	Κόστος παραγωγής ΠΥΒ	99
6.6	Συμπεράσματα	101

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7**

### **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

7.1	Αξιολόγηση της ενζυμικής υδρόλυσης των πρωτεϊνών που περιέχονται στο κραμβάλευρο	104
7.2	Αποτελέσματα μετρήσεων συγκέντρωσης FAN, χρησιμοποίησης κραμβάλευρα και πίτυρα για στερεά ζύμωση και κραμβάλευρα για ενζυμική υδρόλυση	106
7.3	Μελέτη της δυνατότητας κατανάλωσης γλυκερόλης από τον μικροοργανισμό <i>Cupriavidus necator</i> DSZM545	107
7.4	Αξιολόγηση της κατανάλωσης της γλυκερόλης από τον <i>Cupriavidus necator</i> DSZM 545 σε διάφορα θρεπτικά μέσα	109

- 7.5 Μελέτη της κατανάλωσης της γλυκερόλης, του ξηρού 111  
βάρους των κυττάρων και του περιεχομένου τους σε ΠΥΒ,  
σε βακτηριακές βιομετατροπές, με τον *Cupriavidus necator*  
DSZM545

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

1.1	Σύσταση κραιβάλευρου	19
1.2	Σύσταση αλεύρων από σιτάρι	20
2.1	Κατάταξη των πολύ-υδροξυαλκανοϊκών εστέρων	29
2.2	Σύγκριση φυσικών και μηχανικών ιδιοτήτων μεταξύ των βιοαποικοδομήσιμων πλαστικών και του πολύ-προπυλενίου	34
2.3	Βιομηχανική παραγωγή και εφαρμογές των ΠΥAs	39
2.4	Παραγωγή ΠΥA από διάφορες πηγές άνθρακα	42
2.5	Μικροοργανισμοί που παράγουν ΠΥAs	45
2.6	Αποτελέσματα ζυμώσεων	47-50
3.1	Κύριοι πολυσακχαρίτες μυκητιακού κυτταρικού τοιχώματος	69
6.1	Κόστος μηχανολογικού εξοπλισμού	94-95
6.2	Υπολογισμός συνολικού κεφαλαίου επένδυσης	96-97
6.3	Συνολικό ετήσιο λειτουργικό κόστος παραγωγής ΠΥB από την χρησιμοποίηση 100.000 tn/year σιτάρι ως αποκλειστική πρώτη ύλη	98

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

2.1	Το βακτήριο <i>Wautersia eutropha</i> και κόκκοι ΠΥΒ ενδοκυτταρικά	25
2.2	Χημικός τύπος του 3-υδροξυ-βουτυρικού οξέος. {Επαναλαμβανόμενη μονάδα του πολυμερούς πολύ-υδροξυ-βουτυρικό οξύ, ΠΥΒ (n= 100-30000)}	26
2.3	Δομή των ΠΥΑ και κάποιων αντιπροσωπευτικών μελών της οικογένειας αυτής, που έχουν ταυτοποιηθεί, n=100-30.000	28
2.4	Βιοαποικοδόμηση των ΠΥΑs	36
2.5	Αποικοδόμηση φιλμ από ΠΥΒ	37
2.6	Παραγωγή βιο-αποικοδομήσιμων πλαστικών από διάφορες πηγές άνθρακα	44
3.1	Παραγωγή θρεπτικού μέσου από σιτάρι	63
3.2	Σιλό αποθήκευσης δημητριακών	65
6.1	Διάγραμμα ροής και ισοζύγια μάζας για την διεργασία παραγωγής ΠΥΒ από σιτάρι	90
6.2	Διάγραμμα σωληνώσεων και οργάνων	91

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

5.1	Πρότυπη καμπύλη υπολογισμού των ελεύθερων αμινομάδων. [ $y = 3.9524x - 0.2578$ , όπου $x$ είναι η απορρόφηση (570nm), $y$ είναι η συγκέντρωση FAN (mg/l). Η ακρίβεια της παραπάνω εξίσωσης ήταν $R^2=0,997$ ]	82
5.2	Πρότυπη καμπύλη υπολογισμού του ΠΥΒ	86
6.1	Γραφική απεικόνιση του ετήσιου συνολικού λειτουργικού κόστους μεταβάλλοντας την συνολική ετήσια παροχή σιταριού στο βιοδιυλιστήριο	100
6.2	Γραφική απεικόνιση του συνολικού ετήσιου ρυθμού παραγωγής ΠΥΒ μεταβάλλοντας την συνολική ετήσια παροχή μάζας που διοχετεύεται στο βιοδιυλιστήριο	101
6.3	Γραφική απεικόνιση του κόστους παραγωγής ΠΥΒ αυξάνοντας τον συνολικό ετήσιο ρυθμό ροής μάζας στο βιοδιυλιστήριο	
7.1	Γραφική απεικόνιση της συγκέντρωσης του N που περιέχεται στις ελεύθερες αμινομάδες των αμινοξέων και πεπτιδίων που προκύπτουν από την ενζυμική υδρόλυση των πρωτεϊνών του υπολείμματος ελαιοκράμβης	105
7.2	Γραφική συγκριτική απεικόνιση της συγκέντρωσης του FAN καθόλη την διάρκεια της ενζυμικής υδρόλυσης των πρωτεϊνών του κραμβάλειου από πρωτεάσες μυκητιακής προέλευσης που προκύπτουν από στερεές ζυμώσεις κραμβάλειου ή μείγματος του κραμβάλειου και πιτύρου	107

- 7.3 Γραφική απεικόνιση του ρυθμού κατανάλωσης της 108  
γλυκερόλης, από τον *Cupriavidus necator* DSZM545, σε  
υγρά θρεπτικά υποστρώματα (προσαρμογή στην γλυκερόλη  
και διερεύνηση ανάπτυξης σε συνθετικό θρεπτικό μέσο  
πλούσιο σε ανόργανα άλατα).
- 7.4 Γραφική απεικόνιση του ρυθμού κατανάλωσης της 111  
γλυκερόλης, από τον *Cupriavidus necator* DSZM545, σε  
υγρά θρεπτικά υποστρώματα
- 7.5 Γραφική απεικόνιση του ρυθμού κατανάλωσης της 112  
γλυκερόλης, από τον *Cupriavidus necator* DSZM545, του  
ξηρού βάρους των κυττάρων και του περιεχόμενου τους σε  
ΠΥΒ σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα που εμπεριέχει  
γλυκερόλη συγκέντρωσης 11 g/l και το εργαστηριακά  
παραγόμενο υδρόλυμα
- 7.6 Γραφική απεικόνιση του ρυθμού κατανάλωσης της 113  
γλυκερόλης, από τον *Cupriavidus necator* DSZM545, του  
ξηρού βάρους των κυττάρων και του περιεχόμενου τους σε  
ΠΥΒ σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα που εμπεριέχει  
γλυκερόλη συγκέντρωσης 18 g/l και το εργαστηριακά  
παραγόμενο υδρόλυμα

## Abstract

Restructuring and optimization of the conventional fermentation industry for poly-3hydroxyalkanoates (PHA) production is necessary to replace petrochemical production routes. Driven by the fact that the amount of non-degradable plastics that is disposed has dramatically increased, the production of biodegradable plastics is necessary. This could be accomplished by using renewable raw materials to produce biodegradable plastics. PHAs are intracellular storage polyesters that are produced by many bacteria and could replace conventional plastics since many identified members of that family, like PHB, have similar properties to petroleum-derived thermoplastics. Guided by this concept, the objectives of this work are:

1) To evaluate the potential of *Cupriavidus necator* 545 to grow and produce PHB, from glycerol (a by-product of diesel production) and rapeseed meal. Rapeseed meal is used, for the production of enzymes, through solid state fermentation by using the fungus *Aspergillus oryzae*. The crude filtrate was used for the production of rapeseed meal hydrosylates. The later can provide a nutrient complete fermentation medium for bioconversions carried out by *Cupriavidus necator* DSZM545 using glycerol as carbon source. Bioconversions in shake flasks using the above bacteria growing in rapeseed meal hydrosylate (FAN 210 mg/l) and glycerol (18 g/l) led to the production of 9.8 g/l total dry weight and 4.5 g/l PHB after 80h fermentation.

2) To design an integrated process, by using the software Super-Pro Designer 7.0, for large-scale production of PHB using wheat as the only nutrient source. Also, evaluation of total capital investment and total production cost has been carried out. The data for the simulation have been collected from several scientific publications. For a PHB production investment using 100.000 tn/yr wheat as the unique nutrient source the total PHB production cost is 2.57 \$/Kg and total capital investment is \$268.903.072.

## Περίληψη

Ορμώμενοι από την ολοένα αυξανόμενη τιμή του πετρελαίου, την μείωση των αποθεμάτων του, την ραγδαία αύξηση των παραγόμενων πλαστικών και την συνακόλουθη αύξηση των προκυπτόντων από αυτά απορριπτόμενων μη βιοαποικοδομήσιμων απορριμμάτων η αναδιαμόρφωση και βελτιστοποίηση της βιομηχανικής παραγωγής στο τομέα παραγωγής βιοαποικοδομήσιμων πλαστικών, όπως πολύ-3υδροξυ-αλκανοϊκών εστέρων αποτελεί αναγκαιότητα. Οι πολύ-3υδροξυ-αλκανοϊκοί εστέρες (ΠΥΑ) είναι πολυεστέρες μικροβιακής προέλευσης, οι οποίοι μπορούν να παραχθούν από ανανεώσιμες πρώτες ύλες και να αντικαταστήσουν τα συμβατικά πλαστικά καθώς πολλά μέλη τους, όπως οι πολύ-3 υδροξυ-βουτυρικοί εστέρες (ΠΥΒ) έχουν παρόμοιες ιδιότητες με τα θερμοπλαστικά. Κινούμενοι λοιπόν σε αυτό το πλαίσιο οι στόχοι της εργασίας αυτής είναι: 1) Η αξιολόγηση της δυνατότητας ανάπτυξης του *Cupriavidus necator* DSZM545 σε γλυκερόλη και υδρόλυμα κραμβάλευρου και η εργαστηριακή παραγωγή πολυ-3-υδροξυ-βουτυρικού εστέρα (ΠΥΒ). Το κραμβάλευρο χρησιμοποιήθηκε ως θρεπτικό μέσο για την παραγωγή ενζύμων με τον *Aspergillus oryzae*. Ακολούθησε ενζυμική υδρόλυση των θρεπτικών συστατικών του κραμβάλευρου. Το υδρόλυμα αποδείχτηκε ότι αποτελεί ένα πλούσιο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης του *Cupriavidus necator* DSZM545. Τελικά χρησιμοποιώντας ως θρεπτικό μέσο, σε ζυμώσεις σε κωνικές φιάλες, το εργαστηριακά παραγόμενο υδρόλυμα από κραμβάλευρο (FAN 210 mg/l) και γλυκερόλη συγκέντρωσης 18 g/l στο τέλος της ζύμωσης (μετά από 80 h) το ξηρό βάρος των κυττάρων και η συγκέντρωση του ΠΥΒ ήταν 9,8 g/l και 4,5 g/l αντίστοιχα. 2) Ο σχεδιασμός ενός βιοδιυλιστηρίου παραγωγής ΠΥΒ χρησιμοποιώντας ως αποκλειστική και μοναδική πρώτη ύλη σιτάρι, ο υπολογισμός του συνολικού κόστους παραγωγής ή του λειτουργικού κόστους και του συνολικού κεφαλαίου επένδυσης με την χρήση του λογισμικού Super-ProDesigner 7.0. Ο σχεδιασμός και η προσομοίωση με στόχο την οικονομική μελέτη μιας τέτοιας επένδυσης έγινε με δεδομένα από δημοσιευμένα άρθρα και τελικά αποδείχτηκε ότι το κόστος



παραγωγής είναι 2,57 και το συνολικό κεφάλαιο επένδυσης είναι 268.903.072 \$, στην περίπτωση που η συνολική ετήσια παροχή μάζας (σιταριού) είναι 100.000 tn/yr.

## **Κεφάλαιο 1**

### **Εισαγωγή**

#### **1.1 Ανανεώσιμες πρώτες ύλες και αειφόρες διεργασίες**

Τις τελευταίες δεκαετίες η τιμή του πετρελαίου έχει αυξηθεί δραματικά. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα αποθέματα μειώνονται με ταχείς ρυθμούς. Η τιμή του πετρελαίου ανά βαρέλι το Νοέμβριο του 2007 έφτασε τα 98,62\$, ενώ το 1998, δηλαδή 9 χρόνια πριν, η τιμή πώλησης ενός βαρελιού πετρελαίου ήταν 10\$. Αναμφισβήτητα λοιπόν αποτελεί αναγκαιότητα η αντικατάσταση του πετρελαίου, στο οποίο ουσιαστικά βασίζεται η πετρελαιοχημική βιομηχανία, από ανανεώσιμες πρώτες ύλες.

Η φύση γενναιόδωρα παρέχει στον άνθρωπο διάφορες ανανεώσιμες πρώτες ύλες, οι οποίες περιέχουν διάφορα φυσικά πολυμερή όπως άμυλο, πρωτεΐνες, κυτταρίνη, ημικυτταρίνη, κ.λπ. Το σιτάρι, και τα δημητριακά γενικότερα, είναι μια πρώτη ύλη που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή βιοκαυσίμων, βιοαποικοδομήσιμων πολυμερών και χημικών ουσιών.

Τα πιο συνηθισμένα στο εμπόριο βιοκαύσιμα είναι: 1) το βιο-ντίζελ και 2) η βιο-αιθανόλη. Το βιο-ντίζελ είναι μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων, οι οποίοι παράγονται κυρίως από ελαιούχους σπόρους (ηλίανθος, ελαιοκράμβη κ.α) και μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε μόνο του είτε σε μίγμα με ντίζελ σε πετρελαιοκινητήρες.

Η ελαιοκράμβη (*Brassica spp.*) είναι ένα ετήσιο φυτό που ανήκει στην οικογένεια των σταυρανθών. Πολλαπλασιάζεται με σπόρο και καλλιεργείται συνήθως σαν πρώτη ύλη για την παραγωγή ελαίου και σε μικρότερη έκταση για τα φύλλα της (ζωοτροφή). Ο μικρός στρόγγυλος σπόρος της έχει κατά μέσο όρο μεγάλη περιεκτικότητα σε έλαια (30-50%). Η ελαιοκράμβη θεωρείται παγκοσμίως ως το τρίτο σημαντικότερο ελαιοπαραγωγικό φυτό. Οι τεχνικές καλλιέργειας είναι όμοιες με εκείνες των χειμερινών σιτηρών.

Πίνακας 1.1: Σύσταση κραμβάλευρου  
(Koutinas *et al.*, 2010).

<b>Σύσταση</b>	<b>Ποσοστό</b>
Moisture* <sup>1</sup>	10.59%
TN (mg/g, db)* <sup>2</sup>	62.19
Protein (% , 6.25×TN, db)* <sup>3</sup>	38.87%
Oil (% , db)* <sup>4</sup>	2.45%
Ash (% , db)* <sup>5</sup>	7.48%
FAN (mg/g, db)* <sup>6</sup>	0.6504
TP (mg/g, db)* <sup>7</sup>	19.19
IP (mg/g, db)* <sup>8</sup>	0.8064

\*<sup>1</sup>Moisture=υγρασία, \*<sup>2</sup>TN= ολικό άζωτο, \*<sup>3</sup>Protein=πρωτεΐνες, \*<sup>4</sup>oil= λίπος, \*<sup>5</sup>Ash= τέφρα, \*<sup>6</sup>FAN=ελεύθερες αμινομάδες που προκύπτουν από την υδρόλυση των πρωτεϊνών, \*<sup>7</sup>TP=ολικός φώσφορος, \*<sup>8</sup> IP=φώσφορος που περιέχεται σε ανόργανα άλατα.

Μετά την εκχύλιση του ελαίου, τα υπολείμματα της (η λεγόμενη πίτα ή κραμβάλευρο) χρησιμοποιούνται στην κτηνοτροφία καθώς έχουν μεγάλη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη (10-45%). Το έλαιο της ελαιοκράμβης χρησιμοποιείται για την παραγωγή βιο-ντίζελ. Το κραμβάλευρο (Πίνακας 1.1) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή θρεπτικών μέσων καθώς είναι πλούσιο σε πρωτεΐνη όπως και άλλα θρεπτικά συστατικά (Wang R *et al.*, Submitted.)

Το σιτάρι είναι ετήσιο φυτό που ανήκει στην οικογένεια των δημητριακών (Graminae). Στην Ελλάδα το σιτάρι (σκληρό και μαλακό) είναι το πιο διαδεδομένο ετήσιο φυτό και η καλλιέργεια του είναι εκτεταμένη σε όλη τη χώρα. Τα τελευταία χρόνια, παρατηρείται έντονη δραστηριότητα στη χρησιμοποίηση του σιταριού ως πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοκαυσίμων, βιο-αποικοδομήσιμων πολυμερών και χημικών ουσιών (Koutinas *et al.*, 2004, 2005, 2010). Από την άλεση του σιταριού προκύπτει αλεύρι, το οποίο είναι πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά και μπορεί να αποτελέσει ιδανική πρώτη ύλη για βιομετατροπές.

Πίνακας 1.2: Σύσταση αλεύρων από σιτάρι  
(www.wikipedia.gr, Elizabeth *et al.*, 1970).

<b>Θρεπτικά συστατικά</b>	<b>Ποσοστό</b>
Υδατάνθρακες (κυρίως άμυλο)	65-70%
Πρωτεΐνες (γλουτένη)	7-14%
Ανόργανα άλατα/ Βιταμίνες (E, B)	0,5-2%
Λιπαρά	0,5-0,6%
Νερό	11-15%

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει ιδιαίτερη κινητοποίηση και ευαισθητοποίηση στον τομέα της προστασίας του περιβάλλοντος. Στα πλαίσια λοιπόν της «πράσινης ανάπτυξης» εκτός από την προσπάθεια αντικατάστασης του πετρελαίου από βιοκαύσιμα που παράγονται από φυτική βιομάζα εντάσσεται και ο τομέας παραγωγής βιο-αποικοδομήσιμων πολυμερών από διάφορες φυτικές κυρίως πρώτες ύλες. Το σιτάρι, για παράδειγμα, αποτελεί πολύ καλή πρώτη ύλη για την παραγωγή βιο-αποικοδομήσιμων πολυμερών (Koutinas *et al.*, 2005, 2006, 2010). Μάλιστα μπορεί να αποτελέσει την μοναδική πρώτη ύλη για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών εκείνων που παράγουν ΠΥΑ (πολύ-υδροξυ αλκανοϊκοί εστέρες) καθώς είναι πλούσιο σε άμυλο, πρωτεΐνη και άλλα θρεπτικά συστατικά (βλ. Κεφάλαιο 3 & 6).

## **1.2 Πολύ-υδροξυαλκανοϊκοί εστέρες (ΠΥΑ)**

Οι πολύ-υδροξυαλκανοϊκοί εστέρες είναι μια ομάδα βιο-πολυμερών, η οποία έχει αρχίσει να προκαλεί ενδιαφέρον στους επιστήμονες και στην βιομηχανία τις τελευταίες τρεις δεκαετίες. Το κύριο πλεονέκτημα αυτών των βιοπολυμερών είναι ότι είναι πλήρως βιοδιασπώμενα και μπορούν να αντικαταστήσουν τα συμβατικά πλαστικά. Το πιο μελετημένο μέλος της

οικογένειας αυτής είναι ο πολυ-υδροξυβουτυρικός εστέρας (ΠΥΒ) καθώς έχει βρεθεί ότι παράγεται ενδοκυτταρικά από πλήθος μικροοργανισμών, οι οποίοι χρησιμοποιούν ως βασική πηγή άνθρακα κυρίως γλυκόζη. Τελευταία υπάρχει μια μεγάλη στροφή και ερευνητική δραστηριότητα στον τομέα εύρεσης εναλλακτικών και φθηνότερων πρώτων υλών για την παραγωγή ΠΥΒ, από παραπροϊόντα διαφόρων βιομηχανιών. Ο επιδιωκόμενος βέβαια σκοπός δεν είναι μόνο η παραγωγή ΠΥΒ αλλά και η αύξηση της παραγωγικότητας αυτού του βιοπλαστικού σε επίπεδα τέτοια που να είναι δυνατή η παραγωγή του σε βιομηχανική κλίμακα.

Εκτεταμένη περιγραφή για τους πολύ-υδροξυαλκανοϊκούς εστέρες ακολουθεί στο επόμενο κεφάλαιο. Στο σημείο αυτό γίνεται μια απλή αναφορά για να είναι δυνατή η σύντομη περιγραφή όλης της μελέτης σε αρχικό στάδιο στην υποενότητα που ακολουθεί.

### **1.3 Σκοπιμότητα της μελέτης**

Ο σκοπός και το αντικείμενο της μελέτης είναι η αξιολόγηση της δυνατότητας παραγωγής πολύ-υδροξυαλκανοϊκών εστέρων, δηλαδή βιοπολυμερών, από παραπροϊόντα βιομηχανιών παραγωγής βιο-ντίζελ πρώτης γενιάς. Για αυτόν τον λόγο χρησιμοποιήθηκε το κραμβάλευρο και η γλυκερόλη για την παραγωγή πολύ-υδροξυαλκανοϊκών εστέρων.

Το κραμβάλευρο είναι ουσιαστικά αυτό που προκύπτει μετά την άλεση της ελαιοκράμβης αφού προηγουμένως έχει εκχυλιστεί το έλαιο που αξιοποιείται για την παραγωγή βιο-ντίζελ.

Η γλυκερόλη αποτελεί παραπροϊόν της διεργασίας παραγωγής βιο-ντίζελ και χρησιμοποιήθηκε για την υγρή ζύμωση, του *Cupriavidus necator* DSZM545 σε αναδευόμενα δοχεία υπό αερόβιες συνθήκες, με στόχο την αξιολόγηση της δυνατότητας παραγωγής πολύ-υδροξυβουτυρικού εστέρα από το συγκεκριμένο μικροοργανισμό.

Η καθαρή γλυκερόλη χρησιμοποιήθηκε ως πηγή άνθρακα και ενέργειας ενώ τα κραμβάλευρα χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή

θρεπτικών μέσων για μικροβιακές ζυμώσεις (με τον *Cupriavidus necator*). Τα κραμβάλευρα μετατράπηκαν σε θρεπτικό μέσο για την παραγωγή ΠΥΒ (πολύ-υδροξυ-βουτυρικού εστέρα) μέσω της υδρόλυσης της περιεχόμενης πρωτεΐνης τους από πρωτεολυτικά ένζυμα. Οι πρωτεάσες προέκυψαν κατά την ζύμωση στερεής κατάστασης με τον μύκητα *Aspergillus oryzae*. Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για την στερεή ζύμωση ήταν τα κραμβάλευρα. Μετά την ολοκλήρωση της ζύμωσης στερεάς κατάστασης (και την παραγωγή των ακατέργαστων ενζύμων) τα εναπομείναντα στέρεα προστέθηκαν σε υδατικό εναιώρημα που περιείχε κραμβάλευρα, όπου και γίνεται η ενζυμική υδρόλυση της πρωτεΐνης. Σε αυτό το σημείο έγινε προσπάθεια παραγωγής, μέσω διαφοροποίησης παραμέτρων (χρόνος ζύμωσης σε στερεά κατάσταση, χρόνος ενζυμικής υδρόλυσης), όσο το δυνατόν, πλουσιότερου θρεπτικού υποστρώματος. Το υδρόλυμα που προέκυψε αναμείχθηκε με γλυκερόλη και χρησιμοποιήθηκε, μετά την κατάλληλη επεξεργασία, για την πραγματοποίηση υγρής ζύμωσης, σε αναδευόμενα δοχεία, με τον *Cupriavidus necator* DSZM545, βακτήριο που γενικά παράγει ΠΥΒ. Κατά την διάρκεια της υγρής ζύμωσης αναλύθηκαν ποσοτικά οι κινητικές των συγκεντρώσεων α) γλυκερόλης β) μικροβιακής μάζας και γ) ΠΥΒ. Τα γενικά συμπεράσματα που προέκυψαν είναι: 1) Το εργαστηριακά παραγόμενο υδρόλυμα από κραμβάλευρα είναι ένα θρεπτικό μέσο στο οποίο ο *Cupriavidus necator* DSZM545 μπορεί να αναπτυχθεί, 2) Ο *Cupriavidus necator* DSZM545 μπορεί να αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο πλούσιο σε ανόργανα άλατα και ιχνοστοιχεία χρησιμοποιώντας την γλυκερόλη ως πηγή άνθρακα αλλά το εργαστηριακά παραγόμενο υδρόλυμα είναι πιο ικανοποιητικό, 3) Με αυτήν την διαδικασία που περιγράφηκε είναι δυνατή η παραγωγή ΠΥΒ και μάλιστα ο μ.ο μπορεί να καταναλώνει την γλυκερόλη, σχετικά γρηγορότερα, από την στιγμή που έχει προσαρμοστεί στο νέο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης, 4) Η θερμική αποστείρωση του υδρολύματος από κραμβάλευρα επηρεάζει αρνητικά την κατανάλωση γλυκερόλης από το βακτήριο, το οποίο φαίνεται ότι καταναλώνει γρηγορότερα την γλυκερόλη όταν χρησιμοποιείται το υδρόλυμα κραμβάλευρου σε σχέση με την χρησιμοποίηση άλλων

οργανικών εμπορικών θρεπτικών μέσων και 5) Όσο μειώνεται η γλυκερόλη του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης, αυξάνεται η ξηρή βιομάζα και το ενδοκυτταρικό περιεχόμενο σε ΠΥΒ. Αυξανόμενης της αρχικής συγκέντρωσης της γλυκερόλης στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης αυξάνεται η συγκέντρωση της ξηρής βιομάζας και του ενδοκυτταρικού περιεχομένου της σε ΠΥΒ αλλά ο βαθμός απόδοσης της ξηράς ουσίας σε ΠΥΒ παραμένει σταθερός.

Εκτός όμως από την εργαστηριακή έρευνα έγινε και σχεδιασμός ενός βιο-διυλιστηρίου με στόχο την οικονομική αξιολόγηση μιας εγκατάστασης παραγωγής ΠΥΒ. Το ενδιαφέρον και η καινοτομία σε αυτό το σημείο της μελέτης είναι, ότι η παραγωγή ΠΥΒ, γίνεται με την αξιοποίηση του σιταριού ως μοναδική και αποκλειστική πρώτη ύλη. Κάτι το οποίο είναι δυνατόν βάσει βιβλιογραφικών αναφορών (Koutinas *et al.*, 2004, 2005, 2006, 2007, 2010). Το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε για τον σχεδιασμό και την τεχνοοικονομική μελέτη μιας τέτοιας επένδυσης είναι το Super-ProDesigner 7.0. Τελικά υπολογίστηκε το συνολικό κεφάλαιο επένδυσης και το κόστος λειτουργίας μιας τέτοιας επένδυσης. Ο στόχος της συγκεκριμένης προτεινόμενης διεργασίας και η διενέργεια της οικονομικής ανάλυσης, είναι η παραγωγή πολύ-υδροξυ-βουτυρικού εστέρος με την χρησιμοποίηση του σιταριού, ως μοναδικής και αποκλειστικής πρώτης ύλης, σε μεγάλη κλίμακα μέσω αειφόρων διεργασιών. Το σιτάρι το οποίο αλέθεται χρησιμοποιείται για τις μυκητιακές βιομετατροπές με τον *Aspergillus awamori*, και έτσι παράγονται αμυλολυτικά και πρωτεολυτικά ένζυμα (κυρίως βλ.Κεφάλαιο 3 & Κεφάλαιο 6). Τα ένζυμα αυτά χρησιμοποιούνται για την υδρόλυση του αμύλου και της γλουτένης που περιέχεται στο σιτάρι. Η παραγόμενη γλυκόζη αποτελεί την πηγή άνθρακα για την υγρή ζύμωση με τον *Cupriavidus necator*. Με την ολοκλήρωση της ζύμωσης παράγεται ΠΥΒ και στην συνέχεια ακολουθεί η ανάκτηση του ενδοκυτταρικού περιεχομένου. Η προσαρμογή των θεωρητικών δεδομένων στο Super-Pro designer 7.0 οδηγεί σε έναν πλήρη σχεδιασμό της βιοδιεργασίας και δίνει

την δυνατότητα αξιολόγησης μιας τέτοιας επένδυσης, σε μεγάλη βιομηχανική κλίμακα, με οικονομικούς όρους.



## Κεφάλαιο 2

### Παραγωγή ΠΥΒ

#### 2.1 Ιστορία του ΠΥΒ

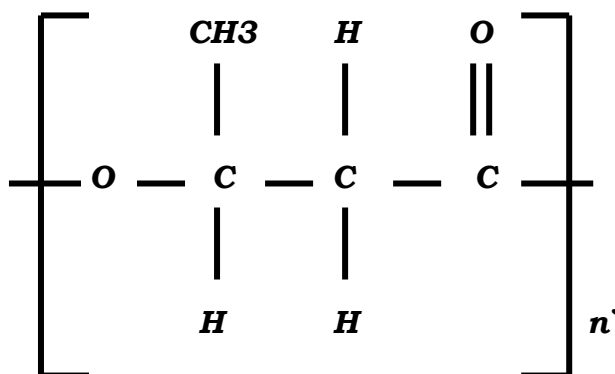
Το ΠΥΒ είναι ένας πολυεστέρας, ο οποίος παράγεται από πολλά βακτήρια και συσσωρεύεται ενδοκυτταρικά σε αυτά με την μορφή κόκκων (granules) περίπου σφαιρικών (Εικόνα 2.1). Έχει αποδειχτεί ότι το ΠΥΒ παράγεται όταν τα θρεπτικά υποστρώματα είναι φτωχά σε θρεπτικά συστατικά όπως N, P, S, O ή Mg αλλά περιλαμβάνουν σε περίσσεια στην σύνθεσή τους πηγή C (Lee, 1996b). Το ΠΥΒ θα μπορούσε να ληφθεί ότι είναι για τα βακτήρια ότι το λίπος για τον άνθρωπο, δηλαδή αποταμιευτική πηγή άνθρακα και ενέργειας.



**PHA granule**

Εικόνα 2.1: Το βακτήριο *Wautersia eutropha* και κόκκοι ΠΥΒ ενδοκυτταρικά ([www2.unil.ch/ibpv/WWWPoirier/research.html](http://www2.unil.ch/ibpv/WWWPoirier/research.html)).

Το ομοπολυμερές έχει ως επαναλαμβανόμενη δομική μονάδα το 3-υδροξυβουτυρικό οξύ, όπως φαίνεται και στο Εικόνα 2.2.



Εικόνα 2.2: Χημικός τύπος του 3-υδροξυ-βουτυρικού οξέος.  
{Επαναλαμβανόμενη μονάδα του πολυμερούς πολύ- υδροξυβουτυρικό οξύ, ΠΥΒ (n= 100-30.000)}.

### 2.1.1 Η ανακάλυψη του ΠΥΒ

Στα μέσα του 1920, ένας μικροβιολόγος, ο Lemoigne, στο Ινστιτούτο Pasteur στο Παρίσι, ήταν ο πρώτος που ανακάλυψε την ύπαρξη του πολύ-υδροξυ-βουτυρικού εστέρα, ΠΥΒ, στο βάκιλο *Bacillus megaterium* (Lemoigne, 1927). Αργότερα αναγνωρίστηκε και ταυτοποιήθηκε ότι το ΠΥΒ ανήκει στην οικογένεια των πολυ-υδροξυ-αλκανοϊκών εστέρων, ΠΥΑ (polyhydroxyalkanoates). Αυτή η χρονική στιγμή σηματοδότησε και το ξεκίνημα των πρώτων ερευνών για το ΠΥΒ. Η λειτουργία του ως αποταμιευτική πηγή ενέργειας και άνθρακα του στον βάκιλο δεν ήταν σαφώς αποδεδειγμένη και ευρέως γνωστή μέχρι την δεκαετία του 1950. Θεωρούσαν, οι επιστήμονες εκείνης της εποχής ότι το ΠΥΒ παραγόταν μόνο στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια (Forysth *et al.*, 1958; Doydoroff and Stanier, 1959). Περισσότερη έρευνα όσον αφορά την κατανόηση του τρόπου παραγωγής του ΠΥΒ, της αποικοδόμησης του, της λειτουργίας του ως αποταμιευτική πηγή ενέργειας και άνθρακα κ.λπ., άρχισε περίπου το 1960 (Hippe, 1967; Ellar *et al.*, 1968; Bohlken, 1969a,b).

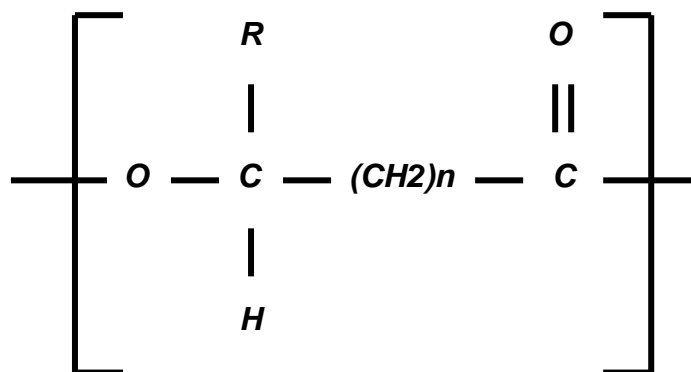
### **2.1.2 Η ταυτοποίηση και κατάταξη των ΠΥΑ**

Στο τέλος περίπου της δεκαετίας του 1970 το ΠΥΒ, για πρώτη φορά, έγινε αποδεκτό ως αποταμιευτικό βακτηριακό υλικό (bacterial storage material). Ακόμα μέχρι τότε θεωρούταν ότι το ΠΥΒ είναι το μοναδικό μέλος της οικογένειας των ΠΥΑ.

Μόλις το 1974, οι Wallen και Rohwedder ανακάλυψαν και άλλα μέλη της οικογένειας των πολύ-υδροξυ-αλκανοϊκών εστέρων. Η ανακάλυψη τους, μπορεί να θεωρηθεί το ορόσημο για το ξεκίνημα της δεύτερης φάσης ανάπτυξης και εξέλιξης της επιστήμης και της τεχνολογίας όσον αφορά στην μελέτη των ΠΥΑ. Μέχρι το τέλος της δεκαετίας του 1980 ένας μεγάλος αριθμός μικροοργανισμών αναγνωρίστηκε ότι παράγει ΠΥΒ ή ΠΥΑ. Σε αυτούς συμπεριλαμβάνονται όχι μόνο αρνητικά κατά Gram βακτήρια αλλά και θετικά καθώς επίσης αερόβια (Byrom, 1987) και αναερόβια βακτήρια.

Το ΠΥΒ είναι ένα μερικώς κρυσταλλικό πολυμερές, το οποίο έχει παρόμοιες ιδιότητες με τα θερμοπλαστικά. Η ευρύτερη χρησιμοποίηση του σε διάφορες εφαρμογές περιορίστηκε λόγω της μειωμένης θερμικής αντοχής του και της ευθραυστότητας του (Lee, 1996a,b). Η αναγνώριση και ταυτοποίηση και άλλων μελών της οικογένειας των πολύ-υδροξυαλκανοϊκών εστέρων οδήγησε στην ανακάλυψη συμπολυμερών με καλύτερες μηχανικές και βιολογικές ιδιότητες (Caron *et al.*, 1983; Odham *et al.*, 1986; Findlay and White, 1987; Withholt *et al.*, 1988).

Μέχρι σήμερα πάνω από 130 μέλη της οικογένειας των ΠΥΑ έχουν αναγνωριστεί και ταυτοποιηθεί. Παρόλα αυτά, μόνο μερικά από αυτά έχουν παραχθεί σε μεγάλες ποσότητες ενδοκυτταρικά ώστε να είναι δυνατός ο χαρακτηρισμός όλων των ιδιοτήτων του τελικού πολυμερούς (Lee, 1996a,b). Η Εικόνα 2.3 δείχνει την δομή των πολύ-υδροξυ-αλκανοϊκών εστέρων και κάποιων μελών της οικογένειας των ΠΥΑ που έχουν αναγνωριστεί και ταυτοποιηθεί.



<b>n=1</b>	<b>R= υδρογόνο</b>	<b>Πολύ-3 υδροξυ-προπιονικός εστέρας</b>
	<b>R= μεθύλιο</b>	<b>Πολύ-3 υδροξυ-βουτυρικός εστέρας</b>
	<b>R= αιθύλιο</b>	<b>Πολύ-3 υδροξυ-βαλερικός εστέρας</b>
	<b>R= προπύλιο</b>	<b>Πολύ-3 υδροξυ-εξανικός εστέρας</b>
	<b>R= πεντύλιο</b>	<b>Πολύ-3 υδροξυ-οκτανικός εστέρας</b>
	<b>R= νούλιο</b>	<b>Πολύ-3υδροξυ-δωδεκα-οκτανικός εστέρας</b>
<b>n=2</b>	<b>R= υδρογόνο</b>	<b>Πολύ-4-υδροξυ-προπιονικός εστέρας</b>
	<b>R= μεθύλιο</b>	<b>Πολύ-4 υδροξυ-βουτυρικός εστέρας</b>
<b>n=3</b>	<b>R= υδρογόνο</b>	<b>Πολύ-5-υδροξυ-προπιονικός εστέρας</b>
	<b>R= μεθύλιο</b>	<b>Πολύ-5-υδροξυ-βουτυρικός εστέρας</b>
<b>n=4</b>	<b>R= εξύλιο</b>	<b>Πολύ-6-υδροξυ-δωδεκαοκτανικός εστέρας</b>

Εικόνα 2.3: Δομή των ΠΥΑ και κάποιων αντιπροσωπευτικών μελών της οικογένειας αυτής, που έχουν ταυτοποιηθεί, n=100-30.000

(Lee, 1996a).

Οι πολύ-υδροξυ-αλκανοϊκοί εστέρες μπορούν να καταταγούν ανάλογα με το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας των υδροξυ-αλκανοϊκών τους μονομερών σε τρεις κατηγορίες: στις αλυσίδες μικρού μήκους (short chain length, SCL), στις μετρίου μήκους αλυσίδες (medium chain length,

MCL) και στις αλυσίδες μεγάλου μήκους (long chain length, LCL) (Steinbüchel *et al.*, 1992).

Στον Πίνακα 2.1 που ακολουθεί φαίνεται ο αριθμός των ατόμων άνθρακα που καθορίζουν σε ποιά από τις τρεις κατηγορίες ανήκει ένα μέλος της οικογένειας των πολύ-υδροξυ-αλκανοϊκών εστέρων. Τα πιο γνωστά συμ-πολυμερή είναι: το πολύ(3-υδροξυβουτυρο-3-υδροξυβαλερικός εστέρας), (P(3HB-co-3HV)), και το πολύ(3-υδροξυβουτυρο-4-υδροξυβουτυρικός εστέρας) (Doi *et al.*, 1990; Zhang *et al.*, 1994; Madison and Huisman, 1999).

Πίνακας 2.1: Κατάταξη των πολύ-υδροξυαλκανοϊκών εστέρων

(πηγή: Steinbüchel *et al.*, 1992).

<b>Κατάταξη ΠΥAs</b>	<b>Αριθμός ατόμων άνθρακα- Μήκος μονομερών</b>	<b>Παραδείγματα</b>
SCL	3-5	Πολύ(3-υδροξυβουτυρικός εστέρας)
MCL	6-14 ή 16*	Πολύ(3-υδροξυεξανικός εστέρας)
LCL	> 14 ή 16*	

\* Οι Steinbüchel *et al.*, (1992) ανέφεραν ότι τα μονομερή με περισσότερα από 14 άτομα άνθρακα πρέπει να ανήκουν στα μακράς αλύσου πολυμερή, ενώ οι Madison και Huisman (1999), ανέφεραν κάτι λίγο διαφορετικό, ότι τα μονομερή με 16 άτομα άνθρακα ανήκουν στα πολυμερή μακράς αλύσου. Αυτός ο τρόπος κατάταξης έχει από τότε ακολουθηθεί από πολλούς επιστήμονες και αναλυτές.

### **2.1.3 Κλωνοποίηση των ΠΥΑ και βιοσύνθεση γονιδίων**

Η πρόοδος της επιστήμης της Μοριακής Βιολογίας και της Γενετικής Μηχανικής ώθησε τους ερευνητές να πειραματιστούν για να μπορέσουν μεταφέροντας γονίδια από ένα βακτηρίδιο δότη σε ένα άλλο βακτηρίδιο δέκτη να αυξήσουν την παραγωγή των πολύ-υδροξυ-αλκανοϊκών εστέρων και να βελτιώσουν τις ιδιότητές τους. Τα τελευταία χρόνια είναι γνωστό ότι έχει αναπτυχθεί η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA (recombinant DNA) με σκοπό την βελτίωση ορισμένων ιδιοτήτων και την δημιουργία ιδιοτήτων στους μικροοργανισμούς. Με βάση αυτήν την τεχνολογία, μεγάλα μόρια DNA διασπώνται από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες σε συγκεκριμένες θέσεις και τα κλάσματα του DNA μεταφέρονται με πλασμίδια ή βακτηριοφάγους σε άλλους μικροοργανισμούς. Όσον αφορά, την παραγωγή ΠΥΑ, σαν μικροοργανισμός δέκτης έχει χρησιμοποιηθεί το βακτήριο *Escherichia coli* από τον οποίο έχουν δημιουργηθεί κλώνοι, οι οποίοι περιέχουν γονίδια άλλων μικροοργανισμών που παράγουν ΠΥΑ. Αξίζει να σημειωθεί ότι το ανασυνδυασμένο βακτήριο *E.coli* έχει αποδειχτεί ότι αποτελεί καλή επιλογή για την παραγωγή ΠΥΒ, αφού παρατηρείται μεγάλη ενδοκυτταρική παραγωγή και είναι δυνατόν να παραχτούν σε μεγάλες συγκεντρώσεις και συμπολυμερή της οικογένειας των πολύ-υδροξυ-αλκανοϊκών εστέρων (Yu *et al.*, 2003).

### **2.2 Βιο-αποικοδομήσιμα πλαστικά**

Τα πλαστικά είναι ευρέως διαδεδομένα και υπάρχουν παντού στη σύγχρονη κοινωνία. Γενικά τα πλαστικά που παράγονται από πετρέλαιο, ως υλικά είναι φτηνά, ελαφριά, ανθεκτικά και βρίσκουν διάφορες εφαρμογές. Αυτές οι ιδιότητες οδήγησαν τις διάφορες βιομηχανίες παραγωγής πλαστικών σε ραγδαία ανάπτυξη και ευημερία. Παρόλα αυτά οι περιβαλλοντικές συνέπειες από την ευρεία και υπέρμετρη χρησιμοποίησή τους είναι ολέθριες και φυσικά επιβλαβείς για το περιβάλλον ειδικότερα όταν τα πλαστικά εναποτίθενται στις διάφορες χωματερές απόρριψής τους.

Μέσα σε μια χρονιά, το 1994, πάνω από 110 εκατομμύρια τόνοι πλαστικού παρήχθησαν σε όλο τον κόσμο. Το 2003, η παραγωγή αυξήθηκε και μάλιστα παρήχθησαν πάνω από 350 δισεκατομμύρια τόνοι ενώ για το 2011 προβλέπεται η παραγωγή πλαστικών στον κόσμο να ξεπεράσει τους 500 δισεκατομμύρια τόνους.

Τα περισσότερα από τα πλαστικά είναι θερμοπλαστικά, συμπεριλαμβανομένων φυσικά και του πολυαιθυλενίου, πολυπροπυλενίου κ.λπ., τα οποία παράγονται από την πετρέλαιο-βιομηχανία και ουσιαστικά δεν αποικοδομούνται (non-degradable), (Demichely, 1996; Gostomski, 1996).

Σε ευρωπαϊκό επίπεδο, κάθε χρόνο κυκλοφορούν στην αγορά 47,7 εκατ. τόνοι πλαστικών, με το 37% να είναι υλικά συσκευασίας, εκ των οποίων οι 19 εκατ. τόνοι πάνε στα σκουπίδια. Από αυτούς τους 19 εκατ. τόνους, οι 9 εκατ. τόνοι ανακτώνται και οι υπόλοιποι 10 εκατ. τόνοι απορρίπτονται.

Η Υπηρεσία Προστασίας Περιβάλλοντος των ΗΠΑ (U.S.E.P.A) αναφέρει ότι το 2003, παρήχθησαν 19,3 εκατομμύρια τόνοι πλαστικών εκ των οποίων μόνο οι 0,7 εκατομμύρια τόνοι ανακυκλώθηκαν. Το 2003, παρήχθησαν πάνω από 236 εκατομμύρια τόνοι αστικών στερεών αποβλήτων, ([www.epa.gov](http://www.epa.gov)), στις ΗΠΑ, ενώ στην δυτική Ευρώπη, υπολογίστηκε ότι το 7,4% των στερεών αστικών αποβλήτων ήταν πλαστικά υλικά (65% πολυαιθυλένιο/προπυλένιο, 15% πολυστυρένιο, 10 % πολυβινυλοχλωρίδιο κ.λπ.),(Premah and Mukesh, 2005).

Τα χρησιμοποιημένα πλαστικά που απορρίπτονται στις χωματερές, δεν αποσυντίθενται. Ο χρόνος ζωής προϊόντων από PVC και πολυαιθυλένιο είναι περίπου 100 χρόνια. Όλα αυτά σε συνδυασμό με το γεγονός ότι απαιτείται πολύ ενέργεια για την καύση τους ενώ οι εκπομπές σε δύσοσμες πτητικές ουσίες, όπως φουράνια και διοξίνες αυξάνουν την μόλυνση της ατμόσφαιρας και είναι επικίνδυνα για την δημόσια υγεία. Όλα αυτά λοιπόν, είναι αρκετά για να καταδειχτεί η ανάγκη αντικατάστασης των

ορυκτών υδρογονανθράκων ως πρώτες ύλες για την παραγωγή πλαστικών από ανανεώσιμες πρώτες ύλες.

Είναι γεγονός, δε ότι οι δραματικές και επικίνδυνες επιδράσεις στο περιβάλλον που έχει προκαλέσει η ολοένα αυξανόμενη παγκόσμια παραγωγή πλαστικών έχει θορυβήσει και αυξήσει την ανησυχία τις παγκόσμιας κοινής γνώμης. Το ενδιαφέρον για την βιώσιμη (sustainable) παραγωγή βιο-αποικοδομήσιμων πλαστικών διαρκώς αυξάνεται με ταχείς ρυθμούς την τελευταία εικοσαετία (Doi, 1990; Ojumu *et al.*, 2004; Premaj and Mukesh, 2005; Zheg *et al.*, 2005). Βιο-αποικοδομήσιμα πλαστικά είναι αυτά τα οποία μπορούν να διασπαστούν σε απλούστερες χημικές ενώσεις από διάφορους μικροοργανισμούς και επομένως αφού αποσυντίθεται φυσικά δεν μολύνουν το περιβάλλον.

Το πόσο βιοδιασπώμενο είναι ένα πολυμερές εξαρτάται από το μοριακό του βάρος, την μοριακή του δομή και την κρυσταλλικότητά του (Gu, 2003). Στην διεργασία της διάσπασης των βιοπλαστικών σε απλούστερες ενώσεις δυο είναι οι κατηγορίες των ενζύμων που συμμετέχουν: οι ενδο-κυτταρικές και εξω-κυτταρικές από-πολυμεράσες (depolymerases), (Doi, 1990; Gu, 2003). Αυτά τα ένζυμα αρχικά αποικοδομούν το σύνθετο πολυμερές σε απλούστερες αλυσίδες, οι οποίες είναι αρκετά μικρές ώστε να είναι δυνατόν να διαπερνούν τα κυτταρικά τοιχώματα των μικροοργανισμών, οι οποίοι τα αναγνωρίζουν ως θρεπτικά συστατικά.

Μεταξύ των βιοδιασπώμενων πλαστικών, οι πολυεστέρες είναι πολυμερή στα οποία, τα συστατικά τους μέρη, δηλαδή τα μονομερή, συνδέονται μεταξύ τους με εστερικούς δεσμούς που είναι γενικά εύκολο να υδρολυθούν και ως εκ τούτου διάφοροι συνθετικοί πολυεστέρες είναι βιοδιασπώμενοι.

Ο πολύ-3-υδρόξυ-βουτυρικός εστέρας, ΠΥΒ, είναι ένας φυσικός πολυεστέρας, ο οποίος συσσωρεύεται στα βακτηριακά κύτταρα ως μια ανθρακούχος ένωση αποθήκευσης ενέργειας. Έχει αναφερθεί ότι περισσότεροι από 300 μικροοργανισμούς έχουν την δυνατότητα να



συσσωρεύσουν το ΠΥΒ κάτω από ειδικές συνθήκες (δηλαδή, σε θρεπτικό υλικό που περιέχει περιοριστικές συγκεντρώσεις συγκεκριμένων θρεπτικών συστατικών όπως N, P, S, O ή Mg και περίσσεια πηγής άνθρακα όπως γλυκόζη) (Lee, 1996 a,b).

Έχει γίνει εκτεταμένη έρευνα και προσπάθεια για την βιομηχανική παραγωγή ΠΥΒ, ήδη από το 1960. Η ICI πρώτη επιτυχώς παρήγαγε και πούλησε ΠΥΒ χρησιμοποιώντας το αρνητικό κατά Gram βακτήριο *Alcaligenes eutrophus* (Σήμερα *Wautersia eutropha* ή *Ralstonia eutropha* ή *Cupriavidus necator*).

Όμως, το ΠΥΒ δεν χρησιμοποιήθηκε εκτεταμένα παρά τις πολλαπλές δυνατές εφαρμογές του ως εναλλακτικό βιο-διασπώμενο πλαστικό, λόγω του πολύ υψηλότερου κόστους παραγωγής του έναντι των συμβατικών πετροχημικών πλαστικών. Κατά συνέπεια, πολλή προσπάθεια έχει γίνει προς την κατεύθυνση αυτή, δηλαδή την μείωση του συνολικού κόστους παραγωγής του ΠΥΒ. Το κόστος αγοράς των πρώτων υλών, που αποτελεί ουσιαστικά μέρος του άμεσου λειτουργικού κόστους (Κουτίνας, 2009) είναι ένας πολύ σημαντικός παράγοντας που συντελεί στην αύξηση του συνολικού κόστους παραγωγής του ΠΥΒ σε βιομηχανική κλίμακα. Διάφορες πηγές άνθρακα έχουν κατά καιρούς χρησιμοποιηθεί για την ενδοκυτταρική παραγωγή ΠΥΒ σε διάφορα βακτήρια. Οι καλύτερες πηγές άνθρακα είναι η γλυκόζη, η φρουκτόζη, το γαλακτικό οξύ, η σουκρόζη και η μεθανόλη (Choi & Lee, 1997; Kessler *et al.*, 2001; Ojumu *et al.*, 2004; Khanna and Srivastava, 2005c; Verlinden *et al.*, 2007).

## **2.2.1 Ιδιότητες των ΠΥΑ**

### **2.2.1.1 Φυσικές και μηχανικές ιδιότητες**

Το μοριακό βάρος όλων των μελών της οικογένειας των πολύ-υδροξυ-αλκανοϊκών εστέρων κυμαίνεται από 50.000 έως 1.000.000 Da. Στην αρχή, τα μέλη της οικογένειας των ΠΥΑ που είχαν ανακαλυφθεί είχαν μικρότερα μοριακά βάρη και οι τιμές τους κυμαίνονταν μεταξύ του εύρους 20000–30000 Da (Madison and Huisman, 1999). Οι πολύ-υδροξυ-

αλκανοϊκοί εστέρες που έχουν υψηλά μοριακά βάρη έχουν πολλά κοινά χαρακτηριστικά με τα συμβατικά πλαστικά. Στον Πίνακα 2.2 που ακολουθεί, γίνεται μια σύγκριση των ιδιοτήτων των πολύ-υδροξυ-αλκανοϊκών εστέρων με το προπυλένιο. Η θερμοκρασία τήξεως στον Πίνακα 2.2 (Melting Temperature,  $T_m$ ) είναι ουσιαστικά η θερμοκρασία όπου το κρυσταλλικό υλικό αλλάζει φάση και ουσιαστικά μετατρέπεται από στερεό σε υγρό. Η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης (Glass Transition Temperature), στην ουσία είναι η θερμοκρασία εκείνη όπου τα άμορφα κλάσματα μεταπίπτουν από μια υαλώδη σε μια ελαστική φάση. Κάτω από την θερμοκρασία αυτή, ουσιαστικά το πολυμερές, στερείται κινητικότητας (low mobility) και είναι σκληρό και δύσκαμπτο ενώ σε θερμοκρασίες πάνω από την θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης το υλικό γίνεται πιο ελαστικό και εύκαμπτο, εξαιτίας της χαλαρότητας σύνδεσης των μονομερών. Ο όρος κρυσταλλικότητα (crystallinity), υποδηλώνει, το ποσοστό των κρυσταλλικών περιοχών, στο συνολικό όγκο του υλικού. Οι ιδιότητες αυτές εξαρτώνται από το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας του πολυμερούς καθώς επίσης και από τον τρόπο ανάκτησης του.

Πίνακας 2.2: Σύγκριση φυσικών και μηχανικών ιδιοτήτων μεταξύ των βιοαποικοδομήσιμων πλαστικών και του πολύ-προπυλενίου

(Verlinden *et al.*, 2007).

<b>Παράμετρος</b>	<b>PHB</b>	<b>P(3HB-co-3HV)</b>	<b>P(3HB-co-4HB)</b>	<b>PP</b>
$T_m$ (°C)	177	145	150	176
$T_g$ (°C)	2	-1	-7	-10
Crystallinity (%)	70	56	45	60
Extension of break (%)	5	50	444	400

$T_m$  is melting temperature,  $T_g$  is glass transition temperature.

Τα ΠΥΑ έχουν παρόμοιες μηχανικές ιδιότητες με τα θερμοπλαστικά, πχ το πολυαιθυλένιο και το πολυπροπυλένιο. Είναι ελαφριά, ανθεκτικά στο σπάσιμο και ελαστικά. Μάλιστα πολλές φορές παρουσιάζουν και βελτιωμένες ιδιότητες, είναι πιο ανθεκτικά και ελαστικά, όπως φαίνεται στον Πίνακα 2.2. Αυτό συνήθως παρατηρείται στα συμπολυμερή.

### **2.2.1.2 Βιολογικές ιδιότητες**

Εκτός από τις ιδιότητες των πολυμερών, που περιγράφηκαν παραπάνω, η βιο-αποικοδομησιμότητα (biodegradability) είναι ένα πάρα πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό των πολύ-υδροξυ-αλκανοϊκών εστέρων.

Τα μέλη της οικογένειας των ΠΥAs αποικοδομούνται σε διοξείδιο και νερό στην φύση από πολυάριθμους μικροοργανισμούς (Jendrossek, 2001). Από την μια μεριά η παραγωγή των πολύ-υδροξυ-αλκανοϊκών εστέρων βασίζεται συνήθως σε γεωργικά προϊόντα, τα οποία είναι πλούσια σε σάκχαρα ή λιπαρά οξέα, καθώς αυτά αποτελούν τις βασικές πηγές άνθρακα και ενέργειας για την ανάπτυξη των κατάλληλων κάθε φορά μικροοργανισμών, οι οποίοι παράγουν τελικά ενδοκυτταρικά ΠΥΑ. Από την άλλη μεριά τα γεωργικά προϊόντα, που αποτελούν πρώτη ύλη για την παραγωγή ΠΥΑ, χρησιμοποιούν το διοξείδιο του άνθρακα και το νερό, που είτε υπάρχει στην φύση είτε προκύπτει από την φυσική αποικοδόμηση άλλων γεωργικών προϊόντων, ζώων, κοπράνων κ.λ.π. και στην συνέχεια προκύπτουν οι ΠΥAs (Madison and Huisman, 1999).

Όσον αφορά, την βιο-αποικοδομησιμότητα των πολύ-υδροξυ-αλκανοϊκών εστέρων θα μπορούσε να διαχωριστεί σε δυο κατηγορίες: A) ενδοκυτταρική βιο-αποικοδομησιμότητα B) εξωκυτταρική βιο-αποικοδομησιμότητα.

Έρευνες που έγιναν, σε αυτό τον τομέα, έδειξαν ότι η ενδοκυτταρική βιοδιάσπαση, του ΠΥΒ στο βακτήριο *Wautersia eutropha* ήταν μια μακροχρόνια διαδικασία και μάλιστα η βιοδιάσπασή του ήταν 10 φορές πιο αργή από την βιοσύνθεση του (Sudesh *et al.*, 2000). Η εξωκυτταρική βιοδιάσπαση είναι αυτή που στην ουσία έχει τραβήξει το ενδιαφέρον των

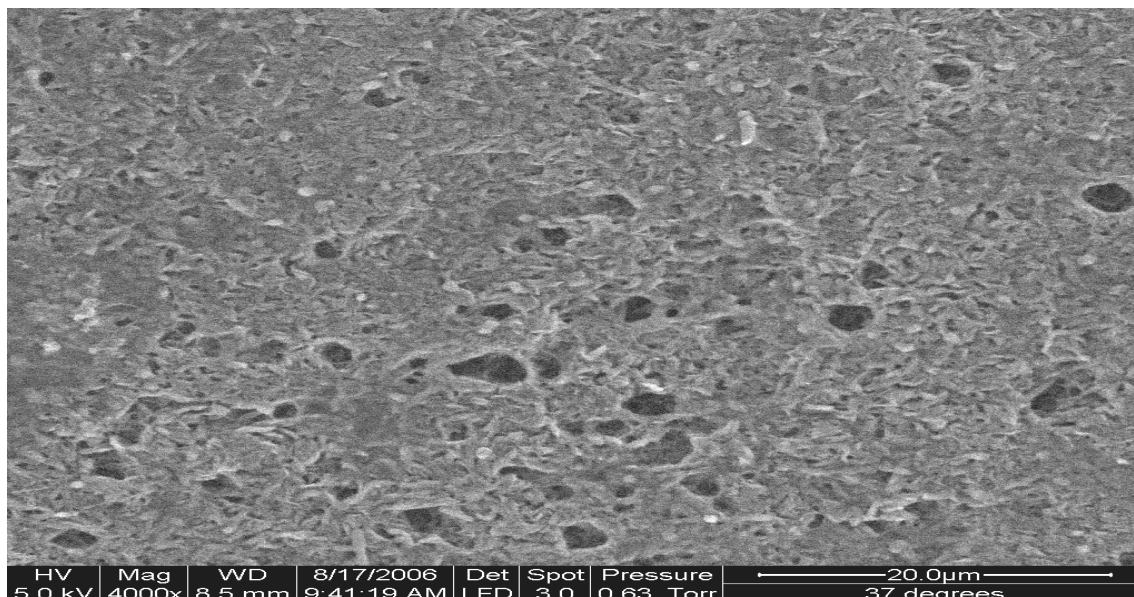
περισσότερων μελετητών. Η Εικόνα 2.4 που ακολουθεί δείχνει την μορφή που λαμβάνουν μπουκάλια από ΠΥΒ, που παρασκευάστηκαν από την Zeneca Bio products, και αφέθηκαν στον χώρο καθαρισμού/επεξεργασίας αποβλήτων της βιομηχανίας, υπό αερόβιες συνθήκες για 0, 2, 4, 6, 8 εβδομάδες (από αριστερά προς τα δεξιά, Εικόνα 2.4).



Εικόνα 2.4: Βιοαποικοδόμηση των ΠΥΑς

(Sudesh *et al.*, 2000).

Η αποικοδόμηση γίνεται με την έκκριση υδρολασών και αποπολυμερασών από τους μικροοργανισμούς (Nobes *et al.*, 1998; Jendrossek, 2007). Η μορφολογία της επιφάνειας των films από ΠΥΒ μελετήθηκε με την χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (Environmental Scanning Electron Microscope), το 2006 από τον Liu. Αυτά τα φιλμ από ΠΥΒ, αφέθηκαν βυθισμένα σε νερό ποταμού για 4 εβδομάδες στους 37°C και στην συνέχεια έγινε οπτική παρατήρηση της επιφάνειας. Στην Εικόνα 2.5 φαίνονται οι άμορφες περιοχές και οι τρύπες που προέκυψαν σε αυτό το υλικό, με την χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου.



Εικόνα 2.5: Αποικοδόμηση φιλμ από ΠΥΒ

(Liu, 2006).

### 2.2.2 Εφαρμογές των ΠΥΑ

Οι πολύ-υδροξυ-βουτυρικοί εστέρες έχουν, όπως έχει ειπωθεί, πολλά κοινά χαρακτηριστικά με τα θερμοπλαστικά και επιπλέον είναι και βιο-αποικοδομήσιμοι. Για αυτόν τον λόγο αναμένεται τις επόμενες δεκαετίες αυτά τα βιο-υλικά να αντικαταστήσουν τα συμβατικά πολύ-χρησιμοποιούμενα πλαστικά / πολυμερή. Η παραγωγή συμπολυμερών και η συνδυασμένη χρήση του αμύλου με πολύ-υδροξυβουτυρικούς εστέρες, έχει διευρύνει το πεδίο εφαρμογής τους. Από πολύ-υδροξυβουτυρικούς εστέρες έχουν παρασκευαστεί διάφορες ταινίες-φιλμ, εμπορευματοκιβώτια (containers), χαρτιά επικάλυψης, βιοδιασπώμενες τσάντες και διάφορα προϊόντα προσωπικής υγιεινής, όπως πάνες και η συσκευασία τους (Martini, 1989; Lee, 1996a; Liggat and Brien, 1997; Noda, 2001; Bucci *et al.*, 2005 and 2007).

Εκτός από την αντικατάσταση των συμβατικών πλαστικών οι πολύ-υδροξυαλκανοϊκοί εστέρες έχουν και διάφορες ιατροφαρμακευτικές εφαρμογές. Τα πλεονεκτήματα των ΠΥΑ, είναι ότι μπορούν να αφομοιωθούν από το ανθρώπινο σώμα. Είναι δε αποδεδειγμένο, ότι πάνω

από μια πίεση αίματος, το 3-υδροξυ-βουτυρικό οξύ είναι παρών στο ανθρώπινο αίμα, κάτι το οποίο από μόνο του καταδεικνύει την εφαρμογή που μπορεί να λάβουν οι πολύ-υδροξυβουτυρικοί εστέρες στον τομέα της Ιατρικής (Wiggam *et al.*, 1997; Zinn *et al.*, 2001). Για αυτόν τον λόγο χρησιμοποιούνται ευρέως ως φαρμακευτικά σκευάσματα (drug carrier).

### **2.3 Βιομηχανίες παραγωγής ΠΥΒ**

Πρώτα η βιομηχανία Zeneca Bio products (formerly ICI, Cleveland, UK) παρήγαγε και πούλησε επιτυχώς, πολύ-υδροξυ-βουτυρικούς εστέρες {P(3HB-co-3HV)} με την επωνυμία BIOPOL™. Η Metabolix (βιομηχανία στις Η.Π.Α), προσπαθώντας να ακολουθήσει την επιτυχημένη ανάπτυξη της ICI, ζήτησε την πατέντα για την παραγωγή του συμπολυμερούς. Η ετήσια παραγωγή των πολύ-υδροξυ-βουτυρικών εστέρων στις Η.Π.Α, Βραζιλία, Γερμανία, Ιαπωνία, Κίνα και Ταϊλάνδη είναι περίπου 1000 τόνοι και η τιμή πώλησή τους κυμαίνεται από 10 έως 20 \$/Kg. Στον Πίνακα 2.3 που ακολουθεί δίνονται σύντομα στοιχεία και πληροφορίες για τις βιομηχανίες που σήμερα εμπλέκονται με την παραγωγή ΠΥΑ.

### **2.4 Σύνθεση του ΠΥΒ**

Το ΠΥΒ μπορεί να παραχθεί από ένα μεγάλο πλήθος μικροοργανισμών αλλά μόνο κάποιοι από αυτούς έχουν χρησιμοποιηθεί για τον σκοπό αυτό. Αυτό συμβαίνει για δυο λόγους: 1) Κάποιοι μ.ο παράγουν ευκολότερα από άλλους ΠΥΑ και 2) Το ενδοκυτταρικό τους περιεχόμενο σε ΠΥΑ είναι υψηλότερο. Το ποσοστό ή περιεχόμενο ή ποσότητα ΠΥΑ που παράγεται ενδοκυτταρικά στους μικροοργανισμούς μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως κριτήριο ή ως ποσοτικό μέτρο για τον καθορισμό της ικανότητας ενός κυττάρου να συνθέσει ΠΥΑ. Άλλωστε όσο υψηλότερη είναι η ενδοκυτταρική παραγωγή ΠΥΑ, σε έναν μικροοργανισμό, τόσο μεγαλύτερη είναι φυσικά η δυνατότητα μετατροπής των πηγών άνθρακα σε πολυεστερικό παράγωγο (όχι ευθέως αναλογικά).

Πίνακας 2.3: Βιομηχανική παραγωγή και εφαρμογές των ΠΥΑs

(Lee, 1996 b).

Εταιρίες/ Βιομηχανίες	Πεδίο δράσης
<p><b>Berlin Packaging Corp.</b> (USA)</p>	<p>Μαρκετινγκ, πωλήσεις, και διανομή του <b>BIOPOL™</b> της Zeneca, (δηλαδή, πώληση των μπουκαλιών σε εταιρίες περιποίησης μαλλιών).</p>
<p><b>Bioscience Ltd. (Finland)</b></p>	<p>Παραγωγή φαρμακευτικών σκευασμάτων.</p>
<p><b>BioVentures Alberta Inc.</b> (Canada)</p>	<p>Παραγωγή ΠΥΑ από <i>Escherichia coli</i>.</p>
<p><b>Metabolix, Inc. (USA)</b></p>	<p>Παραγωγή ΠΥΑ από διαγονιδιακά φυτά. Χορήγηση αδειών τεχνολογίας.</p>
<p><b>Monsanto (USA)</b></p>	<p>Παραγωγή ΠΥΑ από διαγονιδιακά φυτά.</p>
<p><b>ZENECA Bio Products (UK)</b></p>	<p>Παραγωγή ΠΥΒ και Π(3ΥΒ-co-3ΥV) με ημισυνεχή καλλιέργεια του <i>Alcaligenes eutrophus</i>.</p>
<p><b>ZENECA Seeds (UK)</b></p>	<p>Παραγωγή ΠΥΑ από διαγονιδιακά φυτά.</p>

Αυτό το γεγονός με την σειρά του είναι ιδιαίτερα σημαντικό μιας και η διεργασία απομόνωσης του ενδοκυτταρικού παραγώγου είναι σαφέστερα ευκολότερη και λιγότερο επιζήμια.

Τα πιο γνωστά βακτήρια που έχουν χρησιμοποιηθεί και ικανοποιούν αυτούς τους περιορισμούς, είναι τα ακόλουθα: *Wautersia eutropha* (*Ralstonia eutropha* ή *Cupriavidus necator*), *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas oleovorans* και τα τελευταία χρόνια τα ανασυνδυασμένα *Alcaligenes eutrophus*, *Escherichia coli* και *Klebsiella aerogenes* (Steinbuchel et al., 1992).

Τα περισσότερα βακτήρια για να παράγουν ΠΥΑ απαιτούν θρεπτικό υπόστρωμα πλούσιο σε πηγή άνθρακα στα οποία να εμπεριέχεται N, P, S, Mg, K, O ή S σε περιορισμένες συγκεντρώσεις. Με άλλα λόγια, στο θρεπτικό υπόστρωμα / μέσο αύξησης των επιλεγμένων βακτηρίων, πρέπει να γίνεται ελεγχόμενη προσθήκη θρεπτικών συστατικών και ιχνοστοιχείων, έτσι ώστε να είναι δυνατή η παραγωγή υψηλών συγκεντρώσεων και ενδοκυτταρικής περιεκτικότητας ΠΥΑ. Για αυτόν τον λόγο χρησιμοποιούνται ημισυνεχείς καλλιέργειες (αν και τα τελευταία χρόνια υπάρχει ιδιαίτερη κινητοποίηση και στροφή και στις συνεχείς καλλιέργειες), για την παραγωγή υψηλών συγκεντρώσεων ΠΥΒ. Η ζύμωση γενικά ολοκληρώνεται σε δύο στάδια:

1<sup>ο</sup> στάδιο–κυτταρική αύξηση και 2<sup>ο</sup> στάδιο–συσσώρευση ΠΥΑ.

Οι μικροοργανισμοί αρχικά αυξάνονται, με πλήρη τροφοδοσία σε θρεπτικά συστατικά φτάνοντας στην επιθυμητή συγκέντρωση. Αυτό είναι το στάδιο ανάπτυξης (growth stage). Η συσσώρευση του ΠΥΑ ενδοκυτταρικά αρχίζει την χρονική στιγμή που έχει περίπου εξαντληθεί η συγκέντρωση ενός θρεπτικού συστατικού και η σύνθεση συνεχίζεται με την προσθήκη περίσσειας πηγής άνθρακα στο θρεπτικό υπόστρωμα (accumulation stage). Κατά την διάρκεια της σύνθεσης του ΠΥΑ, η υπολειπόμενη κυτταρική μάζα (residual cell weight) {δηλαδή η διαφορά μεταξύ της συνολικής ξηρής κυτταρικής μάζας (total dry cell weight) και της συγκέντρωσης του ΠΥΑ (PHA concentration)} παραμένει σταθερή. Η



αύξηση του συνολικού ξηρού κυτταρικού βάρους οφείλεται μόνο στην ενδοκυτταρική συγκέντρωση του ΠΥΑ. Στον Πίνακα 2.4 που ακολουθεί, παρουσιάζονται κάποια βακτήρια, όπου έχει αποδειχτεί ότι είναι δυνατή η ενδοκυτταρική παραγωγή ΠΥΑ, σε μορφή κόκκων (granules).

#### **2.4.1 Τρόποι παραγωγής ΠΥΑ**

Το πιο γνωστό βιο-πολυμερές της οικογένειας των πολύ-υδροξυ-αλκανοϊκών εστέρων (ΠΥΑ) είναι ο πολύ-υδροξυ-βουτυρικός εστέρας (ΠΥΒ). Πολλοί μικροοργανισμοί μπορούν να παραγάγουν ενδοκυτταρικά ΠΥΒ αλλά το βακτήριο *Ralstonia eutropha* (Πίνακας 2.4) έχει θεωρηθεί σε διάφορες βιβλιογραφικές αναφορές ίσως το καλύτερο, εξαιτίας του γεγονότος ότι συσσωρεύει ενδοκυτταρικά μεγάλα ποσά ΠΥΒ και μπορεί να αυξάνεται εύκολα.

Οι ΠΥΒ, παράγονται μικροβιακά αλλά για την παραγωγή τους απαιτούνται τρία βήματα που είναι τα ακόλουθα:

1. Βακτηριακή αύξηση που στοχεύει στην παραγωγή μεγάλης ποσότητας κυτταρικής βιομάζας.
2. Συσσώρευση ενδοκυτταρικά σε υψηλό ποσοστό ΠΥΒ, και
3. Ανάκτηση ΠΥΒ από τα κύτταρα.

Η οικονομική βιωσιμότητα (economic viability) ολόκληρης της διεργασίας καθορίζεται από το ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων (cell-growth rate), το ενδοκυτταρικό περιεχόμενο σε ΠΥΒ (intracellular PHB content), και την αποδοτικότητα των διάφορων σταδίων διαχωρισμού που επιλέγονται για την ανάκτηση και καθαρισμό του ΠΥΒ (recovery efficiency).

Η επίτευξη υψηλών ποσοστών κυτταρικής αύξησης και πολλαπλασιασμού εξαρτάται από δυο παραμέτρους, την επιλογή κατάλληλων ισορροπημένων θρεπτικών μέσων και την επίτευξη των βέλτιστων συνθηκών επώασης.

Πίνακας 2.4: Παραγωγή ΠΥΑ από διάφορες πηγές άνθρακα.

<b>Βακτήριο</b>	<b>Πηγή Άνθρακα</b>	<b>ΠΥΑ</b>	<b>Πηγή</b>
<i>Wautersia eutropha</i>	<i>Glucose, valeric acid, fructose, butyrolactone acetic acid, propionic acid, butyric acid.</i>	<i>PHB, P(3HB-co- 3HV), P(3HB-co-4HB).</i>	<i>Pötter et al.,2002; Pederson and Srienc, 2004; Yu and Si, 2004; Kim et al., 2005.</i>
<i>Recombinant Escherichia coli</i>	<i>Glucose, fatty acids, such as dodecanoic acid, valeric acid, heptanoic acid, nonanoic acid.</i>	<i>PHB, P(3HB-co- 3HV), P(3HB-co- 3HHx), P(3HBco-3HV- co-3HHx).</i>	<i>Lu et al.,2003; Park et al., 2001; Valentin et al., 2000.</i>
<i>Alcaligenes latus</i>	<i>Glucose, sucrose.</i>	<i>PHB</i>	<i>Wang and Lee, 1997; Verlinden et al., 2007.</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Glucose, fructose, Sucrose, gluconate.</i>	<i>PHB,P(3HB-co- 3HV), P(3HB-co-4HB), P(3HBco-3HV- co-4HB).</i>	<i>Valappil et al. 2007a, b.</i>

Από την άλλη μεριά ικανοποιητική ενδοκυτταρική συσσώρευση ΠΥΒ, επιτυγχάνεται κάτω από μη ισορροπημένες θρεπτικές συνθήκες, όπου η πηγή άνθρακα υπάρχει σε περίσσεια στο θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης ενώ η πηγή αζώτου ή κάποιο άλλο θρεπτικό συστατικό τροφοδοτείται σε πολύ περιορισμένη συγκέντρωση.

Οι συμβατικές στρατηγικές ενθαρρύνουν την ασυνεχή (ή διαλείπωντος έργου) αύξηση (batch growth). Συνήθης πρακτική επίσης αποτελεί η ημι-συνεχής επώαση (fed-batch incubation) όπου μετά την εξάντληση του αζώτου τροφοδοτείται θρεπτικό μέσο με υψηλή συγκέντρωση άνθρακα.

Ο διαχωρισμός των ενδοκυτταρικών κόκκων ΠΥΒ (intracellular PHB granules) απαιτεί τη διάσπαση της κυτταρικής μεμβράνης (cell disruption) και την αφαίρεση του ενδοκυτταρικού προϊόντος από τα λοιπά κυτταρικά υλικά. Οι τρέχουσες διαδικασίες περιλαμβάνουν την χρήση διαλύτη για την εκχύλιση του ΠΥΒ (solvent extraction), ή την χημική πέψη με την χρησιμοποίηση αντιδραστηρίων (chemical reagent) ή την ενζυμική πέψη (enzyme digestion) ή τον συνδυασμό χημικών και μηχανικών μεθόδων (ομογενοποίηση υψηλής πίεσης) (Chisti and Moo-Young, 1986, 1991, 1994; Harrison, 1991; Kula and Schutte, 1987; Middelberg, 1995, Fernanda M. Kapritchkoff *et al.*, 2006; Harrison *et al.*, 1991b; Huimin *et al.*, 2003).

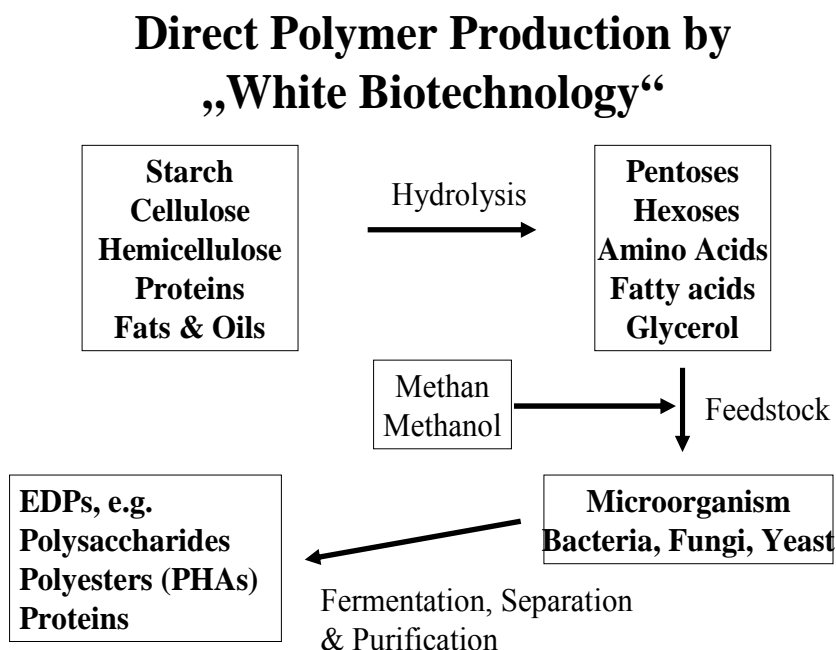
#### **2.4.2 Παραγωγή πολύ-υδροξυ-αλκανοϊκών εστέρων μέσω της εφαρμογής της βιοτεχνολογίας στην βιομηχανία**

Όπως έχει ήδη ειπωθεί ένα σημαντικό μειονέκτημα για την ευρεία χρησιμοποίηση των ΠΥAs είναι το γεγονός ότι στις περισσότερες περιπτώσεις το κόστος παραγωγής τους είναι πολύ υψηλό. Η παραγωγή τους γίνεται κάτω από αερόβιες συνθήκες συνήθως, επομένως μόνο περίπου το 50% των κύριων πηγών άνθρακα, και ένα ακόμη χαμηλότερο ποσοστό των αντιδρώντων ενώσεων που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή των ομο-πολυεστέρων (συνήθως) καταλήγουν στα επιθυμητά προϊόντα. Για να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα, η πιο πιθανή λύση θα ήταν να χρησιμοποιούνται φτηνές πηγές άνθρακα και αζώτου για τη μικροβιακή αύξηση και σύνθεση των ΠΥA έτσι ώστε να μειωθούν οι δαπάνες παραγωγής. Τέτοιες πηγές άνθρακα είναι διαθέσιμες και μπορούν να βρεθούν στα απόβλητα των γεωργικών βιομηχανιών, π.χ η λακτόζη στο

τυρόγαλα, η γλυκερόλη, που παράγεται από την διεργασία παραγωγής biodiesel κ.λπ (Joao Cavalleiro *et al.*, 2009; Mothes *et al.*, 2007).

Χρησιμοποιώντας λοιπόν τέτοιες ανανεώσιμες πηγές είναι δυνατόν να αναπτυχθούν νέες τεχνολογίες για την παραγωγή βιο-αποικοδομήσιμων πλαστικών οι οποίες θα ενσωματώνουν τις αρχές της «καθαρότερης παραγωγής, Cleaner Production» και «της ανάλυσης κύκλου ζωής, Life Cycle Analysis» για τον σχεδιασμό της διεργασίας παραγωγής των βιοδιασπώμενων πλαστικών.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.6, μέσω της υδρόλυσης των αρχικών πρώτων υλών, που θα χρησιμοποιηθούν για την ζύμωση, και με τη βοήθεια διάφορων μικροοργανισμών (συνήθως βακτήρια, Πίνακας 2.5) ποικίλα βιοδιασπώμενα πολυμερή μπορούν να παραχθούν κατά την εφαρμογή των βιοτεχνολογικών πρακτικών στην βιομηχανία.



Εικόνα 2.6: Παραγωγή βιο-αποικοδομήσιμων πλαστικών από διάφορες πηγές άνθρακα

(Braunegg *et al.*, 2009).

Πίνακας 2.5: Μικροοργανισμοί που παράγουν ΠΥΑs  
(Braunegg *et al.*, 2004).

<i>Acinetobacter</i>	<i>Comamonas</i>	<i>Methylomonas</i>	<i>Rhodospirillum</i>
<i>Actinomycetes</i>	<i>Corynebacterium</i>	<i>Methylovibrio</i>	<i>Rubrivivax</i>
<i>Aeromonas</i>	<i>Derxia</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Saccharophagus</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Delftia</i>	<i>Microcoleus</i>	<i>Shinorhizobium</i>
<i>Allochroatiium</i>	<i>Ectothiorhodospira</i>	<i>Microcystis</i>	<i>Sphaerotilus</i>
<i>Anabaena</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Microlunatus</i>	<i>Spirillum</i>
<i>Aphanothece</i>	<i>Ferrobacillus</i>	<i>Moraxella</i>	<i>Spirulina</i>
<i>Aquaspirillum</i>	<i>Gamphospheria</i>	<i>Mycoplana</i>	<i>Staphylococcus</i>
<i>Asticcaulus</i>	<i>Gloeocapsa</i>	<i>Nitrobacter</i>	<i>Stella</i>
<i>Azomonas</i>	<i>Gloeotheca</i>	<i>Nitrococcus</i>	<i>Streptomyces</i>
<i>Azospirillum</i>	<i>Haemophilus</i>	<i>Nocardia</i>	<i>Synecococcus</i>
<i>Azotobacter</i>	<i>Halobacterium</i>	<i>Nostoc</i>	<i>Syntrophomonas</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Haloarcula</i>	<i>Oceanospirillum</i>	<i>Thiobacillus</i>
<i>Beggiatoa</i>	<i>Haloferax</i>	<i>Oscillatoria</i>	<i>Thiocystis</i>
<i>Beijerinckia</i>	<i>Halomonas</i>	<i>Paracoccus</i>	<i>Thiodictyon</i>
<i>Beneckea</i>	<i>Haloquadratum</i>	<i>Paucispirillum</i>	<i>Thiopedia</i>
<i>Brachymonas</i>	<i>Haloterrigena</i>	<i>Pedomicrobium</i>	<i>Thiosphaera</i>
<i>Burkholderia</i>	<i>Hydrogenophaga</i>	<i>Photobacterium</i>	<i>Variovorax</i>
<i>Caryophanon</i>	<i>Hyphomicrobium</i>	<i>Protomonas</i>	<i>Vibrio</i>
<i>Caulobacter</i>	<i>Lamprocystis</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Wautersia</i>
<i>Chlorofrexeus</i>	<i>Lampropedia</i>	<i>Ralstonia</i>	<i>Xanthobacter</i>
<i>Chlorogloea</i>	<i>Leptothrix</i>	<i>Rhizobium</i>	<i>Zoogloea</i>
<i>Chromatium</i>	<i>Methanomonas</i>	<i>Rhodobacter</i>	
<i>Chromobacterium</i>	<i>Methylobacterium</i>	<i>Rhodococcus</i>	
<i>Clostridium</i>	<i>Methylocystis</i>	<i>Rhodopseudomonas</i>	

## 2.5 Φτηνές πρώτες ύλες για την παραγωγή βιο-αποικοδομήσιμων πλαστικών

ΠΥΑ δύναται να παραχτούν από διάφορες πηγές άνθρακα και πολλούς μικροοργανισμούς. Στον Πίνακα 2.6, που ακολουθεί φαίνονται τα αποτελέσματα από διάφορες ζυμώσεις οι οποίες πραγματοποιήθηκαν από διάφορους μικροοργανισμούς και διάφορες πηγές άνθρακα. Από τις πιο σημαντικές ανανεώσιμες πρώτες ύλες που εμφανίζουν ενδιαφέρον και πληρούν τις προϋποθέσεις για παραγωγή βιο-αποικοδομήσιμων πλαστικών είναι το τυρόγαλα, φυτικά έλαια που εκχυλίζονται από σπόρους πλούσιους

σε λάδι ή παράγονται ως απόβλητα από διάφορες βιομηχανίες τροφίμων, η ακατέργαστη γλυκερόλη που προκύπτει κατά την παραγωγή βιοντίζελ, υδρολύματα λιγνοκυτταρινούχων υλικών και υδρολύματα αμύλου ή αλεύρων (Braunegg *et al.*, 2009; Cavalheiro *et al.*, 2009; Tin- Hen Huan *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2001; Koutinas *et al.*, 2007; Huimin *et al.*, 2003). Στις επόμενες ενότητες παρουσιάζεται βιβλιογραφική επισκόπηση όσον αφορά την παραγωγή ΠΥΑ από ακατέργαστη (απόβλητη) γλυκερόλη και υδρολύματα αλεύρου ή αλεύρων.

### **2.5.1 Υδρολύματα αμύλου ή αλεύρων**

Το άμυλο αποτελεί μια ανανεώσιμη πηγή άνθρακα που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τη βιομηχανική παραγωγή ΠΥΑ. Η χρησιμοποίηση του αμύλου ως πηγή άνθρακα για τη βιοτεχνολογική παραγωγή των ΠΥΑ μπορεί να δημιουργήσει ηθικά προβλήματα καθώς η πρωταρχική χρήση του είναι ως τρόφιμο. Εντούτοις, υπάρχουν διάφορα αμυλούχα απόβλητα ή παραπροϊόντα (π.χ. παραπροϊόντα άλεσης σίτου, ψωμί που δεν καταναλώνεται, απόβλητα βιομηχανιών ζαχαροπλαστικής) που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές).

Εχουν δημοσιευτεί εργασίες που αναφέρουν την παραγωγή ΠΥΑ από δημητριακά όπως το καλαμπόκι, το ρύζι και το σιτάρι (Huang *et al.* 2006; Koutinas *et al.*, 2004; 2005, 2006, 2007, 2010.). Η χρησιμοποίηση καρπών δημητριακών ως πρώτη ύλη για την παραγωγή ΠΥΑ μπορεί να οδηγήσει σε μικρότερο κόστος παραγωγής των ΠΥΑ σε σύγκριση με ζυμώσεις που χρησιμοποιούν άμυλο ή γλυκόζη (Huimin *et al.*, 2003; Sang *et al.*, 1999; Kahar *et al.*, 2005; Il Lae *et al.*, 2005.). Ενδεικτικά αναφέρεται ότι η μέση τιμή του σιταριού είναι 0,136 \$/Kg, η μέση τιμή του αμύλου από καλαμπόκι είναι περίπου 0,22\$/Kg ενώ η αντίστοιχη τιμή της γλυκόζης είναι 0,5 \$/Kg (Koutinas *et al.*, 2004).

Πίνακας 2.6: Αποτελέσματα ζυμώσεων.

ΠΥΒ (g/lh)	Συγκέντρωση (g/l)	Απόδοση/ Περιεχόμενο (g/g ή Kg/Kg ή %)	Πηγή C	Μικροοργανισμός	Source
2.42	121	3.33 76%	Glucose	<i>Ralstonia eutropha</i>	Kim et al., 1994.
-	5.08	0.25	Glucose	<i>Ralstonia eutropha</i>	Doi et al., 1988.
-	4.23	0.25	Valerate	<i>Ralstonia eutropha</i>	Doi et al., 1988.
2.18	85	3.5	Glucose	Recombinant <i>Escherichia coli</i>	Lee et al., 1994.
2.5	71.4	5.88	Sucrose	<i>Alcaligene latus</i>	Yamane et al., 1996.
1.86	52	5.26 Kg	Methanol	<i>Methylobacterium organiphilum</i>	Kim et al., 1996.
-	85.2	The glucose conversion rate was 0.43	Glucose	Recombinant <i>E. coli</i>	Lae et al., 2005.
3.2	157	77%	Glucose	Recombinant <i>E. coli</i>	Jong et al., 1998.
4.94	98.7	88.3 %	Sucrose	<i>Alcaligene latus</i>	Sang Y et al., 1997.
-	3.78	0.25	Fructose	<i>Ralstonia eutropha</i>	Valera et al., 1992.
-	6.48	0.32	Starch	<i>Haloferax mediterranei</i>	Lillo et al., 1990.
-	118-126	72-6 %(w/w) 0.72 – 0.76	Soybean oil	<i>Ralstonia eutropha</i> H16	Kahar et al., 2004.

Πίνακας 2.6: Αποτελέσματα ζυμώσεων (συνέχεια-2).

ΠΥΒ (g/lh)	Συγκέντρωση (g/l)	Απόδοση/ Περιεχόμενο (g/g ή Kg/Kg ή %)	Πηγή C	Μικροοργανισμός	Source
copolymer of 3HB with 5 mol%(R)-3- hydroxyhe xanoate, P(3HB-co-5 mol% 3HHx)	138	74% (w/w), 0.72	Soybean oil ή plant oils ή medium- chain-length alkanoic acids	Recombinant <i>Ralstonia eutropha</i>	<i>Kahar et al., 2004.</i>
3 HB- 3HHx	3.5	76%	Olive oil (1%)	PYB-4/pJRDEE32d13 (DSM 541)	<i>Fukui et al., 1998.</i>
3 HB- 3HHx	3.6	77%	Corn oil (1%)	PYB-4/pJRDEE32d13 (DSM 541)	<i>Fukui et al., 1998.</i>
3 HB- 3HHx	3.6	81%	Palm oil (1%)	PYB-4/pJRDEE32d13 (DSM 541)	<i>Fukui et al., 1998.</i>
3 HB- 3HHx	2.2	70%	Oleic acid (1%)	PYB-4/pJRDEE32d13 (DSM 541)	<i>Fukui et al., 1998.</i>
3.2	204.3	77% (=157.1 g/l)	Glucose	Recombinant <i>E. coli harboring the R. eutropha</i>	<i>Sang et al., 1999.</i>
4,63	194.1	73% (=141.6 g/l)	Glucose	Recombinant <i>E. coli harboring the R. eutropha</i>	<i>Sang et al., 1999.</i>
-	48.5	65%, 0.39	Biodizel	<i>Ralstonia Eutropha</i>	<i>Braunegg et al., 2009.</i>



Πίνακας 2.6: Αποτελέσματα ζυμώσεων (συνέχεια-3).

ΠΥΒ (g/lh)	Συγκέντρωση (g/l)	Απόδοση/ Περιεχόμενο (g/g ή Kg/Kg ή %)	Πηγή C	Μικροοργανισμός	Source
0.35	54	46%	Starch	<i>Azotobacter chroococcum</i>	Braunegg et al., 1998
-	20	76% PHA + 12.4% 3-hydroxy valerate	Glycerol from biodizel production	<i>Haloferax mediterranei</i>	Braunegg et al., 1998.
3.05	167, 6	90,1% (ή 95 % όταν κατά την ζύμωση αυξηθεί η θερμοκρασία στους 42-50°C, 1h)	Starch <i>hydrosylates</i>	<i>Escherichia coli</i> , VG1	Huimin Yu et al., 2003.
1.27	72.6	42%	Sugar cane molasses	<i>Bacillus megaterium</i>	Songsri Kulpreecha, 2009.
2.42	164	76 % (=121 g/l)	Glucose	<i>Alcalgenes eutrophus</i>	Kim et al., 1994.
4.94	112	88% (= 98.7 g/l)	Sucrose	<i>Alcaligene latus</i>	Wang et al., 1997.
1.04	106	58% (= 61.5 g/l)	Tapioca	<i>Ralstonia eutropha</i>	Kim et al., 1995.
-	140	55,6% (= 77,8 g/l)	Rice bran (ERB) + Comstarch (ECS) = 1:8 g/g	<i>Haloferax Mediterranei</i>	Huang et al., 2006.

Πίνακας 2.6: Αποτελέσματα ζυμώσεων (συνέχεια-4).

ΠΥΒ (g/lh)	Συγκέντρωση (g/l)	Απόδοση/ Περιεχόμενο (g/g ή Kg/Kg ή %)	Πηγή C	Μικροοργανισμός	Source
-	62.6	38.7% (= 24.2 g/l)	Cornstarch (ECS)	<i>Haloferax Mediterranei</i>	Huang et al., 2006.
0.84	68.8	38%	Waste glycerol	<i>Cupriavidus necator</i> DSMZ 545	Joao et al., 2009.
1.52	82.5	62%	Commercial glycerol (PG)	<i>Cupriavidus necator</i> DSMZ 545	Joao et al., 2009.
4.6	194	87 % (=169 g/l)	Whey / (NH <sub>4</sub> )HPO <sub>4</sub>	<i>Escherichia coli</i>	Ahn et al ., 2001
2.57	120	81 % (=96.2 g/l)	Whey / (NH <sub>4</sub> )HPO <sub>4</sub>	<i>E. coli</i>	Ahn et al., 2000.
2.8	160.8	80 %	Glucose / (NH <sub>4</sub> )HPO <sub>4</sub>	<i>E. coli</i> XL1-Blue	Kahar et al., 2005.
1.1	109	52% (=50 g/l)	Whey powder (αγελαδιώ γάλα)	Recombinant <i>E. coli</i>	Wong et al., 1998.
1.4	87	80% (=69 g/l)	Whey powder	Recombinant <i>E. coli</i>	Wong et al., 1998.
2.8	153.7	65.9 % (=101.3 g/l)	Glucose	Recombinant <i>E. coli</i>	Sang et al., 1999.
1.79	168.4 g/l	36.05% (=60.7 g/l)	Oleic acid	<i>Pseudomonas putida</i>	Sang et al., 1999.

Το άμυλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή ΠΥΑ είτε ως έχει, είτε μετά από ενζυματική ή χημική υδρόλυσή του, ως ολιγομερές (maltotetraose, maltohexaose), διμερές (maltose) ή μονομερές (glucose).

Το *Azotobacter chroococcum* αυξήθηκε σε ένα θρεπτικό μέσο με άμυλο επιτυγχάνοντας μια κυτταρική συγκέντρωση 54 g/l μετά από 70 ώρες. Η συγκέντρωση και η παραγωγικότητα του παραγόμενου ΠΥΒ ήταν 46% (κ.β.) και 0,35 g/lh αντίστοιχα (Gerhart Braunegg *et al.*, 1998). Το 2002, οι Lapointe *et al.* ανακάλυψαν και πατένταραν μια μέθοδο για την παραγωγή ΠΥΑ χρησιμοποιώντας το βακτήριο *Azotobacter salinestris*. Ως πηγή άνθρακα χρησιμοποίησαν μερικώς υδρολυμένο άμυλο από πατάτα. Τα αποτελέσματα ήταν ιδιαίτερα ικανοποιητικά αφού η κυτταρική συγκέντρωση ήταν 30-40 g/l, και από αυτά τα 15-20 g/l ήταν το συμπολυμερές P(3HB-co-8%-3HV).

Ανασυνδυασμένο βακτήριο, το *Escherichia coli*, χρησιμοποιήθηκε από τους Humin *et al.*, το 2003, για την παραγωγή ΠΥΒ από υδρολύματα αμύλου. Ο στόχος των ερευνητών ήταν η αντικατάσταση της γλυκόζης από υδρολύματα αμύλου, που είναι μια φτηνότερη πρώτη ύλη. Με γενετικούς χειρισμούς εισήχθησαν στο βακτήριο βιοσυνθετικοί και λυτικοί γόνιοι καθώς επίσης και γονίδια που αυξάνουν την κυτταρική κατανάλωση οξυγόνου με στόχο την αύξηση της παραγωγικότητας του ΠΥΒ και την μείωση του κόστους παραγωγής. Τα αποτελέσματα όσον αφορά την παραγωγικότητα και την συγκέντρωση του ΠΥΒ ήταν 167,6 g.dm<sup>-3</sup> 3.05gdm<sup>-3</sup>.h<sup>-1</sup>, αντίστοιχα.

Έχει αναφερθεί εκτενώς σε πολλές βιβλιογραφικές αναφορές η δυνατότητα παραγωγής ΠΥΒ από το σιτάρι (Koutinas *et al.*, 2004, 2005, 2006, 2007, 2010). Η καινοτομία της συγκεκριμένης μεθόδου βασίστηκε στο γεγονός ότι δεν χρησιμοποιήθηκαν εμπορικά παρασκευάσματα θρεπτικών συστατικών στις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν για την παραγωγή ΠΥΒ. Το σιτάρι περιέχει όλα τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά για να σχηματιστεί ένα πλήρες θρεπτικό μέσο για μικροβιακές ζυμώσεις. Μετά την ολοκλήρωση των μικροβιακών ζυμώσεων προέκυπταν ένζυμα, τα

οποία υδρόλυαν τα μακρομόρια του αμύλου, των πρωτεϊνών και του φυτικού οξέος με αποτέλεσμα να παράγονται όλα τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά τα οποία απαιτούνται για την ζύμωση με τον *Cupriavidus necator*. Η γλυκόζη που αποτελεί την πηγή άνθρακα προερχόταν από την υδρόλυση του αμύλου, η οποία γινόταν με την χρησιμοποίηση ενζύμων μυκητιακής προέλευσης. Το 2006, οι Koutinas *et al.*, παρήγαγαν θρεπτικά μέσα που περιείχαν N που περιέχεται στις ελεύθερες αμινομάδες (FAN) που προκύπτουν από την υδρόλυση των πρωτεϊνών (από 0,3 έως 1,48 g/l) και γλυκόζη (από 200 έως 220 g/l). Αυτά τα θρεπτικά μέσα με τους ποικίλους διαφορετικούς συνδυασμούς συγκεντρώσεων σε FAN και γλυκόζη, αφού αναμείχτηκαν χρησιμοποιήθηκαν για την υγρή ζύμωση με τον *Cupriavidus necator*, σε αναδευόμενα δοχεία. Τα συμπεράσματα ήταν ότι όσο αυξανόταν η συγκέντρωση FAN στο θρεπτικό μέσο αύξησης τόσο βελτιωνόταν και η παραγωγικότητα σε ΠΥΒ. Το 2010, οι ίδιοι ερευνητές με ημισυνεχείς ζυμώσεις με τον *Cupriavidus necator* κατάφεραν να παραγάγουν ΠΥΒ. Το θρεπτικό μέσο ήταν υδρολύματα αμύλου. Τελικά παρήγαγαν ΠΥΒ σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις που άγγιζε τα 162,8 g/l. Επίσης ο βαθμός απόδοσης της βιομάζας σε ΠΥΑ ήταν 93%, κάτι το οποίο επιτεύχθηκε μέσω της μικροβιακής αυτόλυσης των βακτηριακών κυττάρων στο τέλος της ζύμωσης. Η κατανάλωση των πηγών αζώτου που προέκυψαν από την υδρόλυση της γλουτένης οδήγησαν σε υψηλό βαθμό απόδοσης της γλυκόζης σε ΠΥΑ (0,48 g/g). Η ταχύτητα παραγωγής ΠΥΑ ήταν 0,9 g/l h και ο βαθμός απόδοσης του σιταριού σε σιτάρι ήταν 0,3g ΠΥΑ ανά g σιτάρι.

### **2.5.2 Γλυκερόλη, ως προϊόν της διεργασίας παραγωγής βιοντίζελ**

Η παραγωγή βιοντίζελ (κυρίως μεθυλεστέρες και σε μικρότερο βαθμό αιθυλ- ή βουτυλ-εστέρες λιπαρών οξέων) με διεργασίες πρώτης γενιάς πραγματοποιείται μέσω μετεστεροποίησης των λιπαρών οξέων φυτικών ελαίων που προέρχονται κυρίως από σπόρους ή από διάφορους

τύπους λιπών και ελαίων ευτελούς κόστους. Το βιοντίζελ χρησιμοποιείται ήδη από δεκαετίας ως συμπληρωματικό καύσιμο στους κινητήρες εσωτερικής καύσης διαφόρων τύπων αυτοκινήτων και λεωφορείων. Στην Ευρωπαϊκή Ένωση βιοντίζελ παράγεται κυρίως από την ελαιοκράμβη.

Στα πρώτα στάδια της επεξεργασίας της ελαιοκράμβης, τα φυτικά έλαια διαχωρίζονται από το κραμβάλευρο με μηχανική θραύση και εκχύλιση με διαλύτη. Η ποσότητα κραμβαλεύρου που παράγεται, ανέρχεται σε 53-60% κ.β. της συνολικής ποσότητας ελαιοκράμβης η οποία υφίσταται την επεξεργασία. Το κραμβάλευρο μπορεί να είναι πλούσιο σε πρωτεΐνη (34-38% κ.β.), αλλά αποτελεί μία χαμηλής ποιότητας ζωοτροφή (Zhang *et al.*, 2008) γιατί περιέχει σημαντικές ποσότητες γλυκοσινολών (1,5-4,0% του συνολικού ξηρού βάρους της ελαιοκράμβης) (Liu *et al.*, 1995) και φυτικού οξέος (2,0-4,0% του συνολικού ξηρού βάρους της ελαιοκράμβης) (Niewiadomski, 1990).

Μετά την απομάκρυνση του κραμβάλευρου, τα φυτικά έλαια αναμειγνύονται με περίσσεια μεθανόλης παρουσία ενός βασικού καταλύτη (π.χ. ΚΟΗ ή ΝαΟΗ) για την παραγωγή ενός διφασικού μείγματος το οποίο διαχωρίζεται σε ένα ρεύμα μεθυλεστέρων και ένα ρεύμα πλούσιο σε γλυκερόλη. Το ρεύμα της γλυκερόλης περιέχει γλυκερόλη, μεθανόλη, νερό, ανόργανα άλατα, ελεύθερα λιπαρά οξέα, μείγμα γλυκεριδίων, μεθυλεστέρες και κυμαινόμενες ποσότητες διάφορων οργανικών ενώσεων. Ως ακατέργαστη γλυκερόλη ονομάζεται το ρεύμα που προκύπτει μετά από το διαχωρισμό της μεθανόλης και τη συνακόλουθη εξουδετέρωση του μείγματος η οποία οδηγεί στην παραγωγή αλάτων. Η ακατέργαστη γλυκερόλη αποτελεί απόβλητο της διεργασίας παραγωγής βιοντίζελ λόγω των υψηλών ποσοστών προσμίξεων που περιέχει.

Από 10 Kg ελαίου που υφίσταται μεθυλίωση προκειμένου να παραχθούν οι μεθυλεστέρες, 1 Kg γλυκερόλης παράγεται ως παραπροϊόν, δεδομένης δε της συνεχώς αυξανόμενης ανάγκης για ανανεώσιμα καύσιμα και της αυξανόμενης ζήτησης και παραγωγής βιοντίζελ, αναμένεται ότι τα επόμενα χρόνια θα υπάρξει ένας υπερκορεσμός γλυκερόλης στην αγορά.

Στη Γερμανία μόνον το 2007 παράχθηκαν περί τους  $6 \times 10^5$  τόνους γλυκερόλης, το δε ακάθαρτο πλούσιο σε γλυκερόλη νερό που προέρχεται από τις βιομηχανίες παραγωγής βιοντίζελ θεωρείται ήδη ως τυπικό βιομηχανικό απόβλητο (Papanικόλαου, 2007). Το κόστος ανάκτησης και (κυρίως) καθαρισμού της απόβλητης γλυκερόλης είναι ιδιαίτερα υψηλό. Επομένως γίνεται αντιληπτό ότι θα πρέπει να αναπτυχθούν καινοτόμες και αειφόρες (πράσινες) τεχνολογίες για την αξιοποίηση της ακατέργαστης γλυκερόλης (da Silva *et al.*, 2009; Koutinas *et al.*, 2007).

Το 2009, οι Joao Cavalleiro *et al.*, χρησιμοποίησαν απόβλητη γλυκερόλη (από την διεργασία παραγωγής βιοντίζελ) και καθαρή γλυκερόλη για να παράγουν ΠΥΒ, με τον *Cupriavidus necator* 545. Η ταχύτητα παραγωγής ΠΥΒ και η τελική συγκέντρωση βιομάζας όταν χρησιμοποιήθηκε ως πηγή άνθρακα απόβλητη γλυκερόλη ήταν 0,84 g/l h και 68,8 g<sub>DW</sub>/l. Όμως μόνο το 38% του ξηρού βάρους αντιστοιχούσε σε ΠΥΒ. Τα αποτελέσματα ήταν λίγο καλύτερα, όταν χρησιμοποιήθηκε ως πηγή άνθρακα, εμπορική (καθαρή) γλυκερόλη. Η ταχύτητα παραγωγής ΠΥΑ, η μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας και το ποσοστό βιομάζας που αντιστοιχεί σε ΠΥΒ ήταν 0,6-1,5 g/lh , 82.5 g<sub>DW</sub>/l , 62% αντίστοιχα.

Οι Mothes *et al.*, (2007) διερεύνησαν την δυνατότητα παραγωγής ΠΥΒ από ακατέργαστη γλυκερόλη που αποτελεί παραπροϊόν της διεργασίας παραγωγής βιο-ντίζελ. Η συγκέντρωση των αλάτων (NaCl Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), της μεθανόλης και των λιπαρών οξέων στο ρεύμα της γλυκερόλης που προκύπτει από την διεργασία παραγωγής βιοντίζελ, μπορεί να ποικίλλει και μάλιστα να είναι τόσο υψηλή που να δρα παρεμποδιστικά στην ανάπτυξη μικροοργανισμών για παραγωγή ΠΥΒ. Τα βακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το *Cupriavidus necator* JMP 134 και το *Paracoccus denitrificans*, τα οποία συσσωρεύουν ενδοκυτταρικά ΠΥΑ σε ποσοστό 70% της ξηρής κυτταρικής τους μάζας (to a content of 70 % of cell dry mass), όταν χρησιμοποιείται ως πηγή άνθρακα καθαρή γλυκερόλη. Όταν χρησιμοποιήθηκε ως πηγή άνθρακα ακατέργαστη γλυκερόλη που περιείχε 5,5 % NaCl τότε η παραγόμενη βιομάζα από τους μικροοργανισμούς ήταν 50 g/l και μόνο το 48% αυτής αντιστοιχούσε σε

ΠΥΒ, ποσοστό το οποίο είναι σαφώς μικρότερο από την περίπτωση που χρησιμοποιείται καθαρή γλυκερόλη για τις ζυμώσεις. Στην περίπτωση που η ακατέργαστη γλυκερόλη περιείχε  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , τα αποτελέσματα ήταν κάπως καλύτερα. Το μοριακό βάρος του παραγόμενου ΠΥΒ ήταν 620000 και 750000 g/l όταν χρησιμοποιήθηκαν τα βακτήρια *Paracoccus denitrificans* και *Cupriavidus necator* JMP 134 κατά αντιστοιχία.

Μια άλλη πηγή άνθρακα που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή ΠΥΑs είναι το ίδιο το βιοντίζελ, όπως αναφέρουν οι Braunegg *et al.*, (2009). Το βακτήριο το οποίο χρησιμοποιήθηκε ήταν το *Wautersia eutropha*, το οποίο αυξάνεται καλά στο συγκεκριμένο υπόστρωμα. Μάλιστα μετά από 48,5 ώρες ζύμωσης η παραγόμενη βιομάζα ήταν 48,5 g/l. Για την παραγωγή του συμπολυμερούς, πολύ-υδροξυβουτυρο-πεντανοϊκός εστέρας (PHBV) (65% της παραγόμενης βιομάζας), εκτός από την κύρια πηγή άνθρακα προστέθηκε στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης και πεντανοϊκό νάτριο (sodium valerate). Το προκύπτον συμπολυμερές έχει πολύ καλές ιδιότητες όπως σημείο τήξης 168 °C, θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης 1,9 °C και κρυσταλλικότητα 40,1%. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον όμως παρουσιάζει και η απόδοση της παραγόμενης βιομάζας καθώς υπολογίστηκε ότι παράγονται 0,60 gβιομάζας/g biodiesel, ποσότητα που είναι 50% υψηλότερη σε σχέση με την περίπτωση που χρησιμοποιήθηκαν εξόζες ως πηγή άνθρακα, για την παραγωγή του συμπολυμερούς.

## **2.6 Μέθοδοι διαχωρισμού και ανάκτησης των ΠΥΑ**

Το υψηλό κόστος παραγωγής των ΠΥΑ είναι ο κυριότερος παράγοντας που έχει αποτρέψει την βιομηχανική παραγωγή αυτών των βιοπολυμερών. Μεταξύ των παραγόντων που συμβάλλουν στο υψηλό κόστος παραγωγής, είναι οι τρόποι απομόνωσης και καθαρισμού του ενδοκυτταρικού βιοπολυμερούς. Έχει δε υπολογιστεί, ότι οι μέθοδοι διαχωρισμού που επιλέγονται κάθε φορά ανάλογα με τον μικροοργανισμό που έχει χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή του ΠΥΑ συμβάλλουν τα μέγιστα

(περισσότερο από 50%) στην διαμόρφωση του τελικού κόστους παραγωγής (Jung *et al.*, 2005). Συνακόλουθα επιλέγοντας την βέλτιστη διεργασία διαχωρισμού και απομόνωσης του ενδοκυτταρικού βιοπολυμερούς είναι δυνατή η μείωση του συνολικού κόστους παραγωγής (Ling *et al.*, 1997).

Για να μειωθεί λοιπόν το συνολικό κόστος παραγωγής της διεργασίας παραγωγής πολύ-υδροξυ-αλκανοϊκών εστέρων έχουν χρησιμοποιηθεί διάφοροι μέθοδοι διαχωρισμού, όπως: 1) χημική επεξεργασία με χρήση διάφορων οργανικών ή ανόργανων ενώσεων 2) ενζυμική πέψη με χρήση εμπορικών ενζύμων, 3) συνδυασμός μηχανικής διάρρηξης της κυτταρικής μεμβράνης και χημικής επεξεργασίας με στόχο την απομόνωση και καθαρισμό των ΠΥΑ και 4) αυτόλυση της κυτταρικής βιομάζας που οδηγεί στο φυσικό διαχωρισμό των ΠΥΑ (Hahn *et al.*, 1994; Hocking *et al.*, 1994; Ramsay *et al.*, 1994; Braunegg *et al.*, 1998; Khosravi-Darani *et al.*, 2004). Στις παρακάτω ενότητες περιγράφονται οι πιο διαδεδομένες διεργασίες διαχωρισμού που έχουν εφαρμοστεί για την απομόνωση και τον καθαρισμό των ΠΥΑ.

Τα τελευταία χρόνια, γίνεται προσπάθεια ανάκτησης του ΠΥΑ, σε βιομηχανικό επίπεδο με τέτοιο τρόπο ώστε να επιτυγχάνονται υψηλότερα ποσοστά ανάκτησης με το μικρότερο κόστος, για αυτό τον λόγο η αυτόλυση και οι μηχανικές μέθοδοι ανάκτησης αποτελούν πεδίο έντονου ενδιαφέροντος.

### **A) Χημική επεξεργασία**

Διάφοροι μέθοδοι χημικής επεξεργασίας (Jong *et al.*, 1998) έχουν χρησιμοποιηθεί για τον διαχωρισμό και καθαρισμό των ΠΥΑ από διάφορους μικροοργανισμούς (*Escherichia coli* και *Cupriavidus necator*). Διάφορα οξέα (π.χ HCL, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), αλκάλια (π.χ NaOH, KOH NH<sub>4</sub>OH), και επιφανειοδραστικές ουσίες (π.χ το βρωμίδιο του δεκαεξυτρυμέθυλο-αμμωνίου [CTAB], το δωδεκασουλφονικό νάτριο [SDS] κ.λ.π) έχουν χρησιμοποιηθεί για τον διαχωρισμό των ΠΥΑ από τα κυτταρικά υλικά (non-PHB cellular material) (Khanna *et al.*, 2007).



Η χρήση οργανικών διαλυτών (π.χ. χλωροφόρμιο) γενικά είναι ικανοποιητική για την διαλυτοποίηση των μη πολυεστερικών κυτταρικών υλικών (Ling *et al.*, 1997). Παρόλα αυτά συχνά απαιτούνται πολύ μεγάλες ποσότητες τοξικών ή πτητικών διαλυτών για την ανάκτηση των ΠΥΑ με αποτέλεσμα να έχει δημιουργηθεί η ανάγκη αντικατάστασης των μεθόδων αυτών σε βιομηχανική κλίμακα. Η χρησιμοποίηση χλωροφορμίου για την εκχύλιση των ΠΥΑ είναι μια μέθοδος που έχει χρησιμοποιηθεί αλλά επειδή αυξάνει κατά πολύ το κόστος όλης της διεργασίας χρησιμοποιείται συνήθως ερευνητικά για αναλυτικούς σκοπούς.

Μια άλλη μέθοδος που έχει κατά καιρούς προταθεί είναι η μερική πέψη με την χρησιμοποίηση υποχλωριώδους νατρίου, NaOCl (Berger *et al.*, 1989). Με αυτήν την μέθοδο τελικά παραλαμβάνονται πολύ-υδροξυαλκανοϊκοί εστέρες υψηλής καθαρότητας. Παρόλα αυτά, κατά την διάρκεια της διεργασίας διαχωρισμού η χρήση του υποχλωριώδους νατρίου προκαλεί υποβάθμιση του ενδοκυτταρικού βιοπολυμερούς. Εύλογα λοιπόν δεν θεωρείται καλή μέθοδος διαχωρισμού.

Επίσης το δωδεκασουλφονικό νάτριο, SDS, είναι μια χημική ουσία η οποία έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για τον διαχωρισμό του ΠΥΒ. Ωστόσο, η βιομηχανική εφαρμογή της δεν ενδείκνυται λόγω του υψηλού κόστους αγοράς του SDS και των προβλημάτων απόθεσης αποβλήτων που προκύπτουν από την χρησιμοποίησή του (Jong-il Choi *et al.*, 1998).

## **B) Χρήσιμοποίηση ενζύμων**

Μια άλλη μέθοδος που έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάκτηση των ενδοκυτταρικών βιο-πολυεστέρων της οικογένειας των ΠΥΑ βασίζεται στην χρήση εμπορικών ενζύμων (Kapritchkoff *et al.*, 2005). Η ενζυμική ανάκτηση είναι γενικά μια πολύ ενδιαφέρουσα μέθοδος μιας και τις περισσότερες φορές γίνεται ικανοποιητική ανάκτηση του βιοπλαστικού ενώ ταυτόχρονα εξαιτίας των ήπιων συνθηκών που συνήθως απαιτούνται για την δράση τους, δεν παρατηρείται αλλαγή των ιδιοτήτων των ΠΥΑ.

Οι πρωτεάσες θρυψίνη, χυμοθρυψίνη, παπαίνη, βρωμελαίνη και οι κυτταρινάσες β-γαλακτοσιδάση και λυσοζύμη είναι κάποια από τα ένζυμα

που έχουν μελετηθεί για να διαπιστωθεί η ικανότητά τους να διασπασουν β-(1,4) γλυκοζιτικούς δεσμούς που συνδέουν τη Ν-ακετυλογλυκοζαμίνη (NAG) και το Ν-ακετυλομουραμικό οξύ (NAM) και τους πεπτιδικούς δεσμούς των τετραπεπτιδίων που συνδέουν τις πολυμερικές αλυσίδες NAM-NAG, την πιο ισχυρή δομή του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος (Bugg, 1997). Οι Kapritchkoff *et al.*, το 2005, αξιολόγησαν την δυνατότητα απομόνωσης και καθαρισμού του ΠΥΒ από το αρνητικό κατά Gram βακτήριο, το *Cupriavidus necator* DSMZ545, με την χρήση των προηγούμενων ενζύμων. Οι κυτταρινάσες, όπως αναφέρουν οι μελετητές, δεν έδωσαν καλά αποτελέσματα. Αυτό πιθανόν οφείλεται στο γεγονός, ότι τα ένζυμα αυτά δεν μπορούσαν να «προσεγγίσουν» την πεπτιδογλυκάνη, μιας και αυτές για να μπορέσουν να υδρολύσουν τους γλυκοζιτικούς δεσμούς της πεπτιδογλυκάνης απαιτείται η συνδυαστική τους χρήση με κάποια επιφανειοδραστική ουσία π.χ SDS ή με την πρωτεΐνωση Κ, ενός άλλου ενζύμου το οποίο αποσταθεροποιεί το εξωτερικό κυτταρικό τοίχωμα. Αντίθετα τα καλύτερα αποτελέσματα, όσο αφορά την διαλυτοποίηση των κυτταρικών υλικών και το ποσοστό ανάκτησης ΠΥΒ από την παραγόμενη βιομάζα πλην του ΠΥΒ, διαπιστώθηκε με την χρήση εμπορικής βρωμελαΐνης 2% (enzyme mass per biomass) (50°C, pH=9) όπου τελικά επιτεύχθηκε ανάκτηση σε ποσοστό 88,8% ΠΥΒ από την παραγόμενη βιομάζα.

Το 1991, η ερευνητική ομάδα του *Harison et al.* ανέφεραν ότι η διάρρηξη της κυτταρικής μεμβράνης βακτηρίων, του γένους *Ralstonia eutropha*, είναι δυνατόν να επιτευχθεί με την χρήση λυτικών ενζύμων από το φυτό *Cytophaga sp.* (37,5°C, pH 7,3, 60 min).

Το 2005, οι Jung *et al.*, αξιολόγησαν την δυνατότητα αυθόρμητης λύσης των βακτηριακών κυττάρων του ανασυνδυασμένου *Escherichia coli*, ρυθμίζοντας το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας να έχει 21% γλυκόζη και το εμβόλιο να είναι χαμηλού κυτταρικού περιεχομένου. Τα αποτελέσματα ήταν ιδιαίτερα ικανοποιητικά μιας και το 80,2% των βακτηριακών κυττάρων κάτω από αυτές τις συνθήκες αυτολύθησαν. Η ξηρή παραγόμενη

βακτηριακή βιομάζα ήταν στο τέλος της ζύμωσης 85,2 g/l και το 99% αντιστοιχούσε σε ΠΥΒ.

Συνδυασμένη χρήση μηχανικής διάρρηξης των κυττάρων και χρήσης ενζύμων για την διαλυτοποίηση των λοιπών κυτταρικών υλικών πέραν των ΠΥΑ δεν έχει ακόμα εφαρμοστεί αλλά πιθανόν να αποτελούσε έναν καλό τρόπο διαχωρισμού.

### **Γ) Συνδυασμός μηχανικής και χημικής επεξεργασίας**

Η μηχανική διάρρηξη της κυτταρικής μεμβράνης έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την ανάκτηση των ενδοκυτταρικών βιοπολυμερών (Chisti and Moo-Young, 1986, 1991, 1994; Harrison, 1991; Kula and Schutte, 1987; Middelberg, 1995). Για παράδειγμα, η ομογενοποίηση υψηλής πίεσης και η άλεση σε σφυρόμυλους (bead mill) είναι τεχνολογίες οι οποίες έχουν αξιολογηθεί για την μηχανική διάρρηξη της κυτταρικής μεμβράνης των βακτηρίων. Οι Ghatnekar *et al.*, 2002, χρησιμοποίησαν δωδεκασουλφονικό κάλιο και εφάρμοσαν ομογενοποίηση υψηλής πίεσης για την παραλαβή ΠΥΒ από βακτηριακά κύτταρα (*Methylobacterium sp. V49*). Το μέγιστο ποσοστό ανάκτησης άγγιξε το 98%, με την διέλευση της βιομάζας από τον ομογενοποιητή, υπό πίεση 400 Kg cm<sup>-2</sup>, δύο φορές και την προσθήκη διαλύματος SDS περιεκτικότητας 5% (w/v). Οι Tamer *et al.*, το 1998, διαπίστωσαν ότι η κυτταρική λύση των βακτηριακών κυττάρων μέσω της άλεσης σε σφυρόμυλους, δεν επηρεάζεται από την συγκέντρωση της προσεπεξεργασία βιομάζας (8-66 KgDW/m<sup>-3</sup>). Επίσης η διάρρηξη της κυτταρικής μεμβράνης και η αποτελεσματικότητα της μεθόδου είναι προβλέψιμη (a first order disruption kinetics is usually observed). Η πλήρης διάρρηξη των βακτηριακών κυτταρικών τοιχωμάτων επιτυγχάνεται με διέλευση της βακτηριακής μάζας από σφυρόμυλους κάτω από τις εξής ειδικές συνθήκες: 1) με ρυθμό ροής της βιομάζας= 90ml/min 2) ρυθμό ανάδευσης = 52800 rpm 3) 85% πληρότητα των σφυρόμυλων

Η συνδυασμένη εφαρμογή χημικών και μηχανικών μεθόδων φαίνεται ιδιαίτερα ελπιδοφόρος ως μέθοδος διαχωρισμού για την παραλαβή των

ενδοκυτταρικών βακτηριακών πολυεστερικών παραγώγων (Harrison *et al.*, 1991b). Για παράδειγμα, οι Harrison *et al.* (1991b) χρησιμοποίησαν την ομογενοποίηση υψηλής πίεσης για την διάρρηξη των κυττάρων και την ανάκτηση του ΠΥΒ από το *Ralstonia eutropha*. Οι ερευνητές αυτοί κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι για να επιτευχθεί πλήρης μηχανική κυτταρική λύση απαιτείται επανάληψη της διεργασίας 3 φορές με εφαρμογή πίεσης από 60 έως 69 Μpa. Επίσης διαπίστωσαν ότι με προεπεξεργασία και μεταχείριση της βιομάζας με διάλυμα SDS συγκέντρωσης 1% w/v, στους 70 °C για 20 min ήταν δυνατή η πλήρη βακτηριακή κυτταρική λύση με ένα μόνο πέρασμα των κυττάρων από τον ομογενοποιητή υψηλής πίεσης και μάλιστα σε πολύ χαμηλότερη εφαρμογή πίεσης (34,5 MPa).

Παρόλα αυτά ίσως η θερμική προ-επεξεργασία των βακτηριακών κυττάρων, είναι καλύτερος τρόπος παραλαβής του πολυμερούς δεδομένου ότι δεν υποβαθμίζει τον πολυεστέρα. Οι Harrison *et al.* (1991a) διαπίστωσαν ότι ήταν δυνατή η απομόνωση του ΠΥΒ από τον *Cupriavidus necator* χωρίς την εφαρμογή μηχανικών μεθόδων. Ο συνδυασμός κατάλληλης θερμικής προ-επεξεργασίας (37,5 °C, pH 7,3, 60 min) και η ακόλουθη χρησιμοποίηση λυτικών ενζύμων (από το βακτήριο *Cytophaga sp*) οδηγούσε σε ολοκληρωτική λύση των βακτηριακών κυττάρων.

## Κεφάλαιο 3

### Παραγωγή ΠΥΒ από σιτάρι σε βιομηχανική κλίμακα

#### 3.1 Περίληψη της τεχνολογικής διεργασίας

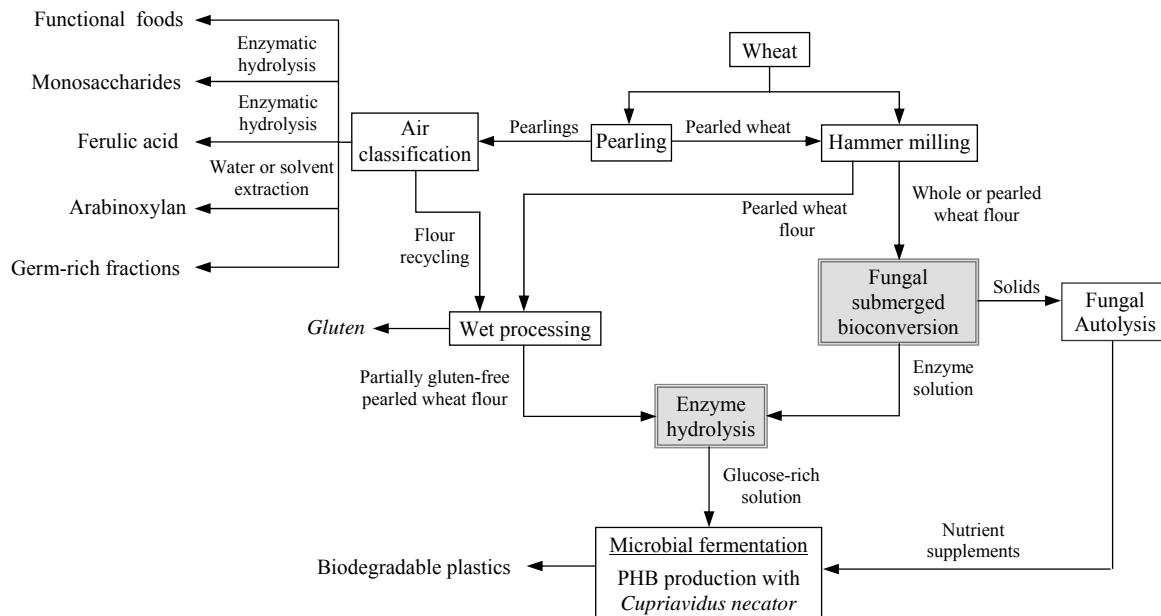
Στα πλαίσια της μεταπτυχιακής έρευνας, αξιολογήθηκε το οικονομικό δυναμικό μίας ολοκληρωμένης διεργασίας για την παραγωγή του βιοαποικοδομήσιμου πολυμερούς πολυ-3-υδρόξυ-βουτυρικού εστέρα (ΠΥΒ) από το σιτάρι. Το σιτάρι χρησιμοποιήθηκε ως η μόνη πρώτη ύλη για την προετοιμασία ενός θρεπτικού μέσου που περιείχε όλα τα θρεπτικά συστατικά που απαιτούνται για μικροβιακή ανάπτυξη και την ενδοκυτταρική συσσώρευση του ΠΥΒ. Για τον σχεδιασμό της διεργασίας και την εκπόνηση της τεχνο-οικονομικής μελέτης χρησιμοποιήθηκαν βιβλιογραφικές αναφορές οι οποίες περιγράφουν τις μονάδες επεξεργασίας που χρησιμοποιούνται για την μετατροπή του σιταριού σε ένα θρεπτικό μέσο για μικροβιακές ζυμώσεις (Koutinas *et al.*, 2004, Arifeen *et al.*, 2007a; Arifeen *et al.*, 2007b; Koutinas *et al.*, 2007a; Koutinas *et al.*, 2007b), την πραγματοποίηση της ζύμωσης με το βακτήριο *Cupriavidus necator* για την παραγωγή ΠΥΒ (Koutinas *et al.*, 2010) και τον διαχωρισμό και καθαρισμό του ΠΥΒ (Kapritchkoff *et al.*, 2006; Tamer *et al.*, 1998).

Θα πρέπει να τονίσουμε βέβαια ότι το σιτάρι καταναλώνεται πρωτίστως ως τρόφιμο και η βιομηχανική του χρήση για την παραγωγή βιοκαυσίμων και χημικών ουσιών δεν ενδείκνυται. Η παραπάνω διεργασία θα μπορούσε όμως να τροποποιηθεί εάν αντικαθιστούσαμε το σιτάρι με αλευρούχα απόβλητα ή παραπροϊόντα βιομηχανιών τροφίμων όπως παραπροϊόντα άλεσης σίτου, αλευρούχα υπολείμματα βιομηχανιών ζαχαροπλαστικής και απόβλητα ψωμιού.

### 3.2 Παραγωγή θρεπτικού μέσου για ζυμώσεις από σιτάρι

Στην Εικόνα 3.1 παρουσιάζεται ένα καινοτόμο βιοδιυλιστήριο (Koutinas *et al.*, 2004; Koutinas *et al.*, 2007a, Koutinas *et al.*, 2007b; Koutinas *et al.*, 2010) στο οποίο χρησιμοποιείται σιτάρι ως η αποκλειστική πρώτη ύλη για την παραγωγή ΠΥΒ και προϊόντων προστιθέμενης αξίας, όπως είναι η γλουτένη και ένα κλάσμα αλεύρων πλούσιο σε πίτυρα. Η διεργασία ξεκινάει με την αποφλοιώση (pearling) των σπόρων του σίτου με αποτέλεσμα να παράγεται ένα ρεύμα πλούσιο σε πίτυρα και ο εναπομείναν καρπός του σίτου που περιέχει κυρίως το ενδοσπέρμιο. Το μεγαλύτερο ποσοστό (92%, κ.β.) των αποφλοιωμένων σπόρων του σίτου χρησιμοποιείται για μερικό διαχωρισμό της γλουτένης καθώς ένα μέρος της γλουτένης υδρολύεται ενζυμικά για την παραγωγή πηγών αζώτου οι οποίες είναι απαραίτητες προκειμένου να επιτευχθεί η απαιτούμενη μικροβιακή ανάπτυξη του βακτηρίου *Cupriavidus necator*. Το υπόλοιπο ποσοστό (8%, κ.β.) των αποφλοιωμένων σπόρων του σίτου χρησιμοποιείται ως θρεπτικό μέσο σε ζύμωση βυθού συνεχούς λειτουργίας για την παραγωγή ενζύμων με τον μύκητα *Aspergillus awamori*. Μετά το τέλος της ζύμωσης, η μυκητιακή μάζα διαχωρίζεται από το υγρό της ζύμωσης με χρήση περιστρεφόμενου φίλτρου διήθησης υπό πίεση συνεχούς λειτουργίας. Το υγρό της ζύμωσης περιέχει διάφορα ένζυμα {αμυλάσες και γλυκοαμυλάσες (Khan *et al.*, 2000), πρωτεάσες (Bhumibhamon, 1982), φυτάσες (Wang, 1999)} τα οποία παρήχθησαν από τον *A. awamori* κατά την διάρκεια της ζύμωσης (Koutinas *et al.*, 2004).

Στο υγρό της ζύμωσης προστίθεται το αλεύρι που παράγεται μετά την άλεση των αποφλοιωμένων σπόρων του σίτου. Η υδρόλυση του αμύλου επιτυγχάνεται μέσω διεργασίας διαλείποντος έργου όπου πραγματοποιείται ταυτόχρονη ζελατινοποίηση, υγροποίηση (liquefaction) και σακχαροποίηση (saccharification) του αμύλου σε θερμοκρασία μικρότερη από 70°C (Koutinas *et al.*, 2007a). Κατά το στάδιο της υδρόλυσης επιτυγχάνεται σχεδόν πλήρης μετατροπή του αμύλου σε γλυκόζη και σημαντική μετατροπή της γλουτένης σε αμινοξέα και πεπτίδια.



Εικόνα 3.1: Παραγωγή θρεπτικού μέσου από το σιτάρι.

Ο μερικός διαχωρισμός του πίτυρου και της γλουτένης από τον καρπό του σίτου έχει ως αποτέλεσμα την μείωση των θρεπτικών συστατικών (π.χ. FAN \*) στο υδρόλυμα σίτου (αναγράφεται ως glucose-rich solution στην Εικόνα 3.1) που θα χρησιμοποιηθεί ως θρεπτικό μέσο για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Cupriavidus necator*. Ένας από τους στόχους του βιοδιυλιστηρίου αυτού είναι η χρησιμοποίηση της αυτόλυσης της μυκητιακής μάζας του *Aspergillus awamori* που παράγεται κατά την διάρκεια της ζύμωσης. Με αυτό τον τρόπο ελαχιστοποιείται η παραγωγή αποβλήτων και ανακυκλώνονται τα θρεπτικά συστατικά που καταναλώθηκαν από τον μύκητα και περιέχονταν αρχικά στο σιτάρι. Η αυτόλυση της μυκητιακής μάζας επιτυγχάνεται με διεργασία διαλείποντος έργου υπό συνθήκες απουσίας οξυγόνου, στους 55°C και φυσικό pH.

\* FAN: άζωτο που περιέχεται στις ελεύθερες αμινομάδες αμινοξέων τα οποία προκύπτουν μετά την ενζυμική υδρόλυση των πρωτεϊνών ή πεπτιδίων.

Το υγρό της αυτόλυσης περιέχει θρεπτική αξία παρόμοια με το εκχύλισμα ζύμης όπως και άλλα εμπορικά παρασκευάσματα θρεπτικών συστατικών που χρησιμοποιούνται σε ζυμώσεις (Koutinas *et al.*, 2005).

Η ανάμειξη των δύο ρευμάτων που προκύπτουν από την υδρόλυση του αποφλοιωμένου σιταριού και την αυτόλυση της μυκητιακής μάζας έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή θρεπτικών μέσων με κατάλληλη περιεκτικότητα σε θρεπτικά συστατικά έτσι ώστε να επιτυγχάνεται είτε μικροβιακή ανάπτυξη είτε συσσώρευση ΠΥΒ. Για παράδειγμα, στην περίπτωση που διαχωριστεί εξ' ολοκλήρου η γλουτένη από το αλεύρι και δεν χρησιμοποιηθεί υγρό από την αυτόλυση της μυκητιακής μάζας τότε το θρεπτικό μέσο που προκύπτει δεν περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις σε πηγές αζώτου και φωσφόρου με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται συσσώρευση ΠΥΒ από τον *Cupriavidus necator*. Οι Arifeen *et al.* (2007b) ανέφεραν ότι η παραπάνω διεργασία οδηγεί στην παραγωγή θρεπτικού μέσου από το σιτάρι με μικρότερο κόστος σε σχέση με την τεχνολογία που χρησιμοποιείται στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής για την παραγωγή υδρολύματος αμύλου από το καλαμπόκι.

Το κυριότερο πλεονέκτημα της διεργασίας που περιγράφεται στην Εικόνα 3.1 είναι ότι το σιτάρι είναι η μόνη πρώτη ύλη που χρησιμοποιείται για την παραγωγή του ΠΥΒ. Επίσης, σημαντικές ποσότητες πίτυρων και γλουτένης διαχωρίζονται και δύναται να χρησιμοποιηθούν ως προϊόντα προστιθέμενης αξίας. Για παράδειγμα, η γλουτένη βρίσκει χρήσεις ως πρόσθετο στα τρόφιμα (Sayaslan, 2004; Day *et al.*, 2006), ως πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοαποικοδομήσιμων ή εδωδιμων μεμβρανών-φίλμς και υλικών συσκευασίας (Bassi *et al.*, 1998) καθώς επίσης και στην παραγωγή υψηλής μηχανικής απόδοσης πλαστικών και συνθέσεων (Woerdeman *et al.*, 2004).

Στις παρακάτω ενότητες περιγράφονται πιο αναλυτικά οι διεργασίες που απαιτούνται για την παραγωγή του θρεπτικού μέσου από το σιτάρι.



### 3.2.1 Αποθήκευση σίτου

Η αποθήκευση του σιταριού γίνεται συνήθως σε σιλό δημητριακών σε πόδια με κώνο ή επιδαπέδια και η συντήρησή του εντός αυτών επιτυγχάνεται με την παροχή ατμοσφαιρικού αέρα και την εφαρμογή συστήματος απεντόμωσης.



Εικόνα 3.2: Σιλό αποθήκευσης δημητριακών

{[www.agroviver.gr/proionta.html](http://www.agroviver.gr/proionta.html) (αριστερή εικόνα), [www.sitos-pellas.gr/installations.html](http://www.sitos-pellas.gr/installations.html) (δεξιά εικόνα)}.

### 3.2.2 Αποφλοιώση σιταριού

Το σιτάρι αποτελείται κυρίως από τα πίτυρα (εξωτερικές στοιβάδες του καρπού) και το ενδοσπέρμιο. Το ενδοσπέρμιο αποτελείται κυρίως από άμυλο και γλουτένη. Κατά το πρώτο στάδιο της διεργασίας, χρησιμοποιήθηκε ένα στάδιο αποφλοιώσης όπου αφαιρέθηκαν από τον καρπό του σιταριού οι εξωτερικές στοιβάδες. Με βάση την τεχνική αυτή γίνεται διαδοχική αφαίρεση των εξωτερικών στρωμάτων-περιβλημάτων του σίτου με διαδοχικά στάδια τριβής και γδαρσίματος (friction and abrasion stages). Ουσιαστικά με αυτή την διεργασία γίνεται αποχωρισμός των περιβλημάτων από το ενδοσπέρμιο.

Είναι γνωστό ότι όλο το άμυλο βρίσκεται στο ενδοσπέρμιο κυρίως ως αμυλόζη (αποτελείται από μακριές γραμμικές αλυσίδες, οι οποίες περιέχουν 1100 – 4400 μόρια γλυκόζης, ενωμένα με α-(1→4) γλυκοζιτικούς δεσμούς) σε αμυλοκκόκους σφαιρικούς ή φακοειδής. Η περιεκτικότητα του ενδοσπερμίου σε πρωτεΐνες, αυξάνει από το κέντρο

προς την περιφέρεια μέχρι να φτάσει στο 18% στο στρώμα της αλευρώνης. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι πρωτεΐνες του ενδοσπερμίου αποτελούνται από ίσες αναλογίες γλιαδίνης και γλουτελίνης, οι οποίες στο νερό σχηματίζουν μια κολλοειδή ουσία την γλουτένη.

Επομένως, με την τεχνική της αποφλοιώσης, δημιουργούνται δυο ρεύματα εξόδου. Το ένα ρεύμα, που είναι τα περιβλήματα και τμήματα των εξωτερικών στοιβάδων του σίτου (pearlings) και το άλλο ρεύμα αποτελείται κυρίως από το ενδοσπέρμιο, που είναι πλούσιο σε άμυλο (pearled wheat kernels). Στην περίπτωση βιομηχανικής παραγωγής ΠΥΒ, το ρεύμα που περιέχει τις εξωτερικές στοιβάδες του σίτου (κυρίως πίτυρα), δηλαδή το προϊόν αποφλοιώσης του σιταριού, θα μπορούσε να πωληθεί ως λειτουργικό τρόφιμο (functional food) ή ακόμη και ως πρώτη ύλη για την παραγωγή συστατικών υψηλής προστιθέμενης αξίας (value added components).

Σε αυτή την μελέτη δεν έχουμε συμπεριλάβει την αποφλοιώση στον σχεδιασμό της μονάδας παραγωγής ΠΥΒ από το σιτάρι.

### **3.2.3 Διαχωρισμός ρευμάτων για παραγωγή θρεπτικού μέσου για μικροβιακές ζυμώσεις**

Σε αυτό το σημείο οι αποφλοιωμένοι σπόροι αλέθονται σε έναν σφυρόμυλο (Koutinas *et al.*, 2004). Συνήθως τέτοιες μονάδες μηχανολογικού εξοπλισμού παράγουν αλεύρι με μέγιστη διάμετρο κόκκων 150-200  $\mu\text{m}$ . Σε αυτό το σημείο έχουμε την παραγωγή δύο ρευμάτων:

#### 1) Μερικός διαχωρισμός της γλουτένης

Το 92% (κ.β.) των αποφλοιωμένων αλεσμένων σπόρων του σίτου χρησιμοποιείται για μερικό διαχωρισμό της γλουτένης (30% κ.β. της συνολικής ποσότητας γλουτένης) η οποία χρησιμοποιείται ως παραπροϊόν της διεργασίας. Το παραπροϊόν αυτό αποτελεί πηγή εσόδων για την βιομηχανική διεργασία παραγωγής ΠΥΒ από το σιτάρι. Ο διαχωρισμός της

γλουτένης πραγματοποιείται με την μέθοδο Martin (Koutinas et al., 2004). Η υπόλοιπη ποσότητα γλουτένης και η συνολική ποσότητα του αμύλου θα χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή ενός πλήρους θρεπτικού μέσου για την παραγωγή ΠΥΒ κατά την ζύμωση με τον μικροοργανισμό *Cupriavidus necator*. Η γλουτένη θα προσφέρει την πηγή αζώτου για την ανάπτυξη του *Cupriavidus necator*.

## 2) Παραγωγή ενζύμων με υγρή ζύμωση με τον *Aspergillus awamori* και θρεπτικού μέσου με την αυτόλυση της μυκητιακής μάζας

Το υπόλοιπο ποσοστό (8%, κ.β.) των αποφλοιωμένων σπόρων του σίτου χρησιμοποιείται ως θρεπτικό μέσο σε ζύμωση βυθού συνεχούς λειτουργίας για την παραγωγή ενζύμων με τον μύκητα *Aspergillus awamori*.

Για να πραγματοποιηθεί η ζύμωση απαιτείται προεπεξεργασία του υποστρώματος που στοχεύει στην ζελατινοποίηση του αμύλου και στην παραγωγή ενός αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου. Με άλλα λόγια αρχικά γίνεται ανάμειξη αυτού του κλάσματος αλεύρου με νερό, σε μια δεξαμενή στους 75 °C υπό συνεχή ανάδευση για 20 min. Η διεργασία ακολουθείται γιατί το φυσικό άμυλο είναι αδιάλυτο και πολύ ανθεκτικό στην ενζυμική υδρόλυση, με αποτέλεσμα εάν δεν έχει προηγηθεί η ζελατινοποίηση του αμύλου, δεν θα είναι δυνατή η ταυτόχρονη υδρόλυσή του στον βιοαντιδραστήρα, όπου ουσιαστικά θα παραχτούν τα ένζυμα.

Στην συνέχεια το υδατικό εναιώρημα αμύλου, αποστειρώνεται με την χρήση ενός εναλλάκτη θερμότητας με την παροχή ατμού θερμοκρασίας 135 °C για 120 min (Koutinas et al., 2005). Η αποστείρωση του θρεπτικού μέσου είναι απαραίτητη έτσι ώστε να αποφευχθεί η μόλυνση της καλλιέργειας κατά την διάρκεια της ζύμωσης.

Το αποστειρωμένο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης εισάγεται σε έναν βιοαντιδραστήρα για την ζύμωση βυθού με τον *Aspergillus awamori*. Οι ελεγχόμενες συνθήκες, που επικρατούν εντός του βιοαντιδραστήρα είναι οι εξής: 1) Θερμοκρασία λειτουργίας (operating temperature): 30°C, 2)

Ρυθμός ανάδευσης (agitation speed): 300rpm, 3) Παροχή αέρα 12595 Kg/h 4) Και τέλος το pH κατά την υγρή ζύμωση (μετά τον εμβολιασμό με εναιώρημα σπορίων συγκέντρωσης  $2 \times 10^6$  σπόρια / ml) πρέπει να είναι 4.5 (Koutinas *et al.*, 2006). Αυτό δεν είναι φυσικά τυχαίο μιας και ο μύκητας μπορεί να αυξάνεται σε αυτό το pH και επιπρόσθετα είναι κοντά στην βέλτιστη τιμή για την γλυκοαμυλάση (και κοντά σε αυτή της πρωτεάσης) που είναι τα κυριότερα ένζυμα που παράγονται εξωκυτταρικά από τον *Aspergillus awamori* και είναι απαραίτητα για την ενζυμική υδρόλυση του αμύλου και της πρωτεΐνης για την παραγωγή ΠΥΒ.

Τα εξωκυτταρικά ένζυμα, γλυκοαμυλάση, αμυλάση, πρωτεάση, φυτάση κ.α στη βυθισμένη καλλιέργεια διαχωρίζονται από τα αδιάλυτα στερεά της καλλιέργειας με διήθηση υπό κενό. Η διεργασία λοιπόν, παραλαβής ενός υδατικού διαυγούς διαλύματος, το οποίο να περιέχει το μεγαλύτερο ποσό από τα ένζυμα σε «ακατέργαστη μορφή» (crude extract) γίνεται με χρήση περιστρεφόμενου φίλτρου διήθησης υπό πίεση συνεχούς λειτουργίας. Τα ένζυμα αυτά θα χρησιμοποιηθούν για την υδρόλυση της αμύλου, της γλουτένης και του φυτικού οξέος.

Η μυκητιακή μάζα που προκύπτει μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πηγή θρεπτικών ουσιών για την κύρια μικροβιακή ζύμωση με τον *Cupriavidus necator*. Για να γίνει αυτό πρέπει το μυκητιακό κυτταρικό τοίχωμα να διαρηχθεί και τα επιμέρους πολυμερή που το απαρτίζουν να υδρολυθούν, έτσι ώστε να είναι δυνατή η απελευθέρωση μέσω υδρόλυσης αφομοιώσιμων μονομερών, τα οποία είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν σε μικροβιακές ζυμώσεις (Koutinas *et al.*, 2004). Γενικά η διάρρηξη (disintegration) της μυκητιακής κυτταρικής μεμβράνης γίνεται συνήθως με την χρήση χημικών και ενζυμικών μέσων. Η χρησιμοποίηση χημικών μέσων για την διάρρηξη του κυτταρικού τοιχώματος απορρίφθηκε μιας και με αυτήν την μέθοδο, παρουσιάζονται προβλήματα που σχετίζονται με τον τρόπο αφαίρεσης και ανάκτησης των χρησιμοποιούμενων χημικών ουσιών, με την αύξηση του άμεσου λειτουργικού κόστους και τέλος με την εμφάνιση τοξικών ουσιών που έχουν επίδραση στο περιβάλλον και στους μικροοργανισμούς που χρησιμοποιούνται στις μετέπειτα ζυμώσεις. Τέλος,

η προσέγγιση της ενζυμικής λύσης του κυτταρικού τοιχώματος, θα μπορούσε να διαχωριστεί σε δύο στάδια. Το μεν πρώτο είναι η εφαρμογή των ενζύμων που έχουν την δυνατότητα αυτή και το δεύτερο είναι η κυτταρική αυτόλυση (Koutinas *et al.*, 2004). Η πρώτη προσέγγιση απορρίφθηκε εξαιτίας του υψηλού κόστους αγοράς των ενζύμων και της δυσκολίας επαναχρησιμοποίησής τους σε μεγάλη βιομηχανική κλίμακα.

Πίνακας 3.1: Κύριοι πολυσακχαρίτες μυκητιακού κυτταρικού τοιχώματος (www.microbiologyprocedure.com).

<b>Πολυμερή</b>	<b>Μονομερή</b>
χιτίνη	<i>N-ακετυλ-γλυκοσαμίνη</i>
χιτοσίνη	<i>D-γλυκοζαμίνη</i>
κυτταρίνη	<i>D-γλυκόζη</i>
$\alpha$ -γλυκάνη	<i>D-γλυκόζη</i>
$\beta$ - γλυκάνη	<i>D-γλυκόζη</i>
μαννάνη	<i>D-μαννάνη</i>

Τελικά ως οικονομικότερη μέθοδος επιλέχθηκε η αυτόλυση η οποία αποτελεί μια φυσική μέθοδος για την διάρρηξη του μυκητιακού κυτταρικού τοιχώματος. Ο στόχος είναι η παραγωγή ενός ρεύματος, πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά (nitrogen enhancement stage) κάτι το οποίο ουσιαστικά επιτυγχάνεται με την εφαρμογή αναερόβιων συνθηκών σε μια δεξαμενή αυτόλυσης (μιας και ο *Aspergillus awamori* είναι αυστηρά αερόβιος και δεν μπορεί να αυξηθεί σε αναερόβιες συνθήκες). Τα μυκητιακά κύτταρα εκκρίνουν αυτολυσίνες προκαλώντας τη διάσπαση της μυκητιακής κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Αυτό το φαινόμενο έχει παρατηρηθεί σε νηματοειδής κυρίως μύκητες ή υφομύκητες (filamentous

fungi), όπου κάτω από συνθήκες έλλειψης θρεπτικών συστατικών στο μέσο ανάπτυξης, παλαιότερες υφές αποικοδομούνται με αποτέλεσμα τα θρεπτικά συστατικά που προκύπτουν να αφομοιώνονται από νέο-αναπτυσσόμενες περιοχές (Mc Intyre *et al.*, 2000; White *et al.*, 2000). Η διαδικασία αυτή αποικοδόμησης λαμβάνει χώρα, όχι μόνο στο κυταρόπλασμα (Isaac *et al.*, 1982) αλλά και στο κυτταρικό τοίχωμα (Mitchell *et al.*, 1966).

Από πειραματικά δεδομένα (Koutinas *et al.*, 2004) αποδείχτηκε ότι κατά την αυτόλυση των κυττάρων του μύκητα είναι δυνατόν να προκύψει ένα ρεύμα, το οποίο έχει παρόμοια σύσταση σε θρεπτικά συστατικά με εκχύλισμα ζύμης, το οποίο είναι απαραίτητο για την κύρια ζύμωση. Μάλιστα τα πειραματικά αποτελέσματα ήταν πολύ καλά (1,6 g/l άζωτο, 0,5 g/l φώσφορος) και γι' αυτό τον λόγο προτείνονται και στην συγκεκριμένη παραγωγική διαδικασία, αφού έτσι δεν επιβαρύνεται η βιομηχανική μονάδα με το κόστος αγοράς επιπλέον πρώτων υλών.

### **3.3 Παραγωγή του ΠΥΒ**

Ο σχεδιασμός της μικροβιακής ζύμωσης για την παραγωγή του ΠΥΒ στηρίχτηκε στην χρήση του βακτηριακού στελέχους *Cupriavidus necator* NCIMB 11599 το οποίο αναπτύχθηκε σε ζυμώσεις βυθού (ασυνεχούς ή ημι-συνεχούς τροφοδοσίας) σε υπόστρωμα που παρήχθει από το σιτάρι βάσει της μεθοδολογίας που περιγράφηκε στην προηγούμενη ενότητα (Koutinas *et al.*, 2010). Η μικροβιακή παραγωγή ΠΥΒ έγινε κάτω από αερόβιες συνθήκες. Η τελική συγκέντρωση της μικροβιακής βιομάζας ήταν 162,8 g/l από τα οποία το 93% (κβ.) ήταν η περιεκτικότητα του ΠΥΒ. Η υψηλή περιεκτικότητα του ΠΥΒ οφείλεται στην μικροβιακή αυτόλυση στο τέλος της βακτηριακής ζύμωσης.

Η κατανάλωση αμινοξέων και πεπτιδίων που προέκυψαν από την υδρόλυση της γλουτένης οδήγησαν στην αυξημένη παραγωγή ΠΥΒ μιας και ο συντελεστής απόδοσης της γλυκόζης σε ΠΥΒ ήταν 0,47 g/g. Ο συντελεστής απόδοσης του σιταριού που απαιτείται για την παραγωγή

ενζύμων και ΠΥΒ ήταν 0,3 g ΠΥΒ ανά g σιταριού και ο ρυθμός παραγωγής ΠΥΒ ήταν 0,9 g/1 h. Τέλος, οι Koutinas *et al.* (2010) ανέφεραν ότι η ζύμωση με θρεπτικό μέσο που παρήχθει από το σιτάρι οδηγεί σε καλύτερη μικροβιακή ανάπτυξη και μεγαλύτερη παραγωγή ΠΥΒ σε σχέση με υποστρώματα που περιέχουν διάφορα εμπορικά θρεπτικά συστατικά (π.χ. γλυκόζη, εκχύλισμα ζύμης, υγρό θρεπτικό μέσο από καλαμπόκι, υδρολύματα καζεϊνών, όξινα πρωτεϊνικά υδρολύματα από σόγια και διάφορες ανόργανες ουσίες).

### **3.4 Απομόνωση και καθαρισμός του ΠΥΒ**

Στο Κεφάλαιο – 2 έγινε εκτεταμένη αναφορά στις μεθόδους ανάκτησης και απομόνωσης του ΠΥΒ από διάφορους μικροοργανισμούς. Για την συγκεκριμένη διεργασία παραγωγής ΠΥΒ με τον *Cupriavidus necator* χρησιμοποιώντας ως μοναδική πρώτη ύλη το σιτάρι επιλέχτηκε η ενζυμική μέθοδος ανάκτησης.

Η ανάκτηση (Εικόνα 6.1) του ΠΥΒ βασίζεται στην ενζυμική αποικοδόμηση της κυτταρικής μεμβράνης (Kapritchkoff *et al.*, 2006). Η συνολική διεργασία αποτελείται από τα παρακάτω στάδια:

- 1) Στο πρώτο στάδιο επιτυγχάνεται απενεργοποίηση των απο-πολυμερασών έτσι ώστε να αποφευχθεί η αποικοδόμηση του ΠΥΒ, μετουσίωση των πρωτεϊνών και αποσταθεροποίηση της κυτταρικής μεμβράνης μέσω θέρμανσης της κυτταρικής μάζας αρχικά στους 95 °C για 45 min και στην συνέχεια στους 85 °C για 15 min.
- 2) Τα βακτηριακά κύτταρα ανακτώνται μέσω φυγοκέντρησης.
- 3) Τα βακτηριακά κύτταρα ξεπλένονται με διάλυμα 0,85% (κ.β.) NaCl.
- 4) Η μικροβιακή μάζα επεξεργάζεται ενζυμικά στους 50 °C με χρήση βρομελαΐνης (2% κ.β.). Η μέγιστη κυτταρική λύση επιτυγχάνεται μετά από 10 ώρες αντίδρασης όπου ανακτάται το 90% (κ.β.) της συνολικής ποσότητας του ενδοκυτταρικού ΠΥΒ (καθαρότητας 88,8%).

- 5) Μετά το τέλος της ενζυμικής επεξεργασίας ακολουθεί φυγοκέντρηση για την παραλαβή του ΠΥΒ, το οποίο ξεπλένεται με αλατούχο υδατικό διάλυμα (0.85% κ.β.). Σε αυτό το σημείο έχει γίνει η ανάκτηση και ο καθαρισμός του ΠΥΒ.



## Κεφάλαιο 4

### Υλικά και Μέθοδοι

#### 4.1 Στόχος και συνοπτική περιγραφή του πειράματος

Σε αυτό το σημείο της μελέτης αξιολογήθηκε πειραματικά η δυνατότητα παραγωγής ΠΥΒ αποκλειστικά από παραπροϊόντα της βιομηχανικής διεργασίας παραγωγής βιοντιζελ 1ης γενιάς από ελαιοκράμβη (γλυκερόλη και κραμβάλευρο) χωρίς την προσθήκη πρόσθετων εμπορικών παρασκευασμάτων θρεπτικών συστατικών. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι συνοπτικά η εξής:

- 1) Αρχικά πραγματοποιήθηκε ζύμωση σε στερεά κατάσταση σε αναδεδόμενα δοχεία με τον μύκητα *Aspergillus oryzae*, με στόχο την παραγωγή διαφόρων ενζύμων (κυρίως πρωτεάσες). Το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης ήταν κραμβάλευρα τα οποία προκύπτουν από την ελαιοκράμβη (ενεργειακό φυτό), μετά την εκχύλιση του ελαίου, το οποίο χρησιμοποιείται για την παραγωγή βιοντιζελ.
- 2) Μετά την ολοκλήρωση της στερεάς ζύμωσης, τα εναπομείναντα στερεά αναμείχθηκαν με υδατικό εναιώρημα κραμβάλευρου για την πραγματοποίηση ενζυμικής υδρόλυσης και την παραγωγή ενός θρεπτικού μέσου πλούσιου σε αμινοξέα, πεπτιδία, πηγές φωσφόρου κτλ.
- 3) Το προκύπτον υδρόλυμα χρησιμοποιήθηκε ως θρεπτικό μέσο για την υγρή ζύμωση με το βακτήριο *Cupriavidus necator* DSMZ 545. Ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκε καθαρή (εμπορική) γλυκερόλη και η ζύμωση έγινε σε αναδεδόμενες κωνικές φιάλες. Αρχικά διαπιστώθηκε, ότι το αρνητικό κατά Gram βακτήριο καταναλώνει την γλυκερόλη αλλά με σχετικά αργούς ρυθμούς. Στην συνέχεια έγινε προσαρμογή του μικροοργανισμού σε θρεπτικό υπόστρωμα με γλυκερόλη μέχρι την στιγμή που ο μικροοργανισμός άρχισε να την καταναλώνει γρηγορότερα. Κατά την διάρκεια της υγρής ζύμωσης αναλύθηκαν ποσοτικά οι κινητικές των συγκεντρώσεων: α) της γλυκερόλης, β) της μικροβιακής μάζας και γ) του ΠΥΒ. Το

συμπέρασμα τελικά είναι ότι το συγκεκριμένο στέλεχος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή ΠΥΒ από παραπροϊόντα παραγωγής βιοντίζελ 1<sup>ης</sup> γενιάς.

#### **4.2 Πρώτες ύλες που χρησιμοποιήθηκαν στις ζυμώσεις**

Στις ζυμώσεις στερεάς κατάστασης και στις ενζυμικές υδρολύσεις χρησιμοποιήθηκαν κραιβάλευρα που περιείχαν 28% (κ.β.) πρωτεΐνη. Καθαρή εμπορική γλυκερόλη χρησιμοποιήθηκε ως πηγή άνθρακα για την υγρή ζύμωση με στόχο την μικροβιακή παραγωγή ΠΥΒ.

#### **4.3 Μικροοργανισμοί**

Το στέλεχος *Aspergillus oryzae* που χρησιμοποιήθηκε στις ζυμώσεις στερεάς κατάστασης της ελαιοκράμβης προμηθεύτηκε από ένα εργοστάσιο παραγωγής σάλτσας σόγιας (Amoy Food Ltd., Hong Kong). Ο στόχος ήταν η παραγωγή ενζύμων (κυρίως πρωτεασών) για την υδρόλυση της πρωτεΐνης του κραιβάλευρου. Οι μυκητιακές καλλιέργειες αποθηκεύονταν σε δοκιμαστικούς σωλήνες στους 4 °C με την μορφή σπορίων σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα το οποίο αποτελούνταν από 50 g/l κραιβάλευρο και 20 g/l άγαρ. Το θρεπτικό μέσο αποστειρώνεται στους 121 °C για 15 min.

Η παραγωγή ΠΥΒ πραγματοποιήθηκε με το βακτηριακό στέλεχος *Cupriavidus necator* DSMZ545. Τα λυοφιλωμένα βακτηριακά κύτταρα ενυδατώθηκαν για μισή ώρα με την προσθήκη υδατικού διαλύματος πλούσιο σε άλατα. Στην συνέχεια μεταφέρθηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης που περιείχε 5 g/l πεπτόνη και 10 g/l εκχύλισμα ζύμης και αναπτύχθηκε στους 30°C για 24h. Το θρεπτικό μέσο αποστειρώθηκε στους 121 °C για 15 min. Ακολούθως, μεταφέρθηκε 1 ml από την υγρή καλλιέργεια σε τριβλία που περιείχαν στερεό θρεπτικό υπόστρωμα με σύσταση 10 g/l εκχύλισμα ζύμης, 5 g/l πεπτόνη και 20 g/l άγαρ. Οι βακτηριακές καλλιέργειες αποθηκεύτηκαν στους 4 °C.

## 4.4 Παραγωγή εμβολίων για τις ζυμώσεις

### 4.4.1 Εμβόλιο για ζύμωση στερεάς κατάστασης με τον *Aspergillus oryzae*

Για κάθε ζύμωση στερεής κατάστασης με τον *A. oryzae* χρησιμοποιείται ως εμβόλιο σπόρια του μύκητα που λαμβάνονται από ένα δοκιμαστικό σωλήνα. Κατά την παρασκευή του εμβολίου για να είναι δυνατή η συλλογή των σπορίων του μύκητα, σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθονται 9,27 ml αποστειρωμένο αποσταγμένο νερό το οποίο έχει αναμειχτεί με 0,01% (v/v) Tween 80. Με αυτόν τον τρόπο καθορίζεται και η τελική υγρασία (65% κ.β. dry basis) του κραμβάλευρου που αποτελεί το θρεπτικό μέσο της ζύμωσης στερεάς κατάστασης. Μετά την προσθήκη του νερού, χρησιμοποιούμε έναν μικροβιακό κρίκο για να δημιουργήσουμε ένα εναιώρημα με τα σπόρια του μύκητα.

Κατόπιν, γίνεται καταμέτρηση του αριθμού των σπορίων του μύκητα, στο αιώρημα με την χρήση ενός αιμοκυτόμετρου. Το αιμοκυτόμετρο είναι ένα γυάλινο πλακίδιο με εγκοπές σε μορφή «H» και με χαραγές βάθους 0,1mm σε σχήμα κάνναβου, που σχηματίζουν 25 τετράγωνα γνωστού εμβαδού. Το κάθε τετράγωνο αποτελείται εσωτερικά από 16 μικρότερα γνωστού όγκου,  $0,0025 \text{ mm}^3$  το καθένα. Συνεπώς η επιφάνεια του πλακιδίου είναι  $0,0025 \times 25 \times 16 = 1 \text{ mm}^2$  συνολικά. Το δείγμα, δηλαδή το αιώρημα των σπορίων, τοποθετείται προσεκτικά με μια πιπέτα Pasteur, (στο κέντρο, πάνω στον σταυρό) στην επιφάνεια του αιμοκυτόμετρου και καλύπτεται με μια γυάλινη καλυπτρίδα. Στην συνέχεια η διάταξη παρατηρείται σε μικροσκόπιο και γίνεται καταμέτρηση του αριθμού των σπορίων σε διαφορετικά τετράγωνα, από τα οποία λαμβάνεται ο μέσος όρος. Το δείγμα καταλαμβάνει γνωστό όγκο και έτσι υπολογίστηκε ότι ο συνολικός αριθμός των σπορίων ανά ml είναι  $10^8$  σπόρια/ml. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται κάθε φορά πριν από τον εμβολιασμό με στόχο την διασφάλιση της ομοιομορφίας των αποτελεσμάτων.

#### **4.4.2 Εμβόλιο για βακτηριακές ζυμώσεις με τον *Cupriavidus necator* DSZM545**

Στην περίπτωση των βακτηριακών ζυμώσεων κάθε φορά χρησιμοποιείται ένα τριβλίο για την παραγωγή του εμβολίου. Μια μέρα πριν την ζύμωση, βακτηριακά κύτταρα μεταφέρονται ασηπτικά με την χρήση μικροβιακού κρίκου σε υγρό θρεπτικό μέσο, το οποίο περιέχει γλυκερόλη (10 g/l), εκχύλισμα ζύμης (10 g/l) και πεπτόνη (5 g/l). Ακολουθεί επώαση για 24 h, στους 30 °C.

#### **4.5 Περιγραφή ζύμωσης στερεάς κατάστασης**

Στην ζύμωση στερεάς κατάστασης χρησιμοποιήθηκαν ως θρεπτικό μέσο: α) 5 g κραμβάλου και β) 2,5 g πίτυρα και 2,5 g κραμβάλου. Το θρεπτικό μέσο αποστειρώθηκε σε κωνικές φιάλες των 250 ml στους 121°C για 30 min. Αφού ολοκληρώθηκε η προετοιμασία του θρεπτικού μέσου, έγινε ο εμβολιασμός (βλ. Ενότητα 4.4.1) υπό ασηπτικές συνθήκες. Η τελική υγρασία του κραμβάλου ήταν 65% (κ.β. σε υγρή βάση). Στην συνέχεια το μείγμα τοποθετήθηκε σε αναδεδόμενο επωαστήρα στους 30°C και 180 rpm για να πραγματοποιηθεί η ζύμωση με στόχο την παραγωγή πρωτεϊνών μυκητιακής προέλευσης. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα για να διαπιστωθεί πόσος χρόνος (24, 48 και 72 h) απαιτείται για να παραχθεί εκείνη η ποσότητα ενζύμων που οδηγούν στην μέγιστη δυνατή υδρόλυση των πρωτεϊνών του κραμβάλου. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο Κεφάλαιο-7.

#### **4.6 Περιγραφή υδρόλυσης του κραμβάλου**

Στο τέλος της στερεάς ζύμωσης όλο το περιεχόμενο των κωνικών φιαλών (εναπομείναντα στερεά) μεταφέρθηκε σε γυάλινα αποστειρωμένα μπουκάλια Duran των 1000 ml, με την προσθήκη 200 ml αποστειρωμένου αποσταγμένου νερού. Ακολουθώντας, προστέθηκαν 10 g κραμβάλου που αντιστοιχεί σε τελική συγκέντρωση 50 g/l. Αυτά τα

πειράματα είχαν σαν στόχο την υδρόλυση της πρωτεΐνης και των λοιπών πολυμερών που περιέχονται στο κραιβάλευρο έτσι ώστε να παραχθεί ένα υδρόλυμα πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά. Κατά την διάρκεια της στερεάς ζύμωσης παράγονται κυρίως πρωτεάσες αλλά επιπλέον και άλλα ένζυμα. Το pH ρυθμίστηκε στη τιμή 5,5 που είναι η βέλτιστη τιμή για τις πρωτεάσες που παράγονται από τον *Aspergillus oryzae*. Η θερμοκρασία κατά την διάρκεια της υδρόλυσης διατηρήθηκε στους 55°C. Κατά την διάρκεια της υδρόλυσης αναλύθηκε ποσοτικά η παραγωγή αζώτου που περιέχεται στις ελεύθερες αμινομάδες αμινοξέων και πεπτιδίων (free amino nitrogen, FAN). Τα δείγματα (1 ml) μεταφέρθηκαν σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες, οι οποίοι περιείχαν ισόποση ποσότητα κρύου τριχλωροξικού οξέος 5%, με το οποίο σταματά η ενζυμική υδρόλυση και έτσι είναι δυνατή η μέτρηση του FAN τη χρονική στιγμή της εκάστοτε δειγματοληψίας.

Το υγρό που προκύπτει μετά το τέλος της υδρόλυσης φυγοκεντρείται για 10 min (9000 rpm, 7 °C) και λαμβάνεται το υπερκείμενο υγρό. Το υδρόλυμα είναι πλούσιο σε πηγές αζώτου (όπως φαίνεται από το παραγόμενο FAN) όπως και άλλα θρεπτικά συστατικά. Υδρόλυμα κραιβάλευρου χρησιμοποιήθηκε ως θρεπτικό υπόστρωμα για την υγρή ζύμωση με τον *Cupriavidus necator* DSMZ545 για την παραγωγή του ΠΥΒ.

Το υδρόλυμα διηθήθηκε υπό κενό για την αφαίρεση των στερεών υπολειμμάτων από την στερεά ζύμωση και την ενζυμική υδρόλυση. Στην συνέχεια αφού ρυθμίστηκε το pH στη τιμή 6,6 - 6,8 με την προσθήκη NaOH, μιας και αυτή είναι η βέλτιστη τιμή για την ανάπτυξη του *C. necator*. Το υδρόλυμα αποστειρώθηκε με φίλτρο με διάμετρο οπών 0,2 μm (Polycap 36 AS, Fisher).

#### **4.7 Περιγραφή ζυμώσεων βυθού με τον *Cupriavidus necator* DSMZ 545**

Για την υγρή ζύμωση με τον *C. necator* DSMZ545 ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκε καθαρή (εμπορική) γλυκερόλη (10 – 20 g/l). Τα πρόσθετα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν στις βακτηριακές ζυμώσεις ήταν: α) ανόργανα άλατα, β) εμπορικά παρασκευάσματα οργανικής φύσης και γ) ακατέργαστο υδρόλυμα κραμβάλευρου. Οι συγκεντρώσεις των ανόργανων αλάτων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: 0,95 g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 5,47 mg/l  $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,68 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,2 g/l  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ . Επίσης, προστέθηκε 1 ml από το παρακάτω μείγμα ιχνοστοιχείων: 0,78 g/l  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ , 0,44 g/l  $\text{ZnCl}_2 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,81 g/l  $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,25 g/l  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , 4,98 g/l  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ . Τα εμπορικά θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 10 g/l εκχύλισμα ζύμης και 5 g/l πεπτόνη. Το υδρόλυμα κραμβάλευρου που χρησιμοποιήθηκε είχε συγκέντρωση FAN 210 mg/l. Οι ζυμώσεις βυθού πραγματοποιήθηκαν στους 30°C και 180 rpm σε αναδευόμενο επωαστήρα. Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν περιγράφονται στις παρακάτω υποενότητες.

##### **4.7.1 Προσαρμογή του *Cupriavidus necator* DSMZ545 στην κατανάλωση της γλυκερόλης**

Αρχικά αξιολογήθηκε η δυνατότητα του βακτηριακού στελέχους *C. necator* DSMZ545 να αναπτυχθεί στην γλυκερόλη ως πηγή άνθρακα. Γι' αυτό τον λόγο πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις σε εμπορικά θρεπτικά μέσα και ανόργανα άλατα (βλ. Ενότητα 7.3). Παρατηρήθηκε ότι ο αρχικός ρυθμός ανάπτυξης του βακτηρίου στην γλυκερόλη ήταν πολύ αργός και γι' αυτό τον λόγο πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές ζυμώσεις και επώσεις των παραγόμενων βακτηρίων σε στερεό υπόστρωμα. Μετά από κάθε υγρή ζύμωση μεταφέρθηκαν τα κύτταρα υπό ασηπτικές συνθήκες με τη βοήθεια μικροβιακού κρίκου στην επιφάνεια στερεού υποστρώματος (10 g/l εκχύλισμα ζύμης, 5 g/l πεπτόνης και 20 g/l άγαρ). Ακολούθησε επώαση στους 30 °C για 24 h. Η προσαρμογή του βακτηρίου στην κατανάλωση της

γλυκερόλης οδήγησε στην σταδιακή αύξηση του ρυθμού κατανάλωσης της γλυκερόλης.

#### **4.7.2 Ζυμώσεις βυθού σε διάφορα θρεπτικά μέσα**

Σε αυτά τα πειράματα αξιολογήθηκε αρχικά η δυνατότητα του *Cupriavidus necator* DSMZ545 να αναπτυχθεί σε υδρόλυμα κραμβάλευρου σε σύγκριση με ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν σε εμπορικά παρασκευάσματα θρεπτικών συστατικών. Επίσης σε αυτό το σημείο αξιολογήθηκε η επίδραση της θερμικής αποστείρωσης του υδρολύματος από κραμβάλευρο στην ανάπτυξη του *Cupriavidus necator* DSZM545. Για να γίνει αυτό διενεργήθηκαν 3 ζυμώσεις υπό αερόβιες συνθήκες σε 3 κωνικές φιάλες στις οποίες η συγκέντρωση γλυκερόλης ήταν σταθερή και περίπου ίση με 12 g/l. Οι ζυμώσεις βυθού πραγματοποιήθηκαν στους 30°C και 180 rpm σε αναδευόμενο επωαστήρα. Τα θρεπτικά συστατικά του μέσου ανάπτυξης σε κάθε ζύμωση ήταν τα εξής:

- 1) Στην πρώτη κωνική φιάλη προστέθηκε γλυκερόλη συγκέντρωσης 13 g/l και το εργαστηριακά παραγόμενο υδρόλυμα από κραμβάλευρο συγκέντρωσης FAN 210 mg/l. Το υδρόλυμα αυτό αποστειρώθηκε με χρήση φίλτρου.
- 2) Η δεύτερη κωνική φιάλη είχε ακριβώς την ίδια σύνθεση με την πρώτη με την μόνη διαφορά ότι το υδρόλυμα είχε προηγουμένως υποστεί θερμική αποστείρωση (στους 121 °C για 15 min).
- 3) Η τρίτη κωνική φιάλη περιείχε γλυκερόλη ίδιας περίπου συγκέντρωσης (12 g/l) όμως το εργαστηριακά παραγόμενο υδρόλυμα αντικαταστάθηκε από εμπορικά παρασκευάσματα θρεπτικών συστατικών, πεπτόνη και εκχύλισμα ζύμης συγκέντρωσης 5 g/l και 10 g/l αντίστοιχα.

Σε αυτό το σημείο είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η γλυκερόλη στην πρώτη κωνική φιάλη πριν αναμειχτεί με το υδρόλυμα κραμβάλευρου είχε αποστειρωθεί στους 121 °C για 15 min. Αυτή η διαδικασία ακολουθήθηκε

γιατί ο στόχος της πρώτης ζύμωσης ήταν να μελετηθεί η ανάπτυξη του μικροβιακού στελέχους σε υδρόλυμα κραμβάλευρου το οποίο δεν είχε υποστεί θερμική αποστείρωση.

Ακολούθησε εμβολιασμός με 1 ml βακτηριακών κυττάρων σε κάθε κωνική φιάλη, υπό τις συνθήκες που αναφέρθηκαν στην αρχή της υποενότητας και τα αποτελέσματα που προέκυψαν, όσον αφορά την κατανάλωση της γλυκερόλης, από τα βακτηριακά κύτταρα κατά την διάρκεια των υγρών ζυμώσεων φαίνονται στην ενότητα 7.4.

Ακολούθως, αξιολογήθηκε η δυνατότητα παραγωγής ΠΥΒ από τον μικροοργανισμό *Cupriavidus necator* DSMZ545 κατά την διάρκεια ζυμώσεων που πραγματοποιήθηκαν σε υδρόλυμα κραμβάλευρου και εμπορική γλυκερόλη. Σε αυτό το σημείο λοιπόν, έγινε ένα σει πειραμάτων μεταβάλλοντας την συγκέντρωση της γλυκερόλης στο υγρό θρεπτικό μέσο αύξησης που περιέχει υδρόλυμα κραμβάλευρου συγκέντρωσης 210 mg FAN/l. Στόχος αυτών των υγρών ζυμώσεων ήταν η μέτρηση της γλυκερόλης, του ξηρού βάρους των κυττάρων και του ΠΥΒ σε διάφορες χρονικές στιγμές της ζύμωσης.

Οι ζυμώσεις βυθού πραγματοποιήθηκαν σε δυο κωνικές φιάλες των 250 ml οι οποίες εμπεριείχαν υδρόλυμα κραμβάλευρου συγκέντρωσης 210 mg/l. Η μόνη διαφορά στην σύνθεση του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης ήταν η συγκέντρωση της γλυκερόλης στις δύο κωνικές φιάλες (11 και 18 g/l αντιστοίχα). Οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν στους 30 °C και 180 rpm σε αναδευόμενο επωαστήρα.

Κατά τη διάρκεια των ζυμώσεων λαμβάνονται δείγματα όγκου 4 mL. Το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη της κινητικής κατανάλωσης της γλυκερόλης με την χρησιμοποίηση ενός υγρού χρωματογράφου υψηλής ανάλυσης. Το ίζημα χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση του ξηρού βάρους των κυττάρων και την ποσοτικοποίηση του περιεχομένου τους σε ΠΥΒ μέσω της χρησιμοποίησης ενός αέριου χρωματογράφου - ανιχνευτή ιονισμού φλόγας.



## **Κεφάλαιο 5**

### **Αναλύσεις**

#### **5.1 Προσδιορισμός και μέτρηση pH**

Το pH του υδατικού διαλύματος που προέκυπτε με την ανάμειξη του κραμβάλου και των εναπομεινάντων στερεών μετά την ζύμωση σε στερεά κατάσταση με τον *Aspergillus oryzae*, μετρούνταν με pH-μετρο τύπου Jenway 3020 pH meter. Γινόταν διόρθωση του pH με διάλυμα υδροχλωρικού οξέος 1 M, ώστε η τιμή του pH να είναι (σταθερά) 5,5. Το pH στο υδρόλυμα κραμβάλου ρυθμιζόταν στην τιμή 6,8 με το ίδιο πεχάμετρο με χρήση καυστικού νατρίου (5 M).

#### **5.2 Ποσοτική ανάλυση της συγκέντρωσης αζώτου στις ελεύθερες αμινομάδες (FAN)**

Η αναλυτική μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση του FAN που περιέχεται στις ελεύθερες αμινομάδες που προκύπτουν από την ενζυμική υδρόλυση των πρωτεϊνών του κραμβάλου αναφέρθηκε για πρώτη φορά στο Ευρωπαϊκό Συνέδριο ζυθοποιείων το 1987 (Lie, 1973).

##### **5.2.1 Αντιδραστήρια για την μέτρηση FAN**

Για την μέτρηση του N που περιέχεται στις ελεύθερες αμινομάδες των αμινοξέων και των πεπτιδίων που προκύπτουν από την ενζυμική υδρόλυση των πρωτεϊνών του κραμβάλου απαιτείται προετοιμασία των δειγμάτων που έχουν ληφθεί κατά την διάρκεια της ενζυμικής υδρόλυσης. Τα αντιδραστήρια που είναι απαραίτητα για την μέτρηση της οπτικής πυκνότητας των δειγμάτων στα 570nm με την χρήση φασματοφωτόμετρου (U-2000, Spectrophotometer, Hitachi) είναι τα εξής:

1) Colour reagent: Αυτό το αντιδραστήριο αποτελείται από 49,71g όξινο φωσφορικό δινάτριο ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), 5 g νινιδρίνη, 3 g φρουκτόζη

και περίπου 60 g όξινο διφωσφορικό κάλιο ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) διαλυμένα σε 1 l απεσταγμένο νερό. Το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε εντός του εύρους 6,6-6,8 με pH-μετρο τύπου Jenway 3020. Το αντιδραστήριο αυτό αποθηκεύτηκε στους 4 °C.

2) Dilution reagent: Το αντιδραστήριο παρασκευάστηκε με την διάλυση 2 g ιοδικού καλίου ( $\text{KIO}_3$ ) σε 616 ml αποσταγμένο νερό. Στην συνέχεια προστέθηκαν 384 ml αιθανόλης (καθαρότητας 100%).

3) Διάλυμα γλυκίνης: Το διάλυμα αυτό προέκυψε με την διάλυση 0,1072 g γλυκίνης σε 100 mL αποσταγμένο νερό.

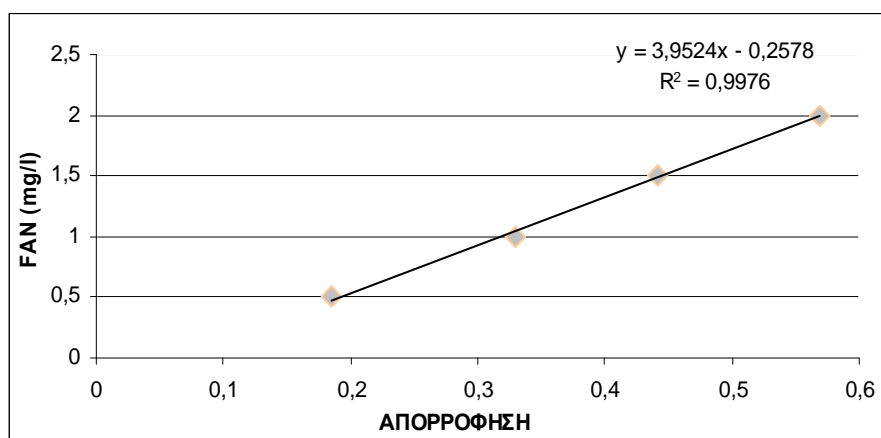
4) Πρότυπο διάλυμα γλυκίνης: Το αντιδραστήριο αυτό προέκυψε ύστερα από την διάλυση 1 ml διαλύματος γλυκίνης σε 100 ml αποστειρωμένο νερό. 2 ml από το παραπάνω διάλυμα περιέχει 2 mg/l FAN.

### **5.2.2 Προσδιορισμός FAN**

Στο υπερκείμενο υγρό των δειγμάτων από την ενζυμική υδρόλυση πραγματοποιήθηκαν οι κατάλληλες αραιώσεις. Ο όγκος του κάθε αραιωμένου δείγματος που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα (2 ανά δείγμα) ήταν 2 ml. Επίσης, προετοιμάστηκαν δοκιμαστικοί σωλήνες για το τυφλό που περιείχε 2 ml αποσταγμένο νερό. Σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκε 1 ml colour reagent. Για το τυφλό δείγμα ακολουθείται η ίδια διαδικασία προετοιμασίας και ανάλυσης. Όλα τα δείγματα μαζί με το τυφλό πωματίζονται με υδρόφιλο βαμβάκι και αλουμινόχαρτο για να αποφευχθεί η εξάτμιση και μεταφέρονται σε ένα υδατόλουτρο με θερμοκρασία 100 °C για ακριβώς 16 min. Αφού τα δείγματα και το τυφλό κρυώσουν για 20 min σε νερό θερμοκρασίας 20 °C μεταφέρονται σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα 5 ml από τον dilution reagent. Αφού ανακινηθούν τα δείγματα μετριέται η απορρόφηση στα 570 nm.

Η πρότυπη καμπύλη που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης FAN σε σχέση με την απορρόφηση προέκυψε από

διαφορετικές αραιώσεις (1:1, 1:2, 1:3 και 1:4) του πρότυπου διαλύματος γλυκίνης. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης FAN των δειγμάτων γινόταν με την χρήση της εξίσωσης:



Γράφημα 5.1: Πρότυπη καμπύλη υπολογισμού των ελεύθερων αμινομάδων. [ $y = 3.9524x - 0.2578$ , όπου  $x$  είναι η απορρόφηση (570nm),  $y$  είναι η συγκέντρωση FAN (mg/l). Η ακρίβεια της παραπάνω εξίσωσης ήταν  $R^2=0,997$ ].

Όλες οι απορροφήσεις μετρήθηκαν με την χρήση φασματοφωτόμετρου τύπου Hitachi U-2000 Spectrophotometer.

### 5.3 Ζυμώσεις βυθού

Κατά την διάρκεια των ζυμώσεων (4.9.3) λαμβάνονται δείγματα 1 ml για τις βακτηριακές βιομετατροπές των ενοτήτων 4.9.3.1 και 4.9.3.2 και 4 ml για τις ζυμώσεις της ενοτήτας 4.9.3.3. Ακολουθεί φυγοκέντριση σε φυγόκεντρο τύπου Universal 320R-Hettich (9000 rpm για 10 min στους 7°C), όλων των δειγμάτων. Το υπερκείμενο χρησιμοποιείται για την ανάλυση της γλυκερόλης. Το ίζημα χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του ξηρού βάρους (παραγόμενης βιομάζας) και του ενδοκυτταρικού περιεχομένου τους σε ΠΥΒ κατά την διάρκεια των ζυμώσεων.

### 5.3.1 Προσδιορισμός γλυκερόλης

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της γλυκερόλης πραγματοποιήθηκε με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Όλα τα δείγματα αρχικά φυγοκεντρούνταν και στην συνέχεια φιλτράρονταν με την χρήση φίλτρων whatman που διαθέτουν πόρους 0,2 μm. Ο απαιτούμενος όγκος κάθε ένεσης ήταν 20 μl.

#### Μέθοδος ανάλυσης HPLC

Για την μέτρηση της γλυκερόλης χρησιμοποιήθηκε ένας υγρός χρωματογράφος υψηλής απόδοσης

Όργανο: Waters 600E

Στήλη (Στατική φάση): Aminex HPX-87H (Bio-rad, Richmond, USA)(30cm x 7,8 ml)

Κινητή φάση: 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> σε δισ-απεσταγμένο και φιλτραρισμένο νερό.

Ανιχνευτής: RI (410 Waters)

Ροή διαλυτών (κινητής φάσης): 0,6 ml/min

Όγκος ένεσης: 50μl

Αφού έγινε η κατάλληλη προμεταχείριση των δειγμάτων, έγινε η εισαγωγή τους στον υγρό χρωματογράφο υψηλής απόδοσης. Ο χρόνος που απαιτείται από την στιγμή εισαγωγής του δείγματος μέχρι την εμφάνιση της κορυφής είναι περίπου 13 min για την γλυκερόλη. Υπολογίζοντας το εμβαδόν της περιοχής και αφού προηγουμένως έχει γίνει η πρότυπη καμπύλη της γλυκερόλης (χρησιμοποίηση γνωστών συγκεντρώσεων γλυκερόλης), είναι δυνατός ο υπολογισμός της γλυκερόλης που αντιστοιχεί σε κάθε εμβαδό. (Εξίσωση γλυκερόλης:  $\text{γλυκερόλη} = 0,058151 + (4,1638E-6 * \text{Εμβαδό})$ ). Τα αποτελέσματα από τις ζυμώσεις σε αναδευόμενα δοχεία φαίνονται στο Κεφάλαιο-7. Η ανάλυση που μόλις περιγράφηκε ακολουθήθηκε και για τα τρία σει πειραμάτων των ενοτήτων 4.9.3.1, 4.9.3.2 και 4.9.3.3.

### **5.3.2 Προσδιορισμός κυτταρικής βιομάζας**

Είναι γνωστό ότι μία πολύ χρήσιμη παράμετρος που χαρακτηρίζει την πορεία μιας ζύμωσης είναι το ξηρό βάρος των κυττάρων (dry cell weight) που εκφράζεται σε g και g/l. Το ξηρό βάρος των κυττάρων προκύπτει από την μέτρηση του βάρους (με ακρίβεια 4 δεκαδικών ψηφίων) πριν και μετά την ξήρανση των δειγμάτων και την αφαίρεση των δύο αυτών τιμών.

Η διαδικασία που ακολουθείται για την μέτρηση του ξηρού βάρους είναι η ακόλουθη:

1) Αρχικά λαμβάνονται δείγματα από τις καλλιέργειες και αφού αφαιρεθεί το υπερκείμενο και ξεπλυθούν τα κύτταρα με ακετόνη επανααναδεύονται και ξαναφυγοκεντρώνται.

2) Στην συνέχεια μετά την αφαίρεση της ακετόνης με την χρήση πιπέτας και επαναπροστίθεται ακετόνη για να είναι δυνατή η μεταφορά των κυττάρων σε προζυγισμένα, γυάλινα φιαλίδια τύπου McCartney.

3) Ακολουθεί ξήρανση στους 60 °C, (σε φούρνο Heraeus) για λιγότερο από 24h, μέχρι να εξατμιστεί η ακετόνη και ακολουθεί ο υπολογισμός του ξηρού βάρους.

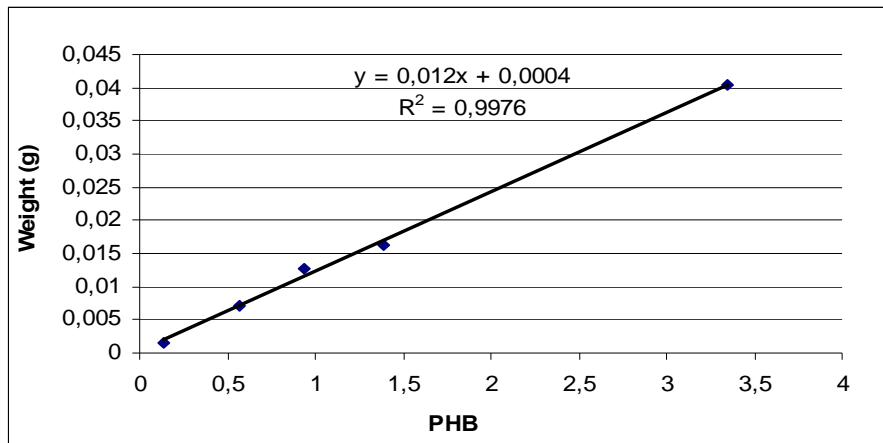
### **5.3.3 Ανάλυση ΠΥΒ**

Μετά από την ανάλυση του συνολικού ξηρού βάρους των βακτηριακών κυττάρων, το στερεό δείγμα χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του ΠΥΒ. Η μέθοδος που ακολουθήθηκε για τον σκοπό αυτό περιγράφεται από τους Riis και Mai (1988) και βασίζεται στην ανάλυση των παραγώγων εστέρα του υδροξυβουτυρικού εστέρα, με την χρήση ενός αέριου χρωματογράφου.

Οι παραγόμενοι εστέρες προκύπτουν μετά την υδρόλυση και μετεστεροποίηση του ΠΥΒ με την χρήση υδροχλωρικού οξέως και προπανόλης. Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε το 1,2 - διχλωροαιθάνιο (dichloroethane, DCE).

Τα γυάλινα φιαλίδια (τύπου Mc-Cartney) που εμπεριείχαν τα ξηρά βακτηριακά κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του συνολικού ξηρού βάρους (5.4.2) αναλύθηκαν και για την ποσοτικοποίηση του περιεχόμενου τους σε ΠΥΒ. Σε κάθε γυάλινο φιαλίδιο λοιπόν, προστίθονταν, 2 mL DCE και 2 mL acidified propanol (που προέκυπτε από την ανάμειξη υδροχλωρικού οξέως και προπανόλης σε αναλογία 1:4) και το μίγμα βραζόταν στους 100 °C για 2 ώρες. Στην συνέχεια αφού τα δείγματα αφήνονταν σε θερμοκρασία δωματίου να κρυώσουν, προστίθονταν 4 ml αποσταγμένου νερού σε φιαλίδιο και το μίγμα αναδευόταν για 2 λεπτά. Στην συνέχεια αφού απομακρύνονταν η ελαφριά φάση (υδατική), η βαρύτερη χρησιμοποιούταν για τον προσδιορισμό του ΠΥΒ με τη χρήση ενός αέριου χρωματογράφου με ενσωματωμένο ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (GC 8130 FISON). Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση είναι τύπου Fused Silica WCOT: CP-Sil1188 (μήκους 50m και διαμέτρου 0,32m). Η κινητή φάση (το φέρον αέριο) ήταν το ήλιο (ρυθμό ροής 1,38 ml/min). Το πρόγραμμα του φούρνου του αέριου χρωματογράφου ξεκινούσε στους 120 °C όπου και παρέμενε σταθερό για 1 min. Στην συνέχεια η θερμοκρασία ανέβαινε με ρυθμό 10 °C/min μέχρι τους 200 °C όπου και παρέμενε για 5 min και ξανα αυξανόταν μέχρι τους 220 °C με ρυθμό 10 °C/min όπου και παρέμενε για 3 min, μέχρι το τέλος της ανάλυσης. Η θερμοκρασία του εισαγωγέα ρυθμίστηκε στους 240 °C, και του ανιχνευτή στους 230 °C. Η ανίχνευση του ΠΥΒ γίνεται μετά την έκλυση του από την στήλη με έναν ανιχνευτή ιονισμού φλόγας, FID (H<sub>2</sub>: 60kPa, O<sub>2</sub>: 110kPa).

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης ΠΥΒ των δειγμάτων γινόταν με την χρήση της εξίσωσης:  $y = 0,012x$ , όπου  $x$  είναι ο λόγος του εμβαδού του ΠΥΒ προς του δικλωροαιθανίου,  $y$  είναι μάζα ΠΥΒ. Η ακρίβεια της παραπάνω εξίσωσης ήταν  $R^2=0,997$ ].



Γράφημα 5.2: Πρότυπη καμπύλη υπολογισμού του ΠΥΒ.

## Κεφάλαιο 6

### Τεχνοοικονομική ανάλυση- Αποτελέσματα προσομοίωσης

#### 6.1 Σχεδιασμός της διεργασίας παραγωγής ΠΥΒ σε μεγάλη κλίμακα

Παρακάτω στο Σχήμα 6.1 ακολουθούν τα ισοζύγια μάζας για την διεργασία παραγωγής ΠΥΒ σε μεγάλη κλίμακα. Οι υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν θεωρώντας ότι το σιτάρι έχει την εξής περιεκτικότητα σε θρεπτικά συστατικά: 68% άμυλο, 15% πρωτεΐνη, 12% πίτυρα και 5% άλλα συστατικά (κ.β. σε ξηρή βάση). Τα ισοζύγια βασίζονται σε παροχή μάζας 12.626,26 Kg πρώτη ύλη/h ή 100.000 tn wheat/year. Τελικά παράγονται 3.461,18 Kg ΠΥΒ/h ή 27.412.545,6 Kg wheat/year που αντιστοιχεί σε βαθμό απόδοσης του σιταριού σε ΠΥΒ ίσο με 0,28 (πολύ κοντά στην θεωρητική τιμή, βλ. Κεφάλαιο 3). Επιπρόσθετα οι ανάγκες για την συγκεκριμένη διεργασία σε ενέργεια υπολογίστηκαν σε KW.

Ο στόχος είναι ο σχεδιασμός και ο υπολογισμός του κόστους παραγωγής ΠΥΒ σε ένα καινοτόμο βιοδιυλιστήριο που αξιοποιεί το σιτάρι ως μοναδική και αποκλειστική πρώτη ύλη για την παραγωγή ΠΥΒ. Ο σχεδιασμός βασίστηκε στην τεχνολογική διεργασία που περιγράφηκε στο Κεφάλαιο-3 υποθέτοντας ότι η εγκατάσταση λειτουργεί 24 h/day, δηλαδή 330 days/year. Επίσης, οι υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τα τεχνολογικά χαρακτηριστικά που περιγράφηκαν στο Κεφάλαιο-3 σε συνθήκες συνεχούς λειτουργίας. Σε προκαταρκτικές τεchnοοικονομικές μελέτες μας δίνεται η δυνατότητα να απλοποιήσουμε τον σχεδιασμό μίας εγκατάστασης προκειμένου να εκτιμήσουμε την βιωσιμότητα της συγκεκριμένης επένδυσης. Σε μονάδες συνεχούς λειτουργίας αποφεύγονται πολλά τεχνικά προβλήματα που αντιμετωπίζονται σε διεργασίες διαλείποντος έργου (π.χ. μειώνεται ο χρόνος που παρεμβάλλεται μεταξύ των επιμέρους σταδίων επεξεργασίας) και διευκολύνεται η πραγματοποίηση προκαταρκτικών τεchnοοικονομικών μελετών (π.χ. δεν απαιτείται διευθέτηση των χρόνων καθαρισμού, γεμίσματος και αδειάσματος των επιμέρους μονάδων επεξεργασίας).



Η μοναδική πρώτη ύλη που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή ΠΥΒ είναι το σιτάρι. Η τιμή του εξαρτάται από περιβαλλοντικούς παράγοντες, την ύπαρξη αποθεμάτων και την ετήσια παραγωγή. Η τιμή του σιταριού τελικά καθορίστηκε στα 0,14 \$/Kg που αποτελεί μια μέση τιμή πώλησης του στην Ελλάδα και την Ευρώπη την τελευταία δεκαετία. Η τιμή αγοράς της γλουτένης, είναι περίπου εφταπλάσια της τιμής αγοράς του σιταριού (0,98 \$/Kg) (Koutinas *et al.*, 2004). Η γλουτένη αποτελεί παραπροϊόν της συγκεκριμένης παραγωγικής διαδικασίας και για αυτό το λόγο τα έσοδα από την πώλησή της αφαιρούνται από το λειτουργικό κόστος. Το κυρίως προϊόν είναι φυσικά ο παραγόμενος πολυεστέρας για τον οποίο δεν υπάρχουν δεδομένα όσον αφορά την τιμή πώλησής του με βάση την συγκεκριμένη διεργασία, καθώς αποτελεί καινοτομία το γεγονός ότι η κύρια και μοναδική αναγκαία πρώτη ύλη για την παραγωγή του είναι το σιτάρι. Ο στόχος είναι σε αυτό το σημείο η αξιολόγηση του κόστους παραγωγής του ΠΥΒ με βασική μέριμνα την παραγωγή όσο το δυνατόν φτηνότερου προϊόντος.

Το λογισμικό το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση της συγκεκριμένης τεχνοοικονομικής ανάλυσης είναι το Super-ProDesigner 7.0 και η ανάλυση και η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με την χρήση του λειτουργικού MS Office 2003&2007.

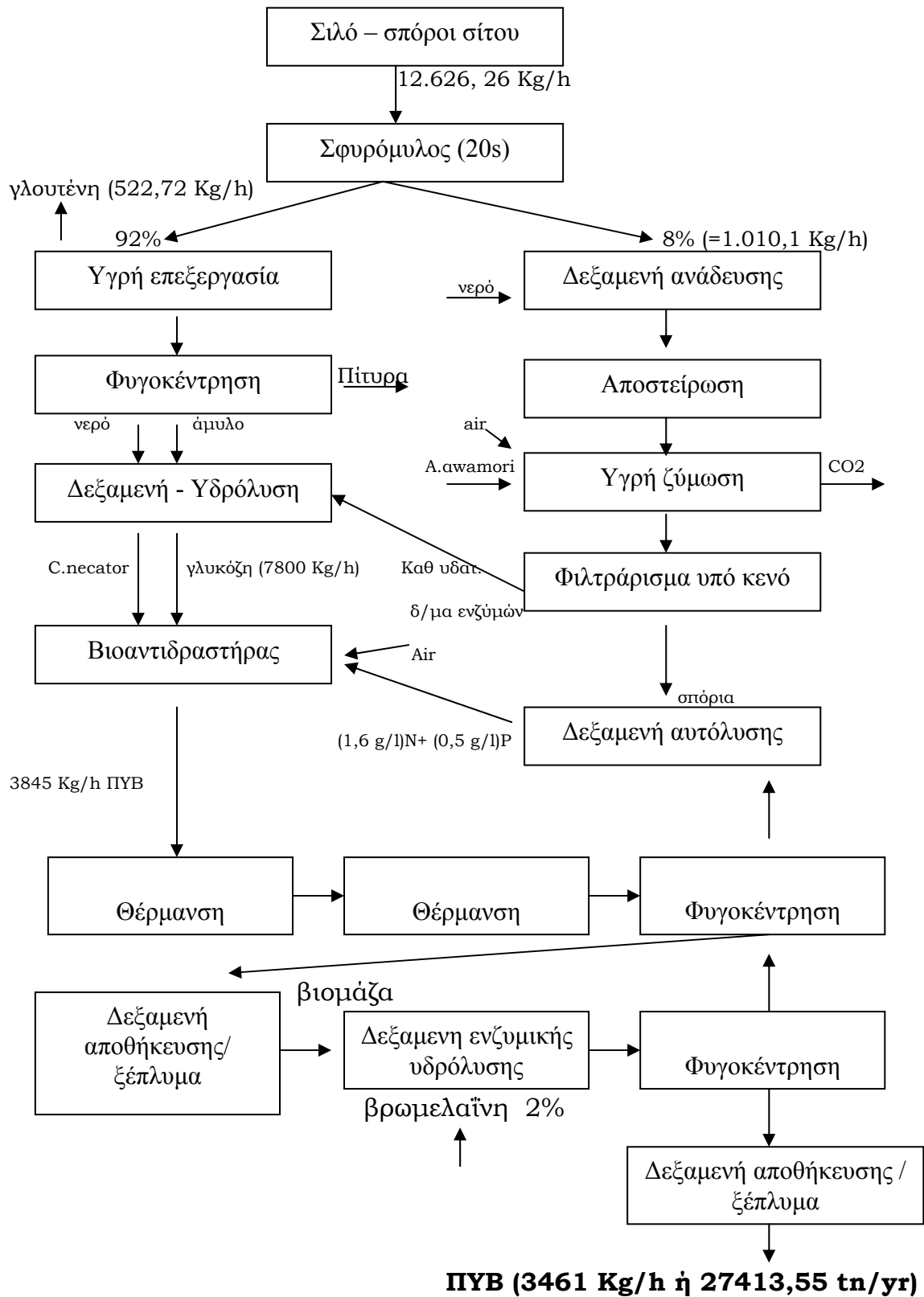
## **6.2 Στάδια παραγωγής ΠΥΒ**

Τα στάδια παραγωγής ΠΥΒ όπως έχουν ήδη ειπωθεί (βλ. Κεφάλαιο 3) είναι συνοπτικά τα εξής:

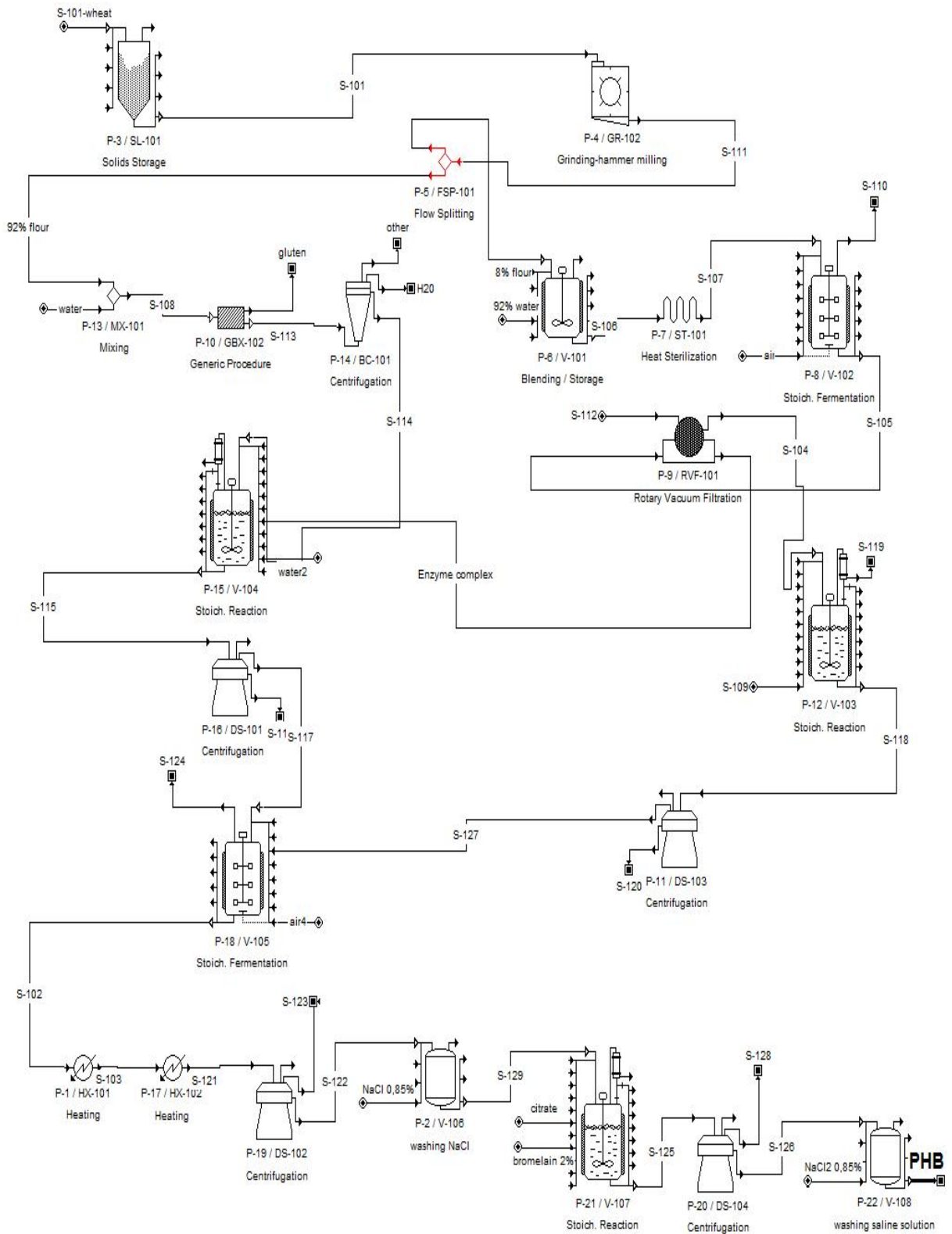
- 1) Αποθήκευση σιταριού σε σιλό.
- 2) Άλεση του σίτου.
- 3) Χρησιμοποίηση ενός μικρού ποσοστού του αλεύρου (8% κ.β.) για παραγωγή ενζύμων και θρεπτικού μέσου με τον *Aspergillus awamori*.
- 4) Μερικός διαχωρισμός της γλουτένης (30% κ.β.) από τον αλεσμένο σπόρο του σίτου.

- 5) Ενζυμική υδρόλυση του αμύλου και της υπολειπόμενης γλουτένης (70% κ.β. της αρχικής περιεκτικότητας γλουτένης στο σιτάρι).
- 6) Βακτηριακή βιομετατροπή με τον *Cupriavidus necator* και ενδοκυτταρική συσσώρευση ΠΥΒ.
- 7) Ανάκτηση και καθαρισμός του παραγόμενου πολυεστέρα σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφηκε στην Ενότητα-3.4.

Στο διάγραμμα βαθμίδων που ακολουθεί (Εικόνα 6.1) περιγράφεται συνοπτικά και απλοποιημένα η τεχνολογία που χρησιμοποιήθηκε για τον σχεδιασμό του βιοδυλιστηρίου παραγωγής ΠΥΒ από σιτάρι. Η φορά της διεργασίας υποδηλώνεται με την χρήση βέλους, τα οποία ενώνουν τις διάφορες βαθμίδες και περιγράφουν μεταφορά μάζας και ενέργειας σε κάθε βαθμίδα. Επιπλέον βέλη χρησιμοποιήθηκαν για να καταδειχτεί η εισαγωγή δευτερευουσών ροών μάζας π.χ. γλουτένης, νερό για ξέπλυμα κυττάρων κ.λ.π. Στην συνέχεια, στο μεθοδολογικό διάγραμμα ροής (Εικόνα 6.2) φαίνονται πιο αναλυτικά οι μονάδες μηχανολογικού εξοπλισμού που χρησιμοποιήθηκαν για τον σχεδιασμό του βιοδυλιστηρίου παραγωγής ΠΥΒ. Το άμυλο το οποίο υδρολύεται με αμυλάσες οι οποίες έχουν προκύψει από την υγρή ζύμωση με τον μύκητα *Aspergillus awamori* με αποτέλεσμα να προκύπτουν 7800 Kg γλυκόζης την ώρα. Η γλυκόζη αποτελεί την κύρια πηγή άνθρακα για την υγρή ζύμωση με τον *Cupriavidus necator*. Τα υπόλοιπα θρεπτικά συστατικά δηλαδή το N (1,5 g/l) και ο P (0,5 g/l) παρέχονται από την αυτόλυση των σπορίων του μύκητα καθώς και από την υδρόλυση της εναπομένουσας γλουτένης (το 30% κ.β. διαχωρίζεται και αποτελεί παραπροϊόν). Η συγκέντρωση της μικροβιακής βιομάζας στο τέλος της ζύμωσης με το βακτήριο είναι 162,8 g/l. Στο τέλος της βιοδιεργασίας παραγωγής ΠΥΒ αφού έχει ολοκληρωθεί η ενζυμική ανάκτηση του ενδοκυτταρικού πολυμερούς σε ποσοστό 90% παράγονται 3461 Kg ΠΥΒ ανά ώρα. Άρα ο συντελεστής απόδοσης της γλυκόζης σε ΠΥΒ και του σιταριού σε ΠΥΒ είναι 0,45 Kg/Kg και 0,27 Kg/Kg αντίστοιχα.



Εικόνα 6.1: Διάγραμμα ροής και ισοζύγιο μάζας για την διεργασία παραγωγής ΠΙΥΒ από σιτάρι.



Εικόνα 6.2: Διάγραμμα σωληνώσεων και οργάνων.

Στο μεθοδολογικό διάγραμμα ροής περιγράφονται τα στοιχεία μηχανολογικού εξοπλισμού που χρησιμοποιήθηκαν για την ολοκλήρωση της διεργασίας παραγωγής ΠΥΒ σε βιομηχανική κλίμακα. Σε κάθε στοιχείο μηχανολογικού εξοπλισμού δίνονται και πληροφορίες σχετικά με το όνομά τους και τον κωδικό τους (ο τύπος και ο κωδικός αναλύονται στον Πίνακα 6.1).

### **6.3 Συνολικό κεφάλαιο επένδυσης**

Το συνολικό κεφάλαιο επένδυσης που απαιτείται για την κατασκευή μιας βιομηχανικής εγκατάστασης μπορεί να χωριστεί σε δυο βασικά δομικά στοιχεία:

- Το πάγιο κεφάλαιο επένδυσης (Fixed Capital Investment)
- Το κεφάλαιο κίνησης (Working Capital)

#### **6.3.1 Πάγιο κεφάλαιο επένδυσης**

Το πάγιο κεφάλαιο επένδυσης αποτελείται από το άμεσο κόστος, το έμμεσο κόστος και τα έξοδα αρχικής λειτουργίας. Το άμεσο κόστος περιλαμβάνει τα έξοδα εκείνα που έχουν άμεση σχέση με τη διεργασία, όπως η αγορά μηχανημάτων, η αγορά γης και η κατασκευή των κτιρίων της βιομηχανικής μονάδας. Το έμμεσο κόστος περιλαμβάνει τα έξοδα εκείνα που έχουν έμμεση σχέση με τη διεργασία, όπως είναι τα έξοδα μηχανικού σχεδιασμού, επίβλεψης και διάφορων απρόβλεπτων δαπανών. Τα έξοδα αρχικής λειτουργίας περιλαμβάνουν το κόστος για την αρχική περίοδο λειτουργίας της βιομηχανικής μονάδας, όσον αφορά μετατροπές μηχανημάτων, τεχνική υποστήριξη ή/και εκπαίδευση προσωπικού.

Στον Πίνακα 6.1 που ακολουθεί δίνονται λεπτομέρειες για τις μονάδες μηχανολογικού εξοπλισμού που χρησιμοποιήθηκαν για τον σχεδιασμό της διεργασίας και λεπτομέρειες όσον αφορά την δυναμικότητα και το κόστος κάθε στοιχείου μηχανολογικού εξοπλισμού. Ο καθορισμός του κόστους των μηχανημάτων είναι σημαντικός καθώς συντελεί στον

καθορισμό του συνολικού κεφαλαίου επένδυσης. Είναι δε γνωστό ότι δομικό στοιχείο του συνολικού κεφαλαίου επένδυσης είναι το πάγιο κεφάλαιο επένδυσης και το κεφάλαιο κίνησης. Άλλωστε η αγορά και η εγκατάσταση των μηχανημάτων διαμορφώνει το 40-70% του συνολικού κεφαλαίου επένδυσης (Maroulis *et al.*, 2003). Στο σημείο αυτό πρέπει να σημειωθεί ότι το κόστος αγοράς των μονάδων επεξεργασίας που θεωρούνται βασικές για την διεργασία, υπολογίζονται από το λογισμικό Super-ProDesigner 7.0 αυτόματα βάσει των δεδομένων που έχουν εισαχθεί (βλ. Κεφάλαιο 3) και τον καθορισμό των ισοζυγίων μάζας. Επομένως η διαμόρφωση του συνολικού κόστους μηχανολογικού εξοπλισμού εξαρτάται από το διάγραμμα βαθμίδων ή το μεθοδολογικό διάγραμμα ροής της βιομηχανικής διεργασίας και από τα ισοζύγια μάζας και ενέργειας που αντιστοιχούν σε κάθε στάδιο του διαγράμματος (Εικόνα 6.1 & 6.2).

### **6.3.2 Κεφάλαιο κίνησης**

Το κεφάλαιο κίνησης περιλαμβάνει έξοδα απογραφών πρώτων υλών, εργατικών και διάφορων λογαριασμών. Συνήθως, για να διευκολύνουμε τον υπολογισμό του κεφαλαίου κίνησης υποθέτουμε το κεφάλαιο που απαιτείται για την αγορά πρώτων υλών που χρειάζονται για 3 μήνες λειτουργίας της βιομηχανικής μονάδας και τα εργατικά έξοδα που χρειάζονται για 1 μήνα λειτουργίας της βιομηχανικής μονάδας. Ο υπολογισμός του συνολικού κεφαλαίου επένδυσης αναλυτικά δίνεται στον Πίνακα 6.2. Τελικά το συνολικό κεφάλαιο το οποίο απαιτείται για την κατασκευή και λειτουργία ενός βιοδιυλιστηρίου παραγωγής ΠΥΒ από το σιτάρι με την τεχνολογία που έχει περιγραφεί είναι 268.903.072 \$.

Πίνακας 6.1: Κόστος μηχανολογικού εξοπλισμού

<b>Τύπος</b>	<b>Όνομα</b>	<b>Μέγεθος/ δυναμικότητα</b>	<b>Purchase Cost (\$/Unit)</b>
Σιλό	SL-101	16504 m <sup>3</sup>	7.000
Σφυρόμυλος	GR-102	12626,26 Kg/h	108.000
Δεξαμενή ανάμειξης (8% αλεύρου)	V-101	1057 l	167.000
Αποστειρωτήρας	ST-101	2889,71 Kg/h	291.000
Βιοαντιδραστήρας για παραγωγή ενζύμων	V-102	52980 l	1.161.000
Περιστροφικό φίλτρο διήθησης για διαχωρισμό υδατικού διαλύματος ενζύμων από υγρή ζύμωση	RVF-101	723 m <sup>2</sup>	68.000
Αναδευόμενη δεξαμενή αυτόλυσης σπορίων μύκητα	V-103	24505 l	725.000
Φυγόκεντρος διαχωρισμού θρεπτικού μέσου από σπόρια	DS-103	78078 l	275.000
Συσκευή ζύμωσης για παραγωγή ζυμαριού, κόσκινο απομάκρυνσης αμύλου, φυγόκεντρος	MX-101 GBX-102 BC-101	17616 Kg/h 17616 Kg/h 100.000 m <sup>2</sup>	315.000
Αντιδραστήρας ενζυμικής υδρόλυσης	V-104	23.408 l	717.000
Φυγόκεντρος	DS-101	219.911 m <sup>2</sup>	482.000
Βιοαντιδραστήρας για	V-105	233.198 l	2.107.000

<b>Τύπος</b>	<b>Όνομα</b>	<b>Μέγεθος/ δυναμικότητα</b>	<b>Purchase Cost (\$/Unit)</b>
παραγωγή ΠΥΒ			
Εναλλάκτης θερμότητας	HX-101 HX- 102	373 m <sup>2</sup> 100 m <sup>2</sup>	2.000 1.000
Φυγόκεντρος διαχωρισμού ΠΥΒ	DS-102	185.833,5 m <sup>2</sup>	440.000
Δεξαμενή ξεπλύματος ΠΥΒ πριν την εφαρμογή ενζύμων για την υδρόλυση συστατικών κυτταρικού τοιχώματος	V-106	1.140 l	44.000
Δεξαμενή υδρόλυσης κυτταρικού τοιχώματος	V-107	33.095 l	786.000
Δεξαμενή ξεπλύματος ΠΥΒ μετά την υδρόλυση των συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος	V-108	54.94 l	46.000
Φυγοκεντρος για παραλαβή ΠΥΒ	DS-104	78079 l	275.000

Στον Πίνακα 6.1 που προηγήθηκε έχει υπολογιστεί το κόστος αγοράς κάθε μονάδας μηχανολογικού εξοπλισμού που απαιτείται για την ολοκλήρωση της επένδυσης. Όμως το συνολικό κόστος μηχανολογικού εξοπλισμού προκύπτει από τον συμψηφισμό των εξόδων που προκύπτουν από την αγορά των μηχανημάτων, τον συνολικό αριθμό των μηχανημάτων (ανάλογα με το είδος φυσικά και την διεργασία που επιτελείται), το άμεσο κόστος (δηλαδή τον συμψηφισμό του εργατικών εξόδων που απαιτούνται για κάθε μονάδα και τα υλικά που πιθανόν χρησιμοποιούνται για την εγκατάσταση) και το έμμεσο κόστος (στο οποίο συμπεριλαμβάνονται έξοδα εγκατάστασης, σχεδιασμού των μηχανημάτων κ.λπ.). Το συνολικό κόστος



λοιπόν του μηχανολογικού εξοπλισμού που υπολογίστηκε για την συγκεκριμένη διεργασία είναι 42.168.750\$.

Αφού υπολογίστηκε το συνολικό κόστος του μηχανολογικού εξοπλισμού παρακάτω ακολουθεί ο Πίνακας 6.2 στον οποίο γίνεται διεξοδική ανάλυση και επιμερισμός των απαιτούμενων κεφαλαίων για την υλοποίηση της επένδυσης λαμβάνοντας υπόψη τα δομικά στοιχεία του συνολικού κεφαλαίου επένδυσης δηλαδή του πάγιου κεφαλαίου επένδυσης που είναι 266.045.046 \$ και το κεφάλαιο κίνησης που είναι 2.858.026. Από το άθροισμά τους προκύπτει το συνολικό κεφάλαιο που απαιτείται για την υλοποίηση της παραγωγής ΠΥΒ χρησιμοποιώντας ως αποκλειστική και μόνη ύλη το σιτάρι.

Πίνακας 6.2: Υπολογισμός συνολικού κεφαλαίου επένδυσης

<b>Κεφάλαιο επένδυσης</b>		<b>Υπολογισμός απαιτούμενων κεφαλαίων (\$)</b>
<b>Πάγιο</b>	<b>A) Άμεσο κόστος (DCI)</b>	
	1) Κατασκευή βιοδιυλιστηρίου	211.207.484
	2) Αγορά μηχανημάτων	42.168.750
		Άθροισμα = 253.376.234
<b>Πάγιο</b>	<b>B) Έμμεσο κόστος</b>	
	Έξοδα μηχανικού σχεδιασμού, απρόβλεπτα έξοδα	
<b>Πάγιο</b>	<b>Γ) Κόστος αρχικής λειτουργίας</b>	12.668.812
	Μετατροπές μηχανημάτων και κατασκευών, τεχνική υποστήριξη, εκπαίδευση προσωπικού, έξοδα λειτουργίας	

<b>Κεφάλαιο επένδυσης</b>		<b>Υπολογισμός απαιτούμενων κεφαλαίων (\$)</b>
Άθροισμα= 266.045.046		
<b>Κίνησης</b>	<b>Κεφάλαιο κίνησης</b> Απογραφή, π.χ. πρώτων υλών, αναλώσιμων και υπηρεσιών, Διάφορα έξοδα, π.χ. μισθοί, διάφοροι λογαριασμοί	2.858.026
<b>Συνολικό κεφάλαιο επένδυσης = 268.903.072\$</b>		

#### **6.4 Ανάλυση και εκτίμηση του συνολικού κόστους παραγωγής**

Ο υπολογισμός του συνολικού κόστους παραγωγής υποδιαιρείται α) στο λειτουργικό κόστος και β) στα γενικά έξοδα και αποτελεί δομικό στοιχείο μιας τεχνοοικονομικής ανάλυσης (Κουτίνας, 2009). Τα δομικά στοιχεία του λειτουργικού κόστους είναι το άμεσο λειτουργικό κόστος (πρώτες ύλες, προμήθειες, εργατικά και επίβλεψη και βοηθητικές παροχές) και τα πάγια έξοδα (απόσβεση, συντήρηση, φόροι κ.λπ.) που είναι ανεξάρτητα της παραγωγικής διαδικασίας. Το δεύτερο δομικό στοιχείο του συνολικού κόστους παραγωγής είναι τα γενικά έξοδα (έξοδα έρευνας και ανάπτυξης, διοικητικά έξοδα κ.λπ.). Στον Πίνακα 6.3 που ακολουθεί φαίνεται αναλυτικά πως υπολογίστηκε το συνολικό κόστος λειτουργίας του βιοδιυλιστηρίου παραγωγής ΠΥΒ. Αξίζει να παρατηρήσουμε ότι το κόστος αγοράς των πρώτων υλών στην συγκεκριμένη επένδυση συντελεί κατά 17% στην διαμόρφωση του συνολικού κόστους παραγωγής. Ποσοστό το οποίο φυσικά δεν είναι καθόλου ευκαταφρόνητο. Στον υπολογισμό του συνολικού κόστους παραγωγής έχουν αφαιρεθεί τα ετήσια συνολικά έσοδα που θα έχει η επιχείρηση από την πώληση της

γλουτένης, της οποίας η τιμή είναι εφταπλάσια από την μέση τιμή αγοράς του σιταριού, όπως έχει ήδη ειπωθεί.

Πίνακας 6.3: Συνολικό ετήσιο λειτουργικό κόστος παραγωγής ΠΥΒ από την χρησιμοποίηση 100.000 tn/year σιτάρι ως αποκλειστική πρώτη ύλη.

<b>Δομικά μέρη του συνολικού κόστους παραγωγής</b>	<b>Ετήσιο κόστος \$/yr</b>
1.Πρώτες ύλες & προμήθειες: α) σιτάρι β) βρωμελαίνη	14.202.000
2. Εργατικά και επίβλεψη (βασικοί μισθοί, υπερωρίες, διάφορα)	5.854.000 878.000
3. Βοηθητικές παροχές (ατμός, ηλεκτρισμός, νερό)	11.383.000
4. Πάγια έξοδα (απόσβεση, συντήρηση, φόροι, ασφάλιση, πατέντες)	47.718.000
<b>Συνολικό κόστος παραγωγής</b>	<b>80.034.000</b>

### 6.5 Κόστος παραγωγής ΠΥΒ

Ο καθορισμός του κόστους παραγωγής του ΠΥΒ είναι φυσικά συνάρτηση του της ετήσιας παραγωγής ΠΥΒ, όπως φαίνεται και από τα Γραφήματα 6.1- 6.3 που ακολουθούν.

Ο υπολογισμός του κόστους παραγωγής ΠΥΒ μετά την ολοκλήρωση παραμετρικής ανάλυσης με μεταβολή της συνολικής ετήσιας παροχής πρώτης ύλης (σιταριού) και την συνακόλουθη μεταβολή της ετήσιας παραγωγής γλουτένης που αποτελεί παραπροϊόν της διεργασίας παραγωγής ΠΥΒ και του ετήσιου κόστους παραγωγής περιγράφεται από την εξίσωση που ακολουθεί.

$$\text{PHB production cost} = \frac{\text{Annual Total Operational cost}}{\text{Annual PHB production rate}}$$

Όπου,

PHB production cost: Κόστος παραγωγής ΠΥΒ σε \$/Kg.

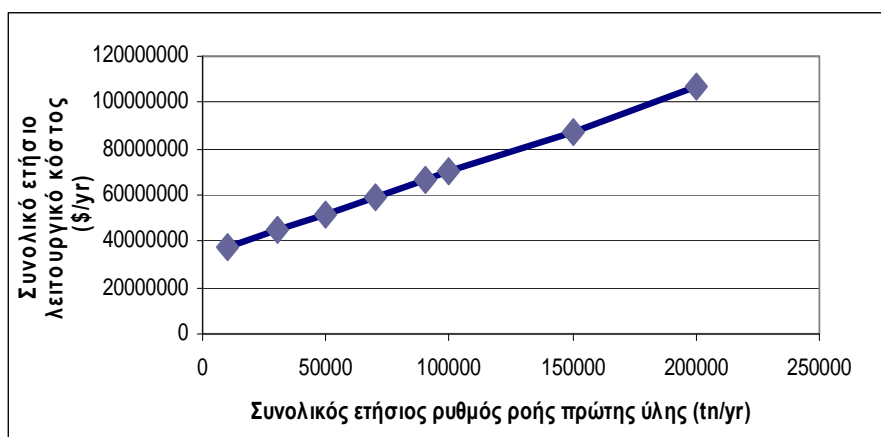
Operational cost: Συνολικό ετήσιο κόστος παραγωγής σε \$/Kg

PHB production rate: Ρυθμός παραγωγής ΠΥΒ σε Kg/h ή tn/yr.

Μεταβάλλοντας λοιπόν, όπως φαίνεται και στο Γράφημα 6.3 που ακολουθεί, την συνολική ετήσια παροχή μάζας (Γράφημα 6.2) παρά το γεγονός ότι αυξήθηκε το συνολικό λειτουργικό κόστος (Γράφημα 6.1) το κόστος παραγωγής του ΠΥΒ μειώθηκε και μάλιστα με παροχή μάζας 200.000 tn/yr σιτάρι το κόστος παραγωγής μπορεί να φτάσει στα 1,94 \$ δηλαδή στα 1,5 ευρώ/Kg, τιμή που μπορεί να είναι ιδιαίτερα ανταγωνιστική στην αγορά. Αυτό συμβαίνει εύλογα γιατί αυξανόμενης της παροχής μάζας εφαρμόζεται η αρχή της οικονομίας κλίμακος (economy of scale).

Παρατηρώντας λοιπόν, το Γράφημα 6.1 παρατηρούμε ότι αυξάνοντας τον συνολικό ρυθμό ροής της πρώτης ύλης αυξάνεται το συνολικό ετήσιο κόστος παραγωγής, κάτι το οποίο είναι λογικό αφού αυξάνονται τα έξοδα για την αγορά πρώτων υλών, η κατανάλωση σε βοηθητικές παροχές, τα εργατικά κ.λ.π. Όμως με την αύξηση του συνολικού ρυθμού ροής της πρώτης ύλης αυξάνεται και η συνολική ετήσια παραγωγή γλουτένης και τα έσοδα από την πώλησή της και όπως

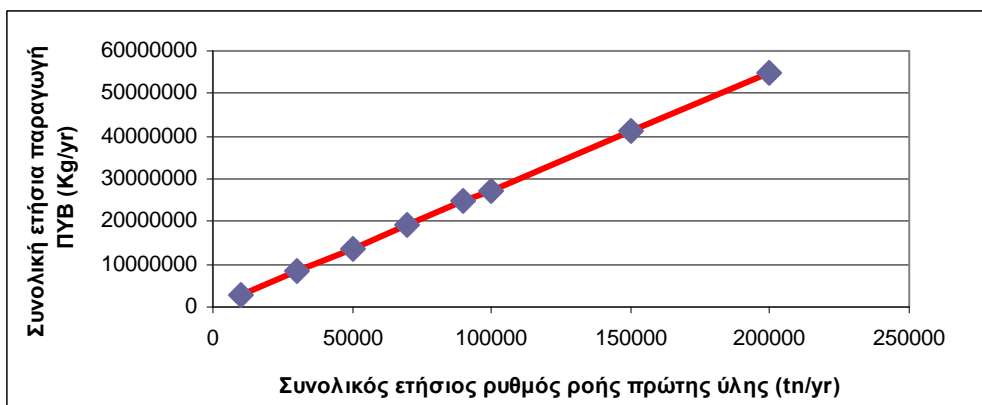
έχει ήδη ειπωθεί αυτή συγκαταλέγεται στα έσοδα της εγκατάστασης και αφαιρείται από το συνολικό κόστος παραγωγής.



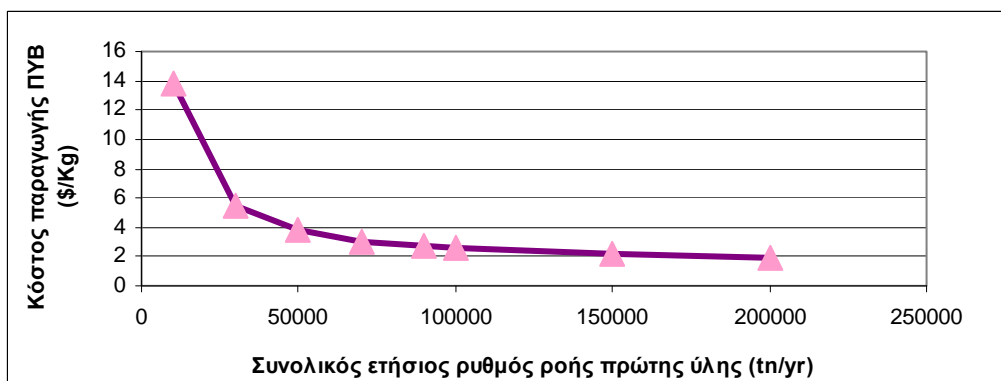
Γράφημα 6.1: Γραφική απεικόνιση του ετήσιου συνολικού κόστους παραγωγής μεταβάλλοντας την συνολική ετήσια παροχή σιταριού στο βιοδιυλιστήριο.

Αυξανόμενης της συνολικής ετήσιας παροχής μάζας στην εγκατάσταση παραγωγής ΠΥΑ αυξάνεται και η συνολική ετήσια παραγωγή ΠΥΒ. Αυτό το γεγονός φαίνεται στο Γράφημα 6.2 που ακολουθεί.

Τέλος, παρατηρώντας το Γράφημα 6.3 καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι είναι δυνατή η μείωση του κόστους παραγωγής ΠΥΒ από 13,85 \$/kg όταν η συνολική ετήσια παροχή σιταριού είναι 10.000 tn wheat/yr σε 2,57 \$/Kg στην περίπτωση που ο συνολικός ετήσιος ρυθμός ροής του σιταριού δεκαπλασιαστεί. Υποθέτοντας στο πλαίσιο αυτής της οικονομικής παραμετρικής ανάλυσης ότι η συνολική ετήσια παροχή σιταριού εικοσαπλασιαστεί τότε το κόστος παραγωγής είναι 1,94\$/kg, γεγονός που είναι ιδιαίτερα ελπιδοφόρο για την υλοποίηση μιας τέτοιας επένδυσης.



Γράφημα 6.2: Γραφική απεικόνιση του συνολικού ετήσιου ρυθμού παραγωγής ΠΥΒ μεταβάλλοντας την συνολική ετήσια παροχή μάζας που διοχετεύεται στο βιοδιυλιστήριο.



Γράφημα 6.3: Γραφική απεικόνιση του κόστους παραγωγής ΠΥΒ αυξάνοντας τον συνολικό ετήσιο ρυθμό ροής μάζας στο βιοδιυλιστήριο.

## 6.6 Συμπεράσματα

Ο σχεδιασμός και η μελέτη με οικονομικούς όρους μιας επένδυσης παραγωγής ΠΥΒ σε μεγάλη κλίμακα με την ενσωμάτωση και τον συνυπολογισμό όλων των πειραματικών παραμέτρων οδήγησε στην παραγωγή βιοαποικοδομήσιμων πλαστικών που το κόστος τους είναι άμεση συνάρτηση της συνολικής ετήσιας παρεχόμενης στην εγκατάσταση μάζας πρώτων υλών. Περιορίζοντας τα έξοδα αγοράς πρώτων υλών δεδομένου ότι η αποκλειστική πηγή θρεπτικών συστατικών για την συγκεκριμένη επένδυση είναι μόνο το σιτάρι, το οποίο είναι φτηνότερο από την συνήθη πηγή άνθρακα, δηλαδή την γλυκόζη που χρησιμοποιείται για

την μικροβιακή παραγωγή ΠΥΒ επιτεύχθηκε σχετική μείωση του κόστους παραγωγής ΠΥΒ αυξάνοντας την συνολική ετήσια παροχή πρώτης ύλης. Αν αναλογιστούμε ότι μέλη της οικογένειας των ΠΥΑ πωλούνται σήμερα έναντι 10-15 \$/Kg με την συγκεκριμένη διεργασία που περιγράφηκε είναι δυνατή η τελική διαμόρφωση του κόστους παραγωγής ΠΥΒ κάτω από τα 2 \$/Kg. Βέβαια ο στόχος παραγωγής των συγκεκριμένων πολυμερών είναι να αντικαταστήσουν τα συμβατικά πλαστικά, των οποίων το κόστος παραγωγής τους είναι πολύ μικρό και σε αυτόν τον τομέα απαιτείται επιπλέον έρευνα και διερεύνηση επιπρόσθετων παραμέτρων που θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην αύξηση της ανταγωνιστικότητας των ΠΥΑ με περαιτέρω μείωση των λειτουργικών και πάγιων εξόδων μιας τέτοιας εγκατάστασης.

## Κεφάλαιο 7

### Πειραματικά αποτελέσματα και συζήτηση

Στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκε η δυνατότητα παραγωγής θρεπτικού υποστρώματος πλούσιου σε πηγές αζώτου, (π.χ. αμινοξέα, πεπτιδία) φώσφορο, διάφορα ιχνοστοιχεία και βιταμίνες μέσω της υδρόλυσης κραμβάλευρου με ένζυμα μυκητιακής προέλευσης. Τα ένζυμα παρήχθησαν μέσω ζύμωσης στερεάς κατάστασης με τον μύκητα *Aspergillus oryzae* χρησιμοποιώντας κραμβάλευρο ως θρεπτικό μέσο. Τα ένζυμα ακολούθως χρησιμοποιήθηκαν με στόχο την παραγωγή υδρολύματος με όσο το δυνατόν μεγαλύτερη συγκέντρωση αζώτου που περιέχεται στις ελεύθερες αμινομάδες πεπτιδίων και αμινοξέων (FAN) που προκύπτουν από την ενζυμική υδρόλυση των πρωτεϊνών του κραμβάλευρου.

Στην συνέχεια χρησιμοποιήθηκε το βακτήριο *Cupriavidus necator* DSMZ545 και αξιολογήθηκε η δυνατότητα ανάπτυξης του σε υποστρώματα που αποτελούνταν από συνδυασμούς γλυκερόλης και θρεπτικού μέσου που προέκυψε από την υδρόλυση του κραμβάλευρου. Το ενδιαφέρον επικεντρώθηκε στην ικανότητα του μικροοργανισμού να καταναλώνει γλυκερόλη. Πραγματοποιήθηκε επίσης συγκριτική μελέτη ανάπτυξης του *C. necator* DSMZ545 σε ακατέργαστο υδρόλυμα από κραμβάλευρο και υπόστρωμα που περιείχε εμπορικά παρασκευάσματα θρεπτικών συστατικών (π.χ. εκχύλισμα ζύμης και πεπτόνη). Επιπρόσθετα έγινε μελέτη της επίδρασης της θερμικής αποστείρωσης του υδρολύματος, όσον αφορά την δυνατότητα κατανάλωσης γλυκερόλης, κατά την ζύμωση σε αναδευόμενα δοχεία.

Επίσης μελετήθηκε η κατανάλωση γλυκερόλης, η παραγωγή βιομάζας και η παραγωγή βιοπολυμερούς (ΠΥΒ) και έγινε σύγκριση των προηγούμενων παραμέτρων με την αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκερόλης διατηρώντας σταθερή την συγκέντρωση σε ελεύθερες αμινομάδες και λοιπά θρεπτικά συστατικά του εργαστηριακά παραγόμενου υδρολύματος.

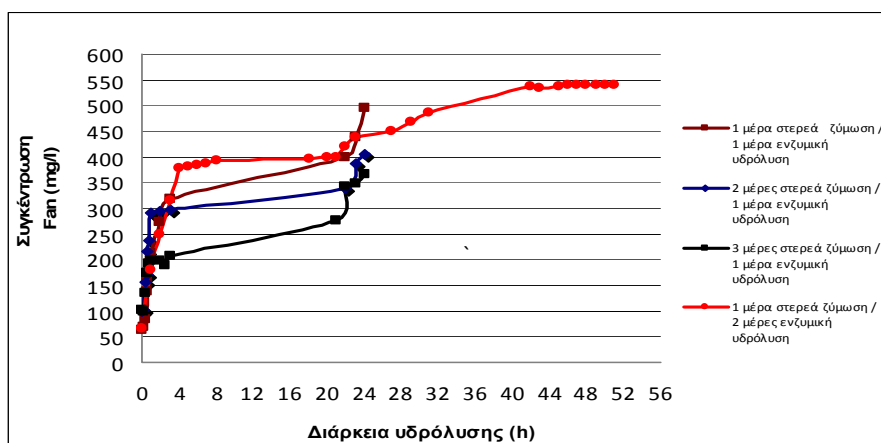


## **7.1 Αξιολόγηση της ενζυμικής υδρόλυσης των πρωτεϊνών που περιέχονται στο κραμβάλευρο**

Ο στόχος των πειραμάτων, όσον αφορά την ζύμωση σε στερεή κατάσταση του κραμβάλευρου και της ενζυμικής υδρόλυσης της περιεχόμενης πρωτεΐνης αυτού, είναι να αξιολογηθεί η δυνατότητα παραγωγής υποστρώματος για μικροβιακές ζυμώσεις από το κραμβάλευρο. Το παραγόμενο υδρόλυμα αξιολογήθηκε ως θρεπτικό μέσο για την παραγωγή ΠΥΒ. Στα πειράματα αυτά πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση μόνο του N που περιέχεται στις ελεύθερες αμινομάδες των αμινοξέων και πεπτιδίων που προκύπτουν από την υδρόλυση της πρωτεΐνης. Όμως από βιβλιογραφικές αναφορές (Koutinas *et al.*, 2006; Koutinas *et al.*, 2004) είναι γνωστό ότι στο υδρόλυμα εκτός από ελεύθερες αμινομάδες υπάρχει φώσφορος, ιχνοστοιχεία και βιταμίνες τα οποία είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη του *Cupriavidus necator* DSZM545.

Η ζύμωση σε στερεά κατάσταση με τον *Aspergillus oryzae* και η ενζυμική υδρόλυση, που περιγράφηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο, αξιολογήθηκαν με στόχο την παραγωγή υδρολύματος με όσο το δυνατόν μεγαλύτερη συγκέντρωση FAN. Κατά την διενέργεια των πειραμάτων αυτών, η παράμετρος που μεταβαλλόταν ήταν η χρονική διάρκεια της στερεάς ζύμωσης και της ενζυμικής υδρόλυσης. Αρχικά πραγματοποιήθηκαν πειράματα όπου η χρονική διάρκεια στερεάς ζύμωσης ήταν 24 h, 48 h και 72 h, ενώ ο χρόνος της ενζυμικής υδρόλυσης ήταν 24 h σε όλες τις προηγούμενες περιπτώσεις. Μελετήθηκε η παραγωγή αζώτου που περιέχεται στις ελεύθερες αμινομάδες αμινοξέων και πεπτιδίων που προκύπτουν από την ενζυμική υδρόλυση της πρωτεΐνης του κραμβάλευρου. Από το Γράφημα 7.1 είναι εύλογο το συμπέρασμα ότι μεγαλύτερη συγκέντρωση FAN παρατηρείται όταν η ζύμωση στερεάς κατάστασης του υπολείμματος της ελαιοκράμβης διαρκεί 24 h. Στην περίπτωση αυτή, οι πρωτεάσες που παρήχθησαν οδήγησαν στην παραγωγή 439,5 mg/1 FAN μετά από 24 h ενζυμικής υδρόλυσης.

Ωστόσο, με μία πιο προσεκτική παρατήρηση του Γραφήματος 7.1 φαίνεται καθαρά ότι σε καμία από τις τρεις παραπάνω περιπτώσεις η ενζυμική υδρόλυση της πρωτεΐνης του υποστρώματος δεν έχει ολοκληρωθεί μετά από 24 h ενζυμικής υδρόλυσης. Γι' αυτόν τον λόγο η ενζυμική υδρόλυση επαναλήφθηκε έως το σημείο όπου σταματάει η παραγωγή FAN.



Γράφημα 7.1: Γραφική απεικόνιση της συγκέντρωσης του N που περιέχεται στις ελεύθερες αμινομάδες των αμινοξέων και πεπτιδίων που προκύπτουν από την ενζυμική υδρόλυση των πρωτεϊνών του υπολείμματος ελαιοκράμβης.

Από την επανάληψη της διαδικασίας, όπως έχει ήδη περιγραφεί στο Κεφάλαιο 4, με την διεξαγωγή της ζύμωσης σε στερεά κατάσταση για χρονικό διάστημα 24 h και ενζυμική υδρόλυση της πρωτεΐνης του κραμβάλειου για 48 h καταλήξαμε στα επιθυμητά αποτελέσματα. Όπως φαίνεται στο Γράφημα 7.1, με αύξηση του χρόνου ενζυμικής υδρόλυσης σε 2 μέρες, επιτεύχθηκαν τα εξής:

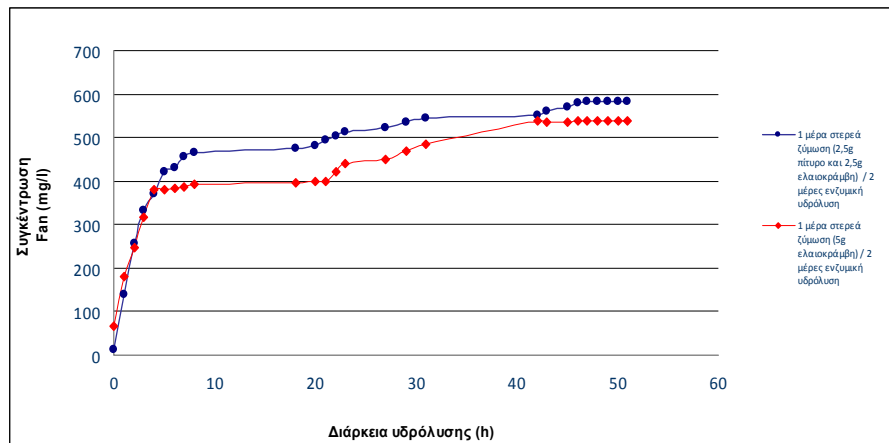
- Αυξήθηκε η συγκέντρωση του αζώτου που περιέχεται στις ελεύθερες αμινομάδες των αμινοξέων και πεπτιδίων στο τελικό υδρόλυμα / θρεπτικό μέσο.
- Μετά τις 43 h ενζυμικής υδρόλυσης του υπολείμματος ελαιοκράμβης (50 g/l κ.β.) η συγκέντρωση FAN περίπου σταθεροποιήθηκε. Άρα είναι αδύνατη η παραγωγή κάτω από αυτές

τις συνθήκες, υψηλότερης συγκέντρωσης FAN (περίπου 539,25 mg/l).

## **7.2 Αποτελέσματα μετρήσεων συγκέντρωσης FAN, χρησιμοποιώντας κραμβάλευρα και πίτυρα για στερεά ζύμωση και κραμβάλευρα για ενζυμική υδρόλυση**

Με απώτερο στόχο την αύξηση της παραγόμενης συγκέντρωσης του N που περιέχεται στις ελεύθερες αμινομάδες και αύξηση του ρυθμού της ενζυμικής υδρόλυσης των πρωτεϊνών από τις πρωτεάσες που παράγονται από την στερεά ζύμωση, πραγματοποιήθηκε ένα πείραμα όπου κατά την ζύμωση στερεάς κατάστασης χρησιμοποιήθηκε μείγμα υπολείμματος ελαιοκράμβης (2,5 g) και πίτυρου (2,5 g). Η παραγωγή FAN κατά την ενζυμική υδρόλυση χρησιμοποιώντας τα ένζυμα από την παραπάνω ζύμωση στερεάς κατάστασης συγκρίθηκαν με την παραγωγή FAN κατά την διάρκεια ενζυμικής υδρόλυσης όπου τα ένζυμα έχουν παραχθεί σε στερεό υπόστρωμα που αποτελείται αποκλειστικά από υπόλειμμα ελαιοκράμβης. Από την στιγμή που είχαν ολοκληρωθεί και εξαχθεί τα συμπεράσματα τις Ενότητας 7.1, η βέλτιστη χρονική διάρκεια ζύμωσης σε στερεή κατάσταση και ενζυμικής υδρόλυσης καθορίστηκαν ως 24 h και 48 h αντίστοιχα. Ο κυριότερος λόγος που οδήγησε στην πραγματοποίηση των παραπάνω πειραμάτων ήταν το γεγονός ότι το πίτυρο αποτελεί καλύτερη πρώτη ύλη για την ανάπτυξη του μύκητα *Aspergillus awamori* και την παραγωγή ενζύμων.

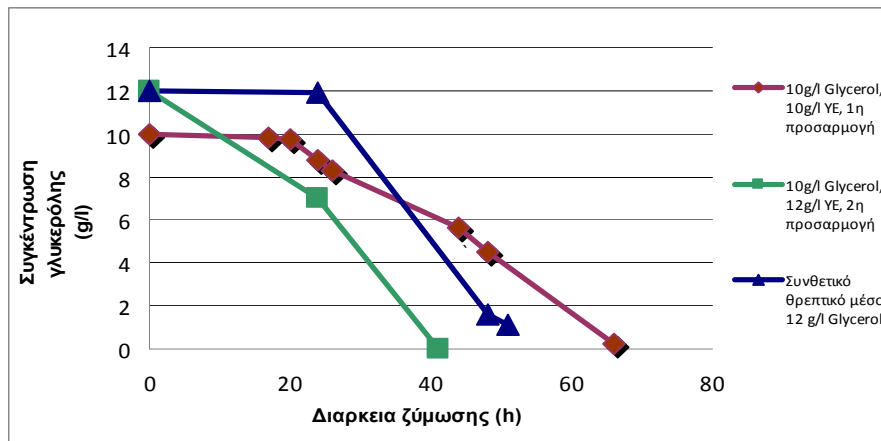
Τελικά παρήχθησαν, (Γράφημα 7.2) 583,63 mg/l FAN όταν στην στερεά ζύμωση χρησιμοποιήθηκαν 2,5 g πίτυρα και 2,5 g κραμβάλευρο ως υπόστρωμα και 539,52 mg/l FAN όταν χρησιμοποιήθηκαν 5 g κραμβάλευρου. Αυτό συμβαίνει μιας και το πίτυρο είναι πιο πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά (ιδιαίτερα πλούσιο σε πηγές άνθρακα καθώς περιέχει άμυλο) από το κραμβάλευρο με αποτέλεσμα ο μύκητας να αυξάνεται καλύτερα.



Γράφημα 7.2: Γραφική συγκριτική απεικόνιση της συγκέντρωσης του FAN καθόλη την διάρκεια της ενζυμικής υδρόλυσης των πρωτεϊνών του κραιβάλευρου από πρωτεάσες μυκητιακής προέλευσης που προκύπτουν από στερεές ζυμώσεις κραιβάλευρου ή μείγματος του κραιβάλευρου και πιτύρου.

### 7.3 Μελέτη της δυνατότητας κατανάλωσης γλυκερόλης από τον μικροοργανισμό *Cupriavidus necator* DSMZ545

Ο μικροοργανισμός *C. necator* DSMZ545 χρησιμοποιήθηκε από τους Cavalhiero *et al.* (2009) για την παραγωγή ΠΥΒ από εμπορική ή ακατέργαστη γλυκερόλη και εμπορικά θρεπτικά μέσα (εκχύλισμα ζύμης και ανόργανα άλατα). Η παρούσα ερευνητική εργασία αποτελεί μία προκαταρκτική μελέτη όπου αξιολογήθηκε η δυνατότητα χρησιμοποίησης του εν λόγω βακτηρίου για την παραγωγή ΠΥΒ χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα την γλυκερόλη (εμπορική ή παραπροϊόν της διεργασίας παραγωγής βιοντιζελ). Ωστόσο, σε πρώτη φάση ήταν αναγκαίο να προσαρμόσουμε την ανάπτυξη του εν λόγω στελέχους αποκλειστικά στην γλυκερόλη. Όπως φαίνεται από το Γράφημα 7.3, στην πρώτη ζύμωση που πραγματοποιήθηκε σε αναδευόμενες φιάλες (κόκκινη γραμμή), ο *C. necator* DSMZ545 καταναλώνει την γλυκερόλη με πολύ αργό ρυθμό. Από το Γράφημα 7.3, φαίνεται επίσης ότι η φάση επώασης διαρκεί περίπου 20 h και απαιτούνται περίπου 66 h για να εξαντληθεί όλη η ποσότητα της γλυκερόλης (10 g/l).



Γράφημα 7.3: Γραφική απεικόνιση του ρυθμού κατανάλωσης της γλυκερόλης, από τον *Cupriavidus necator* DSZM545, σε υγρά θρεπτικά υποστρώματα (προσαρμογή στην γλυκερόλη και διερεύνηση ανάπτυξης σε συνθετικό θρεπτικό μέσο πλούσιο σε ανόργανα άλατα).

Αφού μεταφέρθηκε το στέλεχος μετά την πρώτη ζύμωση σε τριβλία με στερεό θρεπτικό μέσο, κατά την δεύτερη ζύμωση σε αναδευόμενες φιάλες ο ρυθμός κατανάλωσης της γλυκερόλης αυξήθηκε σημαντικά (πράσινη γραμμή, Γράφημα 7.3). Από το Γράφημα 7.3, φαίνεται καθαρά ότι το στέλεχος *Cupriavidus necator* DSMZ545 έχει προσαρμοστεί στην γλυκερόλη, καθώς καταναλώνει την γλυκερόλη με ταχύτερους ρυθμούς καθόλη την διάρκεια της ζύμωσης. Η κατανάλωση γλυκερόλης ολοκληρώνεται σε 41 h ζύμωσης, δηλαδή 25 ώρες νωρίτερα σε σχέση με την πρώτη ζύμωση.

Στο σημείο αυτό διενεργήθηκε και μια ακόμα ζύμωση σε αναδευόμενες κωνικές φιάλες. Το υγρό θρεπτικό μέσο αποτελούταν από γλυκερόλη συγκέντρωσης 12 g/l και ένα υδατικό διάλυμα πλούσιο σε ανόργανα άλατα (βλ. Κεφάλαιο 4). Παρατηρώντας την κίτρινη γραμμή του Γραφήματος 7.3, που αντιπροσωπεύει την κατανάλωση της γλυκερόλης κατά την διάρκεια της ζύμωσης φαίνεται ότι τις πρώτες 30 h της ζύμωσης τα βακτηριακά κύτταρα δεν καταναλώνουν καθόλου γλυκερόλη ενώ απαιτούνται περίπου 51 h μέχρι να γίνει η πλήρης κατανάλωση της. Αυτό σημαίνει ότι απαιτούνται περίπου 10 h περισσότερες για την πλήρη

αξιοποίηση της πηγής άνθρακα του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης από τα βακτηριακά κύτταρα σε σχέση με την 2<sup>η</sup> προσαρμογή του *Cupriavidus necator* DSZM545 (κόκκινη γραμμή). Αυτό φυσικά μπορεί να οφείλεται στην υψηλότερη συγκέντρωση της γλυκερόλης του μέσου ανάπτυξης αλλά επειδή η διαφορά είναι πολύ μικρή της τάξεως των 2 g/l πιο πιθανή εξήγηση αποτελεί η διαπίστωση ότι ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται καλύτερα σε οργανικά θρεπτικά μέσα αντί σε υδατικά διαλύματα αλάτων.

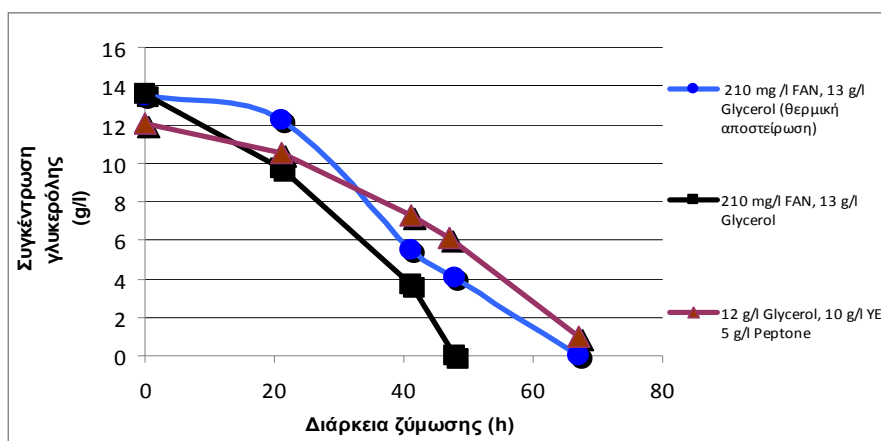
#### **7.4 Αξιολόγηση της κατανάλωσης της γλυκερόλης από τον *Cupriavidus necator* DSZM545 σε διάφορα θρεπτικά μέσα**

Μετά την προσαρμογή του *Cupriavidus necator* στην γλυκερόλη ακολούθησε ένα σει πειραμάτων με στόχο την διερεύνηση της επίδρασης της θερμικής αποστείρωσης στην κατανάλωση της γλυκερόλης από το βακτήριο και την αξιολόγηση της δυνατότητας αντικατάστασης του εργαστηριακά παραγόμενου υδρολύματος από εμπορικά θρεπτικά συστατικά μέσω του ρυθμού κατανάλωσης της γλυκερόλης. Στην ουσία διενεργήθηκαν 3 ζυμώσεις σε 3 αναδευόμενες κωνικές φιάλες στις οποίες η συγκέντρωση γλυκερόλης ήταν σταθερή και ίση με 12 g/l. Στην μια κωνική φιάλη προστέθηκε η γλυκερόλη και το εργαστηριακά παραγόμενο υδρόλυμα από κραμβάλευρο συγκέντρωσης FAN 210 mg/l. Η δεύτερη κωνική φιάλη είχε ακριβώς την ίδια σύνθεση με την διαφορά ότι το υδρόλυμα είχε προηγουμένως υποστεί θερμική αποστείρωση. Τέλος η τρίτη κωνική φιάλη περιείχε φυσικά γλυκερόλη ίδιας συγκέντρωσης όμως το εργαστηριακά παραγόμενο υδρόλυμα αντικαταστάθηκε από πεπτόνη και εκχύλισμα ζύμης συγκέντρωσης 5 g/l και 10 g/l αντίστοιχα. Ακολούθησε εμβολιασμός και τα αποτελέσματα που προέκυψαν, όσον αφορά την κατανάλωση της γλυκερόλης, από τα βακτηριακά κύτταρα κατά την διάρκεια της ζύμωσης φαίνονται στο Γράφημα 7.4. Παρατηρώντας λοιπόν την πορεία των ζυμώσεων φαίνεται ότι ο *Cupriavidus necator* DSMZ545 καταναλώνει γρηγορότερα την γλυκερόλη (48 h) όταν το υδρόλυμα που προστίθεται στο υγρό θρεπτικό μέσο αύξησης δεν έχει

υποστεί θερμική αποστείρωση. Στην περίπτωση που το θρεπτικό μέσο υφίσταται θερμική αποστείρωση πριν την ζύμωση τότε ο χρόνος ζύμωσης είναι 67 h. Αυτό πιθανόν να οφείλεται σε αλλοδομή των πρωτεϊνών ή πεπτιδίων που υπάρχουν στο υδρόλυμα συγκέντρωσης 210 mg/1 FAN, που έχει παρασκευαστεί. Επομένως, είναι δόκιμο να ειπωθεί ότι το ακατέργαστο υδρόλυμα υπολείμματος ελαιοκράμβης δεν πρέπει να υφίσταται θερμική αποστείρωση. Επίσης, το Γράφημα 7.4 δείχνει ότι το ακατέργαστο υδρόλυμα αποτελεί καλύτερο θρεπτικό μέσο σε σύγκριση με εμπορικά παρασκευάσματα θρεπτικών συστατικών.

Συμπερασματικά από αυτό το σει πειραμάτων καταλήγουμε στα εξής συμπεράσματα:

- 1) Ο *Cupriavidus necator* DSZM545 καταναλώνει την γλυκερόλη και μάλιστα έχει ανάγκη και από άλλα θρεπτικά συστατικά αλλά και από γλυκόζη, FAN, πεπτίδια, φώσφορο, βιταμίνες και ιχνοστοιχεία που του παρέχονται από το υδρόλυμα που έχει παρασκευαστεί εργαστηριακά από κραμβάλευρο (Koutinas *et al.*, 2004; Koutinas *et al.*, 2006).
- 2) Το εργαστηριακά παραγόμενο υδρόλυμα αποτελεί ιδανική πηγή θρεπτικών συστατικών, όπως έχει ήδη ειπωθεί και η αντικατάστασή του από άλλα εμπορικά παρασκευάσματα θρεπτικών συστατικών επηρεάζουν την κατανάλωση της γλυκερόλης κατά την διάρκεια της ζύμωσης και καθυστερούν την πλήρη κατανάλωσή της. Κάτι τέτοιο είναι φυσικά ανεπιθύμητο μιας και μείωση του ρυθμού κατανάλωσης της γλυκερόλης οδηγεί στην καθυστέρηση της πλήρης χρησιμοποίησης αυτής της πηγής άνθρακα από τα βακτηριακά κύτταρα που φυσικά επηρεάζει αρνητικά την συσσώρευση του ΠΥΒ τόσο χρονικά όσο και ποσοτικά. Είναι γνωστό δε ότι η συσσώρευση ΠΥΒ στα βακτηριακά κύτταρα ευνοείται από υψηλούς λόγους συγκεντρώσεων C/N (Cavalheiro *et al.*, 2009).



Γράφημα 7.4: Γραφική απεικόνιση του ρυθμού κατανάλωσης της γλυκερόλης, από τον *Cupriavidus necator* DSZM545, σε υγρά θρεπτικά υποστρώματα.

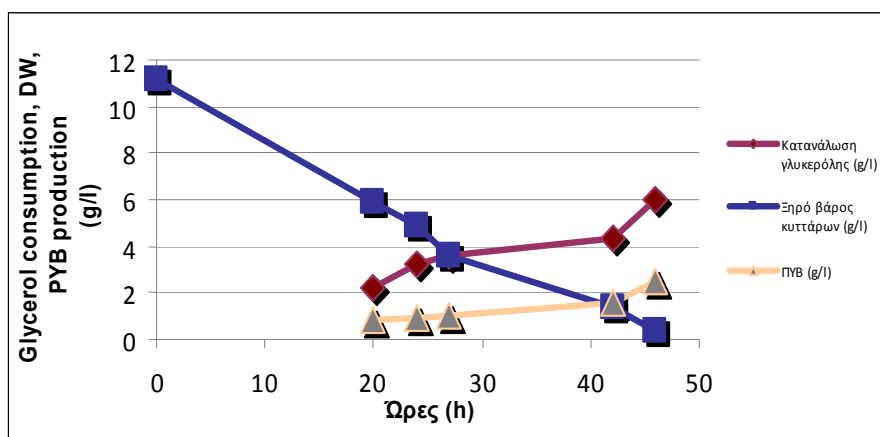
### 7.5 Μελέτη της κατανάλωσης της γλυκερόλης, του ξηρού βάρους των κυττάρων και του περιεχομένου τους σε ΠΥΒ, σε βακτηριακές βιομετατροπές με τον *Cupriavidus necator* DSZM545

Στόχος των υγρών ζυμώσεων στο σημείο αυτό της μελέτης ήταν η αξιολόγηση τριών παραμέτρων και πιο συγκεκριμένα του ρυθμού κατανάλωσης της γλυκερόλης, του ξηρού βάρους των βακτηριακών κυττάρων και του ενδοκυτταρικού περιεχομένου τους σε ΠΥΒ. Επιπρόσθετα διερευνήθηκε και η επίδραση της αύξησης της συγκέντρωσης της γλυκερόλης στο θρεπτικό μέσο της ζύμωσης στις παραμέτρους αυτές. Για αυτόν τον σκοπό διεξήχθησαν δύο ζυμώσεις σε δυο διαφορετικές κωνικές φιάλες, οι οποίες εμπεριείχαν το εργαστηριακά παραγόμενο υδρόλυμα που περιείχε συγκεντρώσεις FAN 210 mg/l και γλυκερόλης 11 g/l και 18 g/l.

Από το Γράφημα 7.5, που ακολουθεί παρατηρούμε ότι η γλυκερόλη καταναλώνεται από τον *C. necator* DSZM 545. Μέσα σε 46 h έχει καταναλωθεί όλη η πηγή άνθρακα του υποστρώματος. Το ξηρό βάρος των κυττάρων μετά της 20 h ζύμωσης αρχίζει να αυξάνει σταδιακά. Όσο μειώνεται η συγκέντρωση γλυκερόλης στο θρεπτικό μέσο αύξησης,



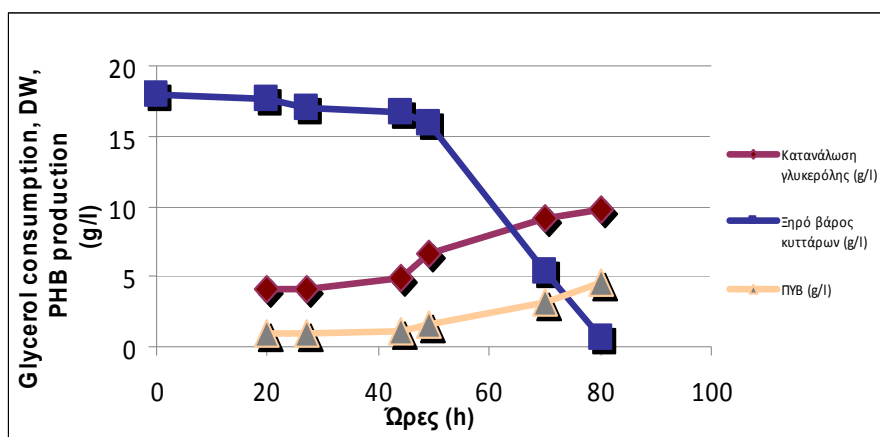
αυξάνεται το ξηρό βάρος των κυττάρων. Μέχρι τις 27 h η συγκέντρωση του ΠΥΒ είναι κάτω από 1 g/l, γεγονός που σημαίνει ότι το 29% του συνολικού ξηρού βάρους των κυττάρων αντιστοιχεί σε ΠΥΒ. Η παραγωγή ΠΥΒ ξεκινάει περίπου στις 20 h κάτι το οποίο υποδεικνύει ότι περίπου αυτήν την χρονική στιγμή έχει εξαντληθεί η πηγή N στο θρεπτικό μέσο αύξησης. Η παραγωγή ΠΥΒ αυξάνεται μέχρι το τέλος της ζύμωσης, δηλαδή τις 46 h όπου έχει γίνει και η πλήρη κατανάλωση της πηγής άνθρακα. Στο τέλος της ζύμωσης το ξηρό βάρος των κυττάρων ήταν 5,97 g/l και η συγκέντρωση ΠΥΒ ήταν 2,5 g/l, δηλαδή το 41,9% του ξηρού βάρους των κυττάρων αντιστοιχεί σε ΠΥΒ.



Γράφημα 7.5: Γραφική απεικόνιση του ρυθμού κατανάλωσης της γλυκερόλης, από τον *Cupriavidus necator* DSZM545, του ξηρού βάρους των κυττάρων και του περιεχομένου τους σε ΠΥΒ σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα που περιέχει 11g/l γλυκερόλη και το εργαστηριακά παραγόμενο υδρόλυμα.

Από το Γράφημα 7.6 φαίνεται ότι η κατανάλωση γλυκερόλης είναι εξαιρετικά αργή για τις πρώτες 40 ώρες ζύμωσης. Από την στιγμή που ο *C. necator* DSZM545 αρχίζει να καταναλώνει με πιο γρήγορους ρυθμούς την γλυκερόλη, μετά από 44h περίπου, αρχίζει να αυξάνεται αισθητά το ξηρό βάρος των κυττάρων. Επομένως από αυτό το σημείο μπορεί να εξαχθεί το

συμπέρασμα ότι όσο μειώνεται η συγκέντρωση της γλυκερόλης στο θρεπτικό μέσο αύξησης, αυξάνεται η συγκέντρωση του ξηρού βάρους των κυττάρων. Μετά τις 44h που είναι περίπου και η χρονική στιγμή που έχουν καταναλωθεί και οι πηγές N του υποστρώματος αυξανόμενης της συγκέντρωσης του ξηρού βάρους των βακτηριακών κυττάρων αυξάνεται και το ενδοκυτταρικό τους περιεχόμενο σε ΠΥΒ. Στο τέλος της ζύμωσης το ξηρό βάρος των κυττάρων και η συγκέντρωση του ΠΥΒ ήταν 9,8 g/l και 4,5 g/l αντίστοιχα. Γεγονός που σημαίνει ότι το 46% περίπου του ξηρού βάρους των βακτηριακών κυττάρων ήταν ΠΥΒ.



Γράφημα 7.6: Γραφική απεικόνιση του ρυθμού κατανάλωσης της γλυκερόλης, από τον *Cupriavidus necator* DSZM545, του ξηρού βάρους των κυττάρων και του περιεχομένου τους σε ΠΥΒ σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα που εμπεριέχει γλυκερόλη (18 g/l) και το εργαστηριακά παραγόμενο υδρόλυμα.

Τελικά από τα προηγούμενα πειράματα μπορούν να εξαχθούν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

1. Όταν αυξάνεται η αρχική συγκέντρωση της γλυκερόλης στο υγρό θρεπτικό μέσο αύξησης παρατηρείται μια καθυστέρηση στην κατανάλωση γλυκερόλης.

2. Όσο μειώνεται η συγκέντρωση της γλυκερόλης στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης αυξάνεται το ξηρό βάρος των κυττάρων. Την χρονική στιγμή που εξαντλείται η πηγή N αρχίζει η παραγωγή του ενδοκυτταρικού ΠΥΒ. Στο τέλος των ζυμώσεων με την αύξηση της συγκέντρωσης της πηγής άνθρακα στο θρεπτικό μέσο αύξησης, αυξάνεται η συγκέντρωση του παραγόμενου πολυεστέρα.

Τέλος τα γενικά συμπεράσματα που προέκυψαν από όλα τα πειράματα που διεξήχθησαν αναφέρονται στο Κεφάλαιο – 1, για αυτό το λόγο δεν κρίνεται σκόπιμο να επαναδιατυπωθούν.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ahn WS, Park SJ, Lee SY. 2001. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from whey by cell recycle fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett* 23:235-240.

Ahn WS, Park SJ, Lee SY. 2000. Production of poly(3-hydroxybutyrate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli* with a highly concentrated whey solution. *Appl Environ Microbiol* 66: 3624-3627.

Arifeen Najmul, Wang Ruohang, Kookos Ioannis, Webb Colin and Koutinas Apostolis, 2007a. Optimization and Cost Estimation of Novel Wheat Biorefining for Continuous Production of Fermentation Feedstock. *Biotechnology progress* 23 (4):872-880.

Arifeen Najmul, Wang Ruohang, Kookos Ioannis, Webb Colin and Koutinas Apostolis, 2007b. Process Design and Optimization of Novel Wheat-Based Continuous Bioethanol Production System. *Biotechnology progress* 23:1394-1403.

Bassi S, Maningat CC, Chinnaswamy R, Nie L, Weibel MK and Watson JJ. 1999. Modified wheat glutens for use in fabrication of films. *US Patent* 5:747-648.

Berger E, Ramsay BA, Ramsay JA, Chavarie C, Braunegg G, 1989. PHB recovery by hypochlorite digestion of non-PHB biomass. *Biotechnol Tech* 3:227-232.

Bhumibhamon O. 1982. Effect of some surfactants on the production of acid protease by *Aspergillus phoenicis* and *Aspergillus awamori*. *J Ferment Technol* 60:167-169.

Bohlken G. 1969a. Storage of Reserve Substances in *Bacillus megaterium*. I. Wild strains, *Zentralblatt fuer Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene, Abteilung 2, Naturwissenschaftliche: Allgemeine, Landwirtschaftliche und Technische Mikrobiologie* 123(1):7-15.

Bohlken G. 1969b. Storage of Reserve Substances in *Bacillus megaterium*. II. Poly-k-Hydroxybutyric Acid-Free Mutants, Zentralblatt fuer Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene, Abteilung 2, Naturwissenschaftliche: Allgemeine, Landwirtschaftliche und Technische Mikrobiologie 123(1):16-29.

Braunegg G, Lefebvre and Genser. 1998. Poly(R-hydroxy-alkanoates), biopolyesters from renewable resources: Physical and engineering aspects. *J. Biotechnol.* 65:127-161.

Braunegg G, Bona R, Koller M. 2004. Sustainable polymer production. *Polymer-Plastics Technology and Engineering* 43(6):1779-1793.

Braunegg G, Koller Martin, Atlic Aid, Garcia Yolanda Gonzalez. 2009. Sustainable plastics from renewable resources and agro-food waste. Institute of Biotechnology and Biochemical Engineering. Graz University of Technology.

Bucci DZ, Tavares LB and I Sell. 2005. PHB Packaging for the Storage of Food Products. *Polymer Testing* 24(5):564-571.

Bucci DZ, Tavares LB and I Sell. 2007. Biodegradation and Physical Evaluation of PHB Packaging, *Polymer Testing* 26(7):908-915.

Bugg T. 1997. Hydrolytic and group transfer reactions. In: Bugg, T. (Ed.), *An Introduction to Enzyme, Coenzyme, Chemistry*. Blackwell Science Ltd. Oxford:73-105.

Bugg T. 1997. Hydrolytic and group transfer reactions. In: Bugg, T. (Ed.), *An Introduction to Enzyme Coenzyme, Chemistry*. Blackwell Science Ltd. Oxford:73-105.

Byrom D. 1987. Polymer Synthesis by Microorganisms: Technology and Economics. *Trends in biotechnology* 5(9):246-250.

Cavalheiro Joao MBT, Catarina M.D. de Almeida, Grandfils Christian, M.M.R. da Fonseca. 2009. Poly(3-hydroxybutyrate)

production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. *Process Biochemistry* 44:509-515.

Capon RJ, Dunlop RW, Ghisalberti EL and Jefferies PR. 1983. Poly-3-hydroxyalkanoates from Marine and Freshwater Cyanobacteria. *Phytochemistry* 22(5):1181-1184.

Chisti Y, Moo-Young M. 1986. Disruption of microbial cells for intracellular products. *Enz Microb Technol* 8:194-204.

Choi J, Lee SY. 1997. Process Analysis and Economic Evaluation for Poly(3-hydroxybutyrate) Production by Fermentation. *Bioprocess Engineering* 17:335-342.

Choi J, S Lee, 1999. High-level Production of Poly(3hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by Fed-batch Culture of Recombinant *Escherichia coli*. *Applied Environment Microbiology* 65:4363-4368.

Coulson JM, Richardson JF, Sinnott RK. 1999. *Chemical engineering-design*. Oxford: Butterworth-Heinemann: 242-279.

Demicheli ME. 1996. *Biodegradable Plastics from Renewable Sources*. IPTS Report.

Dexter JE, Wood PJ. 1996. Recent applications of debranning of wheat before milling. *Trends Food Sci Technol* 7:35-41.

Day L, Augustin MA, Batey IL, Wrigley. 2006. Wheat gluten uses and industry needs. *Trends in Food Science and Technology*:17(2):82-90.

Doi Y. 1990. *Microbial polyesters*. VCH Publishers.

Doi Y, Tamaki A, Kunioka M. and Soga K. 1988. Production of copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxy-valerate by *Alcaligenes eutrophus* from butyric and pentanoic acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28:330-334.

Doudoroff M and Stanier RY. 1959. Role of Poly- $\beta$ -hydroxybutyric Acid in the Assimilation of Organic Carbon by Bacteria. *Nature* 183: 1440-1442.

Ellar D, Lundgren DG, Okamura K and Marchessault RH. 1968. Morphology of Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate Granules. *Journal of Molecular Biology* 35(3):489-502.

Findlay RH and White DC. 1987. A Simplified Method for Bacterial Nutritional Status Based on the Simultaneous Determination of Phospholipid and Endogenous Storage Lipid Poly- $\beta$ -hydroxyalkanoate. *Journal of Microbiological Methods* 6(2):113-120.

Forsyth WGC, Hayward AC and Roberts JB. 1958. Occurrence of Poly- $\beta$ -hydroxybutyric Acid in Aerobic Gram-Negative Bacteria. *Nature* 182:800-801.

Francisco Rodriguez-Valera, Lillo Jose AG. 1992. *Halobacteria* as producers of polyhydroxy-alkanoates. *FEMS Microbiology Reviews* 103: 181-186.

Fukui T, Doi Y. 1998. Efficient production of poly-hydroxy-alkanoates from plant oils by *Alcaligenes Eutrophus* and its recombinant strain. *Appl Microbial Biotechnol* 49:333-336.

Garthe JW, Kowal PD. 2004. The Chemical Composition of Degradable Plastics, Department of Agricultural and Biological Engineering, Penn State University.

Ghatnekar S, JS Pai and M Ganesh. 2002. Production and recovery of poly-3-hydroxybutyrate from *Methylobacterium sp* V49. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 77:444-449.

Gu JD. 2003. Microbiological Deterioration and Degradation of Synthetic Polymeric Materials: Recent Research Advances. *International Bio-deterioration & Biodegradation* 52(2):69-91.

Hahn SK, Chang YK, Kim BS, Lee KM, Chang HN. 1993. The recovery of poly(R-hydroxybutyrate) by using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform, *Biotechnol. Tech.* 7:209–212.

Hahn SK, Chang YK, Kim BS, Chang HN. 1994. Optimization of microbial poly(R-hydroxybutyrate) recovery using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform. *Biotechnol. Bioeng.* 44:256–261.

Harrison STL, Dennis JS, Chase H. 1991b. Combined Chemical and Mechanical Processes for the Disruption of Bacteria. *Bioseparation* 2:95-105.

Hee Wook Ryu, Kyung-Suk Cho, Eun Gyo Lee, and Yong Keun Chang. 2000. Recovery of Poly(3-hydroxybutyrate) from Coagulated *Ralstonia eutropha* Using a Chemical Digestion Method. *Biotechnol. Prog.* 16:676-679.

Hippe H. 1967. Degradation and reutilization of poly(k-hydroxybutyric acid) by *Hydrogenomonas* H16. *Archiv fuer Mikrobiologie* 56:248-277.

Hocking PJ, Marchessault RH. 1994. Biopolyesters, in: G.I.L. Griffin (Ed.), *Chemistry and Technology of Biodegradable Polymers*. Chapman & Hall. London. p.48-96.

Huimin Yu, Yue Shi, Jin Yin, Zhongyao Shen and Shengli Yang. 2003. Genetic strategy for solving chemical engineering problems in biochemical engineering. *Chem Technol Biotechnol* 78:283-286.

Huang Z Ting-Yen, Duan Z Kow-Jen, Huang C Shih-Yow, Chen Will. 2006. Production of polyhydroxyalkanoates from inexpensive extruded rice bran and starch by *Haloferax mediterranei*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 33:701-706.

Isaac S, Gokhale AV. 1982. Autolysis: A tool for protoplast production from *Aspergillus nidulans*. *Trans Br Mycol Soc* 78:389-394.



Jung Lae Il, Phyto Heon Ki, Kim Chan Kug, Park Kook Hyo. 2005. Spontaneous liberation of intracellular polyhydroxybutyrate granules in *Escherichia coli*. *Research in microbiology* 156:856-873.

Jendrossek D. 2001. Microbial Degradation of Polyesters. In *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*. T. Scheper (Eds). Berlin Heidelberg, Springer - Verlag 71.

Jendrossek D. 2007. Peculiarities of PHA Granules Preparation and PHA Depolymerase Activity Determination. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74(6):1186-1196.

Jong-il Choi, Sang Yup Lee. 1998. Efficient and Economical Recovery of Poly(3-Hydroxybutyrate) from Recombinant *Escherichia coli* by Simple Digestion with Chemicals. Department of Chemical Engineering and BioProcess Engineering Research Center. Korea Advanced Institute of Science and Technology.

Jung Il Lae, Phyto Ki Heon, Kim Kug Chan, Hyo Kook Park, In Gyu Kim. 2005. Spontaneous liberation of intracellular polyhydroxybutyrate granules in *Escherichia coli*. *Research in Microbiology* 156:865-873.

Kahar P, Agus J, Kikkawa Y, Taguchi K, Doi Y, Tsuge T. 2005. Effective production and kinetic characterization of ultra-high-molecular-weight poly[(R)-3-hydroxybutyrate] in recombinant *Escherichia coli*. *Polym Degrad Stabil.* 87(1):161-9.

Kahar P, T Tsuge, K Taguchi and Doi Y. 2004. High Yield Production of Polyhydroxyalkanoates from Soybean Oil by *Ralstonia eutropha* and its recombinant strain. *Polymer Degradation and Stability* 83(1):79-86.

Kapritchkoff FM, Viotti AP, Alli Rita CP, Zuccolo M, Pradella JGC, Maiorano AE, Everson MA, Bonomia A. 2006. Enzymatic recovery and purification of polyhydroxybutyrate produced by *Ralstonia eutropha*. *Journal of Biotechnology* 122:453-462.

Kessler B, Weusthuis R, Witholt B, Eggink G. 2001. Production of Microbial Polyesters: Fermentation and Downstream Processes, In Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology. T. Scheper (Eds). Berlin Heidelberg. Springer-Verlan 71.

Khan SMA, Reilly PJ, Ford C. 2000. Thermal and molecular characterization of *Aspergillus awamori* glucoamylase catalytic and starch binding domains. Starch-Starke 52:385-397.

Khanna S, Srivastava AK. 2005c. Recent Advances in Microbial Poly-hydroxy-alkanoates. Process Biochemistry 40:607-619.

Khanna S. 2007. Production of poly(3-hydroxybutyric-co-3-hydroxyvaleric acid) having a high hydroxyvalerate content with valeric acid feeding. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 34: 456-461.

Khosravi-Darani, Vasheghani-Farahani E, Shojaosadati SA, Yamini Y. 2004. Effect of process variables on supercritical fluid disruption of *Ralstonia eutropha* cells for poly(R-hydroxybutyrate) recovery. Biotechnol. Prog. p.1757-1765.

Kim BS, Lee SC, Lee SY, Chang HN, Chang YK, and Woo SI. 1994. Production of poly(3-hydroxybutyric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control. Biotechnol. Bioeng 43:892-898.

Kim BS, Lee SY, and Chang HN. 1995. Control of glucose feeding using exit gas data and its application to the production of PHB from tapioca hydrolysate by *Alcaligenes Eutrophus*. Biotechnol 9:311-314.

Kim JS, Lee BH and Kim BS. 2005. Production of Poly(3- hydroxyl-butyrate-co-4-hydroxybutyrate) by *Ralstonia eutropha*. Biochemical Engineering Journal 23(2):169-174.

Koller M, Bona R, Braunegg G, Hermann C, Horvat P, Kroutil M, et al. 2005. Production of poly-hydroxy-alkanoates from agricultural waste and surplus materials. Biomacromol 6:561-565.

Κουτίνας Αποστόλης. 2009. Σημειώσεις στο μάθημα σχεδιασμός βιομηχανίας με χρήση ηλεκτρονικό υπολογιστή. Μεταπτυχιακό Διατροφής του ανθρώπου, τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Koutinas AA, Arifeen N, Wang R, Webb C. 2004. Restructuring Upstream Bioprocessing: Technological and Economical Aspects for Production of a Generic Microbial Feedstock from Wheat. Willey InterScience.

Koutinas AA, Webb C, Wang R. 2004. Developing a sustainable bioprocessing strategy based on a generic feedstock. Adv Biochem Engin/ Biotechnol 86:195-268.

Koutinas AA, Wang RH, Webb C. 2005. Development of a process for the production of nutrient supplements for fermentations based on fungal autolysis. Enz Microb Technol 36:629-638.

Koutinas AA, Arifeen N, Wang R, Webb C. 2006. Cereal-Based Biorefinery Development: Integrated Enzyme Production for Cereal Flour Hydrolysis. Willey InterScience.

Koutinas AA, Wang RH, Webb C. 2007. The biochemist – Bioconversion of agricultural raw materials for chemical production. Bioprod Bioref 1:24-38.

Koutinas AA, Xu Y, Wang RH and Webb C. 2010. Microbial biodegradable plastic production from a wheat based biorefining strategy. Process Biochemistry.

Koutinas AA, Wang R, Md Shaarani S, Godoy LC, Melikoglu M, Vergara CS, Webb C. submitted. Bioconversion of rapeseed meal for the production of a generic microbial feedstock. Enzyme and Microbial technology.

Lapointe R, Lambert A, Savard L. 2002. Process for production of biopolymer. U.S. Pat. Appl. Publ.

Lee SY, Park SY, Hong SH, Lee Y, Lee SH. 2001. Fermentative production of building blocks for chemical synthesis of polyesters. In: Doi Y, Steinbuchel. A (eds).

Lee SY. 1996a. Plastic Bacteria?, Progress and Prospects for Polyhydroxy-alkanoate Production in Bacteria. Trends Biotechnology 14:431-438.

Lee SY. 1996b. Bacterial Polyhydroxyalkanoates, Biotechnology and Bioengineering 49:1-14.

Lemoigne M. 1927. Microbial Autolysis and the Autolytic Origin of  $\epsilon$ -hydroxybutyric Acid. Ann. inst. Pasteur 41:148-165.

Lie S. 1973. EBC [European Brewery Convention]-ninhydrin method for determination of free  $\alpha$ -amino nitrogen. J Inst Brew. London 79:37-41.

Liggat JJ and GO Brien. 1997. Melt processing of Biopol polymers -recent advances. International Symposium on Baterial poly-hydroxy-alkanoates. Davos Switz. National Research Council of Canada.

Lillo JG and Rodriguez-Valera F. 1990. Effects of culture conditions on Poly (3-hydroxy-butyrac acid) production by *Haloferax mediterranei*. Appl. Environ. Microbiol. 56:2517-2521.

Ling Y, Wong HH, Thomas CJ, Williams DRG, Niddelberg APJ. 1997. Pilot scale extraction of poly( $\epsilon$ -hydroxybutyric acid) from recombinant *E. coli* by homogenization and centrifugation. Bioseparation 7:9-15.

Liu TY. 2006. Downstream Processing of Microbial Polyhydroxybutyrate Production. School of Chemical Engineering and Analytical Science. The University of Manchester MSc.

Lu X, Zhang J, Wu Q and Chen GQ. 2003. Enhanced Production of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) via Manipulating the Fatty Acid  $\epsilon$ -oxidation pathway in *E. coli*. FEMS Microbiology Letters 221(1):97-101.

Madison LL and Huisman GW. 1999. Metabolic Engineering of Poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to Plastic, Microbiology and Molecular Biology Reviews 63(1):21-53.

Martini F, Perazzo L and Vietto P. 1989. Sheet Materials of HB Polymers. U.S. Patent. 4826493.

McIntyre M, Berry DR, McNeil B. 2000. Role of proteases in autolysis of *Penicillium chrysogenum* chemostat cultures in response to nutrient depletion. Appl Microbiol Biotechnol (53):235-242.

Mitchell R, Sabar N. 1966. Autolytic enzymes in fungal cell walls. J Gen Microbiol 42:39-42.

Mothes G, Schnorpfeil C, Ackermann JU. 2007. Production of PHB from Crude Glycerol. Eng. Life Sci 7(5):475-479.

Niewiadomski H. 1990. Rapeseed-Chemistry and technology. Elsevier Science Publishers. Amsterdam. p.448.

Nobes GAR, Marchessault RH, Briese BH and Jendrossek D. 1998. Microscopic Visualization of the Enzymatic Degradation of Poly(3HB-co-3HV) and Poly(3HV) Single Crystals by PHA Depolymerases from *Pseudomonas lemoignei*. Journal of Polymers and the Environment 6(2):99-107.

Noda I. 2001. Films Comprising Biodegradable PHA Copolymers. U.S. Patent. US 6174990 B1

Odham G, Tunlid A, Westerdahl G and Maarden P. 1986. Combined Determination of Poly-k-hydroxyalkanoic and Cellular Fatty Acids in Starved Marine Bacteria and Sewage Sludge by Gas Chromatography with Flame Ionization or Mass Spectrometry Detection. Applied and Environmental Microbiology 56(4):905-910.

Ojumu TV, Yu J, Solomon BO. 2004. Production of Polyhydroxyalkanoates, A Bacterial Biodegradable Polymer. African Journal of Biotechnology 3(1):18-24.

Park SJ, Ahn WS, Green PR and Lee SY. 2001. Biosynthesis of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) by Metabolically Engineered *Escherichia coli* strains. *Biotechnology and Bioengineering* 74(1):81-86.

Pederson EN and Srienc F. 2004. Mass Spectrometry Feedback Control for Synthesis of Polyhydroxyalkanoate Granule Microstructures in *Ralstonia eutropha*. *Macromolecular Bioscience* 4:243-254.

Premraj R, Mukesh D, 2005, Biodegradation of Polymers, *Indian Journal of Biotechnology* 4:186-193.

Prihardi Kahar, Tsuge Takeharu, Taguchi Kazunori, Doi Yoshiharu. 2004. High yield production of polyhydroxyalkanoates from soybean oil by *Ralstonia eutropha* and its recombinant strain. *Polymer Degradation and Stability* 83:79-86.

Pötter M, Madkour MH, Mayer F and Steinbüchel A. 2002. Regulation of Phasin Expression and Polyhydroxyalkanoate (PHA) Granule Formation in *Ralstonia eutropha* H16. *Microbiology* 148:2413-2426.

Ramsay JA, Berger E, Ramsay BA, Chavarie C. 1990. Recovery of Poly-3-Hydroxyalkanoic Acid Granules by a Surfactant-Hypochlorite Treatment. *Biotechnol. Technol* 4: 221-226.

Ramsay JA, Berger E, Voyer R, Chavarie C, Ramsay BA. 1994. Extraction of poly-3-hydroxybutyrate using chlorinated solvents. *Biotech.Tech.* p.589-594.

Reisman HB. 1988. *Economic analysis of fermentation processes.* Boca Raton, FL: CRC Press.

Riis V, Mal W. 1988. Gas chromatographic determination of poly- $\beta$  hydroxy-butyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis. *J Chromatog* 445:285-289.

Roos YH. 1995. *Phase transitions in food,* San Diego California: Academic Press.

Petschacher B. 2001. Diploma work: Verwertung von Maisernterückständen über Hydrolyse der Cellulose und Hemicellulose. Graz University of Technology Graz. Austria.

Sang Yup Lee, Jong-il Choi. 1997. Effect of fermentation performance on the economics of poly(3-hydroxybutyrate) production by *Alcaligenes latus*. Polymer degradation and stability 59:387-393.

Sang Yup Lee, Jong-il Choi. 1999. Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation: mini-review. International Journal of Biological Macromolecules 25:31-36.

Sayaslan A. 2004. Wet-milling of wheat flour: industrial processes and small-scale test methods. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie 37:499-515.

Shimizu Hiroshi. 1999. Maximum production strategy for biodegradable copolymer P(HB-co-HV) in fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus*. Biotechnology and Bioengineering 62(5).

Songsri Kulpreecha, Atipol Boonruangthavorn, Boonyarit Meksiriporn, and Nuttha Thongchul. 2009. Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*. Journal of Bioscience and Bioengineering 107(3):240-245.

Steinbüchel A. and Schlegel HG. 1989. Excretion of Pyruvate by Mutants of *Alcaligenes eutrophus*, Which Are Impaired in the Accumulation of Poly (k-hydroxybutyric acid) (PYB), under Conditions Permitting Synthesis of PHB. Applied Microbiology and Biotechnology 31:168-175.

Steinbüchel A, Hustede E, Liebergesell M, Pieper U, Timm A and Valentin H. 1992. Molecular Basis for Biosynthesis and Accumulation of Polyhydroxyalkanoic Acids in Bacteria. FEMS Microbiology Letters 103:217-230.

Sudesh K, Abe H and Doi Y. 2000. Synthesis, Structure and Properties of Polyhydroxyalkanoates: Biological Polyesters. *Process in Polymer Science* 25:1503-1555.

Sun Ye and Jiayang Cheng. 2001. Hydrolysis of lignocellulosic materials a review. *Bioresearch technology* 83:1-11.

Tamer Melih and Murray Moo-Young. 1998. Disruption of *Alcaligenes latus* for Recovery of Poly( $\alpha$ -hydroxybutyric acid): Comparison of High-Pressure Homogenization, Bead Milling, and Chemically Induced Lysis. *Ind. Eng. Chem* 37:1807-1814.

Valappil SP, Peiris D, Langley G J, Herniman JM, Boccaccini AR, Bucke C and Roy I. 2007a. Polyhydroxyalkanoate (PHA) Biosynthesis from Structurally Unrelated Carbon Sources by A Newly Characterized *Bacillus spp.* *Journal of Biotechnology* 127(3):475-487.

Valappil SP, Boccaccini AR, Bucke C and Roy I. 2007b. Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive Bacteria: Insights from the Genera *Bacillus* and *Streptomyces*. *Antonie van Leeuwenhoek. International Journal of General and Molecular Microbiology* 91(1):1-17.

Valentin HE, Mitsky TA, Mahadeo DA, Tran M and Gruys KJ. 2000. Application of a Propionyl Coenzyme A Synthetase for Poly(3-Hydroxypropionate-co-3-Hydroxybutyrate) Accumulation in Recombinant *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 66(12):5253-5258.

Verlinden RAJ, Hill DJ, Kenward MA, Williams CD, Radecka I. 2007. Bacterial Synthesis of Biodegradable Polyhydroxy-alkanoates. *Journal of Applied Microbiology* 102:1437-1449.

Wallen LL and Rohwedder WK. 1974. Poly-k-hydroxyalkanoate from Activated Sludge. *Environment Science Technology* 8(6):576-579.

Wang R. 1999. Continuous production of a generic fermentation feedstock from whole wheat flour. PhD thesis. UMIST, UK.



Wang F and Lee SY. 1997. Poly(3-hydroxybutyrate) production with high productivity and high polymer content by a fed-batch culture of *Alcaligenes latus* under nitrogen limitation. *Appl Environ Microbiol.* 63:3703-3706.

Wiggam M I, O'Kane MJ, Harper R, Atkinson AB, Hadden DR, Trimble ER and Bell PM. 1997. Treatment of Diabetic Ketoacidosis Usiny, Normalization of Blood 3-Hydroxybutyrate Concentration as the Endpoint of Emergency Management: A Randomized Controlled Study. *Diabetes Care* 20(9):1347-1352.

Witholt B, Lageveen RG, Huisman GW, Preusting H, Nijenhuis A, Kingma J, Tijsterman A and Eggink G. 1988. The Production of Polyalkanoates by *Pseudomonas oleovorans*, *Polymer Preprints* 29(1): 592-593.

Woerdeman DL, Veraverbeke WS, Parnas RS, Johnson D, Delcour JA, Verpoest I, Plummer CJG. 2004. Designing new materials from wheat protein. *Biomacromolecules* 5:1262-1269.

Wong HH. Lee SY. 1998. Poly-(3-hydroxybutyrate) production from whey by high-density cultivation of recombinant *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 50(1):30-33.

Yu J and Si Y. 2004. Metabolic Carbon Fluxes and Biosynthesis of Polyhydroxyalkanoates in *Ralstonia eutropha* on Short Chain Fatty Acids. *Biotechnology Progress* 20(4): 1015-1024.

Zhang H. Obias V. Gonyer K and Dennis D. 1994. Production of Poly-hydroxyalkanoates in Sucrose-Utilizing Recombinant *Escherichia coli* and *Klebsiella* Strains. *Applied and Environmental Microbiology* 60(4): 1198-1205.

Zhang SB. Wang Z. Xu SY. 2008. Antioxidant and Antithrombotic Activities of Rapeseed Peptides. *J Am Oil Chem Soc* 85:521–527.

Zinn M. Witholt B and Egli T. 2001. Occurrence, Synthesis and Medical Application of Bacterial Polyhydroxyalkanoate. *Advanced Drug Delivery Reviews* 53(1):5-21.

Zook EG. Greene FE. Morris ER. 1970. Nutrient composition of selected wheats and wheat products VI. Distribution of Maganese, Copper, Nickel, Zinc, Maganesium, Lead, Tin, Cadmium, Chromium and Selenium as determined by atomic absorption spectroscopy and colorimetry. *Cereal chemistry*.