

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου**

**Εργαστήριο Μηχανικής Τροφίμων, Επεξεργασίας και Συντήρησης  
Γεωργικών Προϊόντων**

**ΠΜΣ: Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του  
Ανθρώπου**

**Κατεύθυνση: Βιοδιεργασίες τροφίμων και βιοδιυλιστήρια**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**

**«Παραγωγή και μελέτη βιοαποικοδομήσιμων πολυμερών μέσω  
βακτηριακών ζυμώσεων»**

**Επιβλέπων**

**Απόστολος Κουτίνας, Επίκουρος Καθηγητής**

**Ευσταθία Α. Πατσαλού**

**ΑΘΗΝΑ 2016**

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου**

**Εργαστήριο Μηχανικής Τροφίμων, Επεξεργασίας και Συντήρησης Γεωργικών  
Προϊόντων**

**ΠΜΣ: Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του Ανθρώπου**

**Κατεύθυνση: Βιοδιεργασίες τροφίμων και βιοδιυλιστήρια**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**

**«Παραγωγή και μελέτη βιοαποικοδομήσιμων πολυμερών μέσω  
βακτηριακών ζυμώσεων»**

**Επιβλέπων**

**Απόστολος Κουτίνας, Επίκουρος Καθηγητής**

**Ευσταθία Α. Πατσαλού**

**ΑΘΗΝΑ 2016**

# ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

«Παραγωγή και μελέτη βιοαποικοδομήσιμων πολυμερών μέσω βακτηριακών  
ζυμώσεων»

Ευσταθία Α. Πατσαλού

Επιβλέπων

Απόστολος Κουτίνας, Επίκουρος Καθηγητής

Εξεταστική Επιτροπή

Κουτίνας Απόστολος , Επίκουρος Καθηγητής

Παπανικολάου Σεραφείμ, Αναπληρωτής Καθηγητής

Νυχάς Γεώργιος-Ιωάννης, Καθηγητής

ΑΘΗΝΑ 2016

## **Ευχαριστίες**

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μηχανικής Τροφίμων, Επεξεργασίας και Συντήρησης Γεωργικών Προϊόντων, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών στα πλαίσια του ΠΜΣ: Βιοδιεργασίες τροφίμων και βιοδιυλιστήρια το ακαδημαϊκό έτος 2015-2016.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω κάποιους ανθρώπους που με τη βοήθεια τους κατέστησαν δυνατή την πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης. Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τους κυρίους Απόστολο Κουτίνα, Σεραφείμ Παπανικολάου και Γεώργιο-Ιωάννη Νυχά για την ανάθεση αυτού του αρκετά ενδιαφέροντος και πρωτότυπου θέματος αλλά και για την καθοδήγησή τους κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Βασιλική Καχριμανίδου για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση της καθ' όλη τη διάρκεια της διεξαγωγής της μελέτης αυτής. Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Μηχανικής Τροφίμων και Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων για το όμορφο κλίμα συνεργασίας.

Τέλος, το πιο μεγάλο ευχαριστώ ανήκει στην οικογένειά μου και στο σύντροφο μου, οι οποίοι ήταν πάντα στο πλευρό μου προσφέροντας μου αμέριστη ηθική υποστήριξη και κατανόηση σε όλη τη διάρκεια της διεξαγωγής της παρούσας μελέτης.

## Περίληψη

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η ικανότητα παραγωγής πολυ-υδροξυαλκανοϊκών οξέων (PHAs) από βακτήρια του γένους *Pseudomonas sp.*. Αρχικά έγινε μια πρώτη επιλογή (screening) ανάμεσα σε 36 στελέχη βακτηρίων που ελήφθησαν από το εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων με ζύμωση σε στερεό θρεπτικό μέσο με χρήση της χρωστικής ουσίας Nile Blue. Εν συνεχεία με τη χρήση της ίδιας μεθόδου έγινε μια δεύτερη επιλογή σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα σε συνθήκες έλλειψης αζώτου. Τα 19 στελέχη επιλέχθηκαν βάση της ικανότητας φθορισμού στο υπεριώδες φως εμφανίζοντας έντονο μπλε χρώμα και μελετήθηκαν εν συνεχεία σε υγρές καλλιέργειες. Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκαν και τέσσερα εμπορικά στελέχη με σκοπό να μελετηθεί η ικανότητα τους για την παραγωγή mcl-PHAs. Από τα στελέχη αυτά 3 ανήκαν στη συλλογή DSMZ, *Pseudomonas chlororaphis* DSM50083, *Pseudomonas resinovorans* DSM 21078, *Pseudomonas citronellolis* DSM 50332 και ένα στην συλλογή της ATCC, *Pseudomonas putida* (Trevisan) Migula ATCC 47054 (KT2440).

Τα ανωτέρω στελέχη αναπτύχθηκαν σε υγρές καλλιέργειες σε συνθετικό θρεπτικό μέσο ενισχυμένο με άλατα και ιχνοστοιχεία. Ως πηγή άνθρακος χρησιμοποιήθηκε ακάθαρτη γλυκερόλη και απόβλητο έλαιο μαγειρικής. Από τα ανωτέρω στελέχη μόνο 6 παρήγαγαν πολυ-υδροξυαλκανοϊκούς εστέρες σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Τα στελέχη αυτά είναι κατατεθειμένα στο είδος *P. fluorescens*, *P. gessardii*, *P. chlororaphis* και *P. fragi*. Αναφορικά με τα εμπορικά στελέχη παρήγαγαν mcl-PHAs αλλά σε μικρές συγκεντρώσεις.

Τα στελέχη που παρήγαγαν mcl-PHAs μαζί με τα εμπορικά στελέχη μελετήθηκαν περαιτέρω σε υπόστρωμα απόβλητο έλαιο μαγειρικής ως πηγή άνθρακος και υδρόλυμα ηλιαλεύρου ως πηγή αζώτου. Από τη ζύμωση αυτή μόνο το στέλεχος *P. resinovorans* (DSM 21078) παρήγαγε PHAs σε ικανοποιητική ποσότητα ( $0.63 \text{ g L}^{-1}$ ) συγκριτικά με τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς. Για το λόγο αυτό επιλέχθηκε να αναπτυχθεί σε βιοαντιδραστήρα σε συνθήκες ημιδιαλείποντος έργου (fed batch) με υπόστρωμα απόβλητο έλαιο μαγειρικής και υδρόλυμα ηλιαλεύρου. Στη ζύμωση αυτή η μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας ήταν  $14.8 \text{ g L}^{-1}$  και η μέγιστη συγκέντρωση PHAs ήταν  $0.88 \text{ g L}^{-1}$ . Τα μονομερή που παρήχθησαν ήταν 3-υδροξυ-

εξανοϊκό (C6), 3-υδροξυ-οκτανοϊκό (C8), 3-υδροξυ-δεκανοϊκό (C10) και 3-υδροξυ-δωδεκανοϊκό (C12).

Τέλος πραγματοποιήθηκε μια μικρή μελέτη για την ικανότητα παραγωγής βιο-επιφανειοδραστικών ουσιών από τα ανωτέρω βακτήρια.

Λέξεις-Κλειδιά: Πολυ-υδροξυαλκανοϊκοί εστέρες, *Pseudomonas sp.*, απόβλητο έλαιο μαγειρικής, υδρόλυμα ηλιαλεύρου.

## Abstract

The aim of the present study was to investigate the ability of certain bacterial strains to produce poly-hydroxyalkanoates (PHAs). Initially, a screening experiment was performed in petri dishes using 36 bacterial strains, kindly provided from the Laboratory of Food Microbiology and Biotechnology, using the Nile blue staining technique. Subsequently, a second screening was carried out using the same method employing a nitrogen limited medium. The 19 strains showed fluorescence under UV light were selected for further study. In parallel, four strains belonging in culture collections namely *Pseudomonas chlororaphis* DSM 50083, *Pseudomonas resinovorans* DSM 21078, *Pseudomonas citronellolis* DSM 50332, *Pseudomonas putida* (Trevisan) Migula ATCC 47054 (KT2440), were also evaluated for their ability to synthesize PHAs. These strains were cultivated in submerged fermentations using synthetic medium supplemented with salts and minerals. Crude glycerol and waste cooking oil were evaluated as carbon sources. Only six of these strains successfully produced PHAs although at low concentrations. These strains were deposited as *P. fluorescens*, *P. gessardii*, *P. chlororaphis* and *P. fragi*. Low concentrations of mcl-PHAs were also attained by the the commercial strains.

Subsequent experiments focused on the evaluation of waste cooking oil and sunflower meal hydrolysate as fermentation supplements for the production of mcl-PHAs using the selected strains. During these fermentation experiments, only the strain *P. resinovorans* (DSM 21078) was able to accumulate mcl-PHAs in sufficient concentration (0.63 g/L) compared to the other strains. Correspondingly, *P. resinovorans* was further evaluated in bioreactor cultivations performed under fed-batch conditions implementing waste cooking oil and sunflower hydrolysate as a nutrient rich feedstocks. Maximum dry weight concentration achieved was 14.8 g/L corresponding to a maximum mcl-PHA concentration of 0.88 g/L. The predominant monomers produced were 3-hydroxy-hexanoic (C6), 3-hydroxy-octanoate (C8), 3-hydroxy-decanoic (C10) and 3-hydroxy-dodecanoate (C12).

Finally a preliminary study on the ability of all the above strains to produce biosurfactants was conducted using well established methods and techniques.

Keywords : mcl-Poly-hydroxyalkanoates (PHA), *Pseudomonas sp.*, waste cooking oil, sunflower hydrolysate.

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 : Εισαγωγή .....</b>	<b>10</b>
1.1 Απόβλητα μαγειρικά έλαια ως υπόστρωμα .....	10
1.2 Πολυ-υδροξυαλκανοϊκοί εστέρες (PHAs).....	11
1.3 Χημική δομή και ταξινόμηση PHAs .....	12
1.4 Εφαρμογές PHAs .....	14
1.5 Παραγωγή PHAs μέσω ζυμώσεων .....	16
1.6 Παραγωγή PHAs με υπόστρωμα απόβλητα μαγειρικά έλαια .....	19
1.7 Βιο-επιφανειοδραστικές ουσίες .....	21
1.8 Σκοπός εργασίας .....	23
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 : Υλικά και Μέθοδοι .....</b>	<b>24</b>
2.1 Βιολογικό υλικό .....	24
2.1.1 Βακτηριακά στελέχη .....	24
2.1.1 Στέλεχος μύκητα .....	26
2.2 Ζύμωση στερεής κατάστασης (Solid state fermentation) .....	27
2.3 Παρασκευή υδρολύματος .....	28
2.4 Θρεπτικό μέσο για την παραγωγή PHAs .....	28
2.5 Ανάπτυξη σε petri με χρώση Nile Blue .....	29
2.6 Ζυμώσεις σε υγρή κατάσταση (κωνικές φιάλες) .....	29
2.7 Ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα .....	30
2.8 Αναλυτικές μέθοδοι .....	31
2.8.1 Προσδιορισμός βιομάζας .....	31



2.8.2 Προσδιορισμός συγκέντρωσης γλυκερόλης .....	32
2.8.3 Προσδιορισμός συγκέντρωσης απόβλητου μαγειρικού ελαίου .....	33
2.8.4 Προσδιορισμός συγκέντρωσης αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN) ...	34
2.8.5 Προσδιορισμός συγκέντρωσης ανόργανου φωσφόρου (IP).....	35
2.8.6 Προσδιορισμός συγκέντρωσης PHAs .....	36
2.8.7 Μέθοδος εξαγωγής ενδοκυτταρικού PHA .....	40
2.8.8 Προσδιορισμός βιο-επιφανειοδραστικών ουσιών .....	40
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 : Αποτελέσματα.....</b>	<b>42</b>
3.1 Μελέτη ικανότητας παραγωγής PHAs σε στερεό θρεπτικό μέσο .....	42
3.2 Μελέτη ικανότητας παραγωγής PHAs σε ζύμωση υγρής κατάστασης .....	44
3.3 Μελέτη ικανότητας παραγωγής PHAs σε υγρή ζύμωση με χρήση υδρολύματος .....	61
3.4 Ανάπτυξη στελέχους σε βιοαντιδραστήρα με χρήση υδρολύματος .....	72
3.5 Μελέτη ικανότητας παραγωγής βιο-επιφανειοδραστικών ουσιών .....	76
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 : Συμπεράσματα.....</b>	<b>77</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>78</b>

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

### Εισαγωγή

#### 1.1 Απόβλητα μαγειρικά έλαια ως υπόστρωμα

Μεγάλες ποσότητες απόβλητων ελαίων μαγειρικής και ζωικού λίπους παράγονται καθημερινά σε όλο τον κόσμο και περισσότερο στις ανεπτυγμένες χώρες. Η διαχείριση των αποβλήτων αυτών είναι αρκετά δύσκολη καθώς η απευθείας απόρριψη τους στο περιβάλλον δύναται να προκαλέσει προβλήματα. Παρόλο που τα συγκεκριμένα απόβλητα δε θεωρούνται τοξικά, οι τυχόν διαρροές προς το οικοσύστημα προκαλούν αύξηση στο βιολογικά και χημικά απαιτούμενο οξυγόνο η οποία οδηγεί εν συνεχεία σε φαινόμενα ευτροφισμού και πιθανή μόλυνση του υδροφόρου ορίζοντα (Akaraonye et al. 2010). Τα απόβλητα μαγειρικά έλαια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή σαπώνων, είτε ως συστατικό σε ζωοτροφές. Ωστόσο το προϊόν αυτό έχει απαγορευθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση από το 2002 λόγω των βλαβερών ουσιών που αναπτύσσονται κατά την διαδικασία του τηγανίσματος, οι οποίες δύνανται να μεταφερθούν στον άνθρωπο μέσω της τροφικής αλυσίδας (Kulkarni et al. 2006). Η Διοίκηση Πληροφοριών Ενέργειας (Energy Information Administration) στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής εκτίμησε ότι περίπου 100 εκατομμύρια γαλόνια απόβλητων ελαίων μαγειρικής παράγονται ημερησίως στις ΗΠΑ, όπου ο μέσος όρος ανά κάτοικο είναι οι 9 λίβρες (Radich 2006). Στις ευρωπαϊκές χώρες, η συνολική παραγωγή απόβλητων ελαίων μαγειρικής υπολογίζεται περί τους 700,000 – 1,000,000 τόνους/έτος (Kulkarni et al. 2006) Στο Ηνωμένο Βασίλειο παράγονται πάνω από 200,000 τόνοι απόβλητων ελαίων μαγειρικής ανά έτος (Carter et al. 2005). Από τα ανωτέρω δεδομένα συνεπάγεται ότι μεγάλο μέρος των αποβλήτων αυτών καταλήγει χωρίς την κατάλληλη επεξεργασία στο οικοσύστημα προκαλώντας περιβαλλοντική μόλυνση (Yang et al. 2007). Μία ευρέως διαδεδομένη τακτική για τη διαχείριση των εν λόγω αποβλήτων είναι η χρήση τους για την παραγωγή βιοντίζελ (Chhetri et al. 2008). Ωστόσο μια ακόμη υποσχόμενη λύση είναι η αξιοποίηση τους για την παραγωγή πολυυδροξυαλκανοϊκών εστέρων (PHAs), τα οποία είναι πλήρως βιοαποδομήσιμα και συνεπώς φιλικά προς το περιβάλλον.

## 1.2 Πολυ-υδροξυαλκανοϊκοί εστέρες (PHAs)

Οι πολυ-υδροξυαλκανοϊκοί εστέρες (PHAs) είναι πολυμερή που ανήκουν στην ομάδα των πολυεστέρων και παράγονται με βιολογικό τρόπο. Τα τελευταία χρόνια έχουν αρχίσει να γίνονται δημοφιλή χάρη στις φυσικές, θερμικές και μηχανικές τους ιδιότητες, οι οποίες προσομοιάζουν πολύ με αυτές των ευρέως χρησιμοποιούμενων πλαστικών (όπως το πολυαιθυλένιο και το πολυπροπυλένιο). Τα PHAs είναι πλήρως βιοδιασπώμενα και παράγονται από ανανεώσιμες πρώτες ύλες, γεγονός που τα καθιστά φιλικά προς το περιβάλλον καθώς δεν συσσωρεύονται στο οικοσύστημα. Επιπρόσθετα κατά τη βιολογική αποδόμηση τους δεν απελευθερώνονται στο περιβάλλον τοξικές ενώσεις. Τα υλικά αυτά παρουσιάζουν πληθώρα εφαρμογών σε καταναλωτικά προϊόντα, τρόφιμα και φάρμακα.

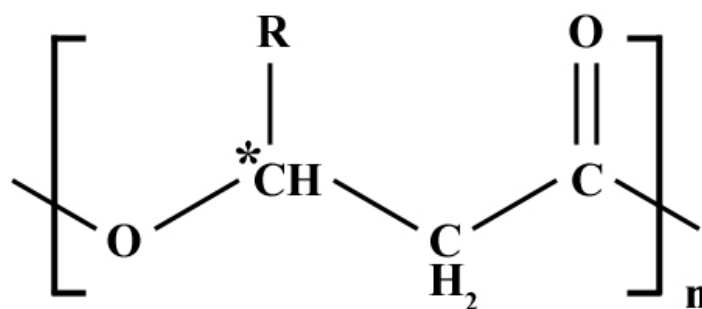
Οι πολυ-υδροξυαλκανοϊκοί εστέρες (PHAs) παράγονται από πληθώρα βακτηριακών στελεχών υπό τη μορφή ενδοκυτταρικών σωματιδίων ως αποθήκη πηγής άνθρακα ή ενέργειας. Συνήθως η συσσώρευση τους παρατηρείται έπειτα από την έλλειψη κάποιου θρεπτικού συστατικού ενώ υπάρχει υπερέπάρκεια της πηγής άνθρακα στο θρεπτικό μέσο. Η εμφάνιση των PHAs στα βακτήρια εντοπίζεται στις αρχές του περασμένου αιώνα, όταν ο Lemoigne παρατήρησε τον σχηματισμό πολυ-υδροξυβουτυρικού εστέρα (PHB) σε έγκλειστα σωματίδια του μικροοργανισμού *Bacillus megaterium* (Lemoigne, 1926). Από τότε παρατηρήθηκε σε παραπάνω από 90 βακτηριακά στελέχη η παραγωγή των PHAs με ποικίλες ιδιότητες.

Η δομή των παραγόμενων PHAs ποικίλλει ανάλογα με τη χρησιμοποιούμενη πηγή άνθρακα, τις συνθήκες της καλλιέργειας αλλά και το μικροοργανισμό (Kim et al. 2007). Ωστόσο, η δομή των βιοπολυμερών επηρεάζει τις θερμοδυναμικές και μηχανικές ιδιότητες του τελικού προϊόντος. Από τις διάφορες κατηγορίες PHAs αυτά που ξεχωρίζουν είναι το συμπολυμερές πολυ-υδροξυ(βουτυρικού-βαλερικού) εστέρα (P(3HB-co-3HV)), το συμπολυμερές πολυ-υδροξυ(βουτυρικού-εξανοϊκού) εστέρα (P(3HB-co-3HHx)), το συμπολυμερές πολυ-υδροξυ(βουτυρικού-προπιονικού) εστέρα (P(3HB-co-3HP)), και το συμπολυμερές πολυ-υδροξυ(3-βουτυρικού-4-βουτυρικού) εστέρα (P(3HB-co-4HB)). Μείζονος σημασίας αποτελεί το γεγονός ότι παρόλο που έχει επιτευχθεί παραγωγή σε βιομηχανική κλίμακα, το κόστος παραγωγής αλλά και το κόστος πρώτων υλών παραμένει σχετικά υψηλό, γεγονός που καθιστά την παραγωγή μη συμφέρουσα ενώ προτιμώνται μόνο σε εφαρμογές που έχουν ιδιαίτερη

σημασία οι ιδιότητες τους. Συνεπώς, για τη μείωση του κόστους παραγωγής κρίνεται αναγκαία η αξιοποίηση των αποβλήτων των βιομηχανιών τροφίμων αλλά και η βελτίωση των μεθόδων ζύμωσης.

### 1.3 Χημική δομή και ταξινόμηση PHAs

Οι πολυ-υδροξυαλκανοϊκοί εστέρες είναι γραμμικά πολυμερή με γενική δομή που φαίνεται στο παρακάτω σχήμα. Η δομή, οι φυσικοχημικές ιδιότητες, η σύνθεση, ο αριθμός των μονομερών καθώς και το μέγεθος του βιοπολυμερούς ποικίλει και εξαρτάται από τον μικροοργανισμό. Τα βιοπολυμερή αυτά μπορούν να παραχθούν τόσο από θετικά όσο και από αρνητικά κατά Gram βακτήρια χωρίς επιβλαβείς συνέπειες στους μικροοργανισμούς.



Σχήμα 1.1 : Γενική δομή PHAs (Tan et al. (2014))

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι διάφοροι τύποι PHAs που σχηματίζονται ανάλογα με την ομάδα R που βρίσκεται στον τρίτο μόριο άνθρακα του μονομερούς.

Πίνακας 1.1 : Αντιπροσωπευτικοί τύποι PHAs (Tan et al. (2014))

Ομάδα R	Αριθμός Ατόμων Άνθρακα	Πολυεστέρας	Συντομογραφία
H	C3	πολυ (3-υδροξυπροπιονικός)	P(3HP)
CH <sub>3</sub>	C4	πολυ (3-υδροξυβουτυρικός)	P(3HB)

C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	C5	πολυ (3-υδροξυβαλερικός)	P(3HV)
C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	C6	πολυ (3-υδροξυεξανοϊκός)	P(3HHx)
C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	C7	πολυ (3-υδροξυεπτανοϊκός)	P(3HHp)
C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	C8	πολυ (3-υδροξυοκτανοϊκός)	P(3HO)
C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>	C9	πολυ (3-υδροξυεννεανικός)	P(3HN)
C <sub>7</sub> H <sub>15</sub>	C10	πολυ (3-υδροξυδεκανοϊκός)	P(3HD)
C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>	C11	πολυ (3-υδροξυεντεκανοϊκός)	P(3HUD)
C <sub>9</sub> H <sub>19</sub>	C12	πολυ (3-υδροξυδωδεκανοϊκός)	P(3HDD)

Η πλευρική ομάδα R που βρίσκεται στον τρίτο άνθρακα μπορεί να ποικίλει από έναν άνθρακα (C1) έως 14 άτομα άνθρακα (C14) σε μήκος. Έτσι τα PHAs χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό των ατόμων άνθρακα που μετέχουν στο μονομερές:

- short-chain-length PHAs ή scl-PHAs (μικρού μήκους αλυσίδα PHA).

Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν τα PHAs που αποτελούνται από 3 έως 5 άτομα άνθρακα. Τα πολυμερή αυτά έχουν ιδιότητες που μοιάζουν με τα συμβατικά πλαστικά, όπως για παράδειγμα το πολυπροπυλένιο. Σε αυτή την κατηγορία ανήκει το PHB το οποίο είναι αρκετά εύθραυστο και άκαμπτο, γεγονός που περιορίζει τις πρακτικές εφαρμογές του.

- medium-chain-length PHAs ή mcl-PHAs (μεσαίου μήκους αλυσίδα PHA).

Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν τα PHAs που αποτελούνται από 6 έως 14 άτομα άνθρακα. Τα πολυμερή αυτά είναι ελαστικά και εύκαμπτα υλικά με χαμηλή κρυσταλλικότητα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε πληθώρα εφαρμογών όπου δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα μικρού μήκους αλυσίδας πολυμερή. Στελέχη του γένους *Pseudomonas* έχουν χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή mcl-PHAs από διάφορα υποστρώματα όπως η γλυκερόλη, τα φυτικά έλαια κ.α.

- long-chain-length PHAs ή lcl-PHAs (μεγάλου μήκους αλυσίδα PHA)

Εδώ ανήκουν τα PHAs που αποτελούνται πάνω από 14 άτομα άνθρακα.

Παρόλο που η πλειονότητα των βακτηρίων που παράγουν PHAs συσσωρεύουν είτε μικρού μήκους αλυσίδες PHA (scl-PHAs) είτε μεσαίου μήκους αλυσίδες (mcl-

PHAs), υπάρχουν και μικροοργανισμοί που συσσωρεύουν συμπολυμερή μικρού και μεσαίου μήκους αλυσίδες PHAs (sc1-co-mcl-PHAs) (Steinbüchel and Hein, 2001). Εν γένει οι μικροοργανισμοί μπορούν να συνθέσουν μεγάλη ποικιλία βιοπολυμερών και περίπου 150 διαφορετικά μονομερή των PHAs έχουν ταυτοποιηθεί.

#### 1.4 Εφαρμογές PHAs

Τα τελευταία χρόνια οι εφαρμογές των PHAs πληθαίνουν ενώ παράλληλα αυξάνονται οι ερευνητικές δημοσιεύσεις αναφορικά με τη βιοσύνθεση, τη ζύμωση και το χαρακτηρισμό τους (Philip et al. 2007). Τα PHAs χάρις στις μηχανικές τους ιδιότητες και την ικανότητα τους να είναι βιοσυμβατά και βιοδιασπώμενα, απαντώνται σε μεγάλο εύρος εφαρμογών στο βιομηχανικό, ιατρικό και γεωργικό τομέα.

Στο βιομηχανικό τομέα οι χρήσεις των PHAs είναι αξιοσημείωτες. Τα λάτεξ από PHAs μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως επιχρίσματα πάνω σε χαρτί ή χαρτόνι με σκοπό την αδιαβροχοποίηση της επιφάνειας σε αντίθεση με τον υφιστάμενο συνδυασμό χαρτονιού-αλουμινίου ο οποίος δεν είναι βιοαποδομήσιμος. Ακόμη η εφαρμογή αυτή είναι οικονομικά συμφέρουσα καθώς απαιτεί μικρές ποσότητες PHAs (Lauzier et al. 1993). Τα PHAs ως υλικό συσκευασίας μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την κατασκευή χάρτινων περιεκτών για τη συσκευασία του γάλακτος και άλλων ποτών. Έχει παρατηρηθεί ότι το συμπολυμερές πολυ-υδροξυ(βουτυρικού-βαλερικού) εστέρα (P(3HB-co-3HV)), παρουσιάζει ικανοποιητικό φραγμό ενάντια στα αέρια (Hocking et al. 1994). Επιπρόσθετα τα PHAs μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την κατασκευή φιλμ, αλουμινόχαρτου και διαφραγμάτων (Babel et al. 1990).

Η εταιρία Metabolix εμπορεύεται το προϊόν Metabolix PHA το οποίο αποτελεί ένα μίγμα PHAs που αποτελείται από μονομερή 3-υδροξυβουτυρικού (3-HB) και 3-υδροξυοκτανοϊκού (3-HO). Το υλικό αυτό είναι ελαστομερές και έχει εγκριθεί από την υπηρεσία τροφίμων και φαρμάκων (FDA) για τη χρήση του ως πρόσθετο συστατικό σε τρόφιμα. Ακόμη, είναι δυνατό τα PHAs χάρις στην πιεζοηλεκτρική τους φύση να χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή αισθητήρων πίεσης σε πληκτρολόγια, όργανα μέτρησης επιτάχυνσης και επιμήκυνσης, δοκιμασίες αντοχής υλικών, αναπτήρες, ακουστικά, μικρόφωνα, ηχεία (Babel et al. 1990) .

Όσον αφορά στον τομέα της ιατρικής, τα PHAs βρίσκουν πληθώρα εφαρμογών όπως για παράδειγμα τα οστεοσυνθετικά υλικά και τα χειρουργικά ράμματα. Ακόμη δύνανται να χρησιμοποιηθούν στην αργή αποδέσμευση φαρμακευτικών ουσιών και ορμονών. Ωστόσο η χρήση του PHB σε τέτοιου είδους εφαρμογές είναι απαγορευτική, κυρίως εξαιτίας του χαμηλού ρυθμού βιοδιάσπασης και της μεγάλης αντοχής του στην υδρόλυση σε αποστειρωμένους ιστούς (Steinbuchel et al. 1998). Οι ίνες των PHAs είναι ιδιαίτερα περιζήτητες για την παρασκευή επιχρισμάτων και επιδέσμων για το χειρουργείο (Babel et al. 1990). Τα PHAs παράγονται σε ζυμώσεις μεγάλης κλίμακας και αντίθετα με τα συμβατικά χημικά δεν περιέχουν υπολείμματα από μη επιθυμητούς καταλύτες που χρησιμοποιούνται στην παρασκευή των χημικών. PHAs όπως P(3HB), P(3HB-co-3HV), P(3HB-co-3HHx) και P(3 HHx-co-3HO) έχουν δοκιμαστεί σε ζώα και εδείχθη ότι τα εν λόγω βιοπολυμερή είναι βιοσυμβατά σε διάφορα βιολογικά συστήματα (Valappil et al. 2006).

Οι Basnett et al. ανέφεραν τη χρήση καινούριων μιγμάτων από PHO και PHB με διαφορετικές αναλογίες. Στη μελέτη τους ανέφεραν τη διεξαγωγή δοκιμασιών για τα ανωτέρω μίγματα ως προς την βιοαποδόμηση και τη βιοσυμβατότητα τους (Basnett et al. 2013). Η αποδόμηση σε αυτά τα μίγματα πραγματοποιήθηκε μέσω επιφανειακής διάβρωσης, γεγονός που οδηγεί σε πιο ελεγχόμενη αποδόμηση διατηρώντας τον αρχικό πυρήνα του υλικού (Luef et al. 2015).

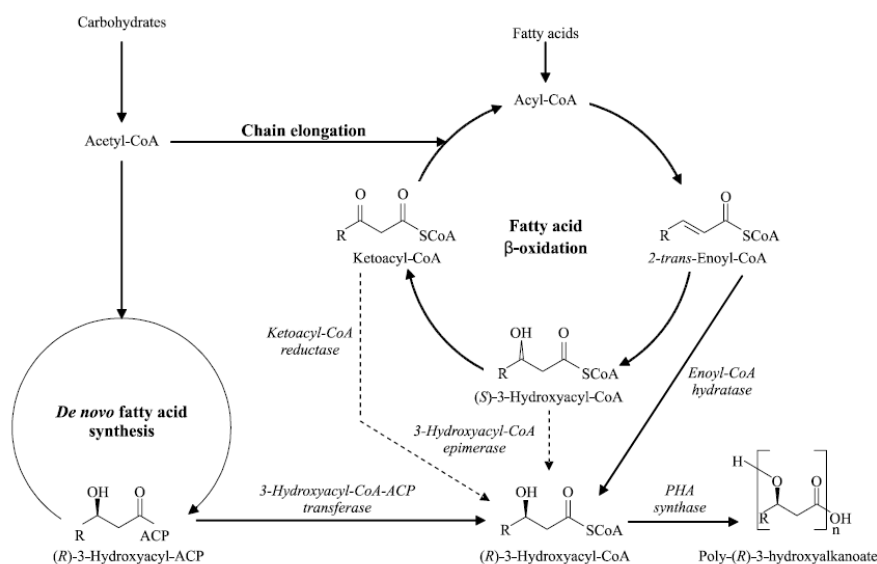
Οι βασικές χρήσεις των PHAs στον τομέα της γεωργίας έγκεινται στην ελεγχόμενη αποδέσμευση λιπασμάτων, εντομοκτόνων και ζιζανιοκτόνων (Philip et al. 2007). Μερικά εμπορικά προϊόντα που επιτρέπουν τον έλεγχο αυτό είναι ήδη σε χρήση. Για παράδειγμα το Nodax™ είναι ένα συμπολυμερές αποτελούμενο κυρίως από 3(HB) και μικρές ποσότητες μονομερών mcl-PHAs και ελέγχθηκε ως επίστρωση για λιπάσματα και ζιζανιοκτόνα, ενώ το 1985 οι Holmes et al. χρησιμοποίησαν το P(3HB-co-3HV) στην ελεγχόμενη απελευθέρωση των εντομοκτόνων καθώς το πολυμερές αποδομείται από τα έντομα (Holmes, 1985).

Μία άλλη εφαρμογή των PHAs στη γεωργία είναι η χρήση τους ως βακτηριακά ενοφθαλμίσματα για την ενίσχυση της δέσμευσης του αζώτου σε φυτά. Η καλλιέργεια που χρησιμοποιείται για το σκοπό αυτό πρέπει να είναι ανθεκτική σε ακραία περιβάλλοντα. Για το λόγο αυτό πρέπει να αποθηκεύεται μακροχρόνια σε

θερμό περιβάλλον ώστε να αντέχει την ξηρασία και τη ζέστη με αποτέλεσμα να έχει υψηλά ποσοστά επιβίωσης εντός του φορέα (Lopez et al. 1998).

### 1.5 Παραγωγή PHAs μέσω ζυμώνσεων

Η σύνθεση των mcl-PHAs στα βακτήρια είναι συνδεδεμένη με 3 διαφορετικές μεταβολικές οδούς που παράγουν πρόδρομα μόρια mcl-PHAs: i) η de novo βιοσυνθετική μεταβολική οδός, μέσω της οποίας παράγεται η πρόδρομη ουσία (R)-3-υδροξυ-ακυλο-συνένζυμοA ((R)-3-hydroxyacyl-CoA) από μη συνδεδεμένες ουσίες όπως η γλυκόζη και το γλυκονικό, ii) η αποικοδόμηση των λιπαρών οξέων μέσω της β-οξειδωσης, η οποία είναι η κύρια μεταβολική οδός για τη σύνθεση των λιπαρών οξέων και iii) η επιμήκυνση αλυσίδας, στην οποία τα ακυλο-συνένζυμοA (acyl-CoA) επεκτείνονται με ακέτυλο-συνένζυμοA (acetyl-CoA) (Witholt et al. 1999). Αυτές οι μεταβολικές οδοί παράγουν διάφορες πρόδρομες ουσίες για την παραγωγή PHAs όπως (R)-3-hydroxyacyl-acyl carrier protein (ACP), 2-trans-enoyl-CoA, (S)-3-hydroxyacyl-CoA, and 3-ketoacyl-CoA (Kim et al. 2007). Το μεταβολικό μονοπάτι φαίνεται αναλυτικά στην εικόνα 1.1 .

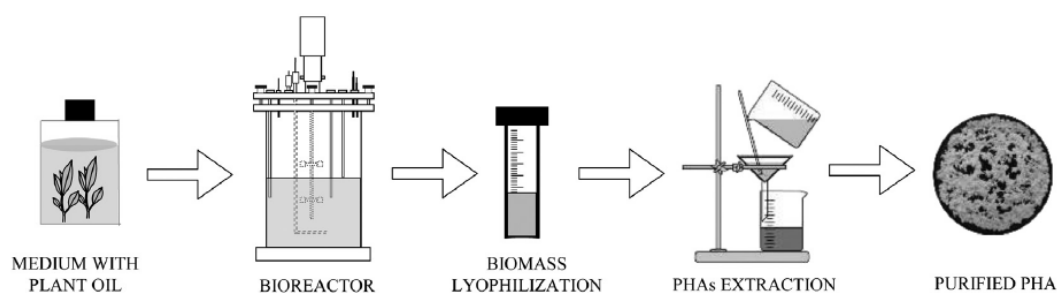


**Εικόνα 1.1 :** Μεταβολικό μονοπάτι παραγωγής PHAs στα βακτήρια (Kim et al. 2007)



Για την αποδοτική παραγωγή PHAs μέσω μικροοργανισμών πολλοί παράγοντες πρέπει να ληφθούν υπόψιν, όπως ο λόγος άνθρακα προς άζωτο, η συγκέντρωση αλάτων και ιχνοστοιχείων, η θερμοκρασία, ο χρόνος ζύμωσης και το pH (Lee et al. 2004). Ωστόσο ο πιο σημαντικός παράγοντας είναι το είδος του μικροοργανισμού που χρησιμοποιείται. Μέχρι σήμερα τουλάχιστον μερικές εκατοντάδες είδη βακτηρίων έχουν μελετηθεί ως προς την ικανότητά τους να παράγουν PHAs αλλά τα περισσότερα εξ' αυτών δεν μπορούν να θεωρηθούν ως παραγωγοί PHAs εξαιτίας της μικρής τους απόδοσης στη σύνθεση και συσσώρευση PHAs (Cieselski et al. 2015).

Για να χρησιμοποιηθεί ένας μικροοργανισμός για βιομηχανική παραγωγή PHAs πρέπει να έχει την ικανότητα να καταναλώνει μια χαμηλού κόστους πηγή άνθρακα και να επιτυγχάνει υψηλές συγκεντρώσεις τόσο κατά την ανάπτυξη όσο και κατά τη συσσώρευση των PHAs. Μόνο λίγα στελέχη έχουν μελετηθεί και είναι ικανά να συσσωρεύσουν PHAs σε ικανοποιητικά ποσοστά και σε χαμηλό κόστος όπως για παράδειγμα οι *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*, *B. megaterium*, *Cupriavidus necator* and *Pseudomonas oleovorans* (Chanprateep, 2010). Το γενικευμένο σχήμα παραγωγής PHAs παρουσιάζεται στην εικόνα 1.2.



**Εικόνα 1.2 :** Γενικευμένο σχήμα παραγωγής PHAs

Διάφορα είδη ζύμωσης για την παραγωγή PHAs έχουν μελετηθεί όπως η ασυνεχής καλλιέργεια (batch), η ημισυνεχής τροφοδοτούμενη καλλιέργεια (fed-batch) και η συνεχής καλλιέργεια (continuous). Όλα τα ανωτέρω είδη καλλιέργειας δύνανται να διεξαχθούν με μεγάλο εύρος συνθηκών καλλιέργειας. Οι πιο διαδεδομένες στρατηγικές για τη βιομηχανική παραγωγή είναι η ασυνεχής και η ημισυνεχής τροφοδοτούμενη καλλιέργεια. Κατά την ασυνεχή καλλιέργεια έχουν

αναπτυχθεί δυο στρατηγικές: η ζύμωση ενός σταδίου και η ζύμωση δυο σταδίων. Στη ζύμωση ενός σταδίου χρησιμοποιούνται μικροοργανισμοί οι οποίοι δύνανται να αναπτύσσονται και να συσσωρεύουν PHAs συγχρόνως. Η ζύμωση δυο σταδίων χρησιμοποιείται όταν οι μικροοργανισμοί χρειάζονται περιορισμό σε κάποιο θρεπτικό συστατικό για να παράξουν PHAs. Κατά το πρώτο στάδιο ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται σε ένα πλούσιο θρεπτικό μέσο ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή συγκέντρωση βιομάζας. Εν συνεχεία τα κύτταρα μεταφέρονται σε θρεπτικό μέσο στο οποίο υπάρχει περιορισμός κάποιου θρεπτικού συστατικού ώστε να γίνει η συσσώρευση των PHAs. Κατά τη διάρκεια αυτού του σταδίου τα κύτταρα δεν έχουν την δυνατότητα να αυξηθούν και η βιομάζα παραμένει σχεδόν σταθερή. Ωστόσο τα κύτταρα μεγαλώνουν σε μέγεθος εξαιτίας της ενδοκυτταρικής συσσώρευσης του βιοπολυμερούς (Lee, 1996).

Η ημισυνεχής τροφοδοτούμενη καλλιέργεια είναι πιο αποδοτική σε σχέση με την ασυνεχή καλλιέργεια γιατί μέσω αυτής επιτυγχάνεται μεγαλύτερη συγκέντρωση βιομάζας και προϊόντος καθώς αποφεύγεται η παρεμπόδιση εκ του υποστρώματος (Chee et al. 2010). Η ημισυνεχής τροφοδοτούμενη καλλιέργεια ενός σταδίου όπου υπάρχει περιορισμός σε άζωτο έχει ως αποτέλεσμα χαμηλές συγκεντρώσεις PHAs εξαιτίας της χαμηλής συγκέντρωσης της βιομάζας (Katircioglu et al. 2003). Για το λόγο αυτό συνήθως χρησιμοποιείται η ημισυνεχής τροφοδοτούμενη καλλιέργεια δυο σταδίων (Diniz et al. 2004).

Η συνεχής καλλιέργεια αποτελεί επίσης μια βιώσιμη στρατηγική για την παραγωγή PHAs για την αποφυγή της παρεμπόδισης εκ του υποστρώματος που συνήθως είναι τα λιπαρά οξέα και τα παράγωγα τους (Koller et al. 2010). Τέτοιου είδους ζύμωση έχει εφαρμοστεί για την παραγωγή τόσο scl-PHAs (Mothes et al. 2005) όσο και mcl-PHAs (Jung et al. 2001). Ωστόσο αυτού του είδους η καλλιέργεια δεν είναι πρακτική σε μεγάλη κλίμακα γεγονός που καθιστά την ημισυνεχή τροφοδοτούμενη καλλιέργεια τη βέλτιστη μέθοδο για την παραγωγή PHAs σε βιομηχανική κλίμακα.

Εκτός από τη χρήση καθαρών καλλιεργειών για την παραγωγή PHAs έχει μελετηθεί και η χρήση μεικτών καλλιεργειών η οποία φαίνεται να είναι πιο συμφέρουσα από οικονομικής απόψεως. Οι μεικτές καλλιέργειες, όπως η ενεργός

ιλύς, έχουν κάποια πλεονεκτήματα καθώς η διεργασία ελέγχεται ευκολότερα, δεν είναι απαραίτητες οι ασηπτικές συνθήκες κατά τη διάρκεια της ζύμωσης ενώ είναι εφικτή η κατανάλωση χαμηλού κόστους πηγής άνθρακος ακόμα και αποβλήτων από τη μεικτή μικροβιακή καλλιέργεια (Salehizadeh et al. 2004). Για τη δημιουργία της μεικτής μικροβιακής καλλιέργειας, χρησιμοποιούνται διάφορες τεχνικές, όπως οι συνθήκες υπερεπάρκειας/έλλειψης υποστρώματος (feast and famine) (Serafim et al. 2008), για τον εμπλουτισμό της καλλιέργειας σε μικροοργανισμούς οι οποίοι δύνανται να παράξουν PHAs σε υψηλές συγκεντρώσεις (Ciesielski et al. 2008).

Σε ότι αφορά την εξαγωγή και τον καθαρισμό των PHAs έχουν μελετηθεί διάφορες μέθοδοι όπως η χρήση οργανικών διαλυτών, η χώνευση, η μηχανική καταπόνηση και το υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα (Jacquel et al. 2008). Η απλούστερη μέθοδος εξαγωγής PHAs είναι μέσω διαλυτών όπως το χλωροφόρμιο, το διχλωρομεθάνιο, το διχλωρομεθάνιο, το ανθρακικό αιθυλένιο και η ακετόνη. Σε πρώτο στάδιο ο διαλύτης καθιστά διαπερατή την κυτταρική μεμβράνη και εν συνεχεία διαλυτοποιεί το πολυμερές. Σε επόμενο στάδιο χρησιμοποιείται μεθανόλη είτε αιθανόλη για τον καθαρισμό και την ανάκτηση του προϊόντος (Anderson et al. 1990). Η μέθοδος αυτή έχει υψηλό κόστος και επιφέρει πληθώρα περιβαλλοντικών επιπτώσεων εξαιτίας της μεγάλης κατανάλωσης διαλυτών οι οποίοι είναι δύσκολο να απορριφθούν. Άλλες μέθοδοι που συνδέονται με την χώνευση των κυτταρικών σωματιδίων πλην των PHAs παρουσιάζουν αρκετά μειονεκτήματα όπως για παράδειγμα το υποχλωριώδες νάτριο δύναται να προκαλέσει υποβάθμιση στο τελικό προϊόν (Ryu et al. 2000), ενώ η ενζυμική ανάκτηση είναι αρκετά ακριβή και κατά συνέπεια μη συμφέρουσα.

## **1.6 Παραγωγή PHAs με υπόστρωμα απόβλητα μαγειρικά έλαια**

Τα mcl-PHAs έχουν παραχθεί από πληθώρα μικροοργανισμών με υπόστρωμα ακατέργαστα και απόβλητα λίπη και έλαια. Αναμφίβολα ο μικροοργανισμός που έχει μελετηθεί περισσότερο είναι του γένους *Pseudomonas sp.* και η πρώτη μελέτη που αναφέρθηκε στην παραγωγή mcl-PHAs με υπόστρωμα τα τριγλυκερίδια πραγματοποιήθηκε τη δεκαετία του 1990. Οι Cromwick et al. 1996, μελέτησαν την παραγωγή PHAs με μοναδικό υπόστρωμα λίπος μέσω του μικροοργανισμού

*Pseudomonas resinovorans*. Ωστόσο η ζύμωση αυτή δεν ήταν αποδοτική εξαιτίας του χαμηλού ποσοστού στη συσσώρευση των PHAs το οποίο ανερχόταν στο 15% του συνολικού ξηρού κυτταρικού βάρους. Αργότερα μελετήθηκαν πιο αποδοτικές βιοδιεργασίες με χρήση διάφορων τύπων ελαίων. Γενικά η ικανότητα των βακτηρίων να χρησιμοποιούν τα έλαια προς την παραγωγή PHAs σχετίζεται με την ενεργότητα της λιπάσης. Ωστόσο κάποιοι ερευνητές ανέφεραν ότι παρόλο που κάποια βακτήρια παράγουν λιπάσες δεν είναι ικανά να μετατρέψουν κάποια έλαια σε πολυυδροξυαλκανοϊκούς εστέρες και σε αυτές τις περιπτώσεις απαιτείται ένα βήμα σαπωνοποίησης (Silva-Queiroz et al. 2009; Mozejko et al. 2013). Επιπρόσθετα επιβεβαιώθηκε ότι η σύνθεση και το είδος των μονομερών που παράγονται έχει άμεση σχέση με το είδος του φυτικού ελαίου που χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα. Είναι γνωστό ότι τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas sp.* συσσωρεύουν μονομερή με 8 και 10 άτομα άνθρακα όταν αναπτύσσονται σε υπόστρωμα που αποτελείται από 13 έως 18 άτομα άνθρακα (Madison et al. 1999). Αυτή η τάση επιβεβαιώθηκε από πληθώρα αποτελεσμάτων των μονομερών τα οποία παρήχθησαν από διάφορα φυτικά έλαια ως μοναδική πηγή άνθρακος.

Οι Hazer et al. 1998 έδειξαν ότι ο *Pseudomonas oleovorans* δύναται να συσσωρεύσει mcl-PHAs όταν αναπτύσσεται σε έλαια από φουντούκι, σουσάμι και ελιά. Τα PHAs που παρήχθησαν αποτελούνταν από επαναλαμβανόμενες μονάδες με 8 έως 20 άτομα άνθρακα. Το υψηλότερο ποσοστό mcl-PHAs ανερχόταν σε 60 % του συνολικού ξηρού κυτταρικού βάρους και αναφέρθηκε σε ζύμωση με υπόστρωμα το έλαιο φουντουκιού. Σε άλλη μελέτη αποδείχθη ότι το βακτήριο *Pseudomonas guzezennei biovar tikehau* δύναται να καταναλώσει έλαιο ελαιοκράμβης (canola oil) για την παραγωγή PHAs με μέγιστη απόδοση στην παραγωγή mcl-PHAs 63 % του συνολικού ξηρού κυτταρικού βάρους (Simon-Colin et al. 2008). Επιπρόσθετα κάποιοι ερευνητές εστίασαν το ενδιαφέρον τους στη βελτιστοποίηση της διεργασίας παραγωγής PHAs με υπόστρωμα φοινικέλαιο ως μοναδική πηγή άνθρακος. Το υψηλότερο ποσοστό mcl-PHAs αναφέρεται από τους Annuar et al. 2007 οι οποίοι ανέπτυξαν τον μικροοργανισμό *Pseudomonas putida* PGA1 με υπόστρωμα σαπωνοποιημένο φοινικέλαιο (palm kernel oil) σε ημισυνεχώς τροφοδοτούμενο βιοαντιδραστήρα όπου επετεύχθη ποσοστό 70 % PHAs. Ακόμη οι ίδιοι συγγραφείς αναφέρουν ότι τα κύρια μονομερή στα mcl-PHAs που προέκυψαν ήταν με 8 και 10 άτομα άνθρακα.

Η παραγωγή mcl-PHAs από απόβλητα φυτικά έλαια έχει μελετηθεί αρκετά στη βιβλιογραφία. Οι [Mozejko et al. 2011](#) ανακάλυψαν ότι το απομονωμένο στέλεχος GI01, το οποίο ανήκει στο γένος *Pseudomonas sp.*, παρήγαγε 21 % mcl-PHAs όταν αναπτύχθηκε σε απόβλητο έλαιο ελαιοκράμβης. Το ίδιο ποσοστό PHAs επετεύχθη από τους [Song et al. 2008](#) κατά την ανάπτυξη του *Pseudomonas sp.* DR2 σε απόβλητα φυτικά έλαια. Σε αυτές τις περιπτώσεις η σύσταση των μονομερών αποτελούνταν κυρίως από 3-υδροξυοκτανοϊκό (3-HO) και 3-υδροξυδεκανοϊκό (3-HD). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, το απόβλητο φοινικέλαιο απεδείχθη κατάλληλο υπόστρωμα για τη σύνθεση mcl-PHAs. Πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις σε ημισυνεχώς τροφοδοτούμενο βιοαντιδραστήρα με το στέλεχος *Pseudomonas sp* GI01 σε υπόστρωμα απόβλητο σαπωνοποιημένο φοινικέλαιο όπου αποδείχθηκε ότι είναι εφικτή η παραγωγή έως και 48 % mcl-PHAs μετά από 17 ώρες καλλιέργειας ενώ το παραγόμενο πολυμερές περιείχε 3-υδροξυεξανοϊκό (3-HHx) και 3-υδροξυδωδεκανοϊκό (3- HDD). Επιπρόσθετα κάποιοι συγγραφείς επεσήμαναν την ύπαρξη υψηλού ποσοστού 3-υδροξυεννεανικού (3-HN) (σε ποσοστά έως 63 % κατά mol) γεγονός που αποδεικνύει την ύπαρξη λιπαρών οξέων με περιττό αριθμό ανθράκων στο υπόστρωμα ([Mozejko et al. 2013](#)). Ομοίως, όταν χρησιμοποιήθηκε απόβλητο έλαιο μαγειρικής ως υπόστρωμα στον μικροοργανισμό *Pseudomonas aeruginosa* 42A2 από τους [Fernandez et al. 2005](#), παρατηρήθηκε ένα μικρό ποσοστό (0.47 %) 3-υδροξυεννεανικού (3-HN) ενώ το συνολικό ποσοστό του παραγόμενου πολυμερούς ήταν χαμηλότερο (29.4 % του ξηρού κυτταρικού βάρους)

### 1.7 Βιο-επιφανειοδραστικές ουσίες

Οι επιφανειοδραστικές ουσίες αποτελούν χημικές ουσίες οι οποίες δρουν επί της διεπιφάνειας των ουσιών. Παρατηρείται προτίμηση στη δράση τους σε διεπιφάνειες στις οποίες τα υλικά έχουν διαφορετική φύση όπως σε διεπιφάνειες υγρού-υγρού ή υγρού-αερίου. Επίσης είναι διαλυτές τόσο σε οργανικούς (μη πολικούς) όσο και σε υδατικούς (πολικούς) διαλύτες. Η ιδιότητα τους αυτή προκύπτει από την αμφιφιλική δομή τους η οποία συνδυάζει υδρόφιλη κεφαλή και υδρόφοβη ουρά ([Desai et al. 1997](#)). Οι επιφανειοδραστικές ουσίες είναι βιολογικής προέλευσης και παράγονται από πληθώρα μικροοργανισμών όπως τα βακτήρια, οι ζύμες και οι μύκητες. Το υδρόφιλο μέρος τους αποτελείται συνήθως από σάκχαρα, αμινοξέα ή

πολικές λειτουργικές ομάδες όπως τα καρβοξυλικά οξέα. Το υδρόφοβο μέρος τους είναι συνήθως μια αλυσίδα αλειφατικού υδατάνθρακα από β-υδροξυ-λιπαρό οξύ (Lang et al. 1999). Οι επιφανειοδραστικές ουσίες κατατάσσονται ανάλογα με το φορτίο που μεταφέρεται από την κεφαλή τους σε ανιονικές, κατιονικές, αμφοτερικές και μη ιονικές.

Τα τελευταία χρόνια οι επιφανειοδραστικές ουσίες που παράγονται με βιολογικό τρόπο παρουσιάζουν σημαντικό ενδιαφέρον εξαιτίας της σύνθεσής τους, σε αντίθεση με τις συνήθεις επιφανειοδραστικές ουσίες. Παρουσιάζουν χαμηλότερη τοξικότητα, δυνητικά υψηλές ενεργότητες και σταθερότητα στη δομή τους σε ακραίες συνθήκες θερμοκρασίας, τιμής pH και αλατότητας. Επιπρόσθετα εμφανίζουν μεγάλη ποικιλία στις δομές τους και είναι δυνατό να παραχθούν από ανανεώσιμες πρώτες ύλες μέσω αρκετών μικροοργανισμών. Ωστόσο το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό τους είναι η ικανότητα τους να βιοδιασπώνται αποτελώντας έτσι ένα περιβαλλοντικά φιλικό χημικό (Abdel-Mawgoud et al. 2010).

Οι πιο βασικές ιδιότητες των βιο-επιφανειοδραστικών ουσιών είναι ο αφρισμός, η δυνατότητα γαλακτωματοποίησης και διαλυτοποίησης και ο σχηματισμός κυστιδίων (Mukherjee et al. 2006). Οι ιδιότητες αυτές είναι συνδεδεμένες με τον αμφίφιλο χαρακτήρα των ραμνολιπιδίων και τους δίνουν τη δυνατότητα να συσσωρεύονται στη διαχωριστική επιφάνεια δύο υγρών μειώνοντας έτσι την επιφανειακή τους τάση. Τα ραμνολιπίδια κατέχουν ένα μεγάλο εύρος εφαρμογών στο περιβάλλον, στα τρόφιμα, στη γεωργία και στη βιομηχανία των φαρμάκων και των καλλυντικών (Nitschke et al. 2011). Η χρήση των βιο-επιφανειοδραστικών ουσιών σε περιβαλλοντικό επίπεδο είναι και η πλέον διαδεδομένη. Τα ραμνολιπίδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αποκατάσταση της μόλυνσης σε έδαφος και ύδατα από διαρροή υδρογονανθράκων, για την απομάκρυνση βαρέων μετάλλων και για την έκπλυση του εδάφους. Επιπρόσθετα τα ραμνολιπίδια ενισχύουν την απομάκρυνση του αρσενικού και των βαρέων μετάλλων από τους χώρους υγειονομικής ταφής απορριμμάτων (Wang et al. 2009). Οι Gustafsson et al. 2009 ανέφεραν ότι τα ραμνολιπίδια είναι ικανά να ελέγξουν την εξάπλωση επιβλαβών φυκών χωρίς να προκαλέσουν παρενέργειες στο οικοσύστημα. Οι Urum et al. 2004 έδειξαν ότι η έκπλυση μολυσμένων δειγμάτων εδάφους με 0.1 % διαλύματος ραμνολιπιδίων εμπορικής προέλευσης συνετέλεσε στην απομάκρυνση του 75 % του πετρελαίου.

Κάποιες ιδιότητες των ραμνολιπιδίων, όπως η δημιουργία γαλακτώματος και η σταθεροποίηση, τους δίνουν την δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν στη βιομηχανία τροφίμων. Στα αρτοσκευάσματα και στα παγωτά, οι βιο-επιφανειοδραστικές ουσίες χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της σύστασης, την καθυστέρηση του μπαγιατέματος και για τη διαλυτοποίηση των αρωματικών ελαίων (Kosaric, 2001). Για παράδειγμα η σταθερότητα, η υφή και ο όγκος της ζύμης στα αρτοσκευάσματα μπορεί να βελτιωθεί με τη χρήση επιφανειοδραστικών ουσιών βιολογικής προέλευσης (Haesendonck et al. 2004). Τέλος, μελέτες έδειξαν ότι ο συνδυασμός νισίνης και ναταμυκίνης με ραμνολιπίδια αυξάνει τη διάρκεια ζωής και αναστέλλει τη μικροβιακή ανάπτυξη σε προϊόντα όπως οι σάλτσες για σαλάτες και το γάλα σόγιας μακράς διάρκειας (Gandhi et al. 2007).

### **1.8 Σκοπός εργασίας**

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η επιλογή και η μελέτη της ικανότητας των βακτηριακών στελεχών (κυρίως του γένους *Pseudomonas* sp.) ως προς την παραγωγή πολυ-υδροξυ-αλκανοϊκών εστέρων (PHAs). Εν συνεχεία τα στελέχη που κατείχαν αυτή την ικανότητα μελετήθηκαν περαιτέρω σε ζυμώσεις τόσο με εμπορικά υποστρώματα όσο και με απόβλητα της βιομηχανίας τροφίμων προς παραγωγή πολυ-υδροξυαλκανοϊκών εστέρων μεσαίου μήκος αλυσίδας (mcl-PHAs). Τέλος, το στέλεχος με την καλύτερη απόδοση μελετήθηκε σε βιοαντιδραστήρα σε συνθήκες ημιδιαλείποντος έργου.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### Υλικά και Μέθοδοι

#### 2.1 Βιολογικό υλικό

##### 2.1.1 Βακτηριακά στελέχη

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 37 βακτηριακά στελέχη του γένους *Pseudomonas* sp. τα οποία χορηγήθηκαν από το εργαστήριο της Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και 3 εμπορικά στελέχη του γένους *Pseudomonas* sp. της συλλογής DSMZ, τα οποία παρουσιάζονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 2.1 :** Πίνακας στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη

FMCC	Στέλεχος	Θερμοκρασία επώασης
B-1	<i>Pseudomonas</i> sp. ( <i>P. fluorescens</i> group) deposited as <i>Achromobacter</i> sp.	30 °C
B-27	<i>Pseudomonas</i> sp. (ungrouped) deposited as <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30 °C
B-28	<i>Pseudomonas</i> sp. ( <i>P. fluorescens</i> group) deposited as <i>Pseudomonas cepacia</i>	30 °C
B-29	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Migula	30 °C
B-30	<i>Pseudomonas</i> sp. ( <i>P. fluorescens</i> group) deposited as <i>Pseudomonas fluorescens</i>	30 °C
B-31	<i>Pseudomonas</i> sp. ( <i>P. chlororaphis</i> group) deposited as <i>Pseudomonas fluorescens</i>	30 °C
B-33	<i>Pseudomonas libanensis</i> Dabboussi et al. deposited as <i>Pseudomonas fragi</i>	30 °C
B-34	<i>Pseudomonas fragi</i> (Eichholz) Gruber	26 °C
B-36	<i>Pseudomonas</i> sp. ( <i>P. chlororaphis</i> group) deposited as <i>Pseudomonas putida</i>	30 °C
B-37	<i>Pseudomonas gessardii</i> Verhille et al. deposited as <i>Pseudomonas putida</i>	30 °C
B-38	<i>Pseudomonas</i> sp. ( <i>P. chlororaphis</i> group) deposited as <i>Pseudomonas putida</i>	30 °C
B-39	<i>Pseudomonas brenneri</i> Baida et al. deposited as <i>Pseudomonas stutzeri</i>	30 °C
B-44	<i>Pseudomonas</i> sp. (ungrouped)	25 °C
B-46	<i>Pseudomonas gessardii</i> Verhille et al. deposited as <i>Pseudomonas</i> sp.	30 °C



B-47	<i>Pseudomonas gessardii</i> Verhille et al. deposited as <i>Pseudomonas sp.</i>	30 °C
B-48	<i>Pseudomonas gessardii</i> Verhille et al. deposited as <i>Pseudomonas sp.</i>	30 °C
B-49	<i>Pseudomonas gessardii</i> Verhille et al. deposited as <i>Pseudomonas sp.</i>	30 °C
B-51	<i>Pseudomonas migulae</i> Verhille et al. <i>Pseudomonas sp.</i>	25 °C
B-55	<i>Pseudomonas psychrophila</i> Yumoto et al. deposited as <i>Pseudomonas sp.</i>	30 °C
B-74	<i>Pseudomonas putida</i> (Trevisan) Migula deposited as <i>Shewanella</i> <i>sp.</i>	30 °C
B-85	<i>Pseudomonas psychrophila</i> Yumoto et al. deposited as <i>Shewanella sp.</i>	25 °C
B-93	<i>Bacillus sp.</i> deposited as <i>Bacillus carotarum</i>	30 °C
B-101	<i>Bacillus altitudinis</i> Shivaji et al. deposited as <i>Bacillus lentus</i>	25 °C
B-102	<i>Bacillus altitudinis</i> Shivaji et al. deposited as <i>Bacillus</i> <i>licheniformis</i>	25 °C
B-107	<i>Bacillus thuringiensis</i> Berliner deposited as <i>Bacillus sphaericus</i>	30 °C
B-108	<i>Bacillus altitudinis</i> Shivaji et al. deposited as <i>Bacillus</i> <i>stearothermophilus</i>	25 °C
B-109	<i>Bacillus subtilis</i> (Ehrenberg) Cohn	30 °C
B-110	<i>Bacillus vallismortis</i> Roberts et al. deposited as <i>Bacillus subtilis</i>	30 °C
B-150	<i>Pseudomonas gessardii</i> Verhille et al. deposited as <i>Pseudomonas sp.</i>	26 °C
B-151	<i>Pseudomonas sp.</i> ( <i>P. chlororaphis</i> group)	30 °C
B-154	<i>Pseudomonas gessardii</i> Verhille et al. deposited as <i>Pseudomonas sp.</i>	25 °C
B-155	<i>Pseudomonas psychrophila</i> Yumoto et al. deposited as <i>Shewanella sp.</i>	26 °C
B-209	<i>Pseudomonas fragi</i> (Eichholz) Gruber	25 °C
B-210	<i>Pseudomonas fragi</i> (Eichholz) Gruber	25 °C
B-211	<i>Pseudomonas fragi</i> (Eichholz) Gruber	25 °C
B-218	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Migula	28 °C
	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> DSM50083	26 °C
	<i>Pseudomonas resinovorans</i> DSM 21078	28 °C
	<i>Pseudomonas citronellolis</i> DSM 50332	30 °C
B-224	<i>Pseudomonas putida</i> (Trevisan) Migula KT2440 [ATCC 47054]	37 °C

Τα βακτηριακά στελέχη του εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων παρελήφθησαν υπό μορφή στερεής καλλιέργειας σε τρυβλία petri σε υπόστρωμα με οργανικό άζωτο (Tryptic Soy Broth, TSB) και άγαρ. Για την παρασκευή υγρού εμβολίου έγινε ανανέωση των παραπάνω μικροοργανισμών σε δοκιμαστικούς σωλήνες με θρεπτικό μέσο TSB και αφέθηκαν για επώαση σε θερμοκρασία 25-37 °C ανάλογα με το είδος του μικροοργανισμού (Πίνακας 2.1) για 12 με 14 ώρες.

Τα εμπορικά στελέχη της εταιρίας DSMZ παρελήφθησαν υπό λυοφιλοποιημένη μορφή. Για την ενυδάτωση των μικροοργανισμών της DSMZ χρησιμοποιήθηκε υγρό θρεπτικό μέσο TSB ή Medium 1 ανάλογα με το μικροοργανισμό (Πίνακας 2.2) για 30 λεπτά. Στη συνέχεια εμβολιάστηκαν υγρές καλλιέργειες με το κατάλληλο θρεπτικό μέσο ως υπόστρωμα για τον κάθε μικροοργανισμό αλλά και στερεές καλλιέργειες σε τρυβλία petri για αποθήκευση στους 2°C.

**Πίνακας 2.2 :** Σύσταση θρεπτικών μέσων

Θρεπτικό μέσο	Συστατικά	Συγκέντρωση (g/L)	Μικροοργανισμοί
Tryptic Soy Broth, TSB	Peptone from casein	17	B1-B224 DSM 21078
	Peptone from soymeat	3	
	D(+) glucose	2.5	
	NaCl	5	
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.5	
Medium 1	Peptone	5	DSM50083
	Meat extract	3	DSM 50332
Phosphate-buffered saline, PBS	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	1.44	Aspergillus oryzae
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·1H <sub>2</sub> O	0.24	
	NaCl	8	
	KCl	0.2	

### 2.1.2 Μυκητιακό στέλεχος

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ένα στέλεχος του μύκητα *Aspergillus oryzae* το οποίο διατηρείται στη συλλογή του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό τη μορφή σπορίων σε γυάλινους περιέκτες με silica gel στους 4°C. Για την ενυδάτωση χρησιμοποιήθηκε διάλυμα PBS (Πίνακας 2.2) σε δοκιμαστικούς σωλήνες στους οποίους προστέθηκε μικρή ποσότητα άμμου (1 g). Από το εν λόγω διάλυμα εμβολιάστηκαν στερεές καλλιέργειες σε τρυβλία petri με σύσταση 2% w/v άγαρ, 2% w/v πίτυρο σίτου και 3% w/v ηλιάλευρο και αφέθηκαν σε επώαση στους 30 °C για περίπου 5-6 ημέρες. Μετά το πέρας της επώασης έγινε εμβολιασμός σε κεκλεισμένους σωλήνες με θρεπτικό μέσο όμοιο με τα τρυβλία petri, οι οποίοι αφέθηκαν για επώαση στις ίδιες συνθήκες για περίπου 4-5 ημέρες. Οι σωλήνες εν

συνεχεία χρησιμοποιήθηκαν για να εμβολιαστούν κωνικές φιάλες με το ίδιο θρεπτικό μέσο ώστε να διασφαλιστεί επαρκής συγκέντρωση σπορίων για τη ζύμωση στερεάς κατάστασης.

Όλα τα χρησιμοποιούμενα σκεύη και εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αποστειρωμένα και όλοι οι χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής και σε περιβάλλον φλόγας.

## 2.2 Ζύμωση στερεάς κατάστασης (Solid state fermentation)

Για τη ζύμωση στερεάς κατάστασης είναι αναγκαία η παραγωγή σπορίων από τους κεκλεισμένους σωλήνες (Ενότητα 2.1.2). Για την παραγωγή σπορίων εμβολιάστηκαν κωνικές φιάλες των 250 mL με 50 mL θρεπτικό μέσο όμοιο με αυτό των σωλήνων με 2 mL εναιωρήματος το οποίο προέκυψε από την προσθήκη 10 mL αποστειρωμένου νερού με γαλακτωματοποιητή Tween 80 (0.01% v/v) σε δοκιμαστικό σωλήνα με τον ανεπτυγμένο μύκητα. Οι κωνικές φιάλες επώαστηκαν στους 30°C για 3 - 4 ημέρες. Για την παραλαβή των σπορίων από τις κωνικές φιάλες, προστέθηκαν γυάλινα σφαιρίδια διαμέτρου 4mm και 50 mL αποστειρωμένου νερού με γνωστή ποσότητα Tween 80 (0.01% v/v) υπό έντονη ανάδευση με σκοπό την παραλαβή εναιωρήματος πλούσιο σε σπόρια.

Για τη ζύμωση στερεάς κατάστασης χρησιμοποιήθηκαν κωνικές φιάλες των 250 mL με υπόστρωμα 5 g ηλιάλευρο και εμβολιάστηκαν με 8.8 mL από το παραπάνω εναιώρημα ώστε να διαβραχεί ομοιόμορφα η συνολική επιφάνεια της κωνικής φιάλης. Η τελική υγρασία του υποστρώματος είναι 65% (w/w, db). Ακολούθως οι κωνικές επώαστηκαν για 48 ώρες σε θερμοκρασία 30 °C ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη ενεργότητα πρωτεασών, ήτοι 400 U/g ([Kachrimanidou et al 2013](#)).

Όλα τα χρησιμοποιούμενα σκεύη και εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αποστειρωμένα και όλοι οι χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής και σε περιβάλλον φλόγας.

### 2.3 Παρασκευή υδρολύματος

Μετά το πέρας των 48 ωρών το περιεχόμενο των κωνικών φιαλών αναδεύτηκε σε κοινό οικιακό μπλέντερ με 500 mL αποστειρωμένο νερό και προστέθηκε σε φιάλη Duran χωρητικότητας 1 L, που περιείχε πρόσθετη ποσότητα 15 g ηλιάλευρου. Οι φιάλες Duran τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 45 °C για 24 ώρες υπό ανάδευση με μαγνητικούς αναδευτήρες για την ενζυμική υδρόλυση. Σκοπός της διεργασίας ήταν η υδρόλυση των μακρομορίων που περιέχονται στο ηλιάλευρο σε απλούστερα, πιο εύκολα αφομοιώσιμα συστατικά από τα βακτήρια, όπως αμινοξέα και πεπτίδια. Στο τέλος της υδρόλυσης, το υγρό που προέκυψε φυγοκεντρήθηκε στις 9000 rpm, στους 4 °C για 15 λεπτά και αποθηκεύτηκε για χρήση σε επόμενα πειράματα ως υπόστρωμα για πηγή αζώτου.

### 2.4 Θρεπτικό μέσο για την παραγωγή PHAs

Για την παραγωγή των PHAs χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα ανάλογα με τις εκάστοτε σειρές πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν.

#### Πηγές άνθρακα

Ως πηγή άνθρακα αρχικά εξετάστηκε η γλυκόζη και στη συνέχεια η γλυκερόλη και απόβλητα μαγειρικά έλαια σε διάφορες συγκεντρώσεις ανάλογα με το σχεδιασμό του πειράματος.

#### Πηγές αζώτου

Αρχικά χρησιμοποιήθηκε ανόργανο άζωτο και στη συνέχεια υδρόλυμα ηλιαλεύρου με αρχική συγκέντρωση Free Amino Nitrogen (FAN) 300-800 mg/L ανάλογα με το εκάστοτε πείραμα.

#### Ιχνοστοιχεία

Για την ενίσχυση του συνθετικού θρεπτικού μέσου πραγματοποιήθηκε προσθήκη ιχνοστοιχείων με σύσταση η οποία φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2.3).

**Πίνακας 2.3 :** Σύσταση ιχνοστοιχείων

Ιχνοστοιχείο	Συγκέντρωση
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2.78 mg/L
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1.98 mg/L
CoSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2.81 mg/L
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1.67 mg/L
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.17 mg/L
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.29 mg/L

### 2.5 Ανάπτυξη σε petri με χρώση Nile Blue

Αρχικά πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων σε τρυβλία petri με τη χρήση της χρωστικής ουσίας Nile Blue A (Spiekermann et al. 1999). Η χρωστική αυτή αποτελεί μια λιπόφιλη ουσία η οποία διαλύθηκε σε οργανικό διαλύτη (dimethylsulfoxide (DMSO)) πριν την προσθήκη της στο θρεπτικό μέσο. Τα petri αφού εμβολιάστηκαν αφέθηκαν για επώαση για 96 ώρες σε στατικό επωαστήριο και σε θερμοκρασία 25 – 30 °C ανάλογα με το βακτηριακό στέλεχος. Ακολούθως, έγινε παρατήρηση υπό υπεριώδες φως στα 312 nm.

### 2.6 Ζυμώσεις υγρής κατάστασης σε κωνικές φιάλες

Η επόμενη σειρά πειραμάτων έλαβε χώρα σε κωνικές φιάλες των 250 mL με ενεργό όγκο 50 mL. Ο όγκος του εμβολίου ήταν 2% v/v και η αρχική τιμή pH 6.8-7.3 (ανάλογα με το βακτηριακό στέλεχος) ενώ η ρύθμιση της τιμής pH κατά τη διάρκεια της ζύμωσης γινόταν χειροκίνητα είτε με προσθήκη βάσεως (NaOH 5M) είτε οξέος (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10% v/v). Η επώαση έλαβε χώρα σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο στις 180 rpm και σε θερμοκρασία από 26 – 37 °C (ανάλογα το βακτηριακό στέλεχος). Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και ανά τακτά χρονικά διαστήματα γινόταν λήψη δείγματος και στη συνέχεια η ανάλυση του, για την παρακολούθηση της εξέλιξης της ζύμωσης. Οι αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν περιγράφονται στην ενότητα 2.8.

Όλες οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν με σκοπό την επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων.

## **2.7 Ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα**

Στο τέλος των πειραμάτων, πραγματοποιήθηκε μια ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα σε συνθήκες ημιδιαλείποντος έργου με σκοπό την αύξηση της παραγωγής των PHAs. Η ζύμωση πραγματοποιήθηκε σε βιοαντιδραστήρα όγκου 1 L, ενεργού όγκου 800 mL με όγκο εμβολίου 10% v/v, από προκαλλιέργεια 14 ωρών. Ο βιοαντιδραστήρας διέθετε ηλεκτρόδιο μέτρησης pH και διαλυτού οξυγόνου, θερμόμετρο και εξωτερικό θερμικό μανδύα για ρύθμιση της θερμοκρασίας, είσοδο και έξοδο αερισμού, μηχανικό αναδευτήρα, αντλίες και υποδοχή για δειγματοληψία. Η θερμοκρασία επώασης ήταν 28 °C και η τιμή του pH διατηρούταν στο εύρος 7.0 – 7.5 με την προσθήκη είτε βάσης (NaOH 5M) είτε οξέος (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10% v/v) μέσω των αντλιών. Το ηλεκτρόδιο του pH βαθμονομήθηκε με πρότυπα διαλύματα γνωστής τιμής pH. Ο αερισμός ρυθμίστηκε στο 1 vvm, η ανάδευση ορίστηκε στις 200 rpm ενώ ήταν συνδεδεμένη με την τιμή του διαλυτού οξυγόνου ώστε ο κορεσμός σε οξυγόνο στο θρεπτικό μέσο να μη μειωθεί λιγότερο από 20%. Το ηλεκτρόδιο του οξυγονόμετρου βαθμονομήθηκε πριν τον εμβολιασμό. Πριν την έναρξη του πειράματος, ο βιοαντιδραστήρας αποστειρώθηκε σε αυτόκλειστο για την εξασφάλιση στείρων συνθηκών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και ανά τακτά χρονικά διαστήματα (2 - 4 ώρες) πραγματοποιούταν δειγματοληψία με σκοπό την παρακολούθηση της ζύμωσης. Οι αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν περιγράφονται στην ενότητα 2.8.



**Εικόνα 2.1 :** Βιοαντιδραστήρας

## **2.8 Αναλυτικές μέθοδοι**

### **2.8.1 Προσδιορισμός βιομάζας**

Ο προσδιορισμός της βιομάζας γινόταν είτε άμεσα, με μέτρηση του ξηρού βάρους είτε έμμεσα, μέσω της οπτικής πυκνότητας. Για τη μέτρηση του ξηρού βάρους, 2 mL δείγματος φυγοκεντρήθηκε στις 9000 rpm για 5-6 min με σκοπό το διαχωρισμό του υπερκείμενου υγρού από τα κύτταρα. Στα πειράματα όπου το υπόστρωμα ήταν απόβλητο μαγειρικό έλαιο (τηγανόλαδο) η βιομάζα ξεπλύθηκε με οργανικό διαλύτη (εξάνιο), με σκοπό την απομάκρυνση του εναπομείναντος υποστρώματος, ενώ στα υπόλοιπα πειράματα η βιομάζα ξεπλύθηκε με νερό, και ακολούθησε φυγοκέντρηση. Τέλος, το ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε σε ακετόνη, μεταφέρθηκε σε προζυγισμένη φιάλη McCartney (14 mL) και τοποθετήθηκε σε

φούρνο στους 50 – 60 °C μέχρις ότου να σταθεροποιηθεί το βάρος της φιάλης. Το ξηρό βάρος σε g/L προκύπτει από την παρακάτω σχέση:

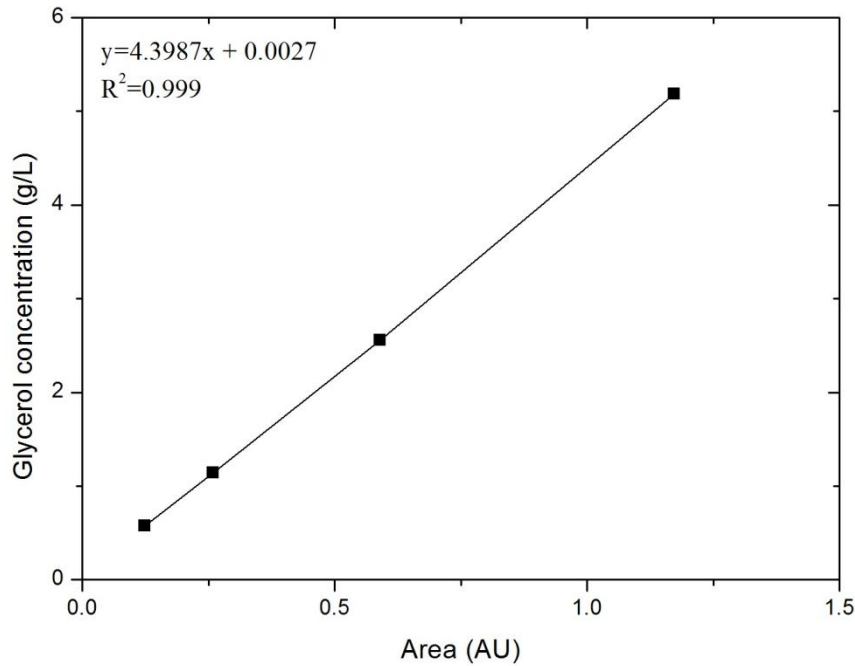
$$\text{Ξηρό βάρος (g/L)} = \frac{\text{βάρος φιάλης μετά την ξήρανση (g)} - \text{αρχικό βάρος φιάλης(g)}}{\text{όγκος δείγματος (L)}}$$

Για τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας μια μικρή ποσότητα δείγματος φωτομετρήθηκε σε φασματοφωτόμετρο (U-2000, Spectrophotometer, Hitachi) στα 650 nm. Η αύξηση της οπτικής πυκνότητας εξέφραζε την αύξηση της βιομάζας. Η φωτομετρική μέθοδος ήταν πολύ πιο άμεση και χρησιμοποιήθηκε για τη γρήγορη εκτίμηση της ανάπτυξης της βιομάζας και τον έλεγχο της ζύμωσης.

### **2.8.2 Προσδιορισμός συγκέντρωσης γλυκερόλης**

Η συγκέντρωση της γλυκερόλης στα πειράματα που διεξήχθησαν προσδιορίστηκε μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC, Waters 600E). Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της γλυκερόλης χρησιμοποιήθηκε το υπερκείμενο υγρό από το εκάστοτε δείγμα το οποίο υπέστη κατάλληλη αραιώση ώστε να είναι εντός της καμπύλης βαθμονόμησης και στη συνέχεια φιλτράρισμα μέσω φίλτρου Whatman με διάμετρο πόρου 0.2μm. Η καμπύλη βαθμονόμησης παρουσιάζεται στο διάγραμμα 2.1. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> με ροή 0.6 mL/min, σε θερμοκρασία φούρνου 65 °C. Για το διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκε η στήλη χρωματογραφίας Aminex HPX-87H (300 mm x 7.8 mm, Bio Rad, CA), ενώ ο όγκος κάθε ένεσης ήταν 20μL.





**Διάγραμμα 2.1 :** Καμπύλη βαθμονόμησης γλυκερόλης

### 2.8.3 Προσδιορισμός συγκέντρωσης απόβλητου μαγειρικού ελαίου

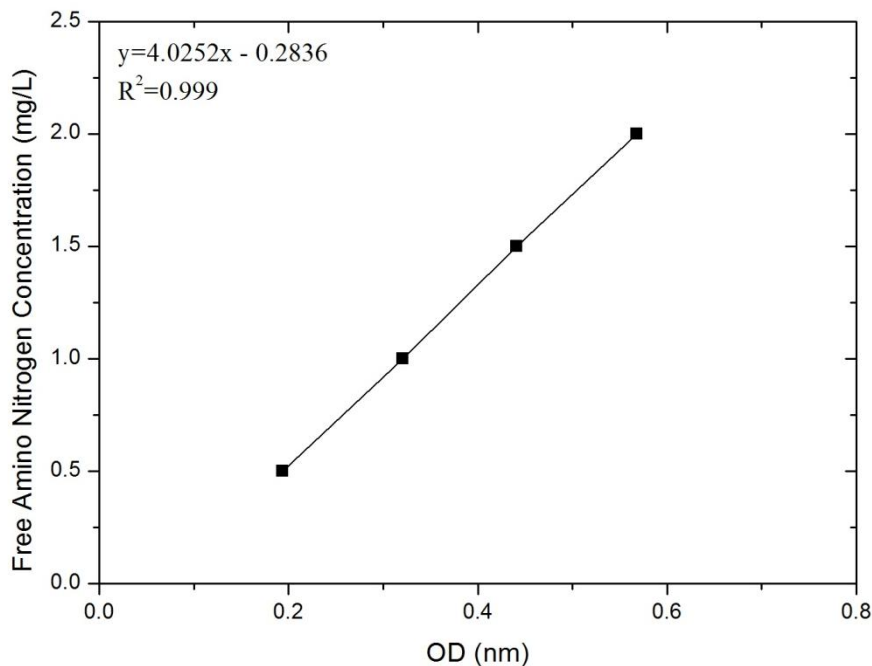
Για τον προσδιορισμό του εναπομείναντος ελαίου μετά το πέρας της ζύμωσης χρησιμοποιήθηκε εκχύλιση υγρού – υγρού με οργανικούς διαλύτες όπως περιγράφεται από τους [Papanikolaou et al. 2011](#). Αρχικά χρησιμοποιήθηκε εξάνιο (πρώτη εκχύλιση) και στη συνέχεια χλωροφόρμιο (δεύτερη και τρίτη εκχύλιση). Για 50 mL υπερκείμενου υγρού χρησιμοποιήθηκαν 40 mL διαλύτη. Στη συνέχεια έγινε αφαίρεση της υγρασίας από το μίγμα των διαλυτών με χρήση κατάλληλης ποσότητας άνυδρου θειώδες νατρίου ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ). Αφού το μίγμα φιλτραρίστηκε ώστε να απομακρυνθούν τα στερεά, μεταφέρθηκε σε προζυγισμένη φιάλη και ακολούθησε εξάτμιση σε περιστροφικό εξατμιστήρα. Το εναπομείναν λάδι στη φιάλη ζυγίστηκε σε ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων και εκφράστηκε σε g/L.

#### 2.8.4 Προσδιορισμός συγκέντρωσης αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN)

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (Free Amino Nitrogen, FAN) είναι η φωτομετρική μέθοδος της νινυδρίνης (Lie, 1973). Σε δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκε 1 mL κατάλληλα αραιωμένου δείγματος και 0.5 mL αντιδραστηρίου χρώσης (color reagent). Οι δοκιμαστικοί σωλήνες μετά από έντονη ανακίνηση (vortex) πωματίστηκαν και αφήθηκαν για επώαση σε υδατόλουτρο στους 100 °C για 16 λεπτά. Στη συνέχεια ακολούθησε ψύξη σε νερό στους 20 °C για 20 λεπτά, προσθήκη 2,5 mL αντιδραστηρίου αραιώσης (dilution reagent) και έντονη ανακίνηση (vortex) έως ότου αλλάξει το χρώμα. Τέλος, έγινε μέτρηση της οπτικής απορρόφησης σε φασματοφωτόμετρο (U-2000, Spectrophotometer, Hitachi) στα 570 nm. Όλα τα δείγματα παρασκευάστηκαν εις διπλούν για να υπάρχει επαναληψιμότητα. Επιπρόσθετα παρασκευάστηκε και ένα τυφλό δείγμα στο οποίο προστέθηκε 1 mL νερό για το μηδενισμό του φωτόμετρου. Για την καμπύλη βαθμονόμησης (διάγραμμα 2.2) χρησιμοποιήθηκαν διάφορες αραιώσεις πρότυπου διαλύματος γλυκίνης και ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία. Αναλυτικά η σύσταση των αντιδραστηρίων φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2.4).

**Πίνακας 2.4 :** Αντιδραστήρια μεθόδου FAN

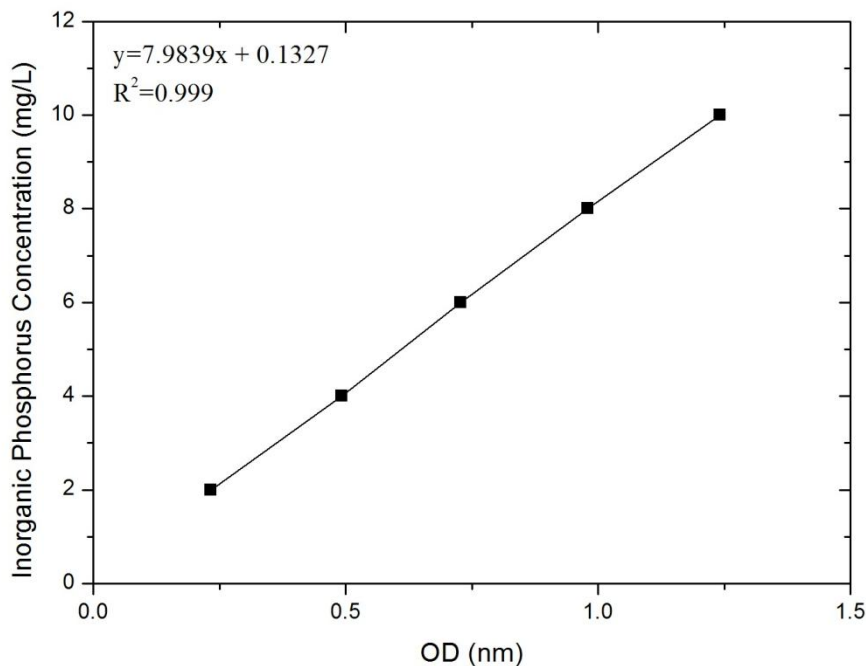
Αντιδραστήρια	Σύσταση
Αντιδραστήριο χρώσης - Color reagent	49.71 g όξινο φωσφορικό δινάτριο ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 5 g νινυδρίνη 3 g φρουκτόζη 60 g όξινο διφωσφορικό κάλιο ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) Διαλυμένα σε 1 L απεσταγμένο νερό
Αντιδραστήριο αραιώσης – Dilution reagent	2 g ιωδικού καλίου ( $\text{KIO}_3$ ) σε 616 mL απεσταγμένο νερό και 384 mL αιθανόλης (καθαρότητας 100%)
Διάλυμα γλυκίνης	0.1072 g γλυκίνης σε 100 mL απεσταγμένο νερό



**Διάγραμμα 2.2 :** Καμπύλη βαθμονόμησης FAN

### 2.8.5 Προσδιορισμός συγκέντρωσης ανόργανου φωσφόρου ( IP)

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του ανόργανου φωσφόρου (IP) ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία. Αρχικά παρασκευάστηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα δείγμα με κατάλληλη αραιώση σε τελικό όγκο 5 mL και προστέθηκαν 0.4 mL 60 % v/v υπερχλωρικού οξέος και ακολούθησε ανακίνηση (vortex) για 20 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια προστέθηκαν 0.3 mL διαλύματος 1% w/v ασκορβικού οξέος και ακολούθησε ανακίνηση (vortex) για 20 δευτερόλεπτα. Τέλος προστέθηκαν 0.4 mL διαλύματος 5 % w/v αμμωνιακού μολύβδου και ακολούθησε ανακίνηση (vortex) για 20 δευτερόλεπτα. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες αφέθηκαν για 10 λεπτά ώστε να αναπτυχθεί μπλε χρώμα και έπειτα ακολούθησε μέτρηση οπτικής απορρόφησης σε φασματοφωτόμετρο (U-2000, Spectrophotometer, Hitachi) στα 730 nm. Όλα τα δείγματα παρασκευάστηκαν εις διπλούν για να υπάρχει επαναληψιμότητα. Επιπρόσθετα παρασκευάστηκε και ένα τυφλό δείγμα στο οποίο προστέθηκαν 5 mL νερό για το μηδενισμό του φωτόμετρου. Για την καμπύλη βαθμονόμησης (διάγραμμα 2.3) χρησιμοποιήθηκαν διάφορες αραιώσεις πρότυπου διαλύματος  $K_2HPO_4$  και ακολούθησε η ίδια διαδικασία.



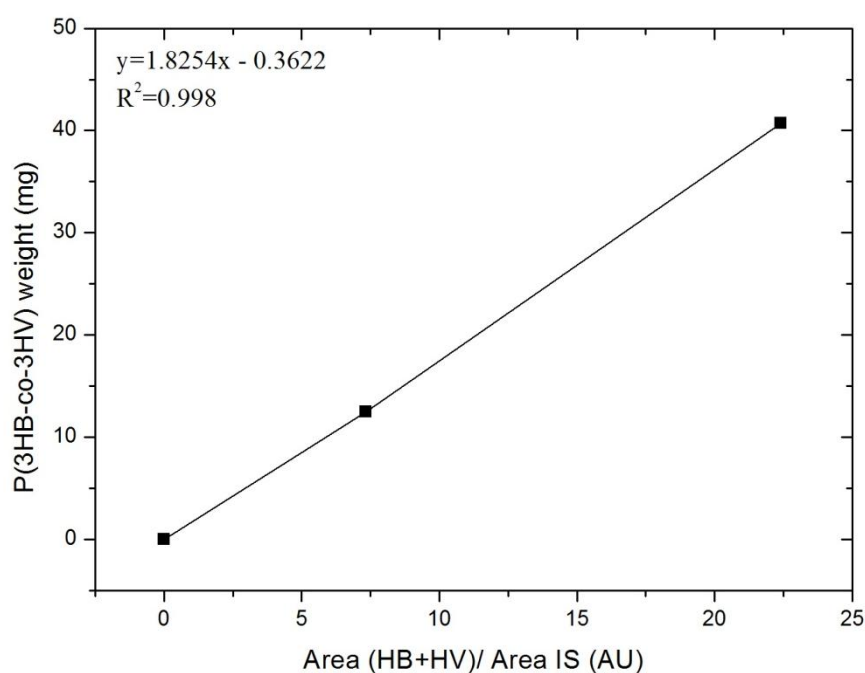
**Διάγραμμα 2.3 :** Καμπύλη βαθμονόμησης IP

### 2.8.6 Προσδιορισμός συγκέντρωσης PHAs

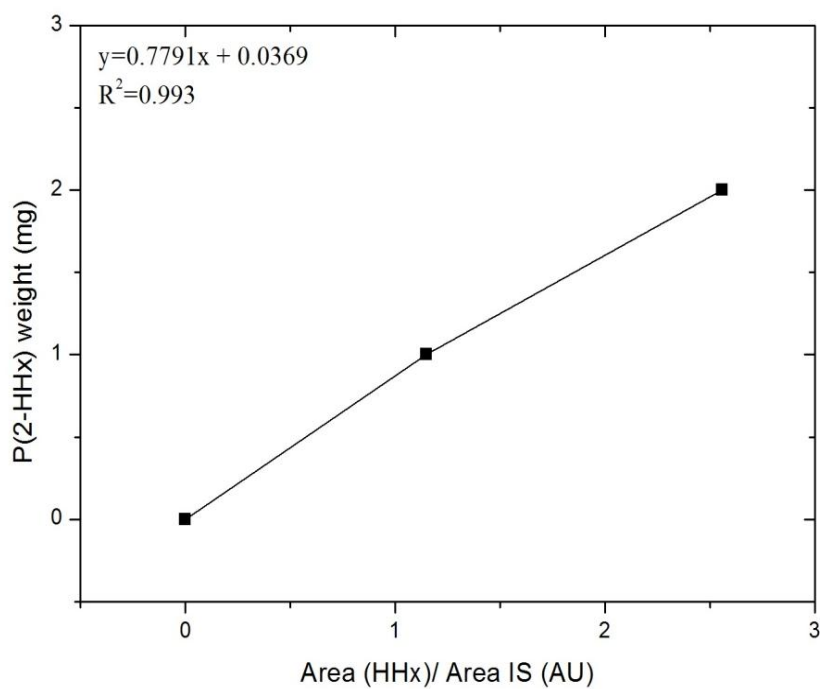
Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των PHAs χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των Brandl et al. 1988, ελαφρώς τροποποιημένη, η οποία στηρίζεται στην παραγωγή των ενδοκυτταρικών PHAs στους αντίστοιχους υδροξυκαρβοξυλικούς μεθυλεστέρες με τη διαδικασία της μεθανόλυσης. Αναλυτικότερα, σε γυάλινο περιέκτη τοποθετήθηκε η ξηρή βιομάζα και προστέθηκαν 1 mL χλωροφόρμιο, 0.85 mL μεθανόλη, 0.15 mL θειϊκό οξύ ( $H_2SO_4$ ) και 200μL βενζοϊκό οξύ (200 mg / L) ως εσωτερικό πρότυπο. Ο περιέκτης, αφού κλείστηκε ερμητικά, μεταφέρθηκε σε υδατόλουτρο στους 100 °C για 140 λεπτά. Μετά το πέρας της αντίδρασης προστέθηκε 0.5 mL απεσταγμένο νερό και ακολούθησε έντονη ανακίνηση (vortex) για ένα λεπτό. Στη συνέχεια ο περιέκτης αφέθηκε σε ηρεμία ώστε να διαχωριστούν οι φάσεις. Η κάτω φάση είναι η οργανική φάση, η οποία μεταφέρθηκε ποσοτικά σε φιαλίδια κατάλληλα για χρήση στον αέριο χρωματογράφο.

Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε αέριο χρωματογράφο (Fisons 8060) με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (FID) και τριχοειδή στήλη Agilent DB-Wax (30m × 0.25 mm, 0.25um film). Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε το ήλιο με ροή 2 mL/min. Το

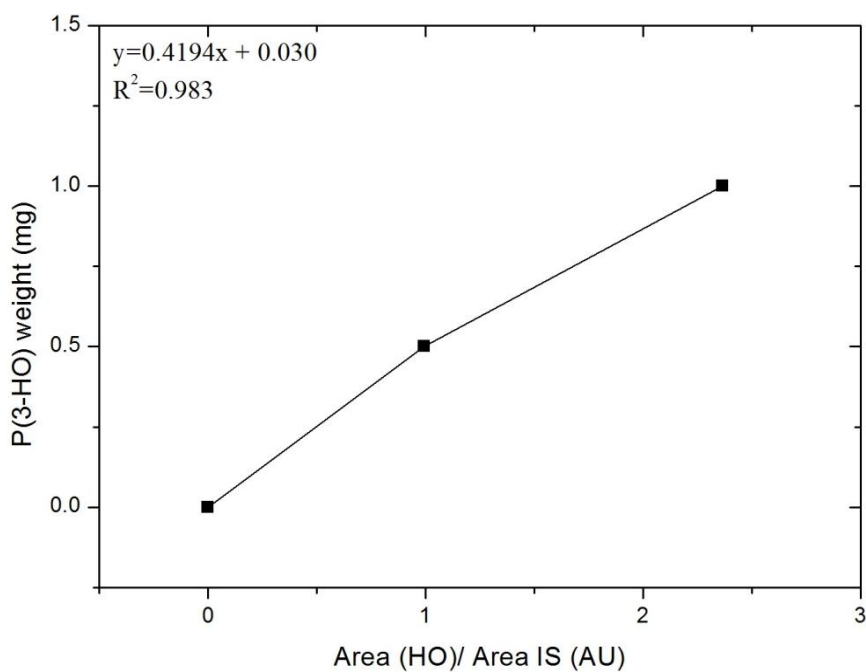
θερμοκρασιακό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το ακόλουθο: η αρχική θερμοκρασία του φούρνου ορίστηκε στους 80 °C και στη συνέχεια η θερμοκρασία του φούρνου αυξήθηκε με ρυθμό 6.6 °C / min μέχρι τους 240 °C, όπου και παρέμεινε για 10 λεπτά. Η θερμοκρασία του εισαγωγέα και του ανιχνευτή ήταν σταθερή στους 250 °C. Για την ποσοτικοποίηση των κορυφών των PHAs παρασκευάστηκαν με την ανωτέρω διαδικασία πρότυπα δείγματα εμπορικών PHAs με γνωστή συγκέντρωση χρησιμοποιώντας το συμπολυμερές πολυ(3-υδροξυβουτυρικό-co-3-υδροξυβαλερικό), και τα μονομερή 3-υδροξυ-εξανοϊκό, 3-υδροξυ-οκτανοϊκό, 3-υδροξυ-δεκανοϊκό και 3-υδροξυ-δωδεκανοϊκό. Οι καμπύλες βαθμονόμησης όπως αυτές προέκυψαν έπειτα από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων παρατίθενται στη συνέχεια (Διαγράμματα 2.4 – 2.8).



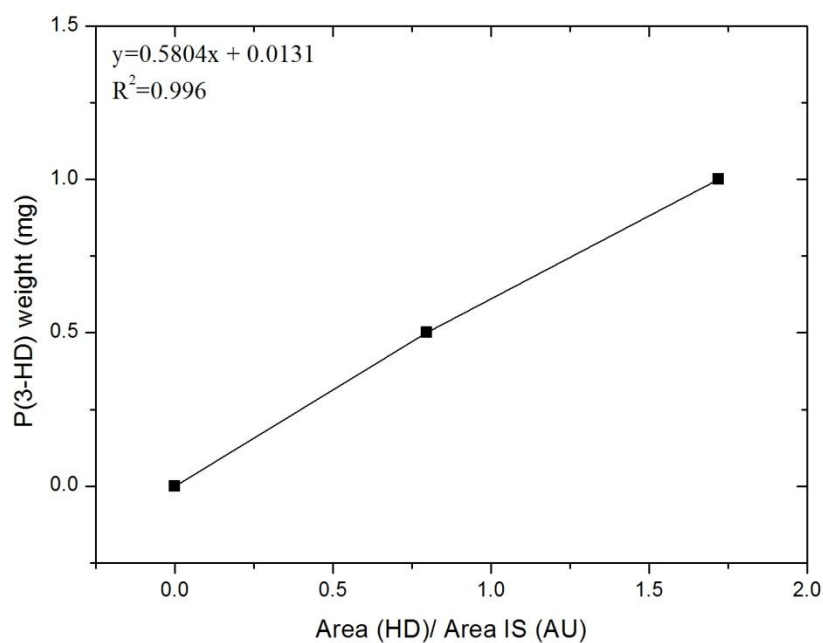
**Διάγραμμα 2.4 :** Καμπύλη βαθμονόμησης P(3HB-co-3HV) με εσωτερικό πρότυπο βενζοϊκό οξύ



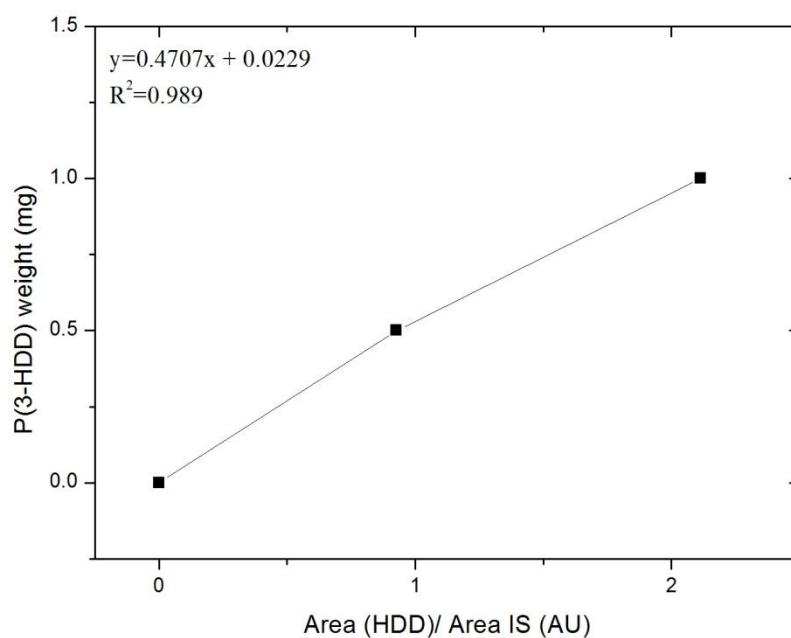
**Διάγραμμα 2.5 :** Καμπύλη βαθμονόμησης 3-υδροξυ-εξανοϊκού (C6) με εσωτερικό πρότυπο βενζοϊκό οξύ



**Διάγραμμα 2.6 :** Καμπύλη βαθμονόμησης 3-υδροξυ-οκτανοϊκού (C8) με εσωτερικό πρότυπο βενζοϊκό οξύ



**Διάγραμμα 2.7 :** Καμπύλη βαθμονόμησης 3-υδροξυ-δεκανοϊκού (C10) με εσωτερικό πρότυπο βενζοϊκό οξύ



**Διάγραμμα 2.8 :** Καμπύλη βαθμονόμησης 3-υδροξυ-δωδεκανοϊκού (C12) με εσωτερικό πρότυπο βενζοϊκό οξύ

### 2.8.7 Μέθοδος εξαγωγής ενδοκυτταρικού PHA

Για την ανάκτηση των PHAs ακολουθήθηκε η μέθοδος των [Hahn et al. 1999](#) με κάποιες διαφοροποιήσεις. Αναλυτικότερα, μετά το τέλος της ζύμωσης η βιομάζα διαχωρίστηκε από το υγρό μέσω φυγοκέντρωσης στις 9,000 rpm για 15 λεπτά στους 4 °C. Στη συνέχεια η βιομάζα ξεπλύθηκε με νερό και λυοφιλοποιήθηκε. Για κάθε γραμμάριο λυοφιλοποιημένων κυττάρων προστέθηκαν 30 mL χλωροφορμίου και 30 mL υδατικού διαλύματος υποχλωριώδους νατρίου (20 % v/v). Το μίγμα αυτό τοποθετήθηκε σε ανακινούμενο θάλαμο στις 150 rpm σε θερμοκρασία δωματίου για 120 λεπτά. Έπειτα ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 9,000 rpm για 10 λεπτά και το μίγμα διαχωρίστηκε σε τρεις φάσεις. Στην επάνω φάση ήταν το υδατικό διάλυμα του υποχλωριώδους νατρίου, στην ενδιάμεση φάση ήταν τα λυμένα κύτταρα και στην κάτω φάση ήταν το χλωροφόρμιο μέσα στο οποίο ήταν δεσμευμένο το βιοπολυμερές. Αφού αφαιρέθηκε η επάνω φάση με χρήση πιπέτας, στη συνέχεια το υπόλοιπο μίγμα αφέθηκε να διαχωριστεί σε χοάνη διαχωρισμού. Η κάτω φάση συλλέχθηκε και φιλτραρίστηκε με φίλτρο διαμέτρου πόρου 25mm. Η ανάκτηση των PHAs έγινε μέσω κατακρήμνισης με παγωμένη μεθανόλη.

### 2.8.8 Προσδιορισμός βιο-επιφανειοδραστικών ουσιών

Για τον προσδιορισμό των βιο-επιφανειοδραστικών ουσιών χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις μέθοδοι ([Alvarez et al. 2015](#)). Αρχικά χρησιμοποιήθηκε μια δοκιμασία για τον προσδιορισμό του δείκτη γαλακτωματοποίησης (emulsification index ( $E_{24}$ )). Για τη δοκιμασία αυτή κάθε στέλεχος αναπτύχθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα με θρεπτικό μέσο 5 mL TSB (Ενότητα 2.1.1) και αφέθηκε για επώαση στους 32 °C για 48 ώρες. Μετά το πέρας της επώασης έγινε φυγοκέντρωση στις 16,200 rpm για 20 λεπτά και 200  $\mu$ L από το υπερκείμενο υγρό μεταφέρθηκαν σε erpendorf των 2 mL και αραιώθηκαν με 800  $\mu$ L αποστειρωμένου νερού. Στη συνέχεια προστέθηκε 1 mL ν-εξαδεκάνιο και ακολούθησε έντονη ανακίνηση (vortex) για 2 λεπτά. Έπειτα τα erpendorf έμειναν σταθερά για 24 ώρες ώστε να αναπτυχθεί το γαλάκτωμα. Ο δείκτης γαλακτωματοποίησης ( $E_{24}$ ) υπολογίζεται ως εξής:



$$E_{24} = \frac{\text{ύψος γαλακτώματος (mm)}}{\text{συνολικό ύψος υγρού (mm)}} \cdot 100\%$$

Τα στελέχη που εμφάνισαν δείκτη γαλακτωματοποίησης ( $E_{24}$ ) μεγαλύτερο από 30 % χρησιμοποιήθηκαν για περαιτέρω μελέτη.

Η επόμενη δοκιμασία που διεξήχθη ήταν η ικανότητα αιμόλυσης (hemolytic assay). Για τον προσδιορισμό της ικανότητας αυτής χρησιμοποιήθηκε ποσότητα ίση με 5  $\mu\text{L}$  από το προαναφερθέν υπερκείμενο υγρό και εμβολιάστηκε σε petri με 5 % αίματος προβάτου και άγαρ ως θρεπτικό υπόστρωμα και αφέθηκε για επώαση στους 32 °C για 48 ώρες. Το τεστ ήταν θετικό αν σχηματιζόταν ένας διάφανος κύκλος γύρω από τις αποικίες.

Έπειτα πραγματοποιήθηκε μια δοκιμασία με σκοπό τον προσδιορισμό της ικανότητας συγκράτησης σταγόνας (Drop collapse test). Αναλυτικότερα, 10  $\mu\text{L}$  από το προαναφερθέν υπερκείμενο υγρό αφέθηκαν να πέσουν σε γυάλινη επιφάνεια καλυμμένη με λάδι. Εάν στο υπερκείμενο υγρό περιέχονταν επιφανειοδραστικές ουσίες, η σταγόνα επεκτεινόταν. Για αρνητικό έλεγχο χρησιμοποιήθηκαν 10  $\mu\text{L}$  αποστειρωμένου TSB (ενότητα 2.1.1) όπου σε αυτή την περίπτωση οι σταγόνες έμεναν ανέπαφες.

Στην τελευταία δοκιμασία που πραγματοποιήθηκε εξετάστηκε η επίδραση των επιφανειοδραστικών ουσιών στη μετατόπιση του ελαίου (Oil displacement test). Για τη δοκιμασία αυτή ένα petri πληρώθηκε με 50 mL απεσταγμένου νερού και 20  $\mu\text{L}$  ελαίου με σκοπό τη δημιουργία ενός άπολου λεπτού στρώματος λαδιού στην επιφάνεια. Στη συνέχεια προστέθηκαν 10  $\mu\text{L}$  από το προαναφερθέν υπερκείμενο υγρό. Για θετικό έλεγχο χρησιμοποιήθηκαν 10  $\mu\text{L}$  10% SDS (sodium dodecyl sulfate) και για αρνητικό έλεγχο 10  $\mu\text{L}$  αποστειρωμένου TSB (ενότητα 2.1.1) Στην περίπτωση του θετικού ελέγχου οι επιφανειοδραστικές ουσίες δρουν επί της διεπιφάνειας και σχηματίζεται ένα στεφάνι και το λάδι συσσωρεύεται περιμετρικά του τοιχώματος του petri.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### Αποτελέσματα

#### 3.1 Μελέτη ικανότητας παραγωγής PHAs σε στερεό θρεπτικό μέσο

Αρχικά μελετήθηκε η ικανότητα παραγωγής πολυ-υδροξυαλκανοϊκών εστέρων των εξεταζόμενων βακτηρίων (Πίνακας 2.1). Η επιλογή των βακτηρίων έγινε με τη μέθοδο της χρώσης Nile Blue (Spiekermann et al. 1999) σε τρυβλία petri. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται ευρέως για την επιλογή μικροοργανισμών που έχουν απομονωθεί. Οι Teeka et al. 2010 χρησιμοποίησαν αυτή τη μέθοδο για την επιλογή των παραγωγών στελεχών PHAs που απομονώθηκαν από το έδαφος και οι Ramachandran et al. 2010 παρατήρησαν τις αποικίες που αναπτύχθηκαν σε πλούσιο θρεπτικό μέσο υπό το υπεριώδες φως (UV) και η ύπαρξη φθορισμού υποδείκνυε την ύπαρξη βακτηρίων που παράγουν PHAs.

Στην παρούσα μελέτη, αρχικά χρησιμοποιήθηκε ένα απλό υπόστρωμα για να εξασφαλιστεί η ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Το εν λόγω θρεπτικό είχε σύσταση σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.1).

**Πίνακας 3.1 :** Σύσταση θρεπτικού μέσου (Bhuwal et al. 2013)

Θρεπτικά συστατικά	Συγκέντρωση
Γλυκόζη	10 g/L
Εκχύλισμα κρέατος (meat extract)	3 g/L
Πεπτόνη	5 g/L
Χλωριούχο νάτριο (NaCl)	8 g/L
Άγαρ	15 g/L
Nile blue A	0.5 µg/ml

Τα στελέχη που παρήγαγαν PHAs φθόρισαν παρουσιάζοντας έντονο μπλε χρώμα και παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.2.). Για λόγους συντομίας στα στελέχη θα αναφέρονται με τον κωδικό FMCC (Πίνακας 2.1).

**Πίνακας 3.2 :** Στελέχη που φθόρισαν σε υπόστρωμα με οργανικό άζωτο

Θερμοκρασία επώασης	Στέλεχος
30 °C	B1, B28, B33, B37, B39, B46, B47, B48, B49, B74, B93, B107, B151
25 °C	B34, B44, B51, B85, B101, B102, B108, B150, B154, B155, B209, B210, B211, B218

Εν συνεχεία τα στελέχη που φθόρισαν αναπτύχθηκαν εκ νέου σε τρυβλία petri με χρώση Nile Blue αλλά με διαφορετικό υπόστρωμα. Σε αυτό το πείραμα το θρεπτικό μέσο ήταν περιοριστικό σε άζωτο και ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκε γλυκερόλη και ελαιόλαδο. Επιπρόσθετα ενισχύθηκε με μίγμα ιχνοστοιχείων (Πίνακας 2.3). Αναλυτικά η σύσταση του μέσου φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.3).

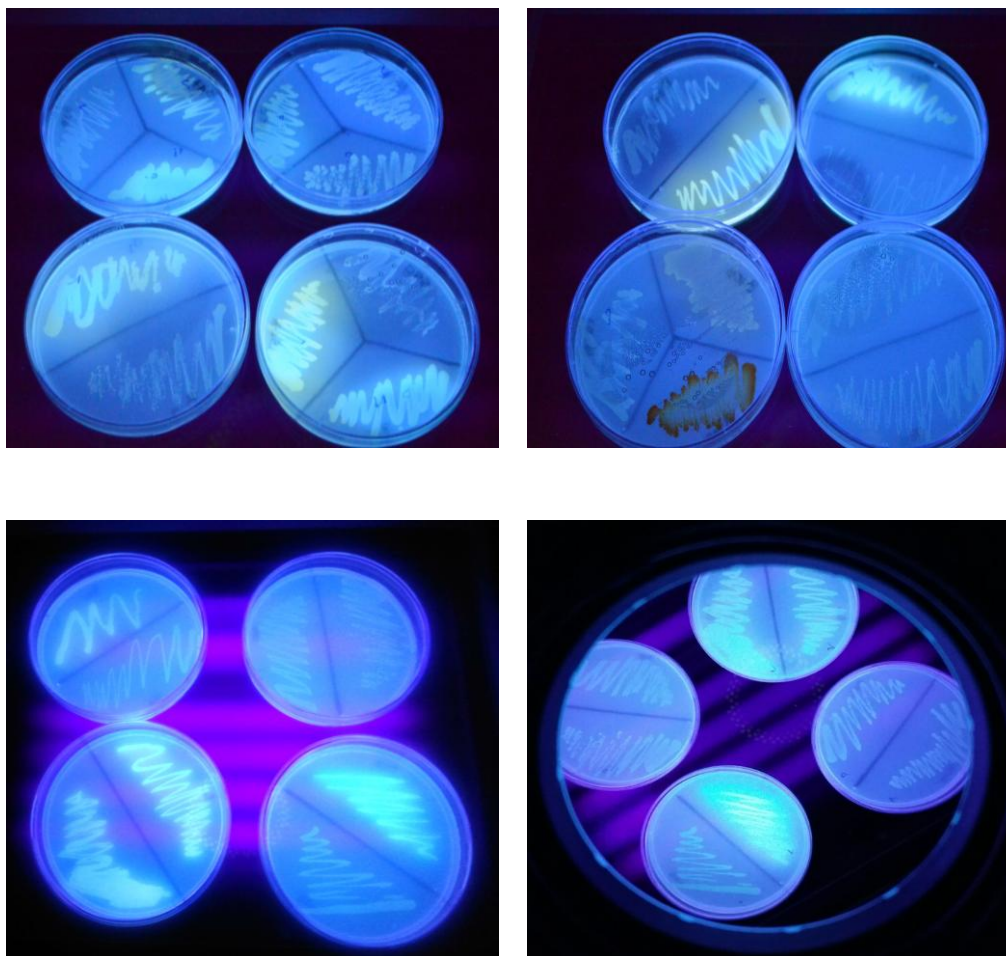
**Πίνακας 3.3 :** Σύσταση θρεπτικού μέσου (Chaudhry et al. 2011)

Θρεπτικά συστατικά	Συγκέντρωση
Γλυκερόλη / Ελαιόλαδο	20 g/L
Θειικό αμμώνιο ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	2 g/L
Δισόξινο φωσφορικό κάλιο (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	13.3 g/L
Θειικό μαγνήσιο (MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	1.2 g/L
κιτρικό οξύ	1.7 g/L
Nile blue A	0.5 µg/ml
Άγαρ	20 g/L

Στην περίπτωση αυτή το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν περιοριστικό σε άζωτο δεδομένου ότι η σύνθεση των PHAs παρατηρείται όταν το υπόστρωμα καθίσταται περιοριστικό σε κάποιο στοιχείο, όπως το άζωτο ή ο φώσφορος. Τα στελέχη που παρήγαγαν PHAs παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.4). Τέλος στην εικόνα 3.1 παρουσιάζονται ενδεικτικά κάποιες φωτογραφίες από τα στελέχη που φθόρισαν .

**Πίνακας 3.4 :** Στελέχη που φθόρισαν σε υπόστρωμα με ανόργανο άζωτο και ως πηγή άνθρακα γλυκερόλη και ελαιόλαδο

Θερμοκρασία επώασης	Στέλεχος
30 °C	B1, B28, B33, B37, B46, B49, B93, B151
25 °C	B34, B44 ,B51 ,B85 , B150, B154, B155, B209, B210, B211, B218



**Εικόνα 3.1 :** Φθορισμός στελεχών υπό υπεριώδες φως (UV)

### 3.2 Μελέτη ικανότητας παραγωγής PHAs σε ζύμωση υγρής κατάστασης

Στο επόμενο στάδιο της πειραματικής μελέτης, τα στελέχη που επιλέχθηκαν βάσει της ικανότητας φθορισμού (Πίνακας 3.4) αναπτύχθηκαν σε υγρές καλλιέργειες, ώστε να εξεταστεί λεπτομερώς η δυνατότητα παραγωγής PHAs, και ειδικότερα μεσαίου μήκους αλυσού PHAs (medium chain length, mcl-PHAs). Ακόμη, σε υγρές καλλιέργειες αναπτύχθηκαν και τα εμπορικά στελέχη που ανήκουν στη συλλογή της

DSMZ. Το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε φαίνεται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.5). Ακόμη, το συνθετικό θρεπτικό μέσο ενισχύθηκε με μίγμα ιχνοστοιχείων (Πίνακας 2.3)

**Πίνακας 3.5 :** Σύσταση θρεπτικού μέσου (Chaudhry et al. 2011)

Θρεπτικά συστατικά	Συγκέντρωση
Ακάθαρτη γλυκερόλη (92.4 %)	20 g/L
Θειικό αμμώνιο ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	2 g/L
Δισόξινο φωσφορικό κάλιο (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	13.3 g/L
Θειικό μαγνήσιο (MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	1.2 g/L
κιτρικό οξύ	1.7 g/L

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του πειράματος χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα τη γλυκερόλη. Η τιμή της κατανάλωσης του υποστρώματος και ο συντελεστής απόδοσης αντιστοιχούν στην τιμή της μέγιστης βιομάζας που παρατηρήθηκε κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Η αρχική συγκέντρωση του υποστρώματος ήταν 20 g/L

**Πίνακας 3.6 :** Αποτελέσματα γλυκερόλης

Στέλεχος (FMCC)	Χρόνος επώασης T <sub>f</sub> (h)	Μέγιστο συνολικό ξηρό βάρος TDW <sub>max</sub> (g/L)	Κατανάλωση υποστρώματος S (g/L)	Συντελεστής απόδοσης Y <sub>X/S</sub> (g/g)
B1	56	7.1	15.4	0.46
B28	56	5.2	14.5	0.35
B33	56	6.5	16.09	0.40
B37	76	6.9	17.03	0.40
B46	76	7.4	16.5	0.44
B49	56	6.6	14.05	0.46
B93	56	2.5	12.94	0.19
B151	76	5.0	16.61	0.30
B34	80	4.8	18.36	0.22
B44	80	3.1	17.64	0.17

B51	80	7.3	18.86	0.38
B85	80	5.0	18.94	0.22
B150	80	6.2	19.11	0.30
B154	80	6.5	19.97	0.32
B155	80	5.7	19.87	0.28
B209	80	4.6	17.09	0.27
B210	80	5.9	17.65	0.33
B211	80	5.5	17.41	0.32
B218	56	5.3	19.24	0.27

Από τον παραπάνω πίνακα είναι εμφανές ότι η κατανάλωση του υποστρώματος και ειδικότερα της γλυκερόλης ευνόησε την μικροβιακή αύξηση και την παραγωγή βιομάζας, ωστόσο δεν παρατηρήθηκε ενδοκυτταρική σύνθεση PHAs, όπως επιβεβαιώθηκε και από την ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο.

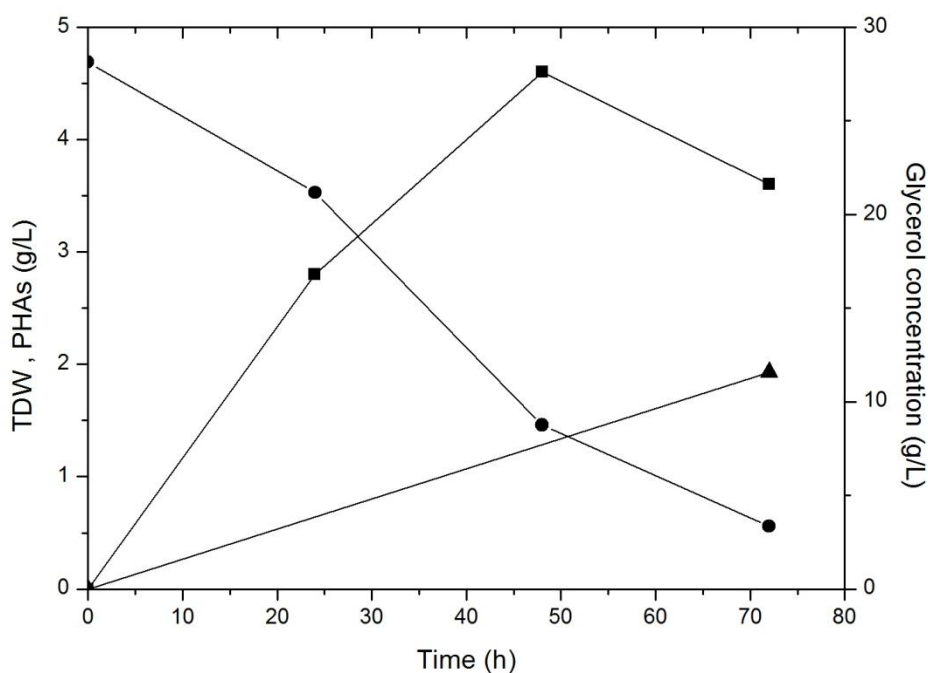
Όπως προαναφέρθηκε πραγματοποιήθηκαν υγρές καλλιέργειες με τα στελέχη της συλλογής DSMZ χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα τη γλυκερόλη και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.7. Εν συνεχεία παρουσιάζονται ενδεικτικά κινητικές από τα εμπορικά στελέχη υπό μορφή διαγραμμμάτων.

**Πίνακας 3.7 :** Αποτελέσματα γλυκερόλης εμπορικά στελέχη

Στέλεχος	Χρόνος επώασης T <sub>f</sub> (h)	Συνολικό ξηρό βάρος TDW (g/L)	PHAs (g/L)	Συγκέντρωση γλυκερόλης (g/L)
<i>P. chlororaphis</i> DSM50083	72	3.6	1.93	3.35
<i>P. resinovorans</i> DSM 21078	72	6.8	0.43	2.50
<i>P. citronellolis</i> DSM 50332	72	5.1	0.31	4.25
<i>P.putida</i> KT2440 ATCC 47054	72	5.8	1.32	2.06

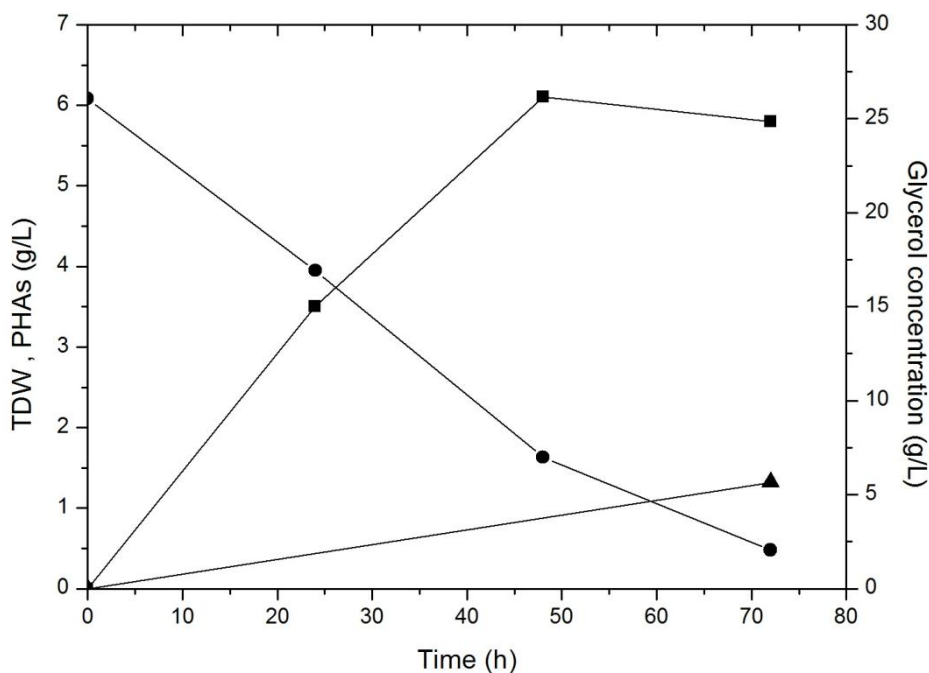
Στον παραπάνω πίνακα οι μετρήσεις για τη συγκέντρωση του συνολικού ξηρού βάρους, των PHAs και της γλυκερόλης αντιστοιχούν στις 72 h ζύμωσης. Ο μικροοργανισμός *P. resinovorans* DSM 21078 συσώρευσε 0.43 g/L PHAs που αντιστοιχούν σε σύσταση μονομερών C6 (22 %), C8 (12 %), C10 (32 %) και C12 (34

%). Αντίστοιχα ο μικροοργανισμός *P. citronellolis* DSM 50332 συσσωρεύσε 0.31 g/L PHAs που αντιστοιχεί σε σύσταση μονομερών C6 (32 %), C8 (6 %), C10 (9 %) και C12 (52 %). Αντίθετα οι μικροοργανισμοί *P. chlororaphis* DSM 50083 και *P.putida* KT2440 συσσωρεύσαν αρκετά μεγαλύτερη συγκέντρωση PHAs. Στη συνέχεια παρουσιάζεται η κινητική της ανάπτυξης των δυο αυτών μικροοργανισμών.



**Διάγραμμα 3.1 :** Στέλεχος *Pseudomonas chlororaphis* DSM 50083

Στο διάγραμμα 3.1 απεικονίζεται η κινητική της ανάπτυξης του στελέχους *P. chlororaphis* με υπόστρωμα τη γλυκερόλη αλλά και η παραγωγή PHAs. Όπως φαίνεται και στο παραπάνω διάγραμμα η μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας ήταν 4.6 g/L και επετεύχθη στις 48 h με αντίστοιχη κατανάλωση υποστρώματος 11.24 g/L και συντελεστή απόδοσης  $Y_{X/S}$  0.41 g/g. Η συγκέντρωση των PHAs ήταν 1.93 g/L αντιστοιχώντας σε ενδοκυτταρικό ποσοστό PHAs 42.54 %, με κύρια μονομερή τα C6 (15 %), C8 (9 %), C10 (27 %), C12 (49 %).



**Διάγραμμα 3.2 :** Στέλεχος *Pseudomonas putida* KT2440 ATCC 47054

Το παραπάνω διάγραμμα (Διάγραμμα 3.2) απεικονίζει την ανάπτυξη του στελέχους *P. putida* KT2440 σε υπόστρωμα γλυκερόλη. Στο εν λόγω διάγραμμα παρατηρείται εκθετική αύξηση ως τις 48 h όπου και επετεύχθη η μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας 6.1 g/L με αντίστοιχη κατανάλωση υποστρώματος 13.01 g/L και συντελεστή απόδοσης  $Y_{X/S}$  0.47 g/g. Όσον αφορά στη συγκέντρωση των PHAs ήταν 1.32 g/L η οποία αντιστοιχεί σε σύσταση μονομερών C8 (9%), C10 (49 %) και C12 (42 %). Οι [Poblete-Castro et al. 2014](#) στη μελέτη τους ανέπτυξαν τον μικροοργανισμό *P. putida* KT2440 με υπόστρωμα ακάθαρτη γλυκερόλη. Τα αποτελέσματα τους μοιάζουν αρκετά με αυτά της παρούσας μελέτης καθώς η συγκέντρωση των PHAs που επετεύχθη ήταν 1.43 g/L αντιστοιχώντας σε ενδοκυτταρικό ποσοστό PHAs C6 (0.83 %), C8 (16.2 %), C10 (74.6 %), C12 (8.9 %) και C14 (0.59 %).

Το επόμενο πείραμα διεξήχθη με σκοπό τη μελέτη της κατανάλωσης του απόβλητου μαγειρικού ελαίου αλλά και την δυνατότητα της παραγωγής mcl-PHAs. Το θρεπτικό υπόστρωμα είναι όμοιο με αυτό που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα με υπόστρωμα την ακάθαρτη γλυκερόλη (Πίνακας 3.8) με μόνη διαφοροποίηση στην πηγή άνθρακος όπου χρησιμοποιήθηκε απόβλητο μαγειρικό έλαιο με αρχική



συγκέντρωση 20 g/L. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του πειράματος.

**Πίνακας 3.8 :** Αποτελέσματα απόβλητου ελαίου μαγειρικής

Στέλεχος (FMCC)	Χρόνος επώασης T <sub>f</sub> (h)	Συνολικό ξηρό βάρος (TDW (g/L))	Υπόστρωμα στο τέλος της ζύμωσης (g/L)
B1	96	1.3	7.45
B28	96	1.7	8.22
B33	96	2.4	6.54
B37	96	0.5	13.8
B46	96	1.6	11.7
B49	96	0.8	12.94
B93	96	0.9	11.83
B151	96	1.8	9.11
B34	96	2.1	7.73
B44	96	2.5	6.42
B51	96	2.7	11.95
B85	96	2.4	8.69
B150	96	2.1	8.86
B154	96	2.2	11.42
B155	96	2.2	7.56
B209	96	1.2	9.65
B210	96	2.0	8.26
B211	96	2.6	7.13
B218	96	3.6	9.0

Εύκολα παρατηρείται από τον παραπάνω πίνακα ότι παρά την κατανάλωση ελαίου οι τιμές για τη συγκέντρωση της βιομάζας παρέμειναν χαμηλές σε όλα τα στελέχη. Πολλές μελέτες που αφορούν στα στελέχη του είδους *Pseudomonas sp.* (Du et al. 2012) έδειξαν ότι η συγκέντρωση της βιομάζας αλλά και των παραγόμενων PHAs κατά την ανάπτυξη μικροοργανισμών σε υπόστρωμα με φυτικά έλαια ως πηγή άνθρακα (όπως το φοινικέλαιο, το καλαμποκέλαιο και το ελαιόλαδο) κυμάνθηκαν σε χαμηλά επίπεδα (κάτω από 10 g/L). Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης είναι σύμφωνα με τη βιβλιογραφία καθώς κανένα από τα στελέχη της συλλογής FMCC δεν απέδωσε συγκέντρωση πάνω από 10 g/L.

Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκε και μια ζύμωση με το προαναφερθέν υπόστρωμα και πηγή άνθρακα το απόβλητο έλαιο μαγειρικής αλλά με την προσθήκη γαλακτωματοποιητή (Tween 80) με σκοπό την καλύτερη ομογενοποίηση του υποστρώματος. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.9) φαίνονται τα αποτελέσματα της προαναφερθείσας ζύμωσης.

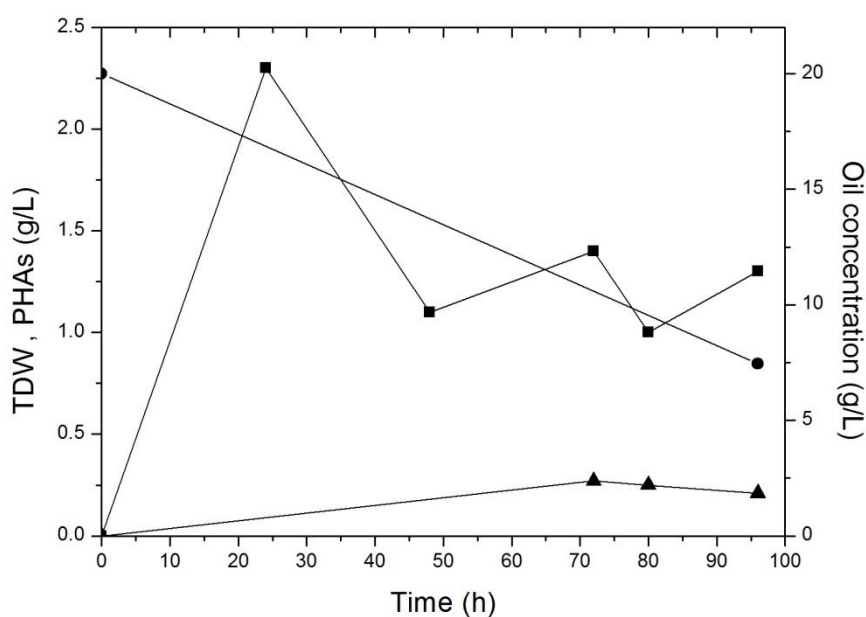
**Πίνακας 3.9:** Αποτελέσματα απόβλητου ελαίου μαγειρικής και Tween 80

Στέλεχος (FMCC)	Χρόνος επώασης $T_f$ (h)	Συνολικό ξηρό βάρος (TDW (g/L))	Υπόστρωμα στο τέλος της ζύμωσης (g/L)
B1	72	1.5	11.78
B28	72	1.1	15.46
B33	72	1.2	12.44
B37	72	0.9	11.89
B46	72	1.4	3.41
B49	72	0.6	10.19
B93	72	0.7	9.68
B151	72	1.2	13.31
B34	72	1.2	8.50
B44	72	1.8	10.38
B51	72	2.4	9.01
B85	72	2.3	6.09
B150	72	2.2	10.08
B154	72	1.5	4.66
B155	72	1.1	4.78
B209	72	1.5	4.88
B210	72	1.4	4.87
B211	72	2.2	11.29
B218	72	1.1	8.27

Τα στελέχη που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα απόβλητο έλαιο μαγειρικής και Tween 80 παρουσιάζουν παρόμοια συγκέντρωση βιομάζας με το πείραμα χωρίς τη χρήση γαλακτωματοποιητή. Ωστόσο, όπως επιβεβαίωσε και η ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο, κανένα από τα στελέχη δεν συσώρευσε PHAs.

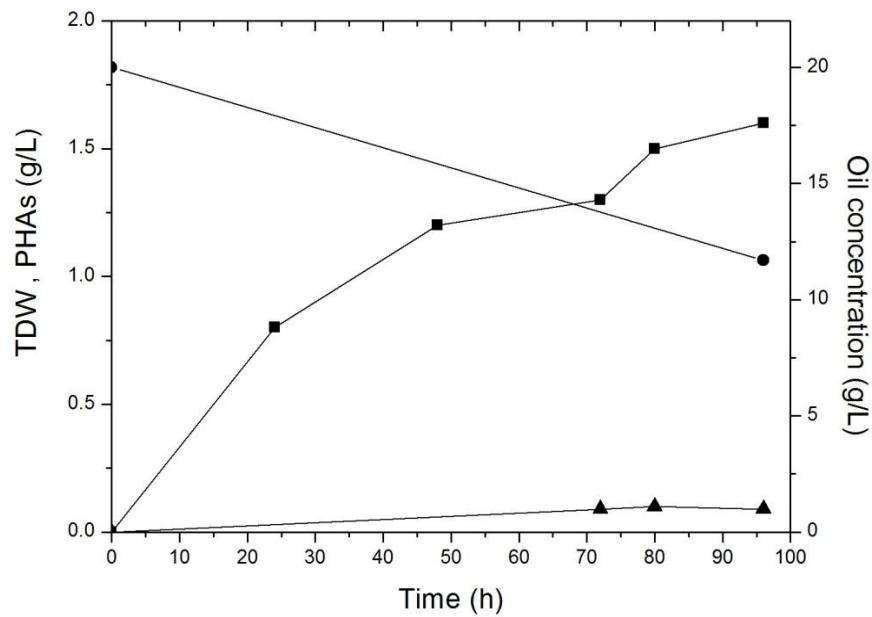
Αντίθετα στο πείραμα που χρησιμοποιήθηκε απόβλητο μαγειρικό έλαιο ως πηγή άνθρακος (Πίνακας 3.8), η ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο έδειξε ότι μόνο

έξι από αυτά παρήγαγαν mcl-PHAs. Τα στελέχη αυτά ήταν τα B1, B46, B151, B209, B211, B218. Τα στελέχη B1 και B218 είναι κατατεθειμένα στο είδος *P. fluorescens*, το στέλεχος B46 στο είδος *P. gessardii*, το στέλεχος B151 στο είδος *P. chlororaphis* και τα στελέχη B209 και B211 στο είδος *P. fragi*. Για τους μικροοργανισμούς αυτούς παρουσιάζεται στα παρακάτω διαγράμματα η μικροβιακή αύξηση, η κατανάλωση υποστρώματος αλλά και η παραγωγή mcl-PHAs.



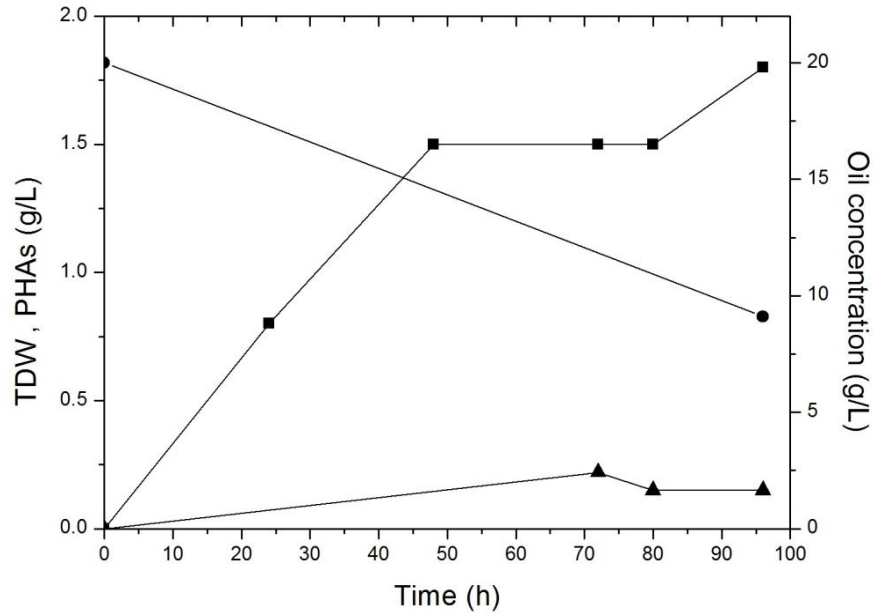
**Διάγραμμα 3.3 :** Στέλεχος B1

Στο στέλεχος B1 παρατηρείται αύξηση έως τις 32 h με μέγιστη τιμή για τη συγκέντρωση της βιομάζας 2.3 g/L ενώ έπειτα ακολουθεί μείωση. Το στέλεχος αυτό συσσωρεύσε PHAs με συγκέντρωση 0.27 g/L με συνολικό ενδοκυτταρικό ποσοστό PHAs 19.32 % και αποτελούνταν κυρίως από C12 και C6 (55 % και 31 % αντίστοιχα) ενώ τα μονομερή C8 και C10 υπήρχαν σε μικρότερες συγκεντρώσεις (6% και 10 %).



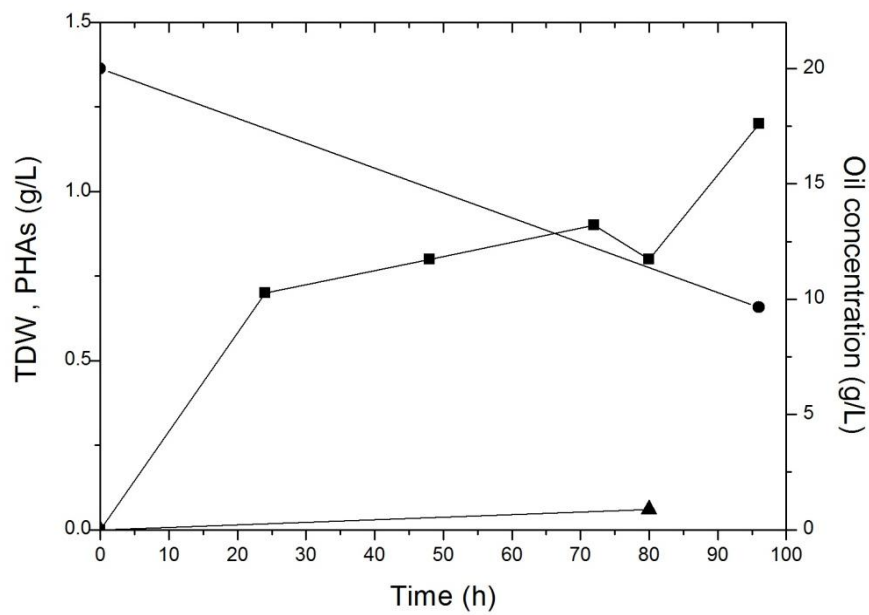
**Διάγραμμα 3.4 :** Στέλεχος B46

Στο παραπάνω διάγραμμα απεικονίζεται η κινητική της ανάπτυξης του στελέχους B46. Στο προαναφερθέν διάγραμμα παρατηρείται συνεχής αύξηση στη συγκέντρωση της βιομάζας έως το τέλος της ζύμωσης, ωστόσο η μέγιστη συγκέντρωση της βιομάζας δεν ξεπερνά τα 1.6 g/L. Ακόμη παρατηρήθηκε ότι και αυτό το στέλεχος δύναται να συσσωρεύσει ενδοκυτταρικά mcl-PHAs σε συγκέντρωση 0.10 g/L και με κυρίαρχο μονομερές το C12 (97 %).



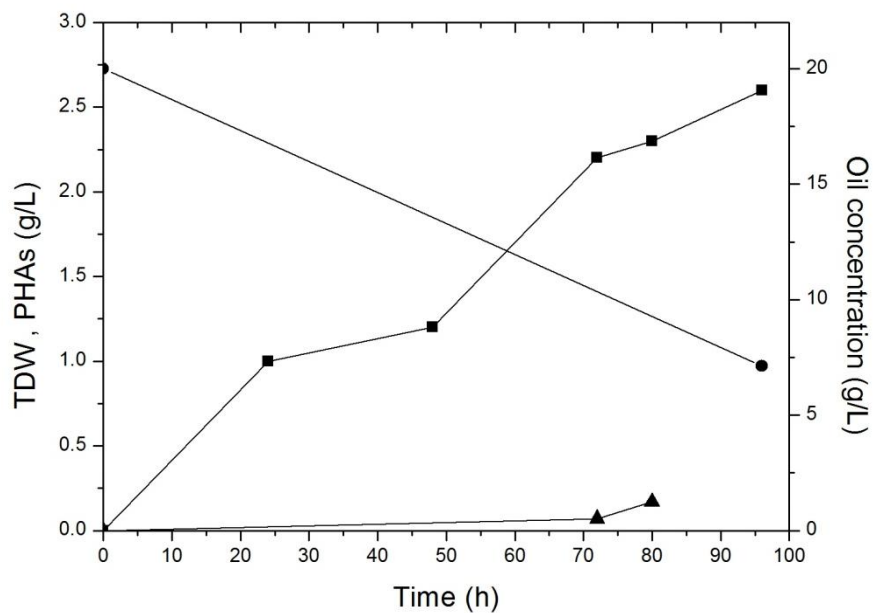
**Διάγραμμα 3.5 :** Στέλεχος B151

Το στέλεχος B151 παρουσιάζει αύξηση στη συγκέντρωση της βιομάζας του έως τις 48 h και εν συνεχεία μπαίνει σε στατική φάση. Ωστόσο στο τέλος της ζύμωσης παρατηρείται μια μικρή αύξηση στη συγκέντρωση της βιομάζας όπου και είναι η μέγιστη συγκέντρωση καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης 1.8 g/L. Η μέγιστη συγκέντρωση mcl-PHAs που παρατηρήθηκε ήταν στις 72 h και αντιστοιχεί σε 0.22 g/L με βασικό μονομερές το C12 (98 %) ενώ το συνολικό ποσοστό των mcl-PHAs ήταν 7.22 % επί του συνολικού ξηρού βάρους.



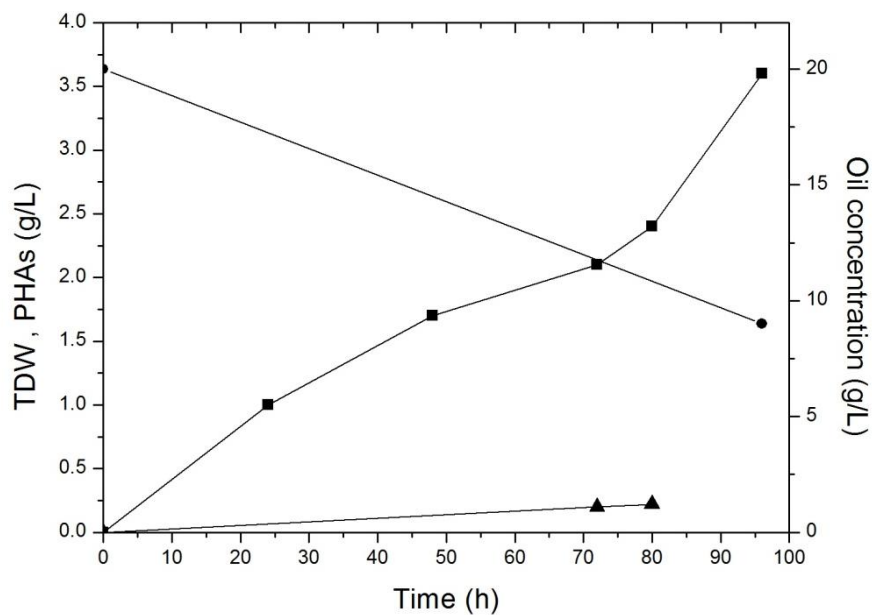
**Διάγραμμα 3.6 : Στέλεχος B209**

Στο παραπάνω διάγραμμα απεικονίζεται η κινητική της αύξησης του στελέχους B209. Το στέλεχος αυτό παρουσιάζει αύξηση μέχρι τις 24 h και στη συνέχεια εισέρχεται σε στατική φάση. Ωστόσο το τελευταίο σημείο της ζύμωσης είναι ελαφρώς αυξημένο (1.2 g/L). Στο στέλεχος αυτό παρατηρήθηκε συσσώρευση σε αρκετά χαμηλή συγκέντρωση 0.06 g/L που αντιστοιχεί σε ποσοστό μονομερών 38 % C10 και 62 % C12.



**Διάγραμμα 3.7 : Στέλεχος B211**

Όπως παρατηρείται και στο παραπάνω διάγραμμα, το στέλεχος B211 αναπτύσσεται καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης έως τις 96 h. Η μέγιστη συγκέντρωση της βιομάζας απαντάται στις 96 h και είναι 2.6 g/L ενώ η μέγιστη συγκέντρωση mcl-PHAs παρατηρήθηκε στις 80 h (0.17 g/L). Το συνολικό ποσοστό των ενδοκυτταρικών PHAs ήταν 7.56 % και αποτελούνταν από τα εξής μονομερή C8 (15 %), C10 (16 %) και C12 (69 %).

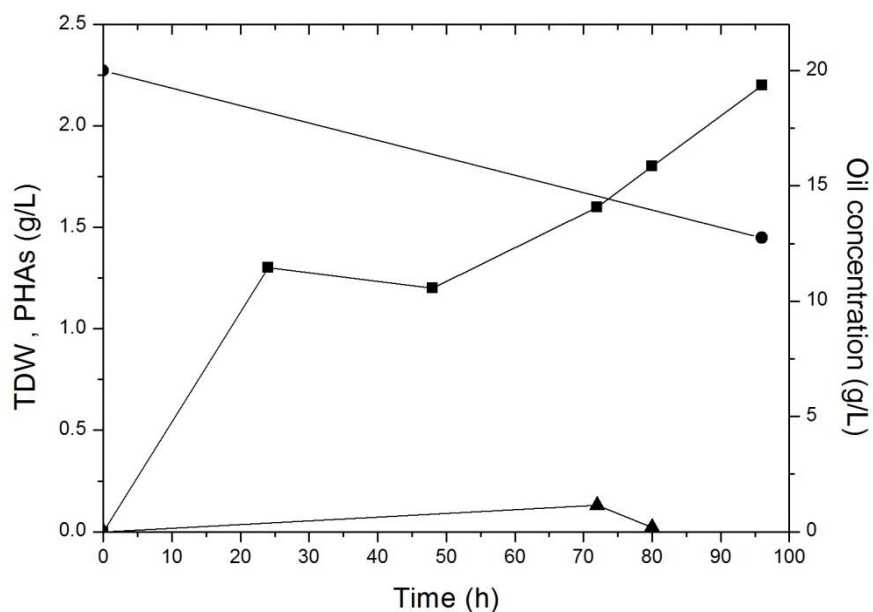


**Διάγραμμα 3.8 :** Στέλεχος B218

Στο στέλεχος B218 παρατηρείται αύξηση της μικροβιακής βιομάζας έως το πέρας της ζύμωσης με διαφορετικούς ρυθμούς. Το μέγιστο σημείο στη συγκέντρωση της βιομάζας είναι και σε αυτή τη ζύμωση το τελικό σημείο και αντιστοιχεί σε 3.6 g/L. Όσον αφορά στη συσσώρευση των mcl-PHAs η μέγιστη συγκέντρωση παρατηρήθηκε στις 80 h και ήταν 0.22 g/L. Η συγκέντρωση αυτή αντιστοιχεί σε ποσοστό μονομερών C6 (41 %), C8 (8 %), C10 (13 %) και C12 (38 %).

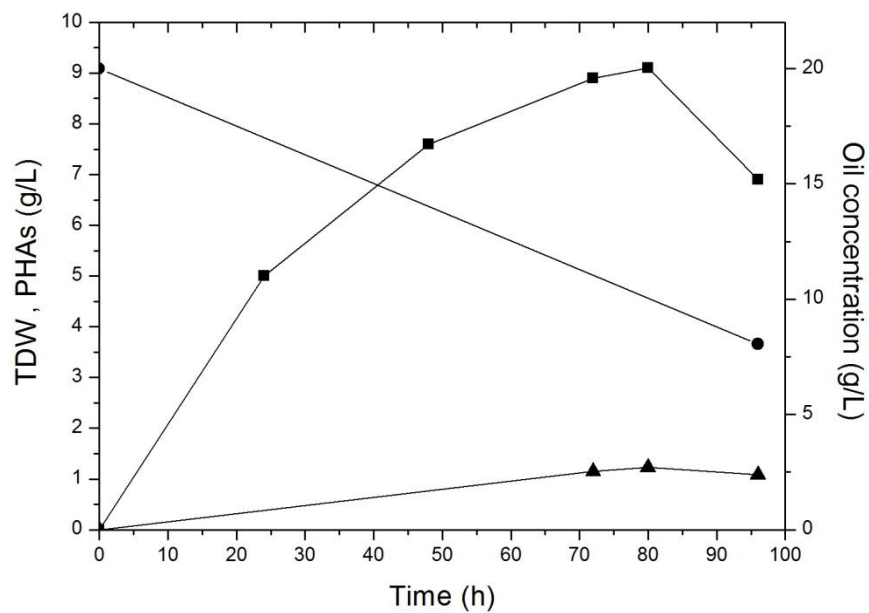
Το προαναφερθέν υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε και για την ανάπτυξη των στελεχών της συλλογής DSMZ. Στα επόμενα διαγράμματα απεικονίζεται η ανάπτυξη τους αλλά και η παραγωγή PHAs.





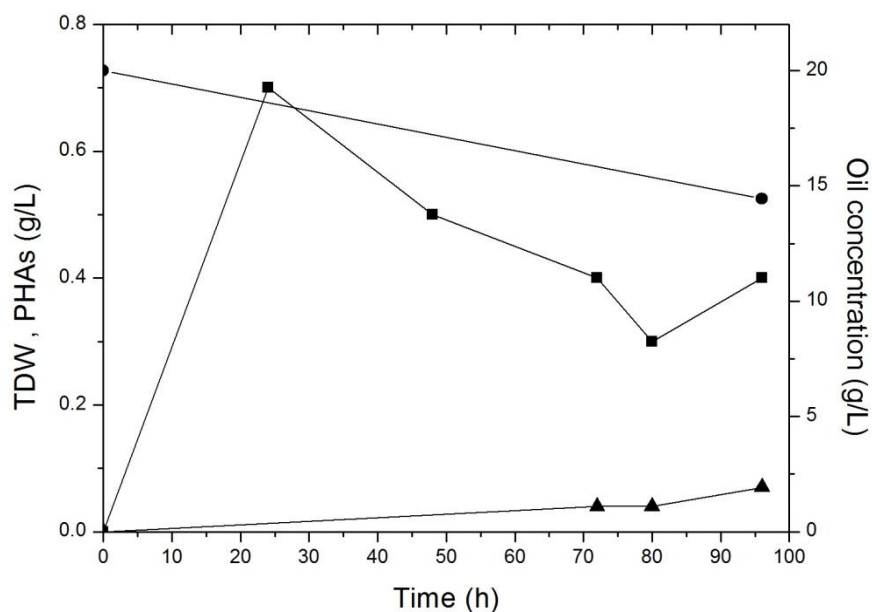
**Διάγραμμα 3.9 :** Στέλεχος *Pseudomonas chlororaphis* DSM 50083

Στο στέλεχος *P. chlororaphis* DSM 50083 παρατηρήθηκε αύξηση στη συγκέντρωση της βιομάζας έως τις 24 h, έπειτα ακολούθησε στατική φάση έως τις 48 h και τέλος συνεχίστηκε η αύξηση. Η μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας είναι 2.2 g/L και απαντάται στις 96 h. Ακόμη παρατηρήθηκε συσσώρευση mcl-PHAs με τη μέγιστη συγκέντρωση να είναι 0.13 g/L στις 72 h. Το συνολικό ποσοστό των ενδοκυτταρικών PHAs ήταν 11.54 % και αποτελούταν από C8 (13 %), C10 (22 %) και C12 (65 %).



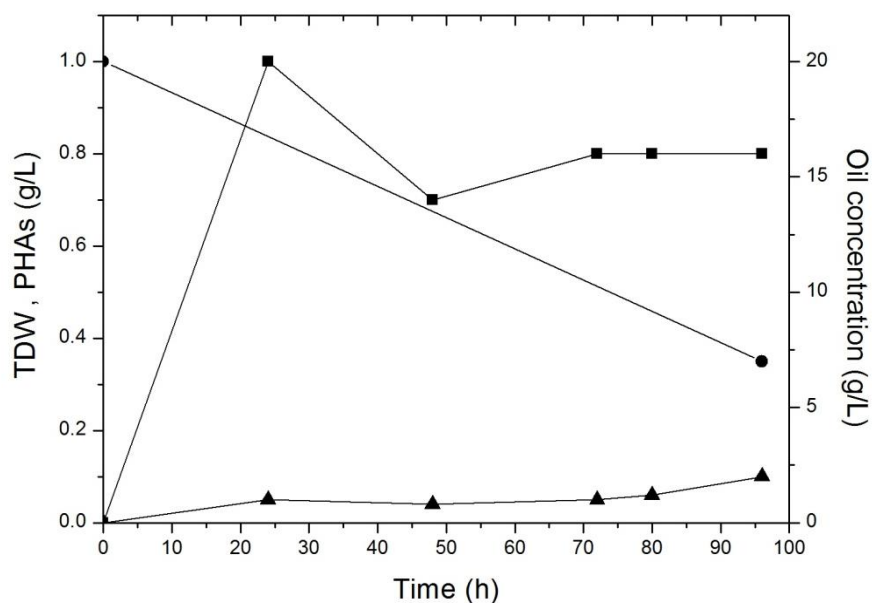
**Διάγραμμα 3.10 :** Στέλεχος *Pseudomonas resinovorans* DSM 21078

Στο παραπάνω διάγραμμα απεικονίζεται η κινητική της ανάπτυξης του μικροοργανισμού *P. resinovorans* DSM 21078. Ο μικροοργανισμός παρουσιάζει αύξηση έως τις 80 h με μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας 9.1 g/L και έπειτα ακολουθεί μείωση. Ακόμη παρατηρήθηκε συσσώρευση mcl-PHAs της τάξης των 1.23 g/L και το συνολικό ποσοστό ενδοκυτταρικών PHAs ήταν 13.61 % με μονομερή τα C6 (9 %), C8 (28 %), C10 (48 %) και C12 (15 %).



**Διάγραμμα 3.11 :** Στέλεχος *Pseudomonas citronellolis* DSM 50332

Ο μικροοργανισμός *Pseudomonas citronellolis* DSM 50332, όπως φαίνεται και στο παραπάνω διάγραμμα, παρουσιάζει αύξηση έως τις 24 h και έπειτα αισθητή μείωση στη συγκέντρωση της βιομάζας. Ωστόσο οι συγκεντρώσεις του συνολικού ξηρού βάρους κινούνται σε αρκετά χαμηλά επίπεδα με τη μέγιστη τιμή να είναι 0.7 g/L στις 24 h. Ακόμη σε χαμηλά επίπεδα κυμάνθηκε και η συσσώρευση των mcl-PHAs με τη μέγιστη συγκέντρωση να είναι 0.07 g/L στις 96 h με κυρίαρχο μονομερές το C12 (98 %).



**Διάγραμμα 3.12 :** Στέλεχος *Pseudomonas putida* KT2440

Στο παραπάνω διάγραμμα φαίνεται η κινητική της αύξησης του μικροοργανισμού *P. putida* KT2440. Παρατηρείται μικροβιακή αύξηση έως τις 24 h και έπειτα ακολουθεί μείωση. Η μέγιστη συγκέντρωση της βιομάζας απαντάται στις 24 h και είναι 1 g/L ενώ γενικά η συγκέντρωση της βιομάζας είναι αρκετά χαμηλή. Ακόμη παρατηρήθηκε μικρή συσσώρευση PHAs με συγκέντρωση 0.1 g/L στις 96 h και κυρίαρχο μονομερές στο C12 (97 %).

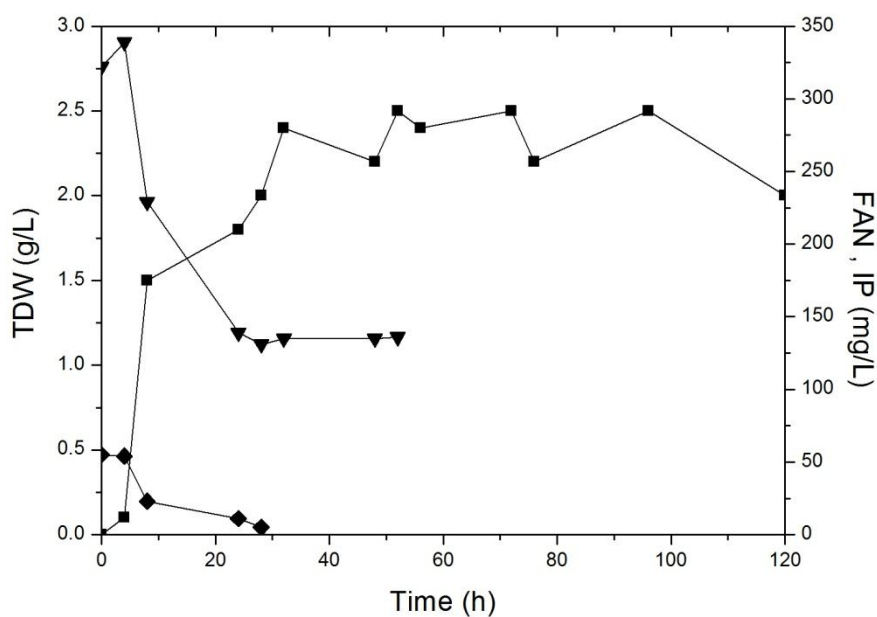
Ανάμεσα στα εμπορικά στελέχη το πιο υποσχόμενο στέλεχος ήταν το *P. resinovorans* DSM 21078 με συγκέντρωση mcl-PHAs 1.23 g/L και μονομερή τα C6 (9 %), C8 (28 %), C10 (47 %) και C12 (15 %) ενώ τα υπόλοιπα εμπορικά στελέχη επέτυχαν χαμηλότερες συγκεντρώσεις mcl-PHAs. Στη μελέτη τους οι [Ashby et al. 1998](#) ανέπτυξαν τον μικροοργανισμό *P. resinovorans* DSM 21078 σε συνθετικό υπόστρωμα με φυτικά έλαια ως πηγή άνθρακα και παρατήρησαν χαμηλές συγκεντρώσεις σε PHAs από 1.2 έως 1.9 g/L με μονομερή από 4 έως 14 άτομα άνθρακα. Οι [Cruz et al. 2015](#) στη μελέτη τους απέδειξαν ότι ο μικροοργανισμός *P. citronellolis* DSM 50332 δεν έχει την ικανότητα να παράγει PHAs από υπόστρωμα πλούσιο σε τριγλυκερίδια εξαιτίας της χαμηλής ενεργότητας του ενζύμου της λιπάσης. Στην παρούσα μελέτη ο ίδιος μικροοργανισμός παρήγαγε PHAs σε πολύ

χαμηλή συγκέντρωση (0.07 g/L). Στην ίδια μελέτη χρησιμοποιήθηκε και ο μικροοργανισμός *P. resinovorans* DSM 21078 σε υπόστρωμα απόβλητο μαγειρικό έλαιο και παρήχθη πολυμερές αποτελούμενο κυρίως από τα μονομερή C8 και C10 και σε μικρότερες ποσότητες C6 και C12. Οι [Walsh et al. 2015](#) ανέπτυξαν τον μικροοργανισμό *P. putida* KT2440 σε φυτικά έλαια ως πηγή άνθρακα και παρατήρησαν χαμηλές συγκεντρώσεις βιομάζας. Αντίστοιχα, και στην παρούσα μελέτη η συγκέντρωση της βιομάζας για τον ίδιο μικροοργανισμό ήταν αρκετά χαμηλή (1 g/L).

### **3.3 Μελέτη ικανότητας παραγωγής PHAs σε υγρή ζύμωση με χρήση υδρολύματος**

Επόμενος στόχος της παρούσας πειραματικής μελέτης ήταν η ανάπτυξη των μικροοργανισμών με τη χρήση ανανεώσιμων πρώτων υλών ως υπόστρωμα. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε υδρόλυμα ηλιαλεύρου ως πηγή αζώτου, με σκοπό να αντικατασταθούν οι συμβατικές πηγές αζώτου που χρησιμοποιούνται στις μικροβιακές ζυμώσεις. Η παρασκευή του υδρολύματος περιγράφεται στο κεφάλαιο 2 (Ενότητα 2.3).

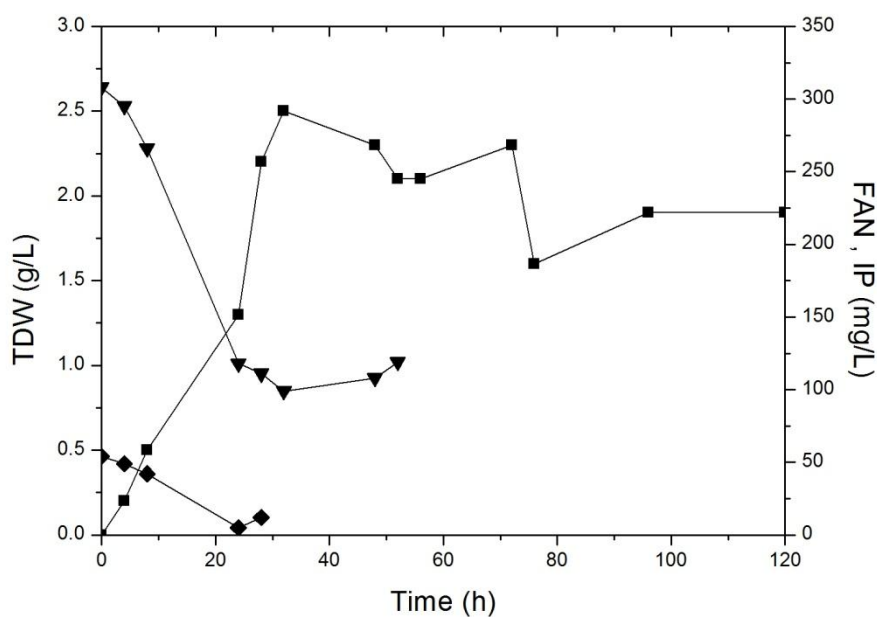
Όπως προαναφέρθηκε, μόνο έξι στελέχη της συλλογής FMCC παρήγαγαν mcl-PHAs. Τα στελέχη αυτά αλλά και τα στελέχη της συλλογής DSMZ αναπτύχθηκαν εκ νέου σε υπόστρωμα με απόβλητο έλαιο μαγειρικής ως πηγή άνθρακα και υδρόλυμα ηλιαλεύρου ως πηγή αζώτου. Όπως προαναφέρθηκε και στο κεφάλαιο 2, το υδρόλυμα που παρασκευάστηκε από ηλιάλευρο μέσω ενζυμικής υδρόλυσης με το μύκητα *Aspergillus oryzae* αποτελεί μια πηγή πλούσια σε άζωτο και ανόργανο φώσφορο που προέρχεται από την υδρόλυση της πρωτεΐνης και του φυτικού οξέος αντίστοιχα. Η αρχική συγκέντρωση Free Amino Nitrogen (FAN), που αντιστοιχεί στο άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων των αμινοξέων και των πεπτιδίων, ήταν 300 mg/L ενώ η αρχική συγκέντρωση ελαίου ήταν 20 g/L. Στα επόμενα διαγράμματα παρουσιάζονται αναλυτικότερα τα αποτελέσματα των προαναφερθέντων πειραμάτων.



**Διάγραμμα 3.13 : Στέλεχος B1**

Στο παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται ανάπτυξη του μικροοργανισμού έως τις 32 h ενώ ακολουθεί στατική φάση και μετά από τις 96 h μείωση της βιομάζας. Η μέγιστη τιμή στη συγκέντρωση της βιομάζας εντοπίστηκε στις 52 h και ήταν 2.5 g/L ενώ η συγκέντρωση του υποστρώματος στο τέλος της ζύμωσης ήταν 17.71 g/L. Η συγκέντρωση των PHAs ήταν αρκετά χαμηλή 0.04 g/L στις 96 h της ζύμωσης με κυρίαρχο μονομερές το C12 (96 %).

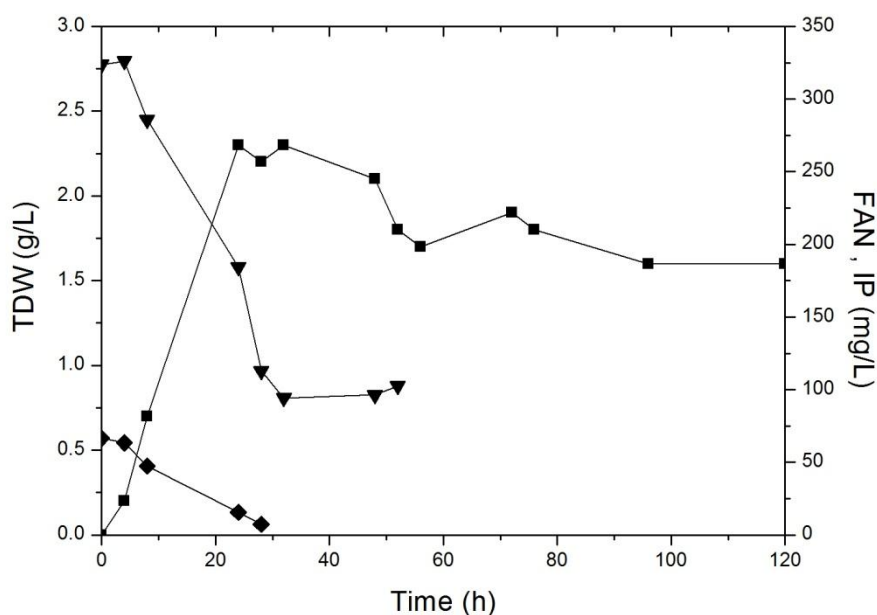
Συγκρίνοντας το παραπάνω διάγραμμα με το αντίστοιχο του στελέχους B1 σε συνθετικό υπόστρωμα παρατηρείται ότι η συγκέντρωση της βιομάζας είναι παρόμοια. Ωστόσο στο πείραμα που έγινε χρήση του υδρολύματος η συγκέντρωση των παραγόμενων PHAs ήταν αισθητά μικρότερη. Η διαφορά αυτή πιθανότατα οφείλεται στην έλλειψη κάποιων ιχνοστοιχείων από το υδρόλυμα που κατά συνέπεια δεν ευνόησε την παραγωγή PHAs σε υψηλότερες συγκεντρώσεις.



**Διάγραμμα 3.14 :** Στέλεχος B46

Αναφορικά με την καλλιέργεια του στελέχους B46 παρατηρείται αύξηση της βιομάζας μέχρι τις 32 h και στη συνέχεια ακολουθεί στατική φάση. Η ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο δεν έδωσε αποτελέσματα ενώ η συγκέντρωση του υποστρώματος στο τέλος της ζύμωσης ήταν 10.31 g/L.

Συγκρίνοντας το παραπάνω διάγραμμα με το αντίστοιχο του στελέχους B46 σε συνθετικό υπόστρωμα παρατηρείται ότι η συγκέντρωση της βιομάζας και η κατανάλωση του υποστρώματος είναι παρόμοιες. Ωστόσο στο δεύτερο πείραμα δεν παρήχθησαν PHAs. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι ενδεχομένως να υπολείπονται από το υδρόλυμα κάποια θρεπτικά συστατικά ή ιχνοστοιχεία τα οποία ευνοούν τη στροφή του μεταβολισμού προς τη συσσώρευση των PHAs.

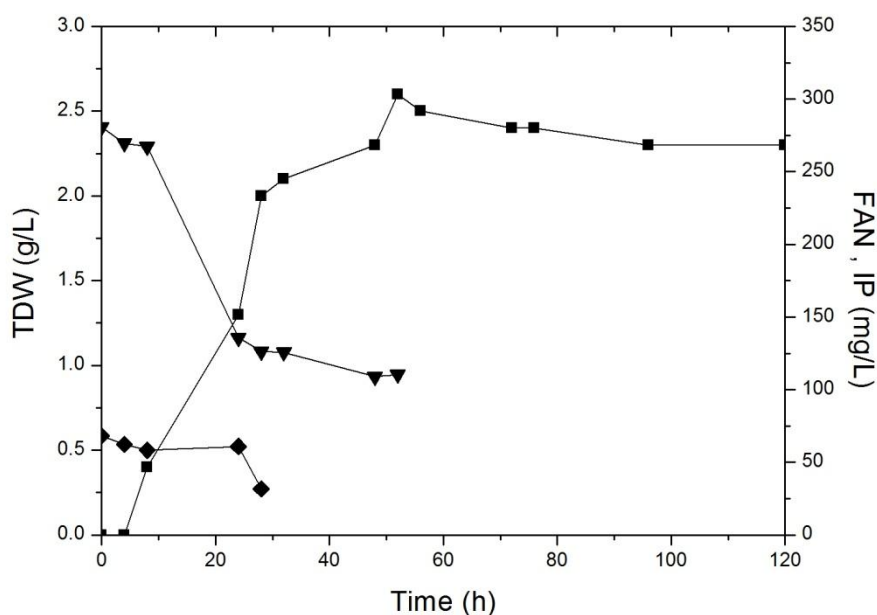


**Διάγραμμα 3.15 :** Στέλεχος B151

Στο παραπάνω διάγραμμα απεικονίζεται η κινητική της ανάπτυξης του στελέχους B151. Η συγκέντρωση της βιομάζας παρουσιάζει αύξηση έως τις 32 h με μέγιστη τιμή 2.3 g/L ενώ στη συνέχεια μειώνεται. Η συγκέντρωση του υποστρώματος μετά το πέρας της ζύμωσης ήταν 11.36 g/L. Ωστόσο η ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο δεν έδωσε αποτελέσματα.

Συγκρίνοντας το παραπάνω διάγραμμα με το αντίστοιχο του στελέχους B151 σε συνθετικό υπόστρωμα παρατηρείται ότι η συγκέντρωση της βιομάζας και η κατανάλωση του υποστρώματος είναι παρόμοιες. Ωστόσο στο δεύτερο πείραμα δεν παρήχθησαν PHAs. Από το διάγραμμα 3.15 είναι εμφανές ότι στις 32 h ο φώσφορος έχει καταναλωθεί πλήρως γεγονός που πιθανότατα δικαιολογεί την πτώση της συγκέντρωσης της βιομάζας από εκείνο το σημείο και έπειτα αλλά και την αδυναμία του μικροοργανισμού να συσσωρεύσει PHAs.

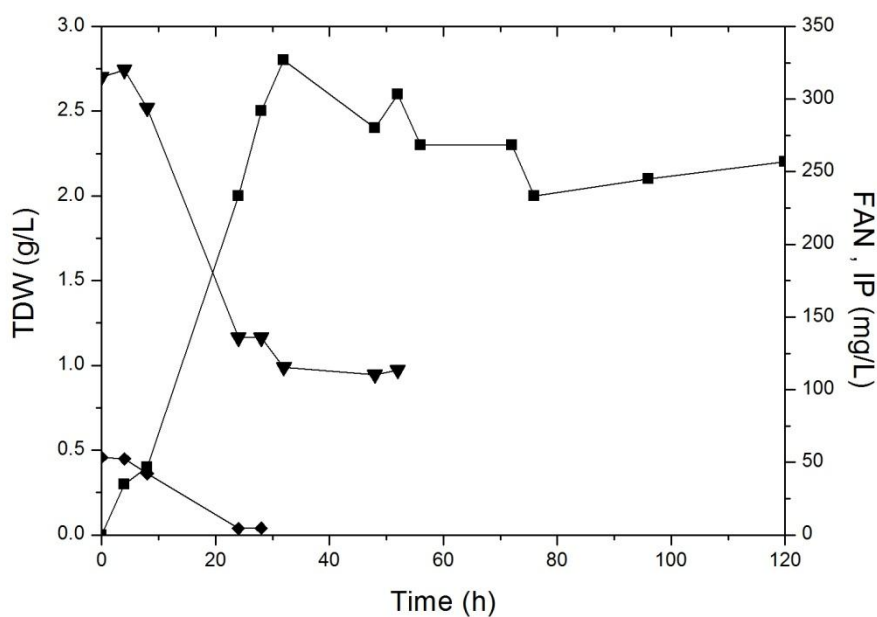




**Διάγραμμα 3.16 :** Στέλεχος B209

Το διάγραμμα 3.16 απεικονίζει την ανάπτυξη του στελέχους B209. Στο διάγραμμα αυτό παρατηρείται αύξηση στη συγκέντρωση της βιομάζας έως τις 52 h με μέγιστη τιμή 2.8 g/L και έπειτα ακολουθεί μείωση. Στο τέλος της ζύμωσης η συγκέντρωση του υποστρώματος ήταν 10.06 g/L και η συγκέντρωση των PHAs ήταν 0.1 g/L με κυρίαρχο μονομερές το C6 (97%). Η συγκέντρωση αυτή των mcl-PHAs αντιστοιχεί σε 4.19 % της συνολικής ξηρής βιομάζας.

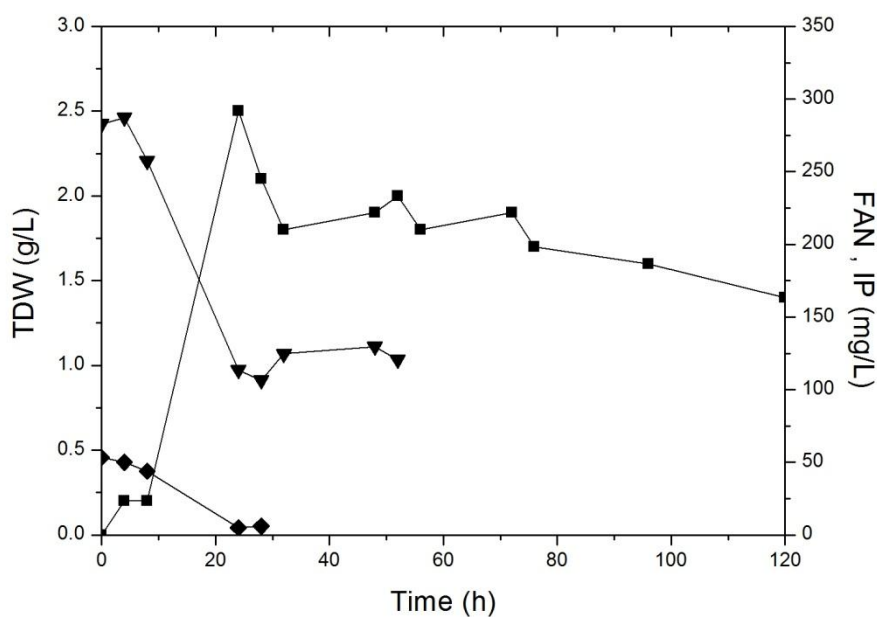
Συγκρίνοντας το παραπάνω διάγραμμα με το αντίστοιχο του στελέχους B209 σε συνθετικό υπόστρωμα παρατηρείται ότι η κατανάλωση του υποστρώματος είναι παρόμοια. Ωστόσο στο παρόν πείραμα η συγκέντρωση της βιομάζας είναι ελαφρώς αυξημένη. Στο διάγραμμα αυτό δεν παρατηρείται κάποια παρεμπόδιση στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού μετά την εξάντληση του φωσφόρου. Ωστόσο μετά το πέρας των 52 h όπου σταματά η κατανάλωση του αζώτου σταματά και η μικροβιακή αύξηση. Το γεγονός αυτό δύναται να δικαιολογήσει την χαμηλή συσσώρευση σε PHAs.



**Διάγραμμα 3.17 :** Στέλεχος B211

Στο διάγραμμα 3.17 όπου απεικονίζεται η ανάπτυξη του μικροοργανισμού B211 παρατηρείται αύξηση στη συγκέντρωση της βιομάζας έως τις 32 h με μέγιστη συγκέντρωση 2.8 g/L και έπειτα παρατηρείται μείωση. Μετά το πέρας της ζύμωσης η συγκέντρωση του υποστρώματος ήταν 11.10 g/L ενώ η συσσώρευση σε PHAs ήταν αρκετά χαμηλή 0.1 g/L στις 96 h με κυρίαρχο μονομερές το C6 (98 %).

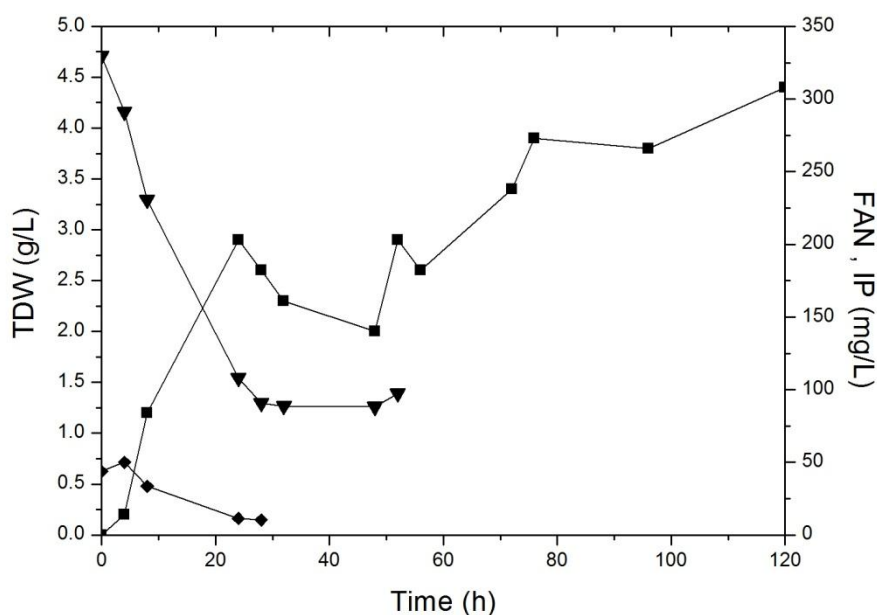
Συγκρίνοντας το παραπάνω διάγραμμα με το αντίστοιχο του στελέχους B211 σε συνθετικό υπόστρωμα παρατηρείται ότι στο παρόν πείραμα η κατανάλωση του υποστρώματος και η συγκέντρωση της βιομάζας είναι ελαφρώς αυξημένη. Ωστόσο στις 32 h όπου παρατηρείται η μέγιστη συγκέντρωση της βιομάζας, έχει καταναλωθεί πλήρως ο φώσφορος. Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγήσει την μετέπειτα μείωση στη συγκέντρωση της βιομάζας αλλά και τη χαμηλή συγκέντρωση των PHAs.



**Διάγραμμα 3.18 :** Στέλεχος B218

Στο στέλεχος B218, όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 3.18, παρατηρείται αύξηση στη συγκέντρωση της βιομάζας έως τις 24 h με μέγιστη τιμή 2.5 g/L και στη συνέχεια ακολουθεί μείωση. Στο τέλος της ζύμωσης η συγκέντρωση του υποστρώματος ήταν 15.49 g/L και η συγκέντρωση των PHAs ήταν 0.1 g/L με κυρίαρχο μονομερές το C6 (97 %). Η συγκέντρωση αυτή των PHAs αντιστοιχεί σε 5.52 % του συνολικού ξηρού βάρους.

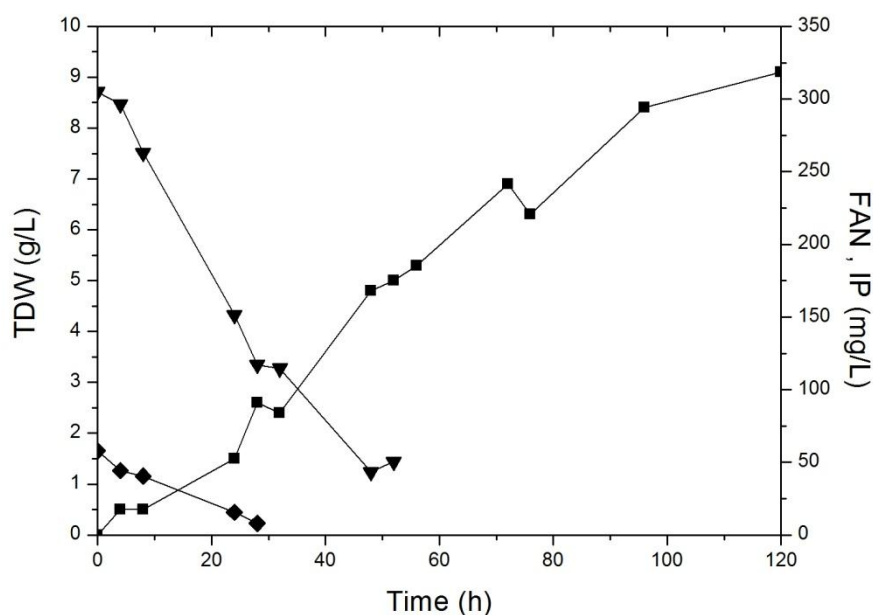
Συγκρίνοντας το παραπάνω διάγραμμα με το αντίστοιχο του στελέχους B218 σε συνθετικό υπόστρωμα παρατηρείται ότι στο παρόν πείραμα η κατανάλωση του υποστρώματος και η συγκέντρωση της βιομάζας είναι μειωμένη. Μετά τις 24 h όπου και καταναλώθηκε ο φώσφορος, η συγκέντρωση της βιομάζας μειώθηκε και κατά συνέπεια η ζύμωση δεν μπόρεσε να συνεχιστεί εξαιτίας της έλλειψης του φωσφόρου.



**Διάγραμμα 3.19 :** Στέλεχος *Pseudomonas chlororaphis* DSM 50083

Στο παραπάνω διάγραμμα όπου αναπαριστάται η ανάπτυξη του μικροοργανισμού *P.chlororaphis*, παρατηρείται αύξηση στη συγκέντρωση της βιομάζας έως τις 24 h, έπειτα παρατηρείται μείωση και στη συνέχεια αύξηση έως τις 120 h με μέγιστη συγκέντρωση 4.4 g/L. Μετά το τέλος της ζύμωσης η συγκέντρωση του υποστρώματος ήταν 4.20 g/L και η συγκέντρωση PHAs ήταν 0.23g/L η οποία αντιστοιχεί σε ποσοστά μονομερών C8 (11 %), C10 (19 %) και C12 (70 %). Το συνολικό ποσοστό των PHAs αντιστοιχεί σε 6.09 % του συνολικού ξηρού βάρους.

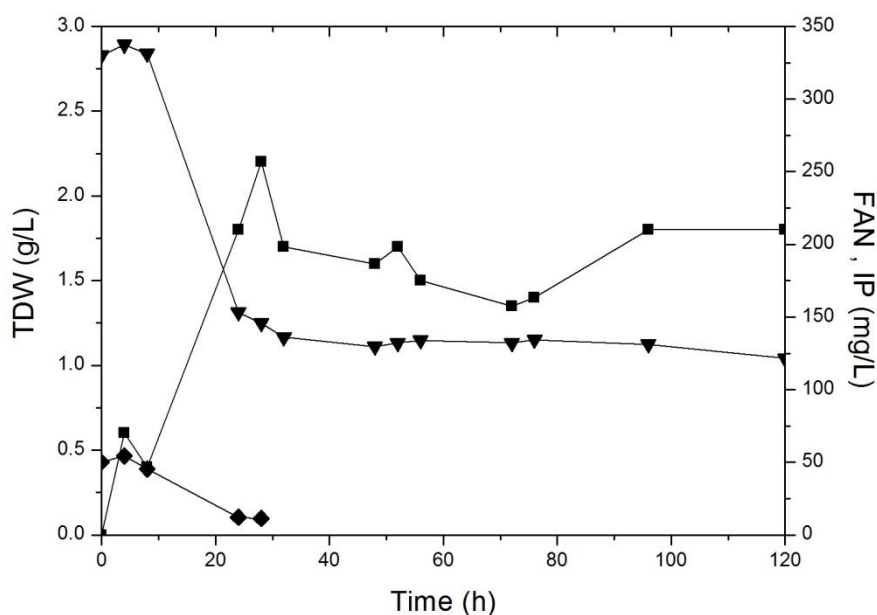
Συγκρίνοντας το παραπάνω διάγραμμα με το αντίστοιχο του στελέχους *P.chlororaphis* σε συνθετικό υπόστρωμα παρατηρείται ότι στο παρόν πείραμα η κατανάλωση του υποστρώματος αλλά και η συγκέντρωση της βιομάζας είναι αυξημένες. Στο παρόν διάγραμμα παρατηρείται αύξηση της βιομάζας έως τις 24 h όπου και υπήρχε πλήρης κατανάλωση του φωσφόρου και στη συνέχεια μια μικρή μείωση έως τις 48 h ενώ η συγκέντρωση της βιομάζας αυξάνεται έως τις 120 h. Επίσης, στο παρόν πείραμα η συγκέντρωση των PHAs είναι ελαφρώς αυξημένη. Συνεπώς είναι πιθανό η σύσταση του υδρολύματος στην προκειμένη περίπτωση να ευνόησε τη σύνθεση PHAs για το συγκεκριμένο στέλεχος.



**Διάγραμμα 3.20 :** Στέλεχος *Pseudomonas resinovorans* DSM 21078

Η ανάπτυξη του μικροοργανισμού *P. resinovorans*, όπως φαίνεται και στο παραπάνω διάγραμμα, παρουσιάζει συνεχή αύξηση στη συγκέντρωση της βιομάζας έως το πέρας της ζύμωσης με μέγιστη συγκέντρωση τα 9.1 g/L. Η συγκέντρωση του υποστρώματος στο τέλος της ζύμωσης ήταν 6.88 g/L ενώ η συγκέντρωση των PHAs ήταν 0.63 g/L με σύσταση μονομερών C6 (16 %), C8 (26 %), C10 (48 %) και C12 (10 %). Τέλος, η ανωτέρω συγκέντρωση mcl-PHAs αντιστοιχεί στο 6.88 % του συνολικού ξηρού βάρους.

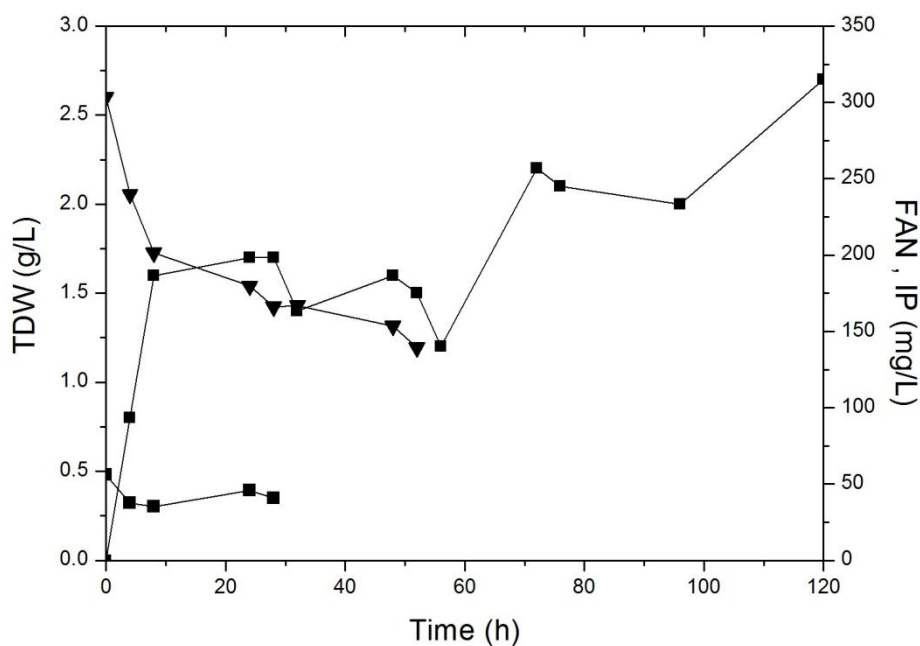
Συγκρίνοντας το παραπάνω διάγραμμα με το αντίστοιχο του στελέχους *P. resinovorans* σε συνθετικό υπόστρωμα παρατηρείται ότι στο παρόν πείραμα η κατανάλωση του υποστρώματος αλλά και η συγκέντρωση της βιομάζας είναι παρόμοιες ενώ από την αύξηση στη συγκέντρωση της βιομάζας δεν παρατηρήθηκε παρεμπόδιση από την έλλειψη κάποιου θρεπτικού συστατικού. Ωστόσο η συγκέντρωση των PHAs είναι αρκετά χαμηλότερη γεγονός που μπορεί πιθανότατα να οφείλεται στην έλλειψη ιχνοστοιχείων η οποία όμως δεν επηρέασε την πορεία της ζύμωσης.



**Διάγραμμα 3.21 :** Στέλεχος *Pseudomonas citronellolis* DSM 50332

Στο διάγραμμα 3.21 παρατηρείται ότι ο μικροοργανισμός *P. citronellolis* παρουσιάζει αύξηση στη συγκέντρωση της βιομάζας έως τις 28 h ενώ έπειτα παρατηρείται μείωση με μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας 2.2 g/L. Στο τέλος της ζύμωσης η συγκέντρωση του υποστρώματος ήταν 11.69 g/L όμως η ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο δεν έδωσε αποτελέσματα.

Συγκρίνοντας το παραπάνω διάγραμμα με το αντίστοιχο του στελέχους *P.citronellolis* σε συνθετικό υπόστρωμα παρατηρείται ότι στο παρόν πείραμα η συγκέντρωση της βιομάζας είναι αυξημένη ενώ η κατανάλωση υποστρώματος είναι παρόμοια. Ωστόσο στο παρόν πείραμα δεν παρήχθησαν PHAs σε αντίθεση με τη ζύμωση στο συνθετικό υπόστρωμα. Από το διάγραμμα 3.21 παρατηρείται ότι στις 28 h όπου απαντάται η μέγιστη συγκέντρωση της βιομάζας έχει καταναλωθεί πλήρως ο φώσφορος. Η έλλειψη αυτή πιθανότατα δικαιολογεί την αδυναμία συσσώρευσης PHAs αλλά και τη μείωση στη συγκέντρωση της βιομάζας από τις 28 h και έπειτα.



**Διάγραμμα 3.22 :** Στέλεχος *Pseudomonas putida* KT2440 (B224)

Στο διάγραμμα 3.22 απεικονίζεται η ανάπτυξη του μικροοργανισμού *P. putida* KT2440 (B224) όπου παρατηρείται αύξηση στη συγκέντρωση της βιομάζας μέχρι το πέρας της ζύμωσης. Στο τέλος της ζύμωσης η συγκέντρωση του υποστρώματος ήταν 6.72 g/L όμως η ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο δεν έδωσε αποτελέσματα.

Συγκρίνοντας το παραπάνω διάγραμμα με το αντίστοιχο του στελέχους *P. putida* KT2440 (B224) σε συνθετικό υπόστρωμα παρατηρείται ότι στο παρόν πείραμα η συγκέντρωση της βιομάζας ήταν ελαφρώς αυξημένη αλλά η κατανάλωση του υποστρώματος ήταν παρόμοια. Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται ότι η κατανάλωση των θρεπτικών συστατικών δεν επηρεάζει τη μικροβιακή αύξηση ωστόσο η έλλειψη ιχνοστοιχείων πιθανότατα δεν ευνόησε την συσσώρευση PHAs.

Τέλος συγκρίνοντας τα αποτελέσματα από όλα τα παραπάνω στελέχη παρατηρήθηκε ότι η συγκέντρωση της βιομάζας κυμάνθηκε από 1.4 έως 4.4 g/L εκτός από το στέλεχος *P. resinovorans* DSM 21078 όπου η συγκέντρωση της ήταν 9.1 g/L (οι τιμές αναφέρονται στα τελικά σημεία της ζύμωσης). Σε όλα τα στελέχη παρατηρείται παρεμπόδιση της μικροβιακής αύξησης και κατά συνέπεια της παραγωγής PHAs εξαιτίας της έλλειψης θρεπτικών συστατικών (είτε αζώτου είτε φωσφόρου είτε ιχνοστοιχείων). Εξάιρεση αποτελεί ο μικροοργανισμός *P.*

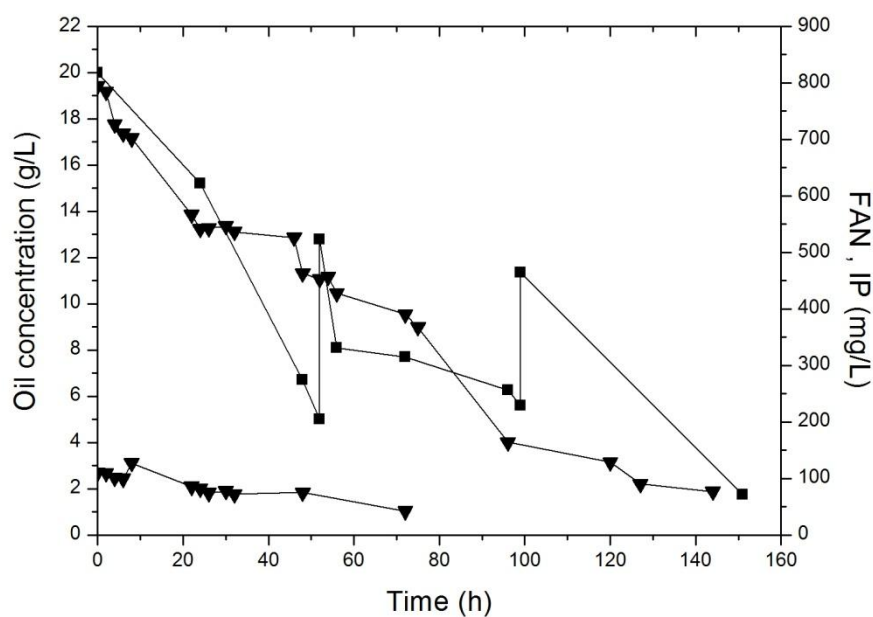
*resinovorans* DSM 21078 καθώς παρατηρήθηκε ομαλή μικροβιακή αύξηση χωρίς κάποια παρεμπόδιση και η συγκέντρωση των PHAs ήταν 0.63 g/L με μονομερή τα HB (1 %), C6 (16 %), C8 (16 %), C10 (30 %) και C12 (10 %). Ωστόσο η συγκέντρωση αυτή είναι αρκετά χαμηλή σε σύγκριση με το πείραμα με συνθετικό υπόστρωμα. Παρόλα αυτά είναι εμφανές πως ο αποδοτικότερος μικροοργανισμός ήταν ο *P.resinovorans*. Για το λόγο αυτό επιλέχθηκε να μελετηθεί περαιτέρω σε ζυμώσεις σε βιοαντιδραστήρα, όπου οι συνθήκες καλλιέργειας είναι καλύτερα ρυθμιζόμενες.

Στη βιβλιογραφία δεν υπάρχει αναφορά για χρήση υδρολύματος ηλιαλεύρου ως πηγή αζώτου και φωσφόρου σε συνδυασμό με απόβλητα μαγειρικά έλαια για την παραγωγή mcl-PHAs. Ωστόσο η χρήση υδρολύματος ως πηγή αζώτου για την παραγωγή scl-PHAs έχει μελετηθεί από τους [Kachrimanidou et al. 2013](#). Οι ερευνητές ανέπτυξαν τον μικροοργανισμό *Cupriavidus necator* DSM 545 χρησιμοποιώντας ακάθαρτη γλυκερόλη ως πηγή άνθρακα και παρατήρησαν μικροβιακή ανάπτυξη και παραγωγή P(3HB-co-3HV).

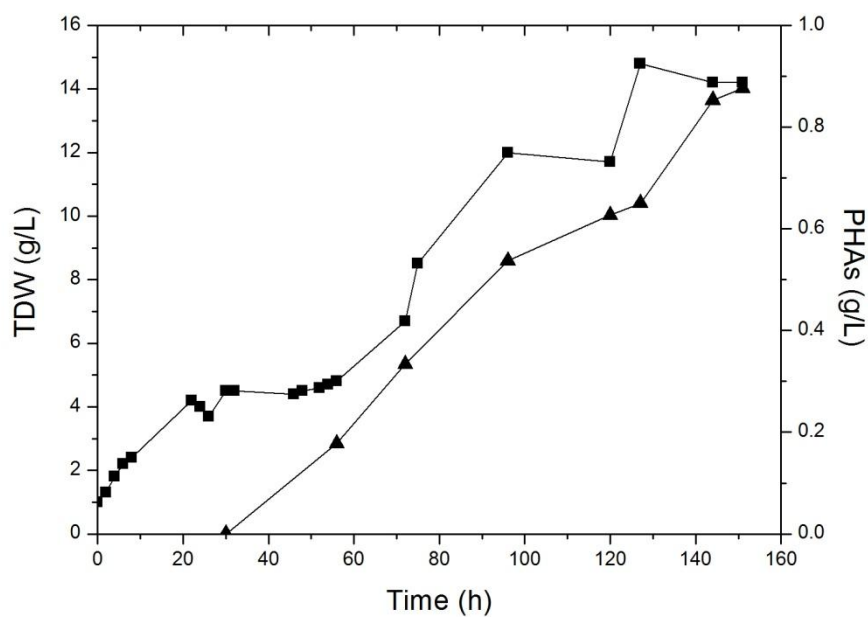
### **3.4 Ανάπτυξη στελέχους σε βιοαντιδραστήρα με χρήση υδρολύματος**

Στο επόμενο στάδιο της παρούσας πειραματικής εργασίας ο μικροοργανισμός *P.resinovorans* επιλέχθηκε για να αναπτυχθεί σε συνθήκες ημιδιαλείποντος έργου σε βιοαντιδραστήρα με συνολικό όγκο 1.0 L και ενεργό όγκο 800 mL. Το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν απόβλητο έλαιο μαγειρικής σε συγκέντρωση 20 g/L ως πηγή άνθρακος και υδρόλυμα ηλιαλεύρου με αρχική συγκέντρωση FAN 800 mg/L ως πηγή αζώτου. Στα παρακάτω διαγράμματα απεικονίζονται τα αποτελέσματα του εν λόγω πειράματος.





**Διάγραμμα 3.23 :** Κατανάλωση υποστρώματος, FAN και IP



**Διάγραμμα 3.24 :** Παραγωγή βιομάζας και PHAs

Το διάγραμμα 3.23 παρουσιάζει την κατανάλωση του FAN, του ανόργανου φωσφόρου (IP) και την κατανάλωση του ελαίου ενώ το διάγραμμα 3.24 παρουσιάζει

την παραγωγή συνολικού ξηρού βάρους (TDW) και PHAs. Σύμφωνα με το διάγραμμα 3.23 διαφαίνεται ότι ο ρυθμός κατανάλωσης του φωσφόρου και του FAN είναι σχετικά σταθερός συνεπάγοντας τη μικροβιακή αύξηση, η οποία ακολουθεί την εκθετική φάση στις πρώτες ώρες της καλλιέργειας.

Κατά την πλήρη κατανάλωση IP σε συγκέντρωση χαμηλότερη των 100 mg/L παρατηρείται μια μείωση στο ρυθμό ανάπτυξης του μικροοργανισμού, όπου και εισέρχεται στη φάση συσσώρευσης. Ακόμη παρατηρείται ότι κατά την προσθήκη της πρώτης τροφοδοσίας δεν είχε καταναλωθεί πλήρως η πηγή αζώτου. Κατά την κατανάλωση της πηγής αζώτου (συμπίπτει με την κατανάλωση του απόβλητου ελαίου μαγειρικής) παρατηρήθηκε μια μικρή μείωση στο ρυθμό ανάπτυξης. Η μέγιστη τιμή στην συγκέντρωση της βιομάζας παρατηρήθηκε στις 127 h και ήταν 14.8 g/L.

Από το διάγραμμα 3.24 που απεικονίζεται η ανάπτυξη της βιομάζας αλλά και η παραγωγή των PHAs είναι εμφανές ότι τα PHAs είναι δευτερογενής μεταβολίτης και είναι ένα προϊόν μη συνδεδεμένο με τη μικροβιακή αύξηση καθώς η παραγωγή των PHAs λαμβάνει χώρα κατά την εξάντληση της πηγής φωσφόρου.

Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται η ανάλυση των μονομερών όπως αυτή προέκυψε από τα αποτελέσματα του αέριου χρωματογράφου. Στον παρακάτω πίνακα παρατηρείται ότι τα μονομερή C10 και C12 κατέχουν μεγαλύτερα ποσοστά σε σχέση με τα υπόλοιπα.

**Πίνακας 3.10 :** Αποτελέσματα ανάλυσης αέριου χρωματογράφου

Χρόνος επώασης $T_f$ (h)	PHAs (g/L)	Content %	Μονομερή			
			C6	C8	C10	C12
54	0.162	3.59				100
56	0.178	3.78		11.8	17.4	70.8
72	0.334	4.94	26.6	6.9	12.6	53.9
96	0.537	4.47	16.8	11.7	19.4	52.1
120	0.627	7.04	11.1	20.0	35.8	33.1
127	0.650	4.4	14.8	16.6	32.5	36.2
144	0.853	6.01	11.1	19.2	39.4	30.2
151	0.876	6.17	10.8	19.6	39.5	30.0

Ανακεφαλαιώνοντας στο παραπάνω πείραμα παρατηρήθηκε ικανοποιητική ανάπτυξη του μικροοργανισμού καθώς η μέγιστη συγκέντρωση της βιομάζας ήταν 14.8 g/L ενώ η μέγιστη συγκέντρωση PHAs ήταν 0.88 g/L με μονομερή C6 (10.8 %), C8 (19.6 %), C10 (39.5 %) και C12 (30 %). Και σε αυτό το πείραμα δεν υπάρχουν αναφορές για χρήση υδρολύματος ηλιαλεύρου ως πηγή αζώτου και απόβλητου μαγειρικού ελαίου ως πηγή άνθρακος σε βιοαντιδραστήρα με συνθήκες ημισυνεχούς τροφοδοσίας. Οι [Dimou et al. 2015](#) χρησιμοποίησαν υδρόλυμα οινολάσπης ως πηγή αζώτου και ακάθαρτης γλυκερόλης ως πηγή άνθρακος για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Cupriavidus necator* DSM 7237 για την παραγωγή PHB σε συνθήκες ημιδιαλείποντος έργου. Ακόμη, οι [Follonier et al. 2014](#) στη μελέτη τους χρησιμοποίησαν για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού *P. resinovorans* DSM 21078 υδρολύματα προερχόμενα από απόβλητα της επεξεργασίας φρούτων (hydrolyzed pomace) ως πηγή άνθρακα και απόβλητα μαγειρικά έλαια ως πρόδρομη ουσία για την παραγωγή mcl-PHAs ενώ παράλληλα το υπόστρωμα ενισχύθηκε με συνθετικά θρεπτικά όπως άζωτο, φώσφορος κα. Οι μελετητές παρατήρησαν παραγωγή PHAs σε συγκέντρωση 1.42 g/L με ποσοστιαία σύσταση μονομερών 16.3 % (C6), 33.8 % (C8), 30.4 % (C10), 9.5 % (C12) και 10% (C14). Το εύρημα αυτό, όπως αναφέρουν, επιβεβαιώνει το γεγονός ότι όλα τα πολυμερή προήλθαν από την ίδια πρόδρομη ουσία, δηλαδή τα απόβλητα μαγειρικά έλαια.

### 3.5 Μελέτη ικανότητας παραγωγής βιο-επιφανειοδραστικών ουσιών

Στο τέλος της παρούσας πειραματικής μελέτης εξετάστηκε η παραγωγή βιο-επιφανειοδραστικών ουσιών σε όλα τα στελέχη του εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων. Οι δοκιμασίες (τεστ) που διεξήχθησαν παρουσιάζονται αναλυτικά στο κεφάλαιο 2. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα στελέχη που εμφάνισαν δείκτη γαλακτωματοποίησης ( $E_{24}$ ) μεγαλύτερο από 30% και επιλέχθηκαν για περαιτέρω μελέτη.

**Πίνακας 3.11 :** Αποτελέσματα δοκιμασίας δείκτη γαλακτωματοποίησης ( $E_{24}$ )

Στέλεχος	Συνολικό ύψος υγρού	Ύψος γαλακτώματος	$E_{24}$	$E_{24}$ (%)
B28	3.5	1.4	0.40	40.00
B49	3.5	1.5	0.43	42.86
B93	3.5	1.5	0.43	42.86
B150	3.5	1.4	0.40	40.00
B209	3.5	1.1	0.31	31.43
B211	3.5	1.5	0.43	42.86

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν οι δοκιμασίες της αιμόλυσης, της ικανότητας συγκράτησης σταγόνας (drop collapse test) και της ικανότητας των βιο-επιφανειοδραστικών ουσιών στην μετατόπιση του ελαίου (oil displacement test). Ωστόσο κανένα από τα παραπάνω στελέχη δεν βρέθηκαν θετικά σε αυτές τις δοκιμασίες. Οι Alvarez et al. 2015 στη μελέτη τους εντόπισαν 34 στελέχη ικανά να παράξουν βιο-επιφανειοδραστικές ουσίες ωστόσο μόνο 19 από αυτά εμφάνισαν δείκτη γαλακτωματοποίησης μεγαλύτερο από 30 % και μελετήθηκαν περαιτέρω. Ωστόσο ανάμεσα σε αυτά τα 19 στελέχη κάποια δεν ήταν θετικά στις επόμενες δοκιμασίες όπως και στην παρούσα μελέτη.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### Συμπεράσματα

Στην παρούσα ερευνητική μελέτη αξιολογήθηκε η ικανότητα διαφόρων βακτηριακών στελεχών της συλλογής του εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων (FMCC) καθώς και στελεχών προερχόμενα από συλλογές προς την παραγωγή πολυ-υδροξυαλκανοϊκών εστέρων (PHAs). Από τη διεξαγωγή των ανωτέρω πειραμάτων τεκμαίρεται ότι τα στελέχη (FMCC) δε δύνανται να συσσωρεύσουν mcl-PHAs με χρήση ακατέργαστης γλυκερόλης ως πηγή άνθρακα σε αντίθεση με τα εμπορικά στελέχη (DSMZ). Στα αντίστοιχα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας απόβλητα μαγειρικά έλαια ως υπόστρωμα εμπλουτισμένο με με άλατα και ιχνοστοιχεία, ορισμένα από τα στελέχη της συλλογής FMCC παρουσίασαν παραγωγή mcl-PHAs. Ωστόσο, στο επόμενο πειραματικό στάδιο, όπου η πηγή αζώτου αντικαταστάθηκε από υδρόλυμα ηλιαλεύρου, η ανάπτυξη τους φάνηκε παρεμποδίζεται από έλλειψη αλάτων και ιχνοστοιχείων. Το πιο υποσχόμενο στέλεχος που παράγαγε mcl-PHAs σε υπόστρωμα από ανανεώσιμες πρώτες ύλες (απόβλητα μαγειρικά έλαια και υδρόλυμα ηλιαλεύρου) ήταν ο *Pseudomonas resinovorans* DSM 21078 σε συνθήκες διαλείποντος έργου σε κωνικές φιάλες και ημιδιαλείποντος έργου σε καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα. Πιο συγκεκριμένα σε συνθήκες ημιδιαλείποντος έργου η μέγιστη συγκέντρωση PHAs που επετεύχθη ήταν 0.88 g/L με ποσοστιαία σύσταση μονομερών 10.8 % (C6), 19.6 % (C8), 39.5 % (C10) και 30 % (C12). Η συγκέντρωση αυτή αντιστοιχεί σε ποσοστό 6.17 % του συνολικού ξηρού βάρους. Μετά από προσεκτική ανασκόπηση της βιβλιογραφίας παρατηρήθηκε ότι παρά το πλήθος των επιστημονικών εργασιών αναφορικά με την παραγωγή mcl-PHAs δεν υπάρχουν αναφορές για χρήση υδρόλυματος ηλιαλεύρου ως πηγή αζώτου σε συνδυασμό με απόβλητα μαγειρικά έλαια ως πηγή άνθρακα. Επιπρόσθετα, μείζονος σημασίας κρίνεται το γεγονός ότι τα εμπορικά στελέχη που προέρχονται από τη συλλογή της DSMZ δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς όσον αφορά στην καλλιέργεια τους σε βιοαντιδραστήρα. Συνεπώς, περαιτέρω μελλοντική μελέτη δύναται να αφορά στη βελτιστοποίηση των συνθηκών καλλιέργειας και ειδικότερα του θρεπτικού υποστρώματος για την αύξηση της παραγωγής mcl-PHAs με συγκεκριμένα στελέχη.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abdel-Mawgoud A.M., Lépine F., Déziel E., (2010), Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles, *Appl Microbiol Biotechnol* 86:1323–1336

Akaraonye E., Keshavarz T., Roy I., (2010), Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice, *J Chem Technol Biotechnol* 2010; 85: 732–743

Alvarez MV, Jurelevicius D, Marques MJ, Souza MP, Araújo LV, Barros GT, Mendonca Alves ROS, Freire Guimarães DM, Seldin L, (2015) *Bacillus amyloliquefaciens* TSBSO 3.8, a biosurfactant-producing strain with biotechnological potential for microbial enhanced oil recovery, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 136 p.14–21

Anderson A.J., Dawes E.A., (1990), Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* 54, 450e472

Annur M.S.M., Tan I.K.P., Ibrahim S., Ramachandran K.B., (2007), Production of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) from crude fatty acids mixture by *Pseudomonas putida*. *Food Bioprod. Process* 85, 104e119

Ashby R.D., Foglia T.A., (1998), Poly(hydroxyalkanoate) biosynthesis from triglyceride substrates *Appl Microbiol Biotechnol* 49: 431-437

Ashby RD, Solaiman DKY, Foglia TA (2005) Synthesis of short-/medium-chain-length poly(hydroxyalkanoate) blends by mixed culture fermentation of glycerol, *Biomacromolecules* 6, 2106-2112

Babel W., Riis V., Hainich E., (1990), Mikrobelle thermoplaste: biosynthese, eigenschaften und anwendung. *Plaste Und Kautschuk* 37:109–115

Basnett P., Ching K.Y., Stolz M., Knowles J.C., Boccaccini A.R., Smith C., Locke I.C., Keshavarz T., Roy I., (2013), Novel Poly(3-hydroxyoctanoate)/Poly(3-hydroxybutyrate) blends for medical application, *React. Funct. Polym.* 73 1340

Bhuwal Anish Kumari, Singh Gulab, Kumar Aggarwal Neeraj, Goyal Varsha, and Yadav Anita (2013), Isolation and Screening of Polyhydroxyalkanoates Producing Bacteria from Pulp, Paper, and Cardboard Industry Wastes Hindawi Publishing Corporation International Journal of Biomaterials Volume 2013, Article ID 752821, 10 pages

Brandl H., Gross R.A. , Lenz W.R., Fuller R. C. (1988), *Pseudomonas oleovorans* as a Source of Poly(P-Hydroxyalkanoates) for Potential Applications as Biodegradable Polyesters , Applied and environmental microbiology Vol. 54, No. 8, p. 1977-1982

Carter D., Darby D., Halle J., Hunt P., (2005), How To Make Biodiesel; Low-Impact Living Initiative, Redfield Community, Winslow, Bucks, ISSN 0-9649171-0-3

Chanprateep S. (2010), Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates, J. Biosci. Bioeng. 110, 621e632

Chaudhry Waqas Nasir, Jamil Nazia, Ali Iftikhar, Ayaz Mian Hashim, Hasnain Shahida (2011), Screening for polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing bacterial strains and comparison of PHA production from various inexpensive carbon sources Annals of Microbiology; 61(3):623-629

Chee J.Y., Tan Y., Samian M.R., Sudesh K., (2010), Isolation and characterization of a *Burkholderia* sp. USM (JCM15050) capable of producing polyhydroxyalkanoate (PHA) from triglycerides, fatty Acids and glycerols. J. Polym. Environ. 18, 584e592

Chhetri A.B., Watts K.C., Islam M.R., (2008), Waste Cooking Oil as an Alternate Feedstock for Biodiesel Production Energies 2008, 1, 3-18; DOI: 10.3390/en1010003

Ciesielski S., Pokoj T., Klimiuk E., (2008), Molecular insight into activated sludge producing polyhydroxyalkanoates under aerobic-anaerobic conditions. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 35, 805e814

Ciesielski S., Mozejko J., Pisutpaisal N., (2015), Plant oils as promising substrates for polyhydroxyalkanoates production, *Journal of Cleaner Production* 106, 408e421

Cromwick A.M., Foglia T., Lenz R.W., (1996), The microbial production of poly(-hydroxyalkanoates) from tallow. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46, 464e469

Cruz M.V., Freitas F., Paiva A., Mano F., Dionisio M., Ramos A.M., Reis M.A.M., (2015), Valorization of fatty acids-containing wastes and byproducts into short- and medium-chain length polyhydroxyalkanoates, *New Biotechnology*, Volume 00, Number 00

Desai JD, Banat IM, (1997), Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol Mol Biol Rev* 61:47–64

Dimou C., Kopsahelis N., Papadaki A., Papanikolaou S., Kookos K.I., Mandala I., Koutinas A.A., (2015), Wine lees valorization: Biorefinery development including production of a generic fermentation feedstock employed for poly(3-hydroxybutyrate) synthesis, *Food Research International* 73 (2015) 81–87

Diniz S.C., Taciro M.K., Gomez J.G., da Cruz Pradella J.G., (2004), High cell-density cultivation of *Pseudomonas putida* IPT 046 and medium-chain-length polyhydroxyalkanoate production from sugar cane carbohydrates. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 119, 51e70

Du C., Sabirova J., Soetaert W., Lin S.K.C., (2012), Polyhydroxyalkanoates Production From Low-cost Sustainable Raw Materials, *Current Chemical Biology*, 6, 00-00

Fernandez D., Rodríguez E., Bassas M., Vinas M., Solanas A.M., Llorens J., Marques A.M., Manresa A., (2005), Agro-industrial oily wastes as substrates for PHA production by the new strain *Pseudomonas aeruginosa* NCIB 40045: Effect of culture conditions. *Biochem.. Eng. J.* 26, 159e167

Follonier S., Goyder M.S., Silvestri A.C., Crelier S., Kalman F., Riesen R., Zinn M., (2014), Fruit pomace and waste frying oil as sustainable resources for the



bioproduction of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates, *International Journal of Biological Macromolecules*. doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.05.061

Gandhi N.R., Skebba V.L.P., (2007), Rhamnolipid compositions and related methods of use, International Patent WO/095258

Gustafsson S., Hultberg M., Figueroa R.I., Rengefors K., (2009), On the control of HAB species using low biosurfactant concentrations. *Harmful Algae*;8: 857–63

van Haesendonck I.P.H., Vanzeveren E.C.A., (2004), Rhamnolipids in bakery products, International Patent WO 2004/040984

Hahn SK, Chang YK, Kim SB, Chang NH, (1994) Optimization of microbial poly(3-hydroxybutyrate) recover using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform, *Biotechnology and Bioengineering* Volume 44, Issue 2, pages 256–261

Hazer B., Torul O., Borcakli M., Lenz R.W., Fuller R.C., Goodwin S.D., (1998), Bacterial production of polyesters from free fatty acids obtained from natural oils by *Pseudomonas oleovorans*. *J. Polym. Environ.* 6, 109-113

Hocking P.J., Marchessault R.H., (1994), Biopolyesters, in *Chemistry and Technology of Biodegradable Polymers*, ed. Griffin GJL. Blackie Academic & Professional, London

Holmes P., (1985). Application of PHB: a microbially produced biodegradable thermoplastics. *Physics in Technology* 16(1)

Jacquel N, Lo C.W., Wei Y.H., Wu H.S., Wang S.S., (2008), Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates), *Biochemical Engineering Journal* 39: 15–27

Jung K., Hazenberg W., Prieto M., Witholt B., (2001), Two-stage continuous process development for the production of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates). *Biotechnol. Bioeng.* 72, 19-24

Katircioglu H., Aslim B., Yüksekdağ Z.N., Mercan N., Beyatli Y., (2003), Production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) and differentiation of putative *Bacillus* mutant strains by SDS-PAGE of total cell protein, *Afr. J. Biotechnol.* 2, 147-149

Kachrimanidou V, Kopsahelis N, Chatzifragkou A, Papanikolaou S, Yanniotis S, Kookos I, Koutinas A. (2013), Utilisation of By-Products from Sunflower-Based Biodiesel Production Processes for the Production of Fermentation Feedstock, *Waste Biomass Valorization* 4 :529–537

Kim D.Y., Kim H.W., Chung M.G., Rhee Y.H., (2007), Biosynthesis, Modification, and Biodegradation of Bacterial Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoates, *The Journal of Microbiology*, Vol. 45, No. 2, p. 87-97

Koller M., Salerno A., Dias M., Reiterer A., Brauneegg G., (2010) Modern biotechnological polymer synthesis: a review. *Food Technol. Biotechnol.* 48, 255e269

Kosaric N., (2001), Biosurfactants and their application for soil bioremediation. *Food Technol Biotechnol*;39 :295–304

Kulkarni M.G., Dalai A.K. , (2006), Waste Cooking Oils An Economical Source for Biodiesel: A Review, *Ind. Eng. Chem. Res.* 2006, 45, 2901-2913

Lang S, Wullbrandt D (1999) Rhamnose lipids—biosynthesis, microbial production and application potential. *Appl Microbiol Biotechnol* 51:22–32

Lauzier C.A., Monasterios C.J., Saracovan I, Marchessault R.H., Ramsay B.A., (1993), Film formation and paper coating with poly( $\beta$ -hydroxyalkanoate), a biodegradable latex, *Tappi J* 76:71–77

Lee S.Y., (1996), Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Trends Biotechnol.* 14, 431e438

Lee, W.H., Azizan, M.N.M., Sudesh, K., (2004), Effect of culture conditions of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) synthesized by *Comamonas acidovorans*, *Polym. Degrad. Stab.* 84, 129-134

Lemoigne M., (1926). "Produit de deshydratation et de polymerisation de l'acide  $\beta$ -oxybutyrique." *Bull Soc Chim Biol* 8: 770-782

Lie S. (1973), The EBC-ninhydrin method for determination of free alpha amino nitrogen. *Journal of the Institute of Brewing* 79, 37-41

Lopez N.I., Ruiz J.A., Mendez B.S., (1998), Survival of poly-3-hydroxybutyrate-producing bacteria in soil microcosms, *W J Microbiol Biotechnol* 14:681–684

Luef K.P., Stelzer F., Wiesbrock F., (2015), Poly(hydroxy alkanate)s in Medical Applications, *Chem. Biochem. Eng. Q.*, 29 (2) 287–297

Madison, L.L., Huisman, G.W., (1999), Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 21-53

Mothes G., Ackermann J.U., (2005), Synthesis of poly(3-hydroxybutyrate- co-4-hydroxybutyrate) with a target mole fraction of 4- hydroxybutyric acid units by two-stage continuous cultivation of *Delftia acidovorans* P4a. *Eng. Life Sci.* 5, 58e62

Mozejko J., Przybyłek G., Ciesielski S., (2011), Waste rapeseed oil as a substrate for mcl-PHAs production. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 113, 1550e1557

Mozejko J., Ciesielski S., (2013), Saponified waste palm oil as an attractive renewable resource for mcl-polyhydroxyalkanoate synthesis. *J. Biosci. Bioeng.* 116, 485e492

Mukherjee PD, Sen R., (2006), Towards commercial production of microbial surfactants, *Trends Biotechnol*;24:509–15

Nitschke M., Costa S. G.V.A.O., Contiero J., (2011), Rhamnolipids and PHAs: Recent reports on Pseudomonas-derived molecules of increasing industrial interest *Process Biochemistry* 46, 621–630

Papanikolaou S., Dimou A., Fakas S., Diamantopoulou P., Philippoussis A., Galiotou-Panayotou M. and Aggelis G. (2011), Biotechnological conversion of waste cooking olive oil into lipid-rich biomass using *Aspergillus* and *Penicillium* strains, *Journal of Applied Microbiology* 110, 1138–1150

Philip, S., Keshavarz T. and Roy I. (2007). Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 82(3): 233-247

Poblete-Castro I., Binger D., Oehlert R., Rohde M. (2014), Comparison of mcl-Poly(3-hydroxyalkanoates) synthesis by different *Pseudomonas putida* strains from crude glycerol: citrate accumulates at high titer under PHA-producing conditions *BMC Biotechnology* (2014) 14:962

Radich, A., (2006), Biodiesel performance, costs, and use. US Energy Information Administration, <http://www.eia.doe.gov/oiaf/analysispaper/biodiesel/index.html>

Ramachandran H., Abdullah A.A., (2010), Isolation of PHA producing bacteria from Malaysian environment, *Proceedings of the 7th IMT-GT UNINET and the 3<sup>rd</sup> International PSUUNS Conferences on Bioscience*, pp. 178–179, 2010

Ryu, H.W., Cho, K.-S., Lee, E.G., Chang, Y.K., 2000. Recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from coagulated *Ralstonia eutropha* using a chemical digestion method. *Biotechnol. Prog.* 16, 676e679

Salehizadeh, H., van Loosdrecht, M.C.M., 2004. Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: recent trends and biotechnological importance. *Biotechnol. Ad* 22, 261e279

Serafim L.S., Lemos, P.C., Albuquerque M.G.E., Reis M.A.M., (2008), Strategies for PHA production by mixed cultures and renewable waste materials. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81, 615e628

Silva-Queiroz S.R., Silva L.F., Pradella J.G.C., Pereira E.M., Gomez J.G.C., (2009), PHA-MCL biosynthesis systems in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* strains show differences on monomer specificities. *J. Biotechnol.* 143, 111e118

Simon-Colin C., Raguenes G., Crassous P., Moppert X., Guezennec J., (2008), A novel mcl-PHA produced on coprah oil by *Pseudomonas guezennei* biovar. tikehau,

isolated from a “kopara” mat of French Polynesia. *Int. J. Biol. Macromol.* 43, 176e181

Song J.H., Jeon C.O., Choi M.H., Yoon S.C., Park W., (2008), Polyhydroxyalkanoate (PHA) production using waste vegetable oil by *Pseudomonas* sp. strain DR2. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 1408e1415

Spiekermann P., Rehm B.H.A., Kalscheuer R., Baumeister D., and Steinbüchel A. (1999), “A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds,” *Archives of Microbiology*, vol. 171, no. 2, pp. 73–80

Steinbüchel, A., Hein S., (2001). Biochemical and molecular basis of microbial synthesis of polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 71, 81-123

Steinbüchel A., Fuchtenbusch B., (1998), Bacterial and other biological systems for polyester production. *Tibtech* 16:419–427

Tan GYA, Chen CL, Li L, Ge L, Wang L, Razaad IMN, Li Y, Zhao L, Mo Y, Wang JY (2014), Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review, *Polymers*, 6, 706-754; doi:10.3390/polym6030706

Teeka J., Imai T., Cheng X., (2010) , Screening of PHA producing bacteria using biodiesel-derived waste glycerol as a sole carbon source,” *Journal of Water and Environment Technology*, vol. 8,pp. 371–381

Urum K., Pekdemir T., (2004), Evaluation of biosurfactants for crude oil contaminated soil washing. *Chemosphere*;57: 1139–50

US Congress (1993), Biopolymers: making materials nature’s way – background paper. Office of Technology Assessment, Washington DC

Valappil S., Misra S.K., Boccaccini A.R., Roy I.,(2006), Biomedical applications of polyhydroxyalkanoates (PHAs), an overview of animal testing and in vivo responses. *Expert Rev., Med. Devices* 3(6), 853-868

Walsh M., O'Connor K., Babu R., Woods T., Kenny S., (2015), Plant Oils and Products of Their Hydrolysis as Substrates for Polyhydroxyalkanoate Synthesis, *Chem. Biochem. Eng. Q.*, 29 (2) 123–133

Wang S., Mulligan C.N., (2009), Rhamnolipid biosurfactant-enhanced soil flushing for the removal of arsenic and heavy metals from mine tailings. *Process Biochem* 44: 296–301

Witholt B., Kessler B., (1999), Perspectives of medium chain length poly(hydroxyalkanoates). *Curr. Opin. Biotechnol.* 10, 279-285

Yang H.H., Chien S.M., Lo M.Y., Lan J.C.W., Lu W.C., Ku Y.Y., (2007), Effects of biodiesel on emissions of regulated air pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons under engine durability testing. *Atmospheric Environment*, 41, 7232–7240