



## ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου  
Εργαστήριο Μηχανικής και Επεξεργασίας Τροφίμων

ΠΜΣ: Επιστήμη & Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του  
Ανθρώπου

### ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

*Βιοτεχνολογική αξιοποίηση παράπλευρων ρευμάτων  
βιομηχανιών τροφίμων για την παραγωγή πολυ(3-  
υδροξυβουτυρικού) εστέρα μέσω βακτηριακών ζυμώσεων*

**Γρηγόριος Π. Χαλμούκος, Χημικός**

**Επιβλέπων:** Αποστόλης Κουτίνας, Αν. Καθηγητής





# ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

*Βιοτεχνολογική αξιοποίηση παράπλευρων ρευμάτων βιομηχανιών τροφίμων για την παραγωγή πολυ(3-υδροξυβουτυρικού) εστέρα μέσω βακτηριακών ζυμώσεων*

*Bioprocess development for poly(3-hydroxybutyrate) production via bacterial fermentations using food industry side streams*

**Γρηγόριος Π. Χαλμούκος**

**Εξεταστική Επιτροπή:**

Κουτίνας Αποστόλης, Αναπληρωτής Καθηγητής  
Παπανικολάου Σεραφείμ, Καθηγητής  
Στοφόρος Νικόλαος, Καθηγητής

**Επιβλέπων:**

Αποστόλης Κουτίνας, Αν. Καθηγητής

## Ευχαριστίες

*Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μηχανικής και Επεξεργασίας Τροφίμων, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια του Προγράμματος «Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου».*

*Στα πλαίσια της εν λόγω μελέτης μου δόθηκε η ευκαιρία να συναναστραφώ και να συνεργαστώ με αξιόλογους ανθρώπους. Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους ακαδημαϊκούς μου καθοδηγητές και συνεργάτες που συνετέλεσαν με τον δικό τους τρόπο ο καθένας στην υλοποίηση της παρούσας εργασίας.*

*Πρωτίστως θα ήθελα να ευχαριστήσω τον αναπληρωτή καθηγητή κ. Αποστόλη Κουτίνα, υπεύθυνο για την ανάθεση και την επίβλεψη της εργασίας μου, για την άριστη συνεργασία και τις ευκαιρίες που μου έδωσε καθ' όλη τη διάρκεια του πονήματος.*

*Ιδιαίτερα θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον διδάκτορα κ. Δημήτριο Λαδάκη για την άριστη συνεργασία μας και την σημαντική αρωγή του στην εκπόνηση της παρούσης εργασίας με την καίρια καθοδήγησή του.*

*Το πιο μεγάλο «ευχαριστώ» το οφείλω στην οικογένεια και τους φίλους μου οι οποίοι μου συμπαραστάθηκαν και με βοήθησαν με κάθε τρόπο καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.*

## Περίληψη

Η συσσώρευση των πλαστικών πετροχημικής προέλευσης στο περιβάλλον καθώς και η μη αποικοδόμησή τους, συνιστά ένα από τα μεγαλύτερα περιβαλλοντικά προβλήματα. Έτσι λοιπόν παρατηρείται μία έντονη τάση αντικατάστασής τους από βιογενή-βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά με χαμηλό περιβαλλοντικό αντίκτυπο. Το πλέον μελετημένο μέλος των PHAs - το PHB – είναι γραμμικός πολυεστέρας που αποτελείται από μονομερή 3-υδροξυβουτυρικού οξέος. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η αξιοποίηση αλευρούχων αποβλήτων, συγκεκριμένα του πιτύρου σίτου, για την παραγωγή πολυ(3-υδροξυβουτυρικού) εστέρα (PHB) μέσω βακτηριακών ζυμώσεων με τη χρήση του μικροοργανισμού *Burkholderia sacchari* IPT 101.

Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα όπου μελετήθηκαν η κινητική ανάπτυξη της βιομάζας, η κατανάλωση του υποστρώματος, η κατανάλωση αζώτου που περιέχεται στις ελεύθερες αμινομάδες πεπτιδίων και αμινοξέων, η κατανάλωση ανόργανου φωσφόρου και η παραγωγή του PHB. Αρχικά διεξήχθησαν πειράματα διαλείποντος έργου σε κωνικές φιάλες, όπου διερευνήθηκε η επίδραση της πηγής αζώτου στη μικροβιακή αύξηση. Οι καλλιέργειες αυτές διεξήχθησαν με και χωρίς την προσθήκη πηγής αζώτου στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης. Η πηγή αζώτου που χρησιμοποιήθηκε ήταν οργανικό άζωτο από εκχύλισμα ζύμης (1 g/L) και τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών έδειξαν διπλάσιες τιμές στην συγκέντρωση της ολικής ξηρής μάζας (6,05 g/L) στην περίπτωση όπου χρησιμοποιήθηκε οργανικό άζωτο στο θρεπτικό μέσο. Επίσης, στα πειράματα όπου χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα ζύμης στις ζυμώσεις παρατηρήθηκε παραγωγή PHB (2,42 g/L) σε αντίθεση με τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν απουσία αζώτου όπου δεν επετεύχθη παραγωγή του βιοπολυμερούς. Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες διαλείποντος έργου σε κωνικές φιάλες του μικροοργανισμού *B.sacchari* σε διαφορετικά εμπορικά σάκχαρα (γαλακτόζη, ξυλόζη, αραβινόζη, μαννόζη) με στόχο την προσομοίωση της σύστασης του υδρολύματος πιτύρου σίτου. Η μεγαλύτερη απόδοση προϊόντος (0,094 g/g) αλλά και παραγωγικότητας προϊόντος (0,048 g/(L×h)), επετεύχθησαν στην περίπτωση της γαλακτόζης. Για την γλυκόζη πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε κωνικές φιάλες των 2 L με ενεργό όγκο 800 mL. Στην περίπτωση αυτή η συγκέντρωση βιομάζας εφτάσε στα 7,37 g/L, η απόδοση προϊόντος 0,1 g/g και η παραγωγικότητα προϊόντος 0,057g/(L×h). Ωστόσο ο αερισμός φαίνεται να επηρέαζε αρκετά τα αποτελέσματα και για αυτό ακολούθησαν καλλιέργειες διαλείποντος έργου του μικροοργανισμού, σε φιάλες των 500 mL για τη γλυκόζη, ξυλόζη και αραβινόζη. Οι τιμές της συνολικής βιομάζας, της απόδοσης και παραγωγικότητας προϊόντος ήταν ψηλότερες σε σχέση με αυτές των αρχικών πειραμάτων. Η απόδοση προϊόντος στην περίπτωση της γλυκόζης (0,13 g/g), είχε παρόμοια τιμή με αυτή της αραβινόζης (0,16 g/g). Η ενδοκυτταρική συσσώρευση επίσης ήταν ίδια (60%), ενώ η παραγωγικότητα ήταν μεγαλύτερη στην περίπτωση της γλυκόζης (0,084 g/(L×h)). Στην περίπτωση της ξυλόζης οι τιμές ήταν αρκετά χαμηλές.

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε κωνικές φιάλες, σε διαφορετικά εμπορικά σάκχαρα αλλά για διαφορετικούς αρχικούς λόγους C/FAN.

Αυτή τη φορά μελετήθηκε η επίδραση του αρχικού λόγου C/FAN τόσο στην ανάπτυξη της βιομάζας και στον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης του μικροοργανισμού, όσο και στην παραγωγή και συσσώρευση του PHB. Οι λόγοι που εξετάστηκαν ήταν περίπου 40, 80, και 160 g/g. Ο μεγαλύτερος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης του μικροοργανισμού σε υπόστρωμα γλυκόζης ( $0,51 \text{ h}^{-1}$ ), ξυλόζης ( $0,30 \text{ h}^{-1}$ ), αραβινόζης ( $0,21 \text{ h}^{-1}$ ), γαλακτόζης ( $0,44 \text{ h}^{-1}$ ), επετεύχθη στον μικρότερο λόγο C/FAN. Στην περίπτωση της γλυκόζης, στον λόγο C/FAN = 140 g/g το ποσοστό ενδοκυτταρικής συσσώρευσης έφτασε σε υψηλότερες τιμές (61,17%) σε σχέση με τους άλλους δύο λόγους. Στην περίπτωση της ξυλόζης οι αποδόσεις προϊόντος (0,11 g/g), βιομάζας (0,29 g/g) και παραγωγικότητας προϊόντος (0,038 g/L) είχαν υψηλότερες τιμές στον μικρότερο αρχικό λόγο (C/FAN=47 g/g) σε σχέση με τους άλλους δύο λόγους. Στην περίπτωση της γαλακτόζης, τόσο στον αρχικό λόγο C/FAN = 44 g/g όσο και στον λόγο C/FAN=100 g/g, ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης του μικροοργανισμού, η απόδοση και η παραγωγικότητα προϊόντος παρουσιάζουν παρόμοιες τιμές. Τέλος, στην περίπτωση της αραβινόζης, η μέγιστη απόδοση προϊόντος (0,16 g/g) και η μέγιστη παραγωγικότητα προϊόντος (0,051 g/(L×h)), επετεύχθησαν στον λόγο C/FAN=150 g/g.

Ακολούθως, έλαβαν χώρα ζυμώσεις ημισυνεχούς λειτουργίας σε βιοαντιδραστήρα, με πηγή άνθρακα διαφορετικά εμπορικά σάκχαρα (γλυκόζη, ξυλόζη) στον βέλτιστο λόγο C/FAN. Στην περίπτωση της γλυκόζης, η μέγιστη τιμή συνολικής βιομάζας (31,52 g/L) και PHB (17,56 g/L) επετεύχθησαν στις 56 h. Στην περίπτωση της ξυλόζης η μέγιστη τιμή συνολικής βιομάζας (20,76 g/L) και PHB (11,83 g/L) επετεύχθησαν στις 56 h.

Ζύμωση στερεάς κατάστασης σε πίτυρο σίτου έλαβε χώρα με σκοπό κυρίως την παραγωγή γλυκοαμυλάσης με χρήση του μύκητα *Aspergillus awamori*. Πραγματοποιήθηκε μελέτη της παραγωγής της γλυκοαμυλάσης κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Η μέγιστη ενεργότητα του ενζύμου (67,5 U/g) επετεύχθη στις 71 h. Τα παραγόμενα ένζυμα χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή υδρολύματος πτύρου σίτου. Στο εν λόγω υδρόλυμα ρυθμίστηκε ο βέλτιστος αρχικός λόγος C/FAN και ακολούθως, το υδρόλυμα χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή PHB σε βιοαντιδραστήρα μέσω ζύμωσης ημισυνεχούς τροφοδοσίας. Η μέγιστη τιμή συνολικής βιομάζας (26,63 g/L) και PHB (13,05 g/L) επετεύχθησαν στις 55 h ζύμωσης με ενδοκυτταρική συσσώρευση ίση με 49%. Η απόδοση μετατροπής των σακχάρων σε PHB ήταν 0,14 g/g και η παραγωγικότητα προϊόντος 0,25 g/(L×h). Τέλος, πραγματοποιήθηκε ανάκτηση PHB από την βιομάζα που παρήχθη στον βιοαντιδραστήρα. Η μέγιστη ανάκτηση PHB (86,7%) παρατηρήθηκε στην βιομάζα που προέκυψε από τη ζύμωση ημισυνεχούς τροφοδοσίας σε θρεπτικό μέσο γλυκόζης.

**Λέξεις κλειδιά:** πολυ(3-υδροξυβουτυρικός) εστέρας, PHB, μικροβιακές ζυμώσεις, *Burkholderia sacchari*, ζύμωση στερεής κατάστασης, γλυκοαμυλάση, *Aspergillus awamori*, υδρόλυμα, ανάκτηση PHB.

## Abstract

The accumulation of petroleum-based polymers in the environment and their degradation inability is one of the major environmental problems. Thus, there is a strong tendency to be replaced by biobased-biodegradable plastics which have a low environmental impact. The most studied member of PHAs – PHB – is a linear polyester consisting of 3-hydroxybutyric acid monomers. The purpose of the present work is the valorization of flour industry by-products, specifically of wheat bran, for poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) production via bacterial fermentations using the microorganism *Burkholderia sacchari* IPT 101.

Experiments were carried out in order to study the microbial growth, the consumption of the substrate, the consumption of free amino nitrogen, the consumption of inorganic phosphorus and the production of PHB. Initially, shake flask experiments were carried out in order to investigate the effect of the nitrogen source on microbial growth. These cultures were carried with or without additional nitrogen source supplementation. The nitrogen source used was yeast extract (1 g/L). The results showed higher biomass concentration (TDW=6.05 g/L) when yeast extract was added in the culture medium, resulting also in a PHB concentration of 2.42 g/L. No biopolymer accumulation was observed when no yeast extract was added.

Shake flasks cultures of *B.sacchari* were carried out on different commercial sugars (galactose, xylose, arabinose, mannose) in a similar composition to wheat bran hydrolysate. The highest product yield (0.094 g/g) and productivity 0.048 g/(L×h) were achieved in the case of galactose. In the case of glucose, batch experiments were performed in 2 L shake flasks with 800 mL working volume. In this case, biomass concentration reached 7.37 g/L, the product yield reached 0.1 g/g and the productivity reached 0.057g/(L×h). However, the aeration seemed to have a significant effect on microbial growth and product formation and for this reason batch cultures were carried out in 500 mL flasks for glucose, xylose, arabinose. Total biomass, product yield and productivity were higher than those of the initial experiments. The product yield in the case of glucose (0.13 g/g) was similar to that of arabinose (0.16 g/g). Intracellular accumulation had a similar (60%), while the productivity was higher in the case of glucose 0.084 g/(L×h). In the case of xylose the values were quite low.

Shake flasks experiments were subsequently carried out on different commercial sugars, for different initial C/FAN ratios. The effect of the initial C/FAN ratio on the specific growth rate and on PHB production was evaluated. The ratios examined were 40, 80,160 g/g. The highest specific growth rate of the microorganism on glucose (0.51 h<sup>-1</sup>), xylems (0.30 h<sup>-1</sup>), arabinose (0.21 h<sup>-1</sup>), galactose (0.44 h<sup>-1</sup>), were achieved at the lowest C/FAN ratio. In the case of glucose, the intracellular PHB accumulation reached higher values (61.17%) at the ratio of C/FAN = 140 g/g. In the case of xylose, the product yield (0.11 g/g), biomass yield (0.29 g/g) and product productivity (0.038 g /L) were higher at the lowest initial ratio (C/FAN = 47 g/g). In the case of galactose, the specific growth rate, the product yield and the

productivity had similar values at the ratios of C/FAN = 100 g/g and C/FAN = 44 g/g. Finally, in the case of arabinose, the maximum product yield (0.16 g/g) and productivity (0.051 g/ (L×h)) were achieved at the ratio of C/FAN = 150 g/g.

Fed-batch fermentation was subsequently carried out in a bioreactor using as a carbon source different commercial sugars (glucose, xylose) at the optimum C/FAN ratio. In the case of glucose, the highest total biomass (31.52 g/L) and PHB (17.56 g/L) were reached after 56 h. In the case of xylose, the highest total biomass (20.76 g/L) and PHB (11.83 g/L) were reached after 56 h.

Solid state fermentation on wheat bran was conducted aiming to crude enzyme production using the fungal strain *Aspergillus awamori*. The production of glucoamylase throughout fermentation has been evaluated. The highest glucoamylase activity (67.5 U/g) was achieved after 71 h. The produced enzymes were used for wheat bran hydrolysate production. In this hydrolysate, the optimal initial C/FAN ratio was adjusted and then, the hydrolysate was used for PHB production in a bioreactor via fed-batch fermentation. The maximum total biomass (26.63 g/L) and PHB concentration (13.05 g/L) were reached after 55 h with a 49% intracellular PHB accumulation. PHB yield reached 0.14 g/g and the productivity reached 0.25 g/(L×h). Finally, PHB was recovered from the biomass with the highest PHB recovery (86.7 %) observed in the biomass produced via fed-batch fermentation on glucose.

**Key words:** poly(3-hydroxybutyrate), PHB, microbial fermentations, *Burkholderia sacchari*, solid state fermentation, glucoamylase, *Aspergillus awamori*, wheat bran hydrolysate, PHB recovery.



## Πίνακας περιεχομένων

1	Εισαγωγή.....	1
1.1	Συνθετικά πολυμερή.....	1
1.2	Βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή.....	2
1.3	Πολυ(υδροξυαλκανοϊκοί) εστέρες (PHAs).....	3
1.3.1	Δομή και ταξινόμηση PHAs.....	5
1.3.2	Πολυ(3-υδροξυβουτυρικός) εστέρας (PHB).....	6
1.4	Παραγωγή PHAs.....	8
1.4.1	Μικροοργανισμοί και υποστρώματα που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή των PHAs.....	9
1.4.2	Παραγωγή συμπολυμερών.....	10
1.4.3	Βιομηχανική παραγωγή PHAs.....	13
1.4.4	Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή PHAs.....	14
1.5	Μεταβολικά μονοπάτια σύνθεσης PHAs.....	17
1.6	Ανάκτηση και καθαρισμός των PHAs.....	20
1.7	Ιδιότητες PHAs.....	24
1.8	Εφαρμογές PHAs.....	27
1.9	Κόκκος σίτου.....	29
1.9.1	Πίτυρο σίτου.....	30
1.10	Βακτήριο <i>Burkholderia sacchari</i> .....	34
1.10.1	Ανασκόπηση βιβλιογραφίας.....	36
1.11	Ζύμωση στερεάς κατάστασης (SSF).....	40
1.12	Σκοπός εργασίας.....	41
2	Υλικά και μέθοδοι.....	43
2.1	Βιολογικό υλικό.....	43
2.2	Σύσταση πιτύρου σίτου.....	44
2.3	Παρασκευή εμβολίου του βακτηριακού στελέχους <i>Burkholderia sacchari</i> IPT 101 και σύσταση του θρεπτικού μέσου.....	45
2.3.1	Παρασκευή εμβολίου του μύκητα <i>Aspergillus awamori</i> .....	46
2.4	Ζυμώσεις στερεάς κατάστασης.....	47
2.4.1	Μέτρηση ενεργότητας γλυκοαμυλάσης.....	49
2.5	Υδρόλυση πιτύρου σίτου και παραγωγή υδρολύματος.....	50
2.6	Συνθήκες ζυμώσεων υγρής κατάστασης διαλείποντος έργου για την παραγωγή PHB	51
2.6.1	Επίδραση πηγής yeast extract.....	51

2.6.2	Καλλιέργειες υγρής κατάστασης διαλείποντος έργου για την παραγωγή PHB 52	
2.6.3	Επίδραση αρχικού λόγου C/FAN.....	52
2.7	Ζυμώσεις σε βιοαντιδραστήρα για παραγωγή PHB .....	53
2.7.1	Τεχνικά χαρακτηριστικά βιοαντιδραστήρα .....	54
2.7.2	Ζυμώσεις ημισυνεχούς τροφοδοσίας σε διαφορετικά εμπορικά σάκχαρα ..	54
2.7.3	Ζύμωση ημισυνεχούς τροφοδοσίας σε υδρόλυμα πιτύρου σίτου στον βέλτιστο λόγο C/FAN .....	55
2.8	Αποστείρωση .....	55
2.9	Αναλυτικές μέθοδοι.....	56
2.9.1	Προσδιορισμός βιομάζας .....	56
2.9.2	Προσδιορισμός σακχάρων και άλλων μεταβολιτών .....	57
2.9.3	Προσδιορισμός συγκέντρωσης αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN)	57
2.9.4	Προσδιορισμός συγκέντρωσης ανόργανου φωσφόρου (IP).....	60
2.9.5	Προσδιορισμός pH .....	61
2.9.6	Προσδιορισμός υγρασίας.....	61
2.9.7	Καθορισμός και ποσοτικοποίηση συγκέντρωσης ενδοκυτταρικού PHB .....	61
2.10	Ανάκτηση ενδοκυτταρικού PHB .....	63
3	Αποτελέσματα.....	65
3.1	Ζυμώσεις στερεάς κατάστασης του μύκητα <i>Aspergillus awamori</i> για την παραγωγή ενζύμων .....	65
3.1.1	Κινητική ενεργότητας γλυκοαμυλάσης.....	65
3.2	Παραγωγή υδρολυμάτων πιτύρου σίτου.....	66
3.3	Καλλιέργειες υγρής κατάστασης διαλείποντος έργου για την παραγωγή PHB.....	68
3.3.1	Επίδραση πηγής εκχυλίσματος ζύμης.....	68
3.3.2	Καλλιέργειες διαλείποντος έργου σε κωνικές φιάλες με διαφορετικά σάκχαρα ως πηγή άνθρακα .....	70
3.3.3	Επίδραση αρχικού λόγου C/FAN.....	85
3.4	Ζυμώσεις σε βιοαντιδραστήρα για παραγωγή PHB.....	92
3.4.1	Ζυμώσεις ημισυνεχούς τροφοδοσίας σε διαφορετικά εμπορικά σάκχαρα στον βέλτιστο λόγο C/FAN .....	92
3.4.2	Ζύμωση ημισυνεχούς τροφοδοσίας σε υδρόλυμα πιτύρου σίτου στον βέλτιστο όγκο C/FAN .....	95
3.5	Ανάκτηση ενδοκυτταρικού PHB .....	97
4	Συμπεράσματα-Συζήτηση .....	99

Βιβλιογραφία..... 103

## ΛΙΣΤΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

**Πίνακας 1.1** Μέγιστος θεωρητικός συντελεστής PHB από διάφορα υποστρώματα (Yamane, 1993).

**Πίνακας 1.2** Εμπορικά προϊόντα PHAs μαζί με τις εταιρίες και τα δεδομένα ζύμωσης (Mozejko-Ciesielska & Kiewisz, 2016).

**Πίνακας 1.3** Φυσικές ιδιότητες κάποιων PHAs και κάποιων πολυμερών πετροχημικής προέλευσης (Sudesh et al., 2000 / Anjum et al., 2016).

**Πίνακας 1.4** Σύσταση υδρολύματος πιτύρου σίτου (Obruca et al., 2015).

**Πίνακας 1.5** Παραγωγή PHB από υδρόλυμα πιτύρου σίτου και από διάφορους μικροοργανισμούς.

**Πίνακας 1.6** Βιβλιογραφική ανασκόπηση παραγωγής PHAs από διαφορετικά στελέχη του μικροοργανισμού *Burkholderia sacchari*.

**Πίνακας 2.1** Σύνθεση του θρεπτικού υλικού για την ενεργοποίηση των κυττάρων του μικροοργανισμού *B.sacchari* IPT 101.

**Πίνακας 2.2** Σύσταση χοντρόκοκκου πιτύρου σίτου.

**Πίνακας 2.3** Σύσταση διαλύματος ιχνοστοιχείων.

**Πίνακας 3.1** Καθαρή συγκέντρωση σακχάρων στο υδρόλυμα πιτύρου σίτου μετά το τέλος της υδρόλυσης, και διορθωμένη συγκέντρωσή τους μετά από κατάλληλη προσθήκη σακχάρων.

**Πίνακας 3.2** Συνοπτικός πίνακας αποτελεσμάτων της καλλιέργειας διαλείποντος έργου του μικροοργανισμού *B.sacchari* στα διαφορετικά εμπορικά σάκχαρα, στο τελικό σημείο των ζυμώσεων και υπολογισμός συντελεστών.

**Πίνακας 3.3** Συνοπτικός πίνακας αποτελεσμάτων της καλλιέργειας διαλείποντος έργου του μικροοργανισμού *B.sacchari*, στο τελικό σημείο της ζύμωσης.

**Πίνακας 3.4** Συνοπτικός πίνακας αποτελεσμάτων και υπολογισμός συντελεστών για την καλλιέργεια διαλείποντος έργου του μικροοργανισμού *B.sacchari* στα διαφορετικά εμπορικά σάκχαρα, στο τελικό σημείο των ζυμώσεων.

**Πίνακας 3.5** Υπολογισμός διαφόρων συντελεστών κατά τη καλλιέργεια διαλείποντος έργου του μικροοργανισμού *B.sacchari*, σε διαφορετικά εμπορικά σάκχαρα και σε διαφορετικούς αρχικούς λόγους C/FAN.

**Πίνακας 3.6** Ποσοστό ανάκτησης και ποσοστό εξαγωγής PHB, το οποίο παρήχθη κατά την διάρκεια ζυμώνσεων του μικροοργανισμού *B.sacchari* σε διαφορετικά υποστρώματα.

**Πίνακας 3.7** Σύγκριση του συντελεστή απόδοσης προϊόντος και της παραγωγικότητας προϊόντος σε διαφορετικούς αρχικούς λόγους C/FAN, σε καλλιέργειες του μικροοργανισμού *B.sacchari* σε διαφορετικά εμπορικά σάκχαρα.

## ΛΙΣΤΑ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

- Σχήμα 1.1** Ταξινόμηση των βιοδιασπώμενων πολυμερών (Πενλόγλου, 2010).
- Σχήμα 1.2** Ηλεκτρονική μικροσκοπία μετάδοσης κυττάρων *W.eutropha* έπειτα από 62 ώρες ζύμωσης (Xu et al., 2010).
- Σχήμα 1.3** Γενική δομή των κυριότερων PHAs (Jacquel et al., 2008).
- Σχήμα 1.4** Χημική δομή των α)PHB, β)PHV, γ)PHBV (Bugnicourt et al., 2014).
- Σχήμα 1.5** Παραγωγή διαφόρων τύπων PHAs από διάφορα υποστρώματα και μικροοργανισμούς (Jiang et al., 2017).
- Σχήμα 1.6** Μεταβολικά μονοπάτια σύνθεσης PHAs (Anjum et al., 2016).
- Σχήμα 1.7** Διαδικασία ανάκτησης των PHAs (Jacquel et al., 2008).
- Σχήμα 1.8** Εφαρμογές των πολυ(υδροξυαλκανοϊκών) εστέρων (Chen, 2011).
- Σχήμα 1.9** Δομή κόκκου σίτου (Onipe et al., 2015).
- Σχήμα 1.10** Η δομή της αμυλόζης (αριστερά) και της αμυλοπηκτίνης (δεξιά) (Shen et al., 2009).
- Σχήμα 1.11** Φυλογενετικό δέντρο βασισμένο στην 16S ριβοσωμική RNA αλληλουχία του μικροοργανισμού *Burkholderia sacchari* και συγγενών βακτηρίων (Bramer et al., 2001).
- Σχήμα 2.1** Εμβόλιο *Aspergillus awamori* αναπτυγμένο σε πίτυρο σίτου και άγαρ.
- Σχήμα 2.2** Ζύμωση στερεάς κατάστασης (SSF) του μικροοργανισμού *Aspergillus awamori* σε πίτυρο σίτου στις (α) 45 ώρες, (β) 60 ώρες, (γ) 70 ώρες, (δ) 90 ώρες ζύμωσης.
- Σχήμα 2.3** (α) Ημισυνεχής τροφοδοτούμενη καλλιέργεια για παραγωγή PHB σε γλυκόζη (β) Ημισυνεχής τροφοδοτούμενη καλλιέργεια για παραγωγή PHB σε υδρόλυμα πιτύρου σίτου.
- Σχήμα 2.4** Αποστείρωση υδρολύματος πιτύρου σίτου μέσω φίλτρου.
- Σχήμα 2.5** Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN).
- Σχήμα 2.6** Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης του πολυ(3-υδροξυβουτυρικού) εστέρα με εσωτερικό πρότυπο (βενζοϊκό οξύ).
- Σχήμα 2.7** Ανακτημένο PHB με τη μέθοδο του χλωροφορμίου-υποχλωριώδους νατρίου.

**Σχήμα 3.1** Ενεργότητα γλυκοαμυλάσης κατά τη διάρκεια ζύμωσης στερεάς κατάστασης του μύκητα *A.awamori*, σε πίτυρο σίτου με υγρασία 65%. και σε θερμοκρασία 30 °C.

**Σχήμα 3.2** Κατανάλωση γλυκόζης (Δ), παραγωγή βιομάζας (■) και κατανάλωση FAN (▲) κατά τη διάρκεια ζύμωσης του μικροοργανισμού *B.sacchari* σε κωνικές φιάλες, σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 1 g/L yeast extract.

**Σχήμα 3.3** Κατανάλωση γλυκόζης (Δ) και παραγωγή βιομάζας (■) κατά τη διάρκεια ζύμωσης του μικροοργανισμού *B.sacchari* σε κωνικές φιάλες.

**Σχήμα 3.4** Κινητική της συγκέντρωσης σακχάρων (●), της ενδοκυτταρικής συσσώρευσης (◆), του FAN (▲) και του IP (■), της βιομάζας (□), του PHB (○) και της υπολειπόμενης βιομάζας (Δ), κατά τη διάρκεια ζύμωσης διαλείποντος έργου (κωνικές φιάλες 250 mL) από τον μικροοργανισμό *B.sacchari* σε υπόστρωμα γαλακτόζης.

**Σχήμα 3.5** Κινητική της συγκέντρωσης σακχάρων (●), της ενδοκυτταρικής συσσώρευσης (◆), του FAN (▲), της βιομάζας (□), του PHB (○) και της υπολειπόμενης βιομάζας (Δ) κατά τη διάρκεια ζύμωσης διαλείποντος έργου (κωνικές φιάλες 250 mL) από τον μικροοργανισμό *B.sacchari* σε υπόστρωμα ξυλόζης.

**Σχήμα 3.6** Κινητική της συγκέντρωσης σακχάρων (●), της ενδοκυτταρικής συσσώρευσης (◆), του FAN (▲) και του IP (■), της βιομάζας (□), του PHB (○) και της υπολειπόμενης βιομάζας (Δ) κατά τη διάρκεια ζύμωσης διαλείποντος έργου (κωνικές φιάλες 250 mL) από τον μικροοργανισμό *B.sacchari* σε υπόστρωμα αραβινόζης.

**Σχήμα 3.7** Κινητική της συγκέντρωσης σακχάρων (●), της ενδοκυτταρικής συσσώρευσης (◆), του FAN (▲) και του IP (■), της βιομάζας (□), του PHB (○) και της υπολειπόμενης βιομάζας (Δ) κατά τη διάρκεια ζύμωσης διαλείποντος έργου (κωνικές φιάλες 250 mL) από τον μικροοργανισμό *B.sacchari* σε υπόστρωμα μαννόζης.

**Σχήμα 3.8** Κινητική της συγκέντρωσης σακχάρων (●), της ενδοκυτταρικής συσσώρευσης (◆), του FAN (▲) και του IP (■), της βιομάζας (□), του PHB (○) και της υπολειπόμενης βιομάζας (Δ) κατά τη διάρκεια ζύμωσης διαλείποντος έργου (κωνικές φιάλες 2 L) από τον μικροοργανισμό *B.sacchari* σε υπόστρωμα γλυκόζης.

**Σχήμα 3.9** Κινητική της συγκέντρωσης σακχάρων (●), της ενδοκυτταρικής συσσώρευσης (◆), του FAN (▲) και του IP (■), της βιομάζας (□), του PHB (○) και της υπολειπόμενης βιομάζας (Δ) κατά τη διάρκεια ζύμωσης διαλείποντος έργου (κωνικές φιάλες 500 mL) από τον μικροοργανισμό *B.sacchari* σε υπόστρωμα γλυκόζης.

**Σχήμα 3.10** Κινητική της συγκέντρωσης σακχάρων (●), της ενδοκυτταρικής συσσώρευσης (◆), του FAN (▲) και του IP (■), της βιομάζας (□), του PHB (○) και της υπολειπόμενης βιομάζας (Δ) κατά τη διάρκεια ζύμωσης διαλείποντος έργου (κωνικές φιάλες 500 mL) από τον μικροοργανισμό *B.sacchari* σε υπόστρωμα ξυλόζης.

**Σχήμα 3.11** Κινητική της συγκέντρωσης σακχάρων (●), της ενδοκυτταρικής συσσώρευσης (◆), του FAN (▲) και του IP (■), της βιομάζας (□), του PHB (○) και της υπολειπόμενης βιομάζας (Δ) κατά τη διάρκεια ζύμωσης διαλείποντος έργου (κωνικές φιάλες 500 mL) από τον μικροοργανισμό *B.sacchari* σε υπόστρωμα αραβινόζης.

**Σχήμα 3.12** Κινητική συγκέντρωσης βιομάζας και ενδοκυτταρικής συσσώρευσης, σε αρχικό λόγο περίπου C/FAN 40 g/g (●), 80 g/g(■), 160 g/g (▲), κατά τη διάρκεια ζύμωσης διαλείποντος έργου από τον μικροοργανισμό *B.sacchari* (a) σε υπόστρωμα γλυκόζης και (b) σε υπόστρωμα αραβινόζης.

**Σχήμα 3.13** Κινητική συγκέντρωσης βιομάζας και ενδοκυτταρικής συσσώρευσης, σε αρχικό λόγο περίπου C/FAN 40 g/g (●), 80 g/g(■), 160 g/g (▲), κατά τη διάρκεια ζύμωσης διαλείποντος έργου από τον μικροοργανισμό *B.sacchari* (a) σε υπόστρωμα ξυλόζης και (b) σε υπόστρωμα γαλακτόζης.

**Σχήμα 3.14** Ειδικός ρυθμός ανάπτυξης του μικροοργανισμού *B.sacchari* για διαφορετικούς αρχικούς λόγους C/FAN, σε υπόστρωμα διαφορετικών εμπορικών σακχάρων.

**Σχήμα 3.15** Κινητική της συγκέντρωσης σακχάρων (●), της ενδοκυτταρικής συσσώρευσης (◆), του FAN (▲), της βιομάζας (□), του PHB (○) και της υπολειπόμενης βιομάζας (Δ) κατά τη διάρκεια ζύμωσης ημισυνεχούς τροφοδοσίας (βιοαντιδραστήρας) από τον μικροοργανισμό *B.sacchari* σε υπόστρωμα εμπορικής γλυκόζης.



**Σχήμα 3.16** Κινητική της συγκέντρωσης σακχάρων (●), της ενδοκυτταρικής συσσώρευσης (◆), του FAN (▲), της βιομάζας (□), του PHB (○) και της υπολειπόμενης βιομάζας (Δ) κατά τη διάρκεια ζύμωσης ημισυνεχούς τροφοδοσίας (βιοαντιδραστήρας) από τον μικροοργανισμό *B.sacchari* σε υπόστρωμα εμπορικής ξυλόζης.

**Σχήμα 3.17** Κινητική της συγκέντρωσης σακχάρων (●), της ενδοκυτταρικής συσσώρευσης (◆), του FAN (▲), της βιομάζας (□), του PHB (○) και της υπολειπόμενης βιομάζας (Δ) κατά τη διάρκεια ζύμωσης ημισυνεχούς τροφοδοσίας (βιοαντιδραστήρας) από τον μικροοργανισμό *B.sacchari* σε υπόστρωμα υδρολύματος πιτύρου σίτου.

## Συντμήσεις

ATP: Τριφωσφορική αδενοσίνη

TCA: Τριγλωροξικό οξύ

NADPH: Φωσφονικοτινάμιδο-αδένινο-δινουκλεοτίδιο

CoA: Συνένζυμο A

ACP: Ακυλοτρανσφεράση

NAG: N-ακέτυλογλυκοζαμίνη

NAM: N-ακέτυλομουραμικό οξύ

PHAs: Πολυ(υδροξυαλκανοϊκοί) εστέρες

P(3HB) ή PHB: Πολυ(3-υδροξυβουτυρικός) εστέρας

P(3HV) ή PHV: Πολυ(3-υδροξυβαλερικός) εστέρας

PHHx: Πολυ(υδροξυεξανοϊκός) εστέρας

PHO: Πολυ(υδροξυοκτανοϊκός) εστέρας

PHN: Πολυ(υδροξυεννεανοϊκός) εστέρας

PHU: Πολυ(υδροξυεντεκανοϊκός) εστέρας

P(4HB): Πολυ(4-υδροξυβουτυρικός) εστέρας

P(3HB-co-3HHx): Πολυ(3-υδροξυβουτυρικός-co-3-υδροξυεξανοϊκός) εστέρας

P(3HB-co-3HV) ή PHBV: Πολυ(3-υδροξυβουτυρικός-co-3-υδροξυβαλερικός) εστέρας

P(3HB-co-4HB): Πολυ(3-υδροξυβουτυρικός-co-4-υδροξυβουτυρικός) εστέρας

P(3HB-co-3HO): Πολυ(3-υδροξυβουτυρικός-co-3-υδροξυοκτανοϊκός) εστέρας

mcl-PHAs: Μεσαίου μήκους αλύσσου PHAs

scl-PHAs: Μικρού μήκους αλύσσου PHAs

US\$/lb: Αμερικανικά δολλάρια/λίβρα.

# 1 Εισαγωγή

## 1.1 Συνθετικά πολυμερή

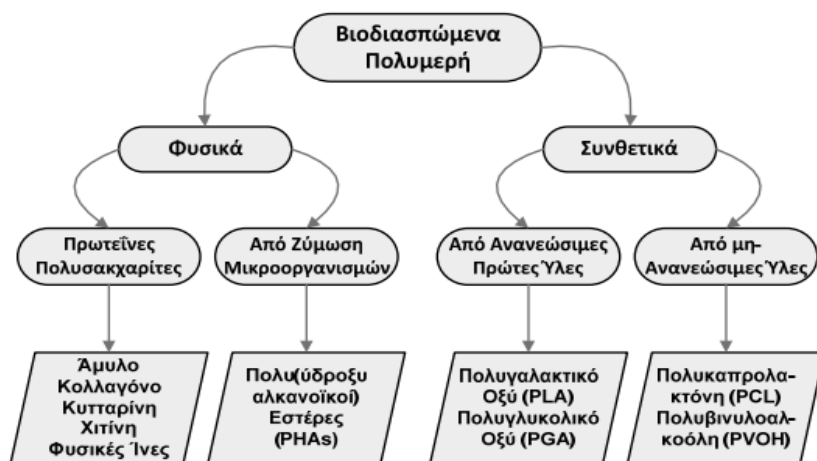
Τα συνθετικά πλαστικά από την ανακάλυψή τους και έπειτα είναι άρρηκτα συνδεδεμένα με την καθημερινότητα του ανθρώπου, γεγονός που οφείλεται στις εξαιρετικές ιδιότητές τους και στο μεγάλο εύρος εφαρμογών τους. Τα συνθετικά πλαστικά (μεταξύ των πιο γνωστών το τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο (PET), το πολυβινυλοχλωρίδιο (PVC), το πολυπροπυλένιο (PP), το πολυστυρένιο (PS)), έχουν μοριακό βάρος από 50.000-1.000.000 g/mol και διαθέτουν ποικίλες ιδιότητες (θερμομόνωση, ανθεκτικότητα σε χημικά, κατάλληλη ελαστικότητα κ.α) (Πενλόγλου, 2010). Έχει αναφερθεί πως η ετήσια κατανάλωση πλαστικών ήταν 80 kg και 60 kg, ανά άνθρωπο για τις Η.Π.Α και την Ευρώπη αντίστοιχα (Shen et al., 2009) ενώ το 2008 ο ρυθμός συσσώρευσης πλαστικών στο περιβάλλον υπολογίστηκε ως 25.000.000 τόνοι/έτος (Jackquel et al., 2008). Η συσσώρευση των πλαστικών πετροχημικής προέλευσης στο περιβάλλον καθώς και η ανικανότητα αποικοδόμησής τους από μικροοργανισμούς, συνιστά ένα από τα μεγαλύτερα περιβαλλοντικά προβλήματα. Πιο συγκεκριμένα, η αλόγιστη χρήση των πετροχημικών πλαστικών έχει συμβάλει στην κλιματική αλλαγή και στις αυξημένες εκπομπές διοξειδίου του άνθρακα. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την ολοένα και μεγαλύτερη εξάντληση των αποθεμάτων πετρελαίου (Ahn et al., 2015) (που αποτελεί πρώτη ύλη για τη σύνθεση πλαστικών) (Πενλόγλου, 2010), έχει οδηγήσει στην αναζήτηση βιογενών και βιοαποικοδομήσιμων πλαστικών (De Sousa Dias et al, 2017). Έτσι λοιπόν, παρατηρείται μία έντονη τάση αντικατάστασης των πετροχημικών πλαστικών από τα βιοπλαστικά που είναι φυσικά, βιογενή, βιοαποικοδομήσιμα και με χαμηλό περιβαλλοντικό αντίκτυπο (Verlinden et al., 2007, De Sousa Dias et al., 2017).

## 1.2 Βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή

Στο *Σχήμα 1.1* φαίνεται η ταξινόμηση των βιοδιασπώμενων πολυμερών. Τα βιοδιασπώμενα πολυμερή διακρίνονται ανάλογα με τον τρόπο σύνθεσής τους, σε φυσικά και συνθετικά. Στη πρώτη περίπτωση τα βιοπολυμερή συντίθενται στο εσωτερικό ζώντων οργανισμών αποτελώντας κατά βάση δομικά συστατικά ιστών (πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες) (Ekiert et al., 2015). Εδώ ανήκουν και τα PHAs που παράγονται κυρίως μέσω ζυμώσεων. Σε ότι αφορά τα συνθετικής προέλευσης πολυμερή, αυτά διακρίνονται σε εκείνα που προέρχονται από ανανεώσιμες πρώτες ύλες και στα πετροχημικής προέλευσης (Πενλόγλου, 2010).

Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί η παρανόηση μεταξύ των όρων ‘βιογενή’ και ‘βιοδιασπώμενα’ υλικά. Πιο συγκεκριμένα, τα βιογενή υλικά είναι οργανικά μακρομόρια που προκύπτουν από βιολογικούς πόρους και δεν είναι απαραίτητα βιοδιασπώμενα. Για παράδειγμα, τα πλαστικά που προκύπτουν από το άμυλο είναι βιοαποικοδομήσιμα εν αντιθέσει με το βιογενές πολυαιθυλένιο το οποίο δεν έχει αυτή την ιδιότητα (Shen et al., 2009). Ως βιοδιάσπαση ορίζεται η διάσπαση που επιτυγχάνεται ύστερα από δράση συγκεκριμένων μικροοργανισμών ή ενζύμων (Χατζάκης, 2016).

Τόσο το πολυ(γαλακτικό οξύ) (PLA ) όσο και οι πολυ(υδροξυαλκανοϊκοί) εστέρες (PHAs) προέρχονται από ανανεώσιμες πρώτες ύλες και αποτελούν βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή. Η εκμετάλλευση των ιδιοτήτων αυτών μπορεί να δώσει λύση στην δημιουργία νέων «πράσινων» υλικών (Jiang & Zhang, 2017). Επιπλέον, τα πολυμερή αυτά διαθέτουν παρόμοιες μηχανικές ιδιότητες με τα πετροχημικής προέλευσης πολυμερή και για αυτό αποτελούν καλή λύση στην μείωση των περιβαλλοντικών προβλημάτων που προκύπτουν από την χρησιμοποίηση πλαστικών πετροχημικής προέλευσης (Χατζάκης, 2016).



**Σχήμα 1.1** Ταξινόμηση των βιοδιασπώμενων πολυμερών (Πενλόγλου, 2010).

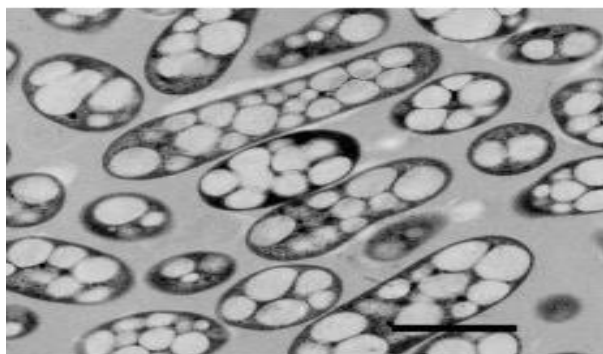
### 1.3 Πολυ(υδροξυαλκανοϊκοί) εστέρες (PHAs)

Οι πολυ(υδροξυαλκανοϊκοί) εστέρες (PHAs) συνιστούν γραμμικούς πολυεστέρες οι οποίοι αποτελούνται από μονομερή υδροξυοξέων. Τα μονομερή αυτά συνδέονται μεταξύ τους με εστερικό δεσμό μεταξύ της καρβοξυλικής ομάδας του ενός μονομερούς και της υδροξυλομάδας ενός γειτονικού. Η γενική δομή τους φαίνεται στο *Σχήμα 1.3* (Mozejko-Ciesielska & Kiewisz, 2016).

Τα PHAs αποτελούν αποθηκευτικές ουσίες οι οποίες συντίθενται από μικροοργανισμούς, υπό κοκκώδη μορφή, όταν μία πηγή άνθρακα είναι σε περίσσεια ενώ την ίδια στιγμή τουλάχιστον κάποιο βασικό για την αύξηση συστατικό (συνήθως άζωτο ή φωσφόρος) έχει εξαντληθεί από το μέσο (Nascimento et al., 2016/Mozejko-Ciesielska & Kiewisz, 2016). Η συχνότερη περίπτωση είναι να έχει εξαντληθεί το άζωτο, ωστόσο για κάποια βακτήρια που ανήκουν στο γένος *Azotobacter* η πιο αποτελεσματική περίπτωση είναι να έχει εξαντληθεί το οξυγόνο (Verlinden et al., 2007). Σε αυτήν την περίπτωση η συσσώρευση των PHAs συμβαίνει σε διαφορετικό στάδιο από αυτό της μικροβιακής αύξησης. Υπάρχει ωστόσο και η περίπτωση όπου η συσσώρευση των εν λόγω ενώσεων συμβαίνει ταυτόχρονα με την αυξητική φάση ανάπτυξης των κυττάρων όπως στην περίπτωση του ανασυνδυσμένου βακτηρίου *Escherichia coli*. Στην περίπτωση αυτή δηλαδή, δεν είναι απαραίτητο να υπάρξει περιορισμός σε κάποιο αναγκαίο για την αύξηση θρεπτικό συστατικό, προκειμένου να πραγματοποιηθεί συσσώρευση PHAs (Raza et al., 2018). Οι κόκκοι των PHAs

καλύπτονται κυρίως από φωσφολιπίδια, στην επιφάνεια των οποίων εδράζονται διάφορα ένζυμα και πρωτεΐνες μεταξύ των οποίων οι φασίνες, η PHA πολυμεράση και η PHA αποπολυμεράση (Mozejko-Ciesielska & Kiewisz, 2016).

Οι εν λόγω ενώσεις είναι αδιάλυτες στο νερό και συσσωρεύονται ενδοκυτταρικά στο κυτόπλασμα των βακτηριακών κυττάρων. Έχει αποδειχθεί ωστόσο, πως σε γενετικά τροποποιημένους μικροοργανισμούς, οι ενώσεις αυτές δύνανται να αποτεθούν και εξωκυτταρικά. Μετά την εξάντληση της εκάστοτε πηγής άνθρακα, οι ουσίες αυτές έχουν την δυνατότητα να αποπολυμεριστούν και τα παραπροϊόντα τους να χρησιμοποιηθούν ως πηγή τόσο άνθρακα όσο και ενέργειας από τους μικροοργανισμούς (Mozejko-Ciesielska & Kiewisz, 2016). Τα PHAs ουσιαστικά επιτελούν ένα σημαντικό βιολογικό ρόλο· προωθούν την επιβίωση του κυττάρου όταν αυτό βρίσκεται σε συνθήκες έλλειψης πηγής άνθρακα. Γενικότερα οι ουσίες αυτές παρέχουν προστασία στα κύτταρα σε εξαιρετικά στρεσογόνες περιβαλλοντικές συνθήκες όπως ακραίες θερμοκρασίες, ακτινοβολία με υπεριώδη ακτινοβολία ή έκθεση σε οξειδωτικούς οργανικούς χημικούς διαλύτες (De Sousa Dias et al., 2017). Επιπλέον μέσω του πολυμερισμού διαλυτών ενδιάμεσων σε αδιάλυτα μόρια (PHAs), στο κύτταρο δεν πραγματοποιούνται αλλαγές ωσμωτικής πίεσης και επομένως δεν παρατηρείται διαρροή των αυτών ενώσεων έξω από τα κύτταρα του μικροοργανισμού χωρίς λόγο (Verlinden et al., 2007).



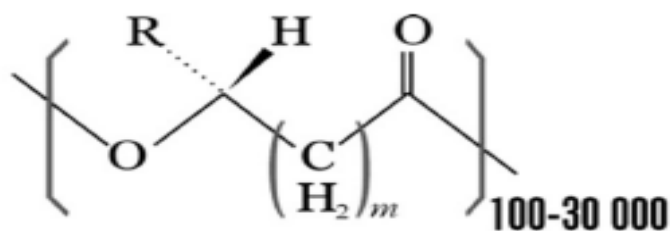
**Σχήμα 1.2** Ηλεκτρονική μικροσκοπία μετάδοσης κυττάρων *W.eutropha* έπειτα από 62 ώρες ζύμωσης (Xu et al., 2010).

### 1.3.1 Δομή και ταξινόμηση PHAs

Ανάλογα με τον αριθμό των ατόμων άνθρακα στις πλευρικές αλυσίδες, τα PHAs μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις ομάδες: βραχείας μήκους αλυσίδα (scI-PHAS), μεσαίου (mcI-PHAS) και μακράς μήκους αλυσίδα (Raza et al., 2018). Ο διαχωρισμός αυτός, έχει να κάνει με το είδος του βακτηρίου και της PHA συνθάσης (βασικό ένζυμο για την βιοσύνθεση των PHAs) που διαθέτει. Διαφορετικές PHA συνθάσες δέχονται διαφορετικά υδροξυοξέα ως υποστρώματα. Τα μονομερή 3-υδροξυβουτυρικό και 3-υδροξυβαλερικό οξύ (ή μίγμα και των δύο) είναι βραχείας μήκους αλυσίδα (Σαμαρίδου, 2012). Τα δύο προαναφερθέντα μονομερή μαζί με το 3-υδροξυεξανοϊκό οξύ είναι τα πιο μελετημένα (Καχριμανίδου 2016). Το PHB και PHV συντίθενται από πληθώρα μικροοργανισμών (*Alcaligenes eutrophus*, *Pseudomonas oleovorans*, *Methylobacterium organophilum* κ.α.). Στον μικροοργανισμό *Alcaligenes eutrophus*, υπό περιορισμό αζώτου στο μέσο ζύμωσης, η ενδοκυτταρική συσσώρευση PHB μπορεί να φτάσει ως και το 85% με τελικές συγκεντρώσεις PHA να φτάνουν 80-120 g/L. Οι πιο διαδεδομένοι μικροοργανισμοί για την παραγωγή μέσου μήκους αλυσίδα πολυμερών είναι αυτοί που ανήκουν στην οικογένεια *Pseudomonas* ενώ έχει αναφερθεί και η παραγωγή τους από θερμοφιλά βακτήρια όπως ο μικροοργανισμός *Thermus thermophilous* (Πενλόγλου, 2010).

Σε ότι αφορά τη σύσταση, διακρίνονται οι ομοπολυεστέρες και οι ετεροπολυεστέρες. Στην πρώτη κατηγορία οι εστέρες συνίστανται μόνο από έναν τύπο μονομερούς, ενώ στην δεύτερη κατηγορία το πολυμερές αποτελείται από δύο ή περισσότερους τύπους μονομερών οι οποίοι διαφέρουν είτε ως προς τις πλευρικές αλυσίδες (συμπολυεστέρες) είτε ως προς τις πλευρικές αλυσίδες και τους σκελετούς (τριπολυεστέρες) (De Sousa Dias et al., 2017). Η σύσταση των εν λόγω πολυεστέρων εξαρτάται τόσο από την πηγή άνθρακα όσο και από τον μικροοργανισμό που χρησιμοποιείται για την ζύμωση (Brämer et al., 2001).

Όπως φαίνεται και στο *Σχήμα 1.3*, στους πολυ(3-υδροξυαλκανοϊκούς) εστέρες, η υδροξυομάδα βρίσκεται στο τρίτο άτομο άνθρακα. Αντίστοιχα όταν η υδροξυομάδα βρίσκεται στον τέταρτο άνθρακα, προκύπτουν οι πολυ(4-υδροξυαλκανοϊκοί) εστέρες κ.ο.κ. (Παπανεοφύτου, 2008).



m=1	R=H	Poly(3-hydroxypropionate)	P(3HP)
	R=CH <sub>3</sub>	Poly(3-hydroxybutyrate)	P(3HB)
	R=C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	Poly(3-hydroxyvalerate)	P(3HV)
	R=C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	Poly(3-hydroxyhexanoate)	P(3HX)
m=2	R=H	Poly(4-hydroxybutyrate)	P(4HB)
m=3	R=H	Poly(5-hydroxyvalerate)	P(5HV)

**Σχήμα 1.3** Γενική δομή των κυριότερων PHAs (Jacquel et al., 2008).

Όλα τα μονομερή έχουν την διαμόρφωση R- εκτός ελαχίστων περιπτώσεων (Παπανεοφύτου, 2008). Αυτό οφείλεται στην στερεοειδικότητα που έχουν τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για την βιοσύνθεση των PHAs (Anjum et al., 2016).

### 1.3.2 Πολυ(3-υδροξυβουτυρικός) εστέρας (PHB)

Το PHB πρωτοανακαλύφθηκε το 1925 από τον Lemoigne (Bugnicourt et al., 2014) και η πρώτη προσπάθεια για βιομηχανική παραγωγή του, έγινε το 1950 από την North American company W.R. Grace (Kachrimanidou et al., 2016). Το 1973, σε μία δημοσίευση περί βακτηριακών αποθηκευτικών υλικών, αναφέρθηκε πως ο ρόλος του P(3HB) στους μικροοργανισμούς, ήταν ανάλογος του αμύλου και του γλυκογόνου. Ένα χρόνο αργότερα χαρακτηρίστηκαν και άλλα υδροξυαλκανοϊκά εκτός από το PHB (Sudesh et al., 2000). Το 1980, η εταιρεία Imperial Chemical Industries (ICI) πραγματοποίησε την μαζική παραγωγή P(3HB) που είχε συντεθεί στον μικροοργανισμό *Ralstonia eutropha* (Lopes et al., 2014). Την ίδια χρονιά ήταν που γονίδια του εν λόγω μικροοργανισμού κλωνοποιήθηκαν και εισήχθησαν στον μικροοργανισμό *Escherichia coli* (Waters, 2007).

Το πλέον μελετημένο μέλος των PHAs - το PHB - είναι γραμμικός πολυεστέρας που αποτελείται από μονομερή 3-υδροξυβουτυρικού οξέος (Bugnicourt



et al., 2014). Παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον ως βιοδιασπώμενο πλαστικό λόγω των ιδιοτήτων του οι οποίες είναι συγκρίσιμες με αυτές του πολυπροπυλενίου (Lopes et al., 2009) με τα πλεονεκτήματα ότι το PHB είναι βιοδιασπώμενο και μπορεί να παραχθεί από ανανεώσιμες πρώτες ύλες (Lopes et al., 2014). Είναι αδιάλυτο στο νερό (Anjum et al., 2016), διαθέτει ικανοποιητική αντίσταση στην πρόσληψη υγρασίας και μπορεί να αποκτήσει εξαιρετικές ιδιότητες σε ότι αφορά την παρεμπόδιση αερίων. Ακόμα βυθίζεται στο νερό, πράγμα που διευκολύνει την ευκολότερη αποικοδόμησή του (Raza et al., 2018).

Το PHB είναι υψηλά κρυσταλλικό (60-70%) (Bugnicourt et al., 2014) ιδιότητα που οφείλεται στην στερεοκανονικότητά του (Anjum et al., 2016). Επίσης, παρουσιάζει μεγάλη ευθραυστότητα που οφείλεται κυρίως σε δύο λόγους: πρώτον, στη δευτερογενή κρυστάλλωση της άμορφης φάσης που λαμβάνει χώρα κατά την αποθήκευσή του σε θερμοκρασία δωματίου και δεύτερον, στην χαμηλή πυκνότητα πυρήνων του, εξαιτίας της οποίας, σχηματίζονται σπασίματα κατά τη διαδικασία δημιουργίας μεγάλων σφαιρουλιτών (Bugnicourt et al., 2014). Η κρυσταλλική και η άμορφη φάση του PHB έχουν τιμές πυκνότητας 1,26 και 1,18 g/cm<sup>3</sup>, αντίστοιχα (Shen et al., 2009). Η διαδικασία κρυστάλλωσής του, πραγματοποιείται γρήγορα σε θερμοκρασίες 80-100 °C και αργά σε θερμοκρασίες χαμηλότερες από 60 °C ή υψηλότερες από 130 °C. Λόγω των κακών μηχανικών του ιδιοτήτων, έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές βελτίωσης των ιδιοτήτων του. Μία εξ'αυτών είναι η παραγωγή συμπολυεστέρων που περιέχουν και άλλα υδροξυοξέα στην κύρια αλυσίδα πολυμερούς εκτός από το 3-υδροξυβουτυρικό οξύ (Bugnicourt et al., 2014). Ακόμα το υψηλού μοριακού βάρους PHB παρουσιάζει βελτιωμένες φυσικές ιδιότητες σε σχέση με το μικρού μοριακού βάρους. Το μοριακό βάρος του PHB που θα προκύψει εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες μεταξύ των οποίων οι συνθήκες ζύμωσης, το είδος του μικροοργανισμού και η μέθοδος εξαγωγής του από το εσωτερικό των κυττάρων (Bugnicourt et al., 2014). Από άγριου τύπου βακτήρια το μοριακό βάρος του PHB που παράγεται είναι μεταξύ 10.000–3.000.000 Da (Anjum et al., 2016).

Ένα από τα μεγαλύτερα μειονεκτήματα του PHB είναι πως αποικοδομείται σε θερμοκρασίες λίγο μεγαλύτερες του σημείου τήξης του (Raposo et al., 2017). Η θερμική αποικοδόμηση του PHB περιλαμβάνει αρχικά δημιουργία κυρίως κροτονικού και ισοκροτονικού οξέος. Από τη διάσπαση των προαναφερθέντων

οξέων προκύπτουν δευτερεύουσες ενώσεις όπως κετένια, προπένιο, διοξείδιο του άνθρακα, ακεταλδεϋδη (Sanguanchairaiwong, 2006). Η πιο απλή μέθοδος για να μετριάσει το πρόβλημα αποικοδόμησης του PHB κατά την επεξεργασία του, είναι η προσθήκη λιπαντικών ουσιών. Επίσης, ανάμιξη του PHB με πλαστικοποιητές, έχει ως αποτέλεσμα την τροποποίηση των θερμικών και μηχανικών του ιδιοτήτων. Πιο συγκεκριμένα η ανάμιξή του με διάφορους πλαστικοποιητές έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό μικρών κρυσταλλιτών, μειώνοντας έτσι την θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης του πολυμερούς και το ποσοστό κρυσταλλικότητας. Τέλος, το PHB είναι αναμίξιμο με διάφορες ουσίες μεταξύ των οποίων το πολυ(αιθυλενοξείδιο) και η πολυ(επιχλωροδρίνη) (Bugnicourt et al., 2014).

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται ο μέγιστος θεωρητικός συντελεστής PHB από διάφορες πηγές άνθρακα που βασίζεται σε βιοχημικές στοιχειομετρικές αντιδράσεις.

**Πίνακας 1.1** Μέγιστος θεωρητικός συντελεστής PHB από διάφορα υποστρώματα .

Πηγή άνθρακα	Γλυκόζη <sup>a</sup>	Γλυκόζη <sup>b</sup>	Γλυκόζη <sup>c</sup>	Σακχαρόζη	Μεθανόλη	Μεθάνιο	Οξικό οξύ	Αιθανόλη	Βουτανόλη
$Y_{max}$	0,48	0,44	0,32	0,5	0,54	0,54	0,48	0,62	0,77

<sup>a</sup>Καταβολισμός μέσω του μονοπατιού Entner-Doudoroff.

<sup>b</sup> Καταβολισμός μέσω του μονοπατιού των φωσφορικών πεντοζών.

<sup>c</sup> Καταβολισμός μέσω της γλυκόλυσης EMP και του κύκλου τρικαρβοξυλικών οξέων.

## 1.4 Παραγωγή PHAs

Οι πολυ(υδροξυαλκανοϊκοί) εστέρες μπορούν να παραχθούν μέσω χημικής σύνθεσης (μέσω πολυμερισμού διάνοιξης των δακτυλίων των λακτονών), με χρήση γενετικά τροποποιημένων φυτών ή τέλος μέσω μικροβιακής ζύμωσης (Jacquel et al., 2008). Τα φυτά και τα βακτήρια είναι οι κύριοι υποψήφιοι για την παραγωγή τους σε μεγάλη κλίμακα (Verlinden et al., 2007) καθώς κατά τη χημική σύνθεση δημιουργείται μίγμα R- και S- στερεοϊσομερών. Ωστόσο μόνο το R- στερεοϊσομερές είναι βιοδιασπώμενο (Sanguanchairaiwong, 2006). Επίσης, στα φυτικά κύτταρα οι

αποδόσεις παραγωγής PHB είναι πολύ χαμηλές (<10% β/β του ξηρού βάρους) σε αντίθεση με τα βακτηριακά κύτταρα όπου η ενδοκυτταρική συσσώρευση δύνανται να φτάσει έως και στο 90% κ.β, της ολικής ξηρής κυτταρικής μάζας. Επιπλέον, υψηλά ποσοστά πολυμερούς στο εσωτερικό των φυτικών κυττάρων δύναται να προκαλέσουν προβλήματα στην ανάπτυξη του οργανισμού (Verlinden et al., 2007).

Εκτός από την παραγωγή PHAs “*in vivo*”, έχει μελετηθεί και η “*in vitro*” σύνθεση των πολυμερών αυτών. Η “*in vitro*” σύνθεση πλεονεκτεί έναντι της “*in vivo*” σύνθεσης, στο ότι δεν απαιτείται το στάδιο ανάκτησης του προϊόντος, (Burns et al., 2007). Ωστόσο, το κόστος των ενζύμων και των απαραίτητων συνενζύμων που είναι απαραίτητα για τον σκοπό αυτό είναι εξαιρετικά υψηλό (Πενλόγλου, 2010). Η παραγωγή PHAs μπορεί να γίνει έπειτα από καλλιέργεια των βακτηρίων υπό ασυνεχείς, ημισυνεχείς ή ακόμα και συνεχείς συνθήκες. Παρόλα αυτά οι συνεχείς καλλιέργειες, κατά τις οποίες είναι απαραίτητος ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων, δεν αποτελούν συνήθη πρακτική (Babel et al., 2001).

#### 1.4.1 Μικροοργανισμοί και υποστρώματα που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή των PHAs

Η βιομηχανική παραγωγή των φυσικών αυτών πολυεστέρων περιορίζεται λόγω κόστους (Lopes et al., 2009) και για αυτόν ακριβώς τον λόγο κρίνεται απαραίτητη η ανάπτυξη λιγότερο κοστοβόρων διεργασιών προς την παραγωγή του (Lopes et al., 2011). Η βελτιστοποίηση της παραγωγικής διαδικασίας για οικονομικότερη παραγωγή απαιτεί νέες μεθόδους κατιούσης επεξεργασίας για την παραλαβή του προϊόντος από το εσωτερικό των κυττάρων, καλύτερο σχεδιασμό βιοδιεργασιών και βαθύτερη κατανόηση της κινητικής των ζυμώσεων (De Sousa Dias et al., 2017). Τόσο προκαρυωτικοί όσο και ευκαρυωτικοί τύποι κυττάρων μπορούν να συνθέσουν διαφόρους τύπους PHAs (Raza et al., 2018). Για την παραγωγή τους χρησιμοποιούνται τόσο άγρια όσο και ανασυνδυασμένα στελέχη. Μεταξύ των πιο γνωστών είναι αυτά που ανήκουν στα γένη *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Aeromonas*, *Methylobacterium*, *Halomonas*, *Bacillus*, *Erwinia*, *Cyanobacteria*, *Haloferax*, *Chromobacterium*. Άλλοι γνωστοί

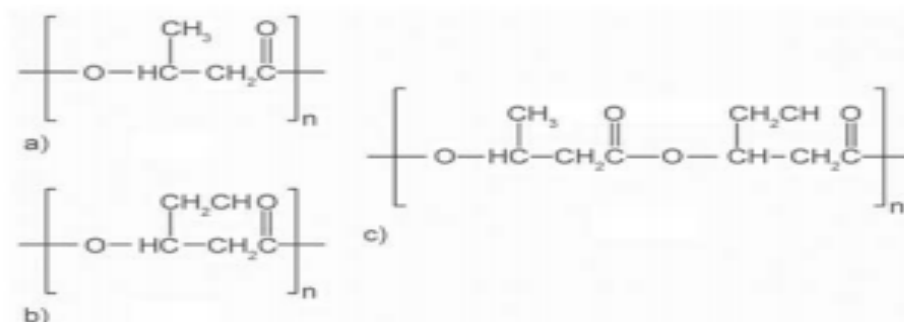
μικροοργανισμοί παράγοντες PHAs είναι οι: *Saccharophagus degradans*, *Thermus thermophilus*, *Cupriavidus necator* (Anjum et al., 2016).

Μιας και το κόστος της πηγής άνθρακα μπορεί να συνεισφέρει έως και στο 30% του συνολικού κόστους παραγωγής του PHB, το πιο σημαντικό προς επίλυση ζήτημα, είναι η κατάλληλη επιλογή «ανθρακούχας» πρώτης ύλης που θα χρησιμοποιηθεί ως πρώτη ύλη για την παραγωγή των ουσιών αυτών (Lopes et al., 2009). Πιο συγκεκριμένα, το ενδιαφέρον εστιάζεται στην χρησιμοποίηση αγροτοβιομηχανικών αποβλήτων (λιπίδια από την επεξεργασία ζωικών προϊόντων, μαγειρεμένα έλαια, γλυκερόλη από την διαδικασία παραγωγής βιοντίζελ, υδρολύματα προερχόμενα από ρίζες φυτών, μελάσσες κ.α), από τα οποία θα παραχθεί το λεγόμενο δεύτερης γενιάς PHA, (De Sousa Dias et al., 2017) και γενικότερα λιγνοκυτταρινούχων υλικών η υδρόλυση των οποίων δύναται να παράξει ένα μίγμα κυρίως πλούσιο σε γλυκόζη, ξυλόζη και αραβινόζη (Lopes et al., 2011). Άλλα γεωργικά απόβλητα που έχουν μελετηθεί ως πηγή άνθρακα για την παραγωγή PHAs είναι το άχυρο και το πίτυρο ρυζιού, το άμυλο, η μπαγκάσσα αγαύης (Ahn et al., 2015). Τέλος, έχει μελετηθεί η παραγωγή από διάφορα σάκχαρα (σακχαρόζη, γαλακτόζη, μαννόζη, ραμνόζη, φρουκτόζη), κυτταρινούχα και ημικυτταρινούχα υδρολύματα, σιρόπια, μεθανόλη, τριγλυκερίδια, φοινικέλαιο, σησαμέλαιο, έλαιο καρύδας, τηγανέλαια αλλά και από οξικό οξύ, γαλακτικό οξύ, κ.α (Anjum et al., 2016).

#### 1.4.2 Παραγωγή συμπολυμερών

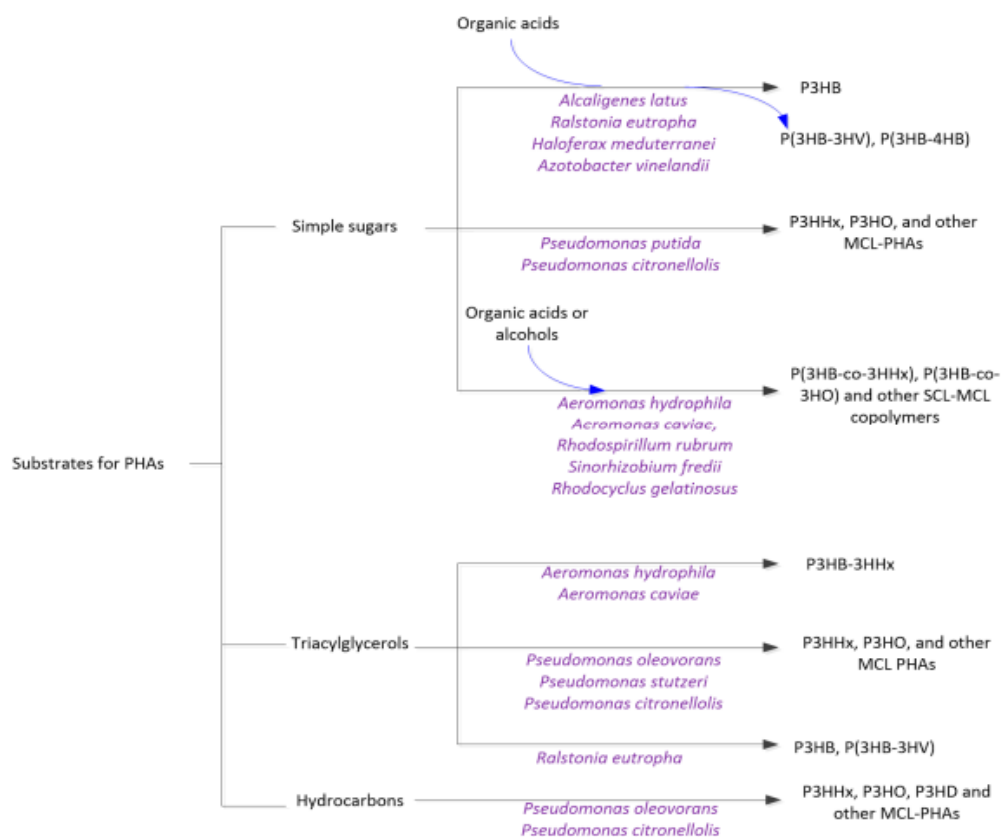
Συμπολυμερή μπορούν να παραχθούν αν, μαζί με την κύρια πηγή άνθρακα, συμπεριληφθούν επίσης κατάλληλες πρόδρομες ενώσεις στο μέσο ζύμωσης (Mendonça et al., 2013). Τα πιο μελετημένα συμπολυμερή είναι τα P(3HB-co-3HV), P(3HB-co-3HHx) και P(3HB-co-4HB). Μάλιστα το πρώτο συμπολυμερές που ανήκει στα PHAs και παράχθηκε σε βιομηχανική κλίμακα υπήρξε το P(3HB-co-3HV) από την εταιρεία Imperial Chemical Industries (ICI) με χρήση του μικροοργανισμού *Ralstonia eutropha* (Kachrimanidou, 2016). Το συγκεκριμένο συμπολυμερές προκύπτει αν μαζί με την πηγή άνθρακα, για παράδειγμα σακχαρόζη, προμηθευτεί η πρόδρομη ένωση προπιονικό νάτριο η οποία θα λειτουργήσει προς τη σύνθεση μονάδων 3-υδροξυβαλερικού οξέος (Mendonça et al., 2013). Η παραγωγή

του εν λόγω πολυμερούς από αυτά τα υποστρώματα επετεύχθη με χρήση του μικροοργανισμού *Alcaligenes latus* με 85% ενδοκυτταρική συσσώρευση (Πενλόγλου, 2010). Το λεβουλινικό οξύ έχει επίσης μελετηθεί ως πρόδρομη ουσία για τη σύνθεση του συμπολυμερούς P(3HB-co-3HV) (Kachrimanidou, 2016).



**Σχήμα 1.4** Χημική δομή των a)PHB, b)PHV, c)PHBV (Bugnicourt et al., 2014).

Το συμπολυμερές P(3HB-co-3HV) έχει χαμηλότερη ακαμψία, κρυσταλλικότητα και σημείο τήξης από το ομοπολυμερές PHB και ταυτόχρονα είναι πιο ευλύγιστο με μεγαλύτερη επιμήκυνση θραύσης (Πίνακας 1.3). Άλλα υδροξυοξέα τα οποία ενσωματώνονται ως μονομερή στην κύρια αλυσίδα πολυμερούς είναι επίσης το 3-υδροξυεξανοϊκό και το 4-υδροξυβουτυρικό οξύ (Anjum et al., 2016). Η μετατροπή των πρόδρομων ουσιών στα επιθυμητά μονομερή περιλαμβάνει τη χρήση ενζύμων τα οποία μέσα από διαδοχικές αντιδράσεις τα μετατρέπουν σε μόρια υδροξυάκυλο-CoAs. Στα προκύπτοντα υδροξυάκυλο-CoAs μόρια, ένα μέρος των αρχικών σκελετών των πρόδρομων ουσιών διατηρείται (Mendonça et al., 2013).



**Σχήμα 1.5** Παραγωγή διαφόρων τύπων PHAs από διάφορα υποστρώματα και μικροοργανισμούς (Jiang et al., 2017).

### 1.4.3 Βιομηχανική παραγωγή PHAs

Σύμφωνα με μία αναφορά του 2017, το μέγεθος της αγοράς των PHAs αναμένεται να φτάσει τα 93,5 εκατομμύρια αμερικανικά δολάρια (US\$) το 2021. Η πρόβλεψη αυτή προέκυψε βάσει ενός υπολογισμένου μεγέθους το 2016 το οποίο ανερχόταν στα 73,6 εκατομμύρια αμερικανικά δολάρια. Το κόστος των συμβατικών πολυμερών, όπως το πολυπροπυλένιο, είναι περίπου 0,60–0,87 US\$/lb ενώ των PHAs κυμαίνεται μεταξύ 2,25–2,75 US\$/lb (Kourmentza et al., 2017).

**Πίνακας 1.2** Εμπορικά προϊόντα PHAs μαζί με τις εταιρίες και τα δεδομένα ζύμωσης (Mozejko-Ciesielska & Kiewisz, 2016).

Εταιρία	Εμπορικό όνομα	PHA, Συσσώρευση %	Βιομάζα (g/L)	Πηγή άνθρακα	Στέλεχος
ETH, Switzerland (Ελβετία)	PHA	mcl-PHAs	60	Λιπαρά οξέα	<i>Pseudomonas putida</i>
PHB Industrial S.A. (Βραζιλία)	Biocycle	P(3HB)	>90	Σακχαρόζη	<i>Bacillus sp</i>
Jiang Su Nan Tian, (Κίνα)	Jiangsu Nantian	P(3HB)	>80	Γλυκόζη	<i>Escherichia coli</i>
Metabolix, (Η.Π.Α.)	Mirel	P(3HB-co-4HB)	>75	Γλυκόζη	<i>Ralstonia eutropha</i>
Biomer (Γερμανία)	Biomer	P(3HB)	>75	Σακχαρόζη	<i>Alcaligenes latus</i>
Tianjin GreenBio Materials, (Κίνα)	GreenBio	P(3HB-co-4HB)	>75	Γλυκόζη + 1,4-βουτανοδιόλη	<i>Escherichia coli</i>
Kaneka Corporation, (Ιαπωνία)	Kaneka PHBH	P(3HB-co-HHx)	>80	Λιπαρά οξέα	<i>Ralstonia eutropha</i>

Στον Πίνακα 1.2 παρουσιάζονται κάποιες από τις πιο γνωστές εταιρίες παρασκευής PHAs. Μεταξύ άλλων, βρίσκονται και οι Bio-on, Natureplast, ColorFabb, EarthBi, Shenzhen Ecomann Biotechnology Co., Ltd, New light

Technologies, LLC (U.S) ([www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/pha-market-395.html](http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/pha-market-395.html)). Η βιομηχανική παραγωγή PHAs διεξάγεται σε βιοαντιδραστήρες με διάφορες πηγές άνθρακα και διαφορετικά στελέχη να έχουν χρησιμοποιηθεί ανά τον κόσμο για τον σκοπό αυτό. Τα εργοστάσια με την μεγαλύτερη δυναμικότητα παραγωγής (50.000 t/έτος) ανήκαν το 2009 στις εταιρίες Metabolix και ADM. Η εταιρία Tianjin Green Bioscience στην Κίνα, η Bio-on στην Ιταλία και η Meredian στις Η.Π.Α είχαν ξεκινήσει την οικοδόμηση εργοστασίων με στόχο δυναμικότητα παραγωγής 10.000 t/έτος. Πιο συγκεκριμένα στην Αμερική έχουν παραχθεί PHAs από κραμβέλαιο ενώ στην Ιταλία η χρήση χυμού σακχαρότευτλων είχε ως αποτέλεσμα σύνθεση πολυμερών με εύρος σημείων τήξης 40-180 °C. Η New light Technologie στις Η.Π.Α χρησιμοποιεί ως πηγή άνθρακα μεθάνιο και στοχεύει μέσα στα επόμενα 20 χρόνια δυναμικότητα παραγωγής που θα ανέρχεται στους 43.000 t/έτος. Στην εταιρία ADM, η παραγωγή PHAs γίνεται από το ρεύμα σακχάρων που προκύπτει από το διαχωρισμό καλαμποκιού, ενώ στη Βραζιλία η βιομηχανική παραγωγή PHA έχει ενσωματωθεί σε βιομηχανικές διεργασίες επεξεργασίας σακχαροκάλαμου. Άλλες μικρότερες εταιρίες στην Κίνα έχουν χρησιμοποιήσει γλυκόζη από καλαμπόκι για την παραγωγή PHAs (Dietrich et al., 2016). Η εταιρία Danimer Scientific στις Η.Π.Α είναι ίσως η μεγαλύτερη εταιρία παραγωγής PHAs και επεκτείνεται και σε άλλες χώρες της νότιας Αμερικής και της Ασίας. Μεταξύ των επιχειρηματικών της κινήσεων υπήρξε η οικοδόμηση ενός εργοστασίου παραγωγής PHA καθώς και η συνεργασία της με την Nestle για την παραγωγή βιοδιασπώμενων μπουκαλιών. Η εταιρία Kaneka Corporation που εδράζεται στην Ιαπωνία έχει ανακοινώσει πως θα αυξήσει την δυναμικότητας παραγωγής στους 5.000 τόνους/έτος από τον Δεκέμβριο του 2019 και θα συνεχίσει στους 10.000 τόνους/έτος ([www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/pha-market-395.html](http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/pha-market-395.html)).

#### 1.4.4 Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή PHAs

Η παραγωγή των PHAs εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως το είδος του μικροοργανισμού και την πηγή άνθρακα, τη θερμοκρασία, το pH, τον αρχικό λόγο άνθρακα/άζωτο (C/N), τον αερισμό και τη συγκέντρωση ιχνοστοιχείων. Διαφορετικά είδη βακτηρίων παρουσιάζουν διαφορετική ικανότητα στην



ενδοκυτταρική συσσώρευση PHAs, και στους ειδικούς ρυθμούς αύξησης (Πενλόγλου, 2010).

Αρχικά το είδος της πηγής άνθρακα φαίνεται να παίζει τον πιο σημαντικό ρόλο τόσο στην ανάπτυξη βιομάζας όσο και στην παραγωγή και σύσταση του πολυμερούς (Παπανεοφύτου, 2008). Προκειμένου να λάβει χώρα η σύνθεση PHB, κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, η πηγή άνθρακα πρέπει να παραμένει σε περίσσεια (Raza et al., 2018).

Ένας άλλος καθοριστικός παράγοντας είναι η διαθεσιμότητα σε θρεπτικά συστατικά. Γενικότερα έχει αναφερθεί πως χαμηλές συγκεντρώσεις αζώτου προωθούν την παραγωγή PHB (Saharan et al., 2014). Τόσο ο κυτταρικός διπλασιασμός όσο και η παραγωγή του πολυμερούς εξαρτώνται από την πηγή αζώτου (Πενλόγλου, 2010). Σε πειράματα με τον μικροοργανισμό *B. Sacchari* LFM 828, διαπιστώθηκε πως το άζωτο του γλουταμικού νατρίου αφομοιωνόταν καλύτερα από ότι αυτό του θειϊκού αμμωνίου. Έτσι οι τιμές βιομάζας, ενδοκυτταρικής συσσώρευσης PHB, απόδοσης και παραγωγικότητας προϊόντος ήταν μεγαλύτερες στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε γλουταμικό νάτριο ως πηγή αζώτου (Lopes et al., 2011). Στον μικροοργανισμό *P. oleovorans*, μικρές συγκεντρώσεις σε αμμωνιακά ιόντα είναι ευνοϊκές για την ανάπτυξη και την παραγωγή PHA. Δεν συμβαίνει το ίδιο όμως, όταν η συγκέντρωση των αμμωνιακών είναι 50 mM. Επίσης, σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της καλλιέργειας και τη συσσώρευση PHAs, διαδραματίζει και η αρχική συγκέντρωση φωσφορικών ιόντων. Πιο συγκεκριμένα έχει αναφερθεί ότι 30-50 μM φωσφορικών ιόντων αποτελεί τη βέλτιστη συγκέντρωση. Τέλος, η απουσία θειϊκού μαγνησίου ή θειϊκού αμμωνίου ή σιδήρου, στον μικροοργανισμό *Methylobacterium extrorquens* είχε αρνητικά αποτελέσματα στον ρυθμό ανάπτυξης της καλλιέργειάς του (Παπανεοφύτου, 2008).

Ο λόγος C/N είναι πολύ σημαντικός παράγοντας και για διαφορετικές συνθήκες και μικροοργανισμούς, ο βέλτιστος λόγος διαφέρει. Για παράδειγμα στον μικροοργανισμό *Bacillus megaterium*, με πηγή άνθρακα σακχαρόζη, πηγή αζώτου  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  και αρχικό λόγο C/N=15:1 η ενδοκυτταρική συσσώρευση έφτασε το 70%. Από την άλλη, το ίδιο ποσοστό ενδοκυτταρικής συσσώρευσης επετεύχθη στην περίπτωση του μικροοργανισμού *Ralstonia eutropha* ο οποίος καλλιεργήθηκε σε μίγμα οξέων (οξικό, προπιονικό και βουτυρικό οξύ), με πηγή αζώτου  $\text{NH}_4\text{Cl}$  και αρχικό λόγο C/N=80:1 (Ahn et al., 2015). Ακόμα, σε πειράματα που

πραγματοποιήθηκαν διατηρώντας τις συνθήκες σταθερές, εκτός από το λόγο C/N (που κυμαινόταν από 6,6-20) βρέθηκε πως σε λόγο ίσο με 10, παρατηρήθηκε η μέγιστη απόδοση ενδοκυτταρικής συσσώρευσης πολυμερούς (46%), απόδοσης βιομάζας, καθώς και μέγιστη τιμή συγκέντρωσης προϊόντος (0,84 g/L). Από την άλλη η τιμή του μοριακού βάρους είχε ανάλογη τάση με τον λόγο C/N αφού όσο αυξανόταν το ένα, αυξανόταν και το άλλο (Πενλόγλου, 2010).

Τέλος, ένας άλλος παράγοντας που έχει μεγάλη επίδραση στο μεταβολισμό των κυττάρων της καλλιέργειας και επομένως στην ικανότητά τους να συσσωρεύουν PHAs, είναι η συγκέντρωση του διαλυτού οξυγόνου. Το οξυγόνο έχει μικρή διαλυτότητα στα υδατικά συστήματα των ζυμώσεων. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με το ότι τα βακτήρια παρουσιάζουν μεγάλες απαιτήσεις σε αερισμό, καθιστά πολλές φορές το διαλυτό οξυγόνο περιοριστικό της ανάπτυξης παράγοντα. Στις ζυμώσεις που λαμβάνουν χώρα σε κωνικές φιάλες, το παραπάνω πρόβλημα γίνεται ακόμα πιο έντονο καθώς δεν υπάρχει παροχή αέρα-οξυγόνου μέσα από την καλλιέργεια. Αντίθετα, αυτό κάπως μετριάζεται στον βιοαντιδραστήρα όπου παρατηρείται τόσο παροχή αέρα-οξυγόνου στην καλλιέργεια όσο και καλύτερο σύστημα ανάδευσης. Ωστόσο τα μειονεκτήματα του βιοαντιδραστήρα ως προς τη μεταφορά του οξυγόνου, αφορούν στον μεγαλύτερο όγκο του και τον αφρισμό που παρατηρείται σε συνθήκες έντονης ανάπτυξης της καλλιέργειας. Σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες, διατηρώντας τις συνθήκες σταθερές εκτός από την ποσότητα του μεταφερόμενου οξυγόνου, διαπιστώθηκε πως όταν ευνοείτο περισσότερο η μεταφορά οξυγόνου (η τιμή του διαλυμένου οξυγόνου ήταν μέγιστη), η σύνθεση βιομάζας του μικροοργανισμού *A.latus* ήταν μέγιστη ενώ δεν παρατηρούταν παραγωγή PHB. Σε αντίστοιχα πειράματα που έλαβαν χώρα σε βιοαντιδραστήρα, μελετήθηκε η επίδραση του επιπέδου οξυγόνου (2,5, 15, 20 ,30% κορεσμού στο μέσο) στην παραγωγή βιομάζας και προϊόντος, στην ενδοκυτταρική συσσώρευση και την απόδοση. Ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκε σακχαρόζη ενώ οι λόγοι C/N και C/P είχαν τιμές 10 g/g και 1,9 g/g, αντίστοιχα. Διαπιστώθηκε, όπως και στην περίπτωση των κωνικών φιαλών, πως στη μέγιστη συγκέντρωση διαλυτού οξυγόνου (30% κορεσμός), παρατηρήθηκε η μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας όσο και η μέγιστη απόδοση βιομάζας ( $Y_{X/S}$ = 0,35 g/g). Οι μέγιστες τιμές συγκέντρωσης προϊόντος (2,27 g/L), ενδοκυτταρικής συσσώρευσης (56%) και απόδοσης προϊόντος ( $Y_{P/S}$ = 0,162 g/g),

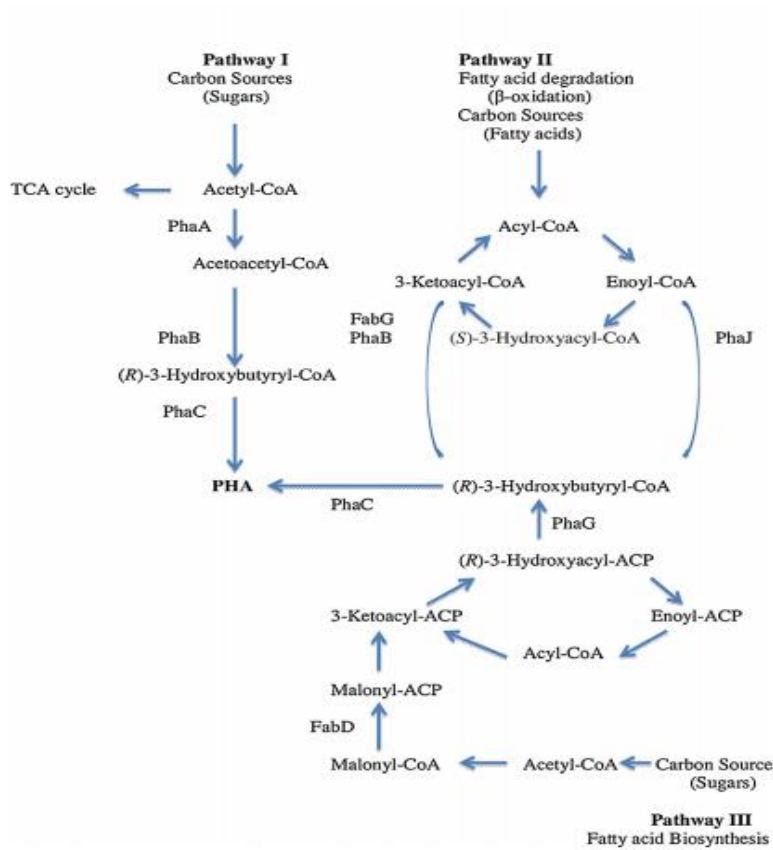
επετεύχθησαν στην περίπτωση που ο κορεσμός σε διαλυτό οξυγόνο στο μέσο ανάπτυξης ήταν 20% (Πενλόγλου, 2010).

## 1.5 Μεταβολικά μονοπάτια σύνθεσης PHAs

Όπως φαίνεται στο μονοπάτι I του Σχήματος 1.6 (pathway I), η βιοσύνθεση του PHB ξεκινά με τη συμπύκνωση δύο μορίων ακετυλ-CoA προς σχηματισμό ακετοακετυλ-CoA, αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο β-κετοθειολάση (PhaA) (Kunasundari & Sudesh, 2011). Στην περίπτωση που χρησιμοποιείται προπιονικό οξύ ως συνυπόστρωμα, το ένζυμο 3-κετοθειολάση καταλύει τη συμπύκνωση του προπιονυλ-CoA και του ακετυλο-CoA οπότε σχηματίζεται 3-κετοβαλερυλο-CoA (Babel et al., 2001). Στη συνέχεια, η εξαρτώμενη από NADPH ακετοακετυλο-CoA αναγωγή (PhaB), καταλύει την αναγωγή του ακετοακετυλο-CoA προς (R)-3-υδροξυβουτυρυλο-CoA. Εν συνεχεία αυτό πολυμερίζεται με τη βοήθεια ενός τρίτου ενζύμου, της συνθάσης του PHA (PhaC), σε PHB (Kunasundari & Sudesh, 2011). Το μεταβολικό αυτό μονοπάτι χρησιμοποιείται από τους μικροοργανισμούς *Z. ramigera* και *R. eutropha* για τη σύνθεση scl-PHAs (Παπανεοφύτου, 2008) και από τους *C. necator* (Anjum et al., 2016), *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas stutzeri* (Mozejko-Ciesielska & Kiewisz, 2016). Το ένζυμο συνθάση του PHA δέχεται ως υποστρώματα μόνο (R)- ισομερή (Verlinden et al., 2007) και μπορεί να ανήκει σε τέσσερις κατηγορίες. Πιο συγκεκριμένα, οι συνθάσες που ανήκουν στις I, III και IV κατηγορίες, δέχονται ως υποστρώματα μόνο scl-μονομερή ενώ αυτά της κατηγορίας II, χρησιμοποιούν mcl-μονομερή. Ακόμα οι συνθάσες που ανήκουν στην κατηγορία I και II αποτελούνται από μία υπομονάδα, ενώ οι III και IV αποτελούνται από δύο υπομονάδες (Mozejko-Ciesielska & Kiewisz, 2016). Το ένζυμο 3-κετοθειολάση έχει απομονωθεί και καθαριστεί από διάφορους μικροοργανισμούς μεταξύ των οποίων οι *Ralstonia eutropha*, *Rhodococcus ruber*, *Zoogloea ramigera*, *Azotobacter beijerinckii*. Στον μικροοργανισμό *Aeromonas caviae*, τόσο το εν λόγω ένζυμο όσο και η αναγωγή του ακετυλο-CoA δεν υπάρχουν και η σύνθεση του PHB λαμβάνει χώρα μέσω μιας ενούλο-CoA υδρατάσης από μόρια κροτονυλο-CoA ή εξενούλο-CoA (Babel et al., 2001). Σε ότι αφορά το μονοπάτι I του Σχήματος 1.6, κατά τη διάρκεια φυσιολογικής βακτηριακής αύξησης, το ένζυμο PhaA παρεμποδίζεται από το ελεύθερο συνένζυμο-A το οποίο

προκύπτει από τον κύκλο του Krebs. Ωστόσο, όταν ένα βασικό για την μικροβιακή αύξηση θρεπτικό συστατικό έχει εξαντληθεί, η είσοδος του ακετυλο-CoA στον κύκλο του krebs δεν πραγματοποιείται και κατευθύνεται προς παραγωγή PHB (Verlinden et al., 2007).

Τα μονοπάτια II και III οδηγούν στη σύνθεση mcl-πολυμερών (Mozejko-Ciesielska & Kiewisz, 2016). Το βιοσυνθετικό μονοπάτι II, περιλαμβάνει οξείδωση λιπαρών οξέων και παραγωγή υποστρωμάτων που θα πολυμεριστούν από τη κατάλληλη συνθήκη προς παραγωγή πολυμερών (Anjum et al., 2016). Ένας πιθανός ρόλος του ένζυμου pHaj (η (R)-ειδική ενοϋλο-CoA υδρατάση) είναι να παρέχει 3-υδροξυακυλο-CoA μόρια όταν ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται σε λιπαρά οξέα (Mozejko-Ciesielska & Kiewisz, 2016). Στο μονοπάτι III του Σχήματος 1.6, παράγονται μονομερή που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση PHA όταν ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιείται γλυκόζη, φρουκτόζη κ.α (Anjum et al., 2016). Η πρωτεΐνη PhaG φαίνεται να είναι το ένζυμο κλειδί. Αρχικά υπήρχε η πεποίθηση πως ο ρόλος της είναι να μεταφέρει την 3-υδροξυακυλο μονάδα, από το μόριο του ACP στο CoA, αλλά αργότερα αναφέρθηκε πως λειτουργεί ως θειοεστεράση του 3-υδροξυακυλο-ACP, ένζυμο υπεύθυνο για την παραγωγή των υδροξυ λιπαρών οξέων. Ένας άλλος τρόπος σύνθεσης mcl-πολυμερών περιλαμβάνει επιμήκυνση τμημάτων ακετυλο-CoA προς 3-υδροξυακυλο-CoA μόρια (δεν φαίνεται στο Σχήμα 1.6) (Mozejko-Ciesielska & Kiewisz, 2016).



Σχήμα 1.6 Μεταβολικά μονοπάτια σύνθεσης PHAs (Anjum et al., 2016).

## 1.6 Ανάκτηση και καθαρισμός των PHAs

Το μέσο μέγεθος των κόκκων PHB είναι περίπου 0,2– 0,5  $\mu\text{m}$ . Προκειμένου να ανακτηθούν οι κόκκοι PHB είναι απαραίτητη είτε η διάρρηξη των βακτηριακών κυττάρων και η απομάκρυνση του πρωτεϊνικού στρώματος που περιβάλλει τους κόκκους, είτε η διάλυση των PHAs σε κατάλληλο διαλύτη (Kunasundari & Sudesh, 2011). Η αποτελεσματικότητα της χρήσης διαλύτη έγκειται στην τροποποίηση αρχικά της διαπερατότητας των κυτταρικών μεμβρανών και έπειτα στην διαλυτοποίηση των PHAs. Ενίοτε έχουν χρησιμοποιηθεί διάφοροι διαλύτες όπως γλωροφόρμιο, 1,2-διχλωροαιθάνιο, γλωροπροπάνιο κ.α. Η μέθοδος πλεονεκτεί έναντι άλλων στο γεγονός ότι τα PHAs που θα ανακτηθούν, μπορούν να έχουν ιατρικές εφαρμογές καθώς καταστρέφονται οι ενδοτοξίνες που παράγονται από κάποια αρνητικά κατά Gram βακτήρια. Ωστόσο, η εν λόγω μέθοδος είναι ακριβή (για την ανάκτηση ενός μέρους πολυμερούς, απαιτούνται 20 μέρη διαλύτη), καταστρέφει εν μέρει τη μορφολογία των κόκκων και έχει μεγάλο περιβαλλοντικό αντίκτυπο (Jacquel et al., 2008). Από την άλλη, οι μέθοδοι χώνευσης αποτελούν εναλλακτική στην χρήση διαλύτη και περιλαμβάνουν έναν μηχανισμό απελευθέρωσης των PHAs από το εσωτερικό των κυττάρων (Raza et al., 2018). Η χώνευση είναι είτε χημική είτε ενζυμική. Εν αντιθέσει με την ανάκτηση με διαλύτη, όπου οι κόκκοι PHA διαλυτοποιούνται, οι μέθοδοι χώνευσης περιλαμβάνουν τη διαλυτοποίηση κυτταρικών υλικών που περιβάλλουν τους κόκκους PHA (Kunasundari & Sudesh, 2011). Η χημική χώνευση περιλαμβάνει χρήση επιφανειοδραστικών ουσιών, υποχλωριώδους νατρίου, υποχλωριώδους νατρίου με γλωροφόρμιο, χηλικών ενώσεων. Στην χώνευση με επιφανειοδραστικές ουσίες, διάφορες ουσίες όπως το δωδεκυλοθειικό νάτριο, το TritonX-100, η παλμιτοϋλκαρνιτίνη, η βεταΐνη (Kunasundari & Sudesh, 2011) έχουν την ιδιότητα αρχικά να διαρρηγνύουν τα κύτταρα, μέσω της ενσωμάτωσής τους στις μεμβράνες λιπιδικής διπλοστιβάδας. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τελικά να σπάει εντελώς η μεμβράνη και να παράγονται μικύλλια επιφανειοδραστικής ουσίας-φωσφολιπιδίων και το PHB να απελευθερώνεται από το εσωτερικό των κυττάρων στο διάλυμα που περιέχει και τα κυτταρικά υπολείμματα. Παρόλο που από μόνη της η μέθοδος δεν δύναται να αποδώσει καθαρότητα προϊόντος πάνω από 97%, το πλεονέκτημά της είναι πως διαλυτοποιούνται πρωτεΐνες και κυτταρικά υλικά-μη περιέχοντα PHA-χωρίς να

προκαλείται αποικοδόμηση του πολυμερούς. Ένα από τα σημαντικότερα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι το υψηλό κόστος ανάκτησης, όταν χρησιμοποιείται πάνω από 5% wt επιφανειοδραστικής ουσίας (Jacquel et al., 2008).

Κατά τη χώνευση με υποχλωριώδες νάτριο, λόγω των ισχυρά οξειδωτικών του ιδιοτήτων, πέπτεται κυτταρικό υλικό, μη περιεχόν PHA (Kunasundari & Sudesh, 2011). Ωστόσο η συγκεκριμένη τεχνική, αν εφαρμοστεί μόνη της, μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική αποικοδόμηση του πολυμερούς με κίνδυνο να προκληθεί έως και 50% μείωση στο μοριακό βάρος του. Η προσθήκη μικρής ποσότητας αντιοξειδωτικής ουσίας μεταδιθειώδους νατρίου, εξασθενεί κάπως τη δράση του οξειδωτικού και έτσι μετριάζεται η μείωση του μοριακού βάρους (Jacquel et al., 2008). Απομόνωση κόκκων PHA με τη μέθοδο επιφανειοδραστικής ουσίας είχε ως αποτέλεσμα μεγαλύτερο μοριακό βάρος και χαμηλότερη καθαρότητα σε σχέση με τη μέθοδο του υποχλωριώδους νατρίου (Kunasundari & Sudesh, 2011). Υπάρχει και η μέθοδος χώνευσης με επιφανειοδραστική ουσία-χηλική ένωση. Η μέθοδος βασίζεται στην αποσταθεροποίηση της εξωτερικής μεμβράνης που προκαλείται μετά την προσθήκη χηλικής ένωσης. Αυτό συμβαίνει λόγω σχηματισμού σύμπλοκων ενώσεων μεταξύ των χηλικών ενώσεων και των δισθενών κατιόντων ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) που εδράζονται στη μεμβράνη κάποιων αρνητικών κατά Gram βακτηρίων όπως του *R. eutropha*. Η αποσταθεροποίηση της εξωτερικής μεμβράνης προκαλεί με τη σειρά της και την αποδυνάμωση της εσωτερικής μεμβράνης με αποτέλεσμα η διάρρηξη των κυττάρων να καθίσταται ευκολότερη και το ανακτώμενο PHB να παρουσιάζει υψηλότερη καθαρότητα (Jacquel et al., 2008).

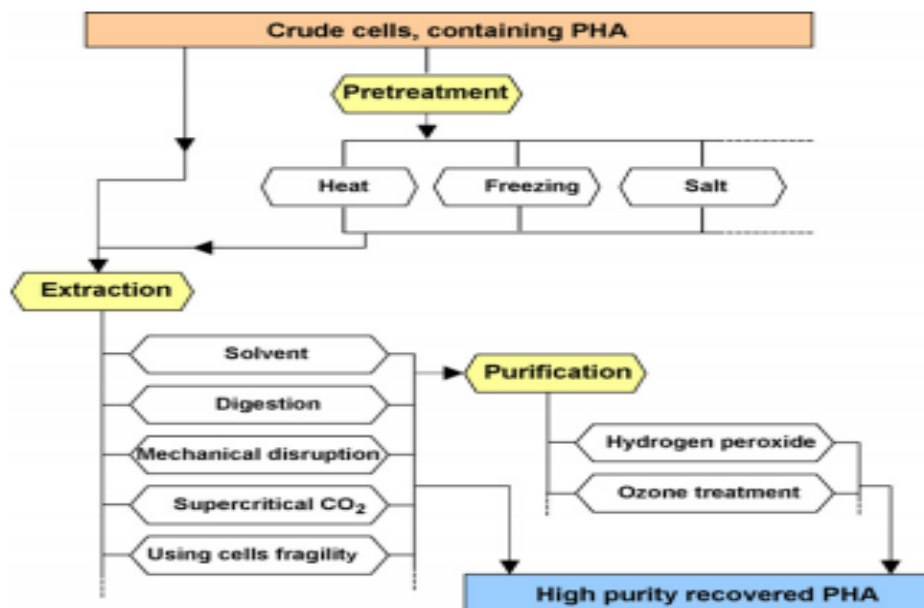
Τέλος, μία άλλη μέθοδος, η χώνευση με υποχλωριώδες νάτριο και χλωροφόρμιο, περιλαμβάνει προσθήκη διαλύματος υποχλωριώδους νατρίου και χλωροφορμίου σε λυοφιλωμένα κύτταρα (Jacquel et al., 2008). Η συγκεκριμένη μέθοδος στηρίχθηκε τόσο στην υδροφοβικότητα του PHB όσο και στην υδροφιλικότητα που παρουσιάζουν τα λυοφιλωμένα κύτταρα βιομάζας (Kunasundari & Sudesh, 2011). Περιλαμβάνει τη δημιουργία τριών ξεχωριστών φάσεων: η πάνω φάση περιέχει το διάλυμα του υποχλωριώδους νατρίου, η μεσαία φάση περιέχει κυτταρικά υπολείμματα-που δεν περιέχουν PHA-μαζί με μη διαρρηγμένα κύτταρα, και η κατώτερη φάση περιέχει το χλωροφόρμιο στο οποίο βρίσκεται διαλυμένο το PHB. Η ανάκτηση του πολυμερούς επιτυγχάνεται μετά από καταβύθιση και φιλτράρισμα. Ο συνδυασμός υποχλωριώδους νατρίου με το

χλωροφόρμιο να μην προκαλεί μεγάλη αποικοδόμηση του πολυμερούς, εντούτοις μεγάλη ποσότητα διαλύτη απαιτείται. Το χλωροφόρμιο διαλυτοποιεί απευθείας το PHB που απελευθερώνεται μετά από την κατεργασία με υποχλωριώδες, με αποτέλεσμα να προστατεύεται το πολυμερές και να μην αποικοδομείται (Jacquel et al., 2008).

Η διαλυτοποίηση κυτταρικών υλικών μη περιεχόντων PHA με ένζυμα, περιλαμβάνει αρχικά θέρμανση, ακολουθεί η ενζυμική υδρόλυση και ξέπλυμα με επιφανειοδραστική ουσία, (Kunasundari & Sudesh, 2011) και τέλος αποχρωματισμός με χρήση υπεροξειδίου του υδρογόνου (Jacquel et al., 2008). Λόγω της εξειδίκευσης των ενζύμων ως προς το στόχο, τα PHAs μπορούν να έχουν μεγάλο ποσοστό ανάκτησης (Raza et al., 2018). Το κύριο χαρακτηριστικό της μεθόδου ωστόσο αποτελεί το υψηλό κόστος ενζύμων. Η κύρια κατηγορία ενζύμων που έχει χρησιμοποιηθεί εκτενέστερα για την λύση των κυττάρων είναι οι πρωτεάσες (Kunasundari & Sudesh, 2011) καθώς διαλύουν τις πρωτεΐνες μεν αλλά έχουν μικρή επίδραση στην αποικοδόμηση των PHAs. Διάφορες πρωτεάσες (θρυψίνη, παπαΐνη, βρωμελαΐνη) αλλά και γλυκοσιδάσες (λυσοζύμη, κυτταρινάση) έχουν μελετηθεί για την ικανότητά τους να προκαλούν σπάσιμο ομοιοπολικών δεσμών. Οι εν λόγω δεσμοί είναι παρόμοιοι με τους β-1,4 δεσμούς της πεπτιδογλυκάνης και τις πεπτιδικές γέφυρες των τετραπεπτιδίων που ενώνουν τις αλυσίδες NAG και NAM (Kapritchkoff et al., 2006). Σε κύτταρα του μικροοργανισμού *Burkholderia sp.* PTU9 έχει εφαρμοστεί η μέθοδος υποχλωριώδους νατρίου συνδυασμένη με ένζυμα δίνοντας μία καθαρότητα 89% και ανάκτηση της τάξης 78% (Jacquel et al., 2008).

Η διάρρηξη των κυττάρων εκτός από τη χρήση διαλύτη και τη χώνευση (χημική ή ενζυμική) μπορεί να πραγματοποιηθεί και με άλλες μεθόδους οι οποίες δεν θα αναλυθούν στην παρούσα εργασία. Ενδεικτικά αναφέρονται διάφορες μηχανικές μέθοδοι, η χρήση υπερήχων, η ομογενοποίηση με υψηλή πίεση, η χρήση υπερκρίσιμου CO<sub>2</sub>, κ.α. Ακόμα, πριν από κάθε μέθοδο, προεπεξεργασία με διάφορες μεθόδους (ψύξη, θέρμανση, προσθήκη άλατος ή αλκάλων) διευκολύνουν την επικείμενη διάρρηξη (Πενλόγλου, 2010) των κυττάρων και την ανάκτηση του ενδοκυτταρικού PHA (Σχήμα 1.7). Έχει αναφερθεί πως προθέρμανση των κυττάρων πριν την ανάκτηση, προκαλεί αποσταθεροποίηση των εξωτερικών μεμβρανών των κυττάρων, και εκφυλισμό του γενετικού υλικού και των πρωτεϊνών των κυττάρων (απενεργοποιείται το ένζυμο αποπολυμεράση PHB) (Jacquel et al., 2008).





Σχήμα 1.7 Διαδικασία ανάκτησης των PHAs (Jacquel et al., 2008).

## 1.7 Ιδιότητες PHAs

Τα PHAs παρουσιάζουν ιδιότητες οι οποίες εξαρτώνται κατά κύριο λόγο από τη χημική τους σύσταση. Κάποιες από τις γενικές τους ιδιότητες είναι οι παρακάτω:

- Ενώσεις αδιάλυτες στο νερό, διαλυτές στο χλωροφόρμιο και άλλους χλωριωμένους διαλύτες.
- Μη τοξικές, βιοσυμβατές με τους ανθρώπινους ιστούς.
- Με καλή σχετικά αντοχή στην υδρολυτική διάσπαση και στην υπεριώδη ακτινοβολία αλλά όχι σε οξέα και βάσεις.
- Καταβυθίζονται και είναι λιγότερο «κολλώδεις» από τα παραδοσιακά πολυμερή όταν τήκονται.

Τα μικρού μήκους αλύσσου πολυμερή έχουν μεγάλο βαθμό κρυσταλλικότητας που κυμαίνεται από 55-80% και επομένως είναι εύθραυστα και άκαμπτα. Επίσης παρουσιάζουν υψηλές θερμοκρασίες τήξης (173-180 °C) και χαμηλές θερμοκρασίες υαλώδους μετάπτωσης (5-9 °C). Τα συμπολυμερή τους παρουσιάζουν καλύτερες ιδιότητες από τα ομοπολυμερή τους (χαμηλότερη κρυσταλλικότητα, σκληρότερα, κ.α) (Mozejko-Ciesielska et al., 2016). Τα μέσου μήκους αλύσσου πολυμερή από την άλλη έχουν μικρότερη κρυσταλλικότητα από τα μικρού μήκους αλύσσου πολυμερή (20-40%), (Sanguanchairaiwong, 2006) κυρίως λόγω των μεγάλων διακλαδώσεων που υπάρχουν στα μόρια τους (Πενλόγλου, 2010). Έχουν την ιδιότητα να δρουν ως ελαστομερή σε ένα στενό θερμοκρασιακό εύρος, γεγονός που οφείλεται στην χαμηλή θερμοκρασία τήξης τους (39-61 °C) (Mozejko-Ciesielska et al., 2016). Ακόμα παρουσιάζουν υψηλές τιμές επιμήκυνσης θραύσης (Πενλόγλου, 2010) ενώ οι θερμοκρασίες υαλώδους μετάπτωσης τους κυμαίνονται σε θερμοκρασίες από -43 έως -25 °C (Mozejko-Ciesielska et al., 2016). Το PHB παρουσιάζει παρόμοιες ιδιότητες με αυτές του πολυπροπυλενίου (μέτρο Young, τάση σε εφελκυσμό). Ωστόσο η επιμήκυνση θραύσης στην περίπτωση του PHB παρουσιάζει αρκετά χαμηλότερη τιμή (Πίνακας 1.3).

Μία από τις σημαντικότερες ιδιότητες των ενώσεων αυτών είναι πως είναι βιοδιασπώμενες. Το PHB μπορεί να αποικοδομηθεί τόσο υπό αερόβιες όσο και υπό αναερόβιες συνθήκες χωρίς να σχηματιστούν τοξικά παραπροϊόντα. Όταν η

βιοαποικοδόμηση των PHAs λαμβάνει χώρα υπό αερόβιες συνθήκες, τα κύρια προϊόντα είναι διοξείδιο του άνθρακα και νερό ενώ υπό αναερόβιες συνθήκες, παράγεται διοξείδιο του άνθρακα και μεθάνιο (Bugnicourt et al., 2014). Το ποσοστό βιοδιάσπασης των PHAs εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, μεταξύ των οποίων, ο τύπος και η σύσταση του πολυμερούς, (Raza et al., 2018) οι περιβαλλοντικές συνθήκες (θερμοκρασία, υγρασία), το pH (Sanguanchairaiwong, 2006) και ο τύπος του μικροοργανισμού, καθώς διαφορετικές αποπολυμεράσες PHA παράγονται από διαφορετικούς μικροοργανισμούς (Raza et al., 2018). Για παράδειγμα, το στέλεχος *Pseudomonas fluorescens* GK13 μπορεί να παράξει αποπολυμεράση για να αποικοδομήσει το PHO. Επίσης ο μικροοργανισμός *Pseudomonas maculicola* έχει τη δυνατότητα αποικοδόμησης του PHO, του (PHN) και του (PHU), όχι όμως του PHB και PHBV (Sanguanchairaiwong, 2006).

**Πίνακας 1.3** Φυσικές ιδιότητες κάποιων PHAs και κάποιων πολυμερών πετροχημικής προέλευσης (Sudesh et al., 2000).

Δείγμα	Μέτρο Young (GPa)	Τάση σε εφελκυσμό (MPa)	Σημείο τήξης (°C)	Επιμήκυνση θραύσης (%)	Θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης (°C)	Αναφορά
P(3HB)	3,5	40	180	5	4	Sudesh et al., 2000
P(3HB-co-3 mol% 3HV)	2,9	38	170	Δ.Π	Δ.Π	Anjum et al., 2016
P(3HB-co-14 mol% 3HV)	1,5	35	150	Δ.Π	Δ.Π	Anjum et al., 2016
P(3HB-co-25 mol% 3HV)	0,7	30	137	Δ.Π	Δ.Π	Anjum et al., 2016
P(3HB-co-6 mol% 3HA) <sup>a</sup>	0,2	17	133	680	-8	Sudesh et al., 2000
P(3HB-co-3 mol% 4HB) <sup>a</sup>	Δ.Π <sup>d</sup>	28	166	45	Δ.Π	Anjum et al., 2016
P(3HHx-co-3HO)	Δ.Π	10	61	300	Δ.Π	Anjum et al., 2016
P(3HO)	Δ.Π	6-10	61	300-450	Δ.Π	Anjum et al., 2016
LDPE <sup>b</sup>	0,2	10	130	620	-30	Sudesh et al., 2000
PP <sup>c</sup>	1,7	38	176	400	-10	Sudesh et al., 2000

<sup>a</sup>Οι μονάδες 3 HA συγκεκριμένα περιέχουν: 3-υδροξυδεκακανοϊκό οξύ (3 mol%), 3-υδροξυδεκακανοϊκό οξύ (3 mol%), 3-υδροξυ cis – 5-δεδεκενοϊκό οξύ (<1 mol%), 3-υδροξυοκτανοϊκό οξύ (<1 mol%).

<sup>b</sup>Πολυαιθυλένιο χαμηλής πυκνότητας.

<sup>c</sup>Πολυπροπυλένιο.

<sup>d</sup>Δεν προσδιορίστηκε.

Τουλάχιστον 39 βακτηριακά στελέχη, αρνητικά ή θετικά κατά Gram, ανήκοντα στα φύλα *Firmicutes* και *Proteobacteria* μπορούν να αποικοδομήσουν το PHB. Διάφοροι, μικροοργανισμοί που αποικοδομούν το PHB, αερόβιοι ή μη, έχουν απομονωθεί από το χώμα (*Pseudomonas lemoigne*, *Acidovorax faecalis*, *Variovorax paradoxus* αλλά και μύκητες όπως *Aspergillus fumigates*), από ενεργοποιημένη ιλύ (*Illyobacter delafieldi*), από θαλασσινά ή λιμνάζοντα νερά (*Comamonas testosterone*, *Pseudomonas stutzeri*) (Bugnicourt et al., 2014). Μάλιστα σε αναερόβια λάσπη έχει βρεθεί πως το PHB αποικοδομήθηκε εξ ολοκλήρου μέσα σε έξι εβδομάδες (Sanguanchairaiwong, 2006).

Σε φυσικά περιβάλλοντα οι μικροοργανισμοί που αποικοδομούν το PHB, εκκρίνουν συγκεκριμένα ένζυμα (αποπολυμεράση του PHB) τα οποία είναι υπεύθυνα για το σπάσιμο του πολυμερούς σε υδροξυοξέα, στους βασικούς θεμέλιους λίθους, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγή άνθρακα από τους μικροοργανισμούς. Η διαδικασία του αποπολυμερισμού συμβαίνει σε μεσοφιλικές συνθήκες. Κάποια είδη στα οποία το ένζυμο έχει ταυτοποιηθεί είναι τα παρακάτω: *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas lemoignei*, *A. beijerinckii* (Bugnicourt et al., 2014).

## 1.8 Εφαρμογές PHAs

Λόγω της πληθώρας των ιδιοτήτων τους, τα PHAs έχουν πολλές εφαρμογές, στη συσκευασία, στην ιατρική, αλλά και στη φαρμακευτική βιομηχανία και τη γεωπονία. Είναι γνωστό πως στο παρελθόν έχουν χρησιμοποιηθεί ως περιέκτες καλλυντικών ή για το φραγμό της υγρασίας σε διάφορα προϊόντα υγιεινής, ακόμα και ως πρώτη ύλη για την παραγωγή άλλων (Mozejko-Ciesielska & Kiewisz, 2016). Το Biomer και το Mirel αποτελούν εμπορικές ονομασίες του PHB με χρήσεις στην παραγωγή σκληρών πλαστικών και συσκευασιών για τρόφιμα αντίστοιχα (Πενλόγλου, 2010).

Στον γεωπονικό τομέα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ελεγχόμενη απελευθέρωση παρασιτοκτόνων ή εντομοκτόνων ενώ στην βιομηχανία ιχθυολογίας, τα πολύ μεγάλου μοριακού βάρους PHAs, για την παραγωγή πολύ σκληρών ινών (Mozejko-Ciesielska & Kiewisz, 2016).

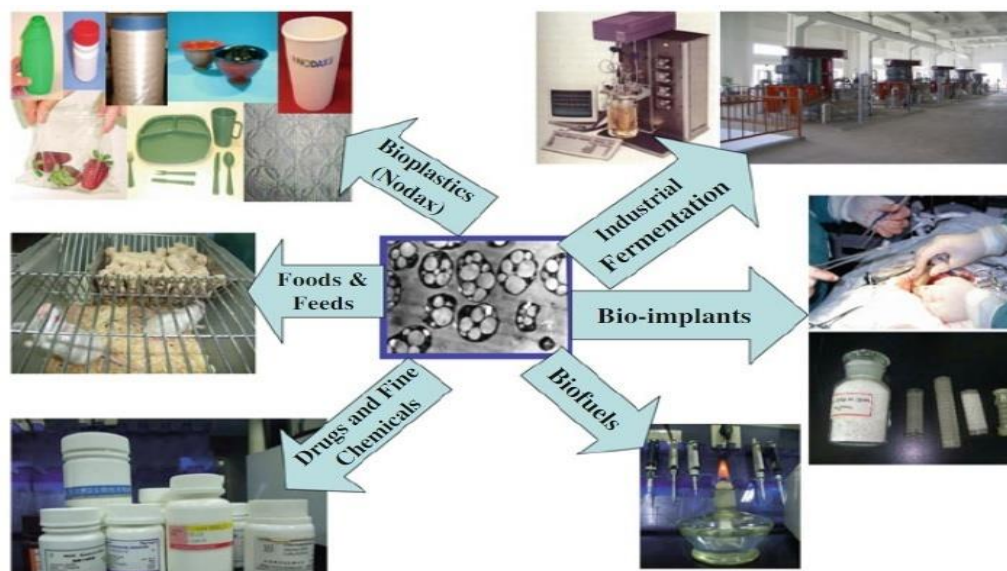
Οι εφαρμογές στους τομείς υγείας ωστόσο έχει το περισσότερο ενδιαφέρον, καθώς το ομοπολυμερές PHB και ο συμπολυεστέρας P(3HB-co-3HV) μπορούν να

αποτελέσουν υλικά για την κατασκευή προϊόντων που σχετίζονται με καρδιαγγειακά νοσήματα (βαλβίδες καρδιάς) ή ορθοπεδικές παθήσεις. Ακόμα, μπορούν να έχουν χρήσεις στην φαρμακευτική βιομηχανία λόγω της χαμηλής τοξικότητας, της υψηλής ανοσολογικής ανοχής και της ικανότητας βιοαποικοδόμησής τους. Πιο συγκεκριμένα τα PHAs αποτελούν υποσχόμενα βιοϋλικά. Ακόμα, 3-υδροξυαλκανοϊκά οξέα (3HA) έχουν παραχθεί από γενετικά τροποποιημένους μικροοργανισμούς που μπορούν να χρησιμεύσουν ως πρόδρομες ενώσεις για τη σύνθεση άλλων ουσιών προστιθέμενης αξίας όπως αντιβιοτικά, αρώματα, βιταμίνες αλλά και πρόσθετα τροφίμων. Επιπλέον έχει αποδειχθεί πως το ομοπολυμερές PHO, παρουσιάζει αντιμικροβιακή δράση ενώ το 3-υδροξυεξανοϊκό οξύ μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ενδιάμεση ένωση για τη σύνθεση αντικαρκινικών χημικών. Τέλος, οι πολυ(υδροξυαλκανοϊκοί) εστέρες μπορούν να αποτελέσουν πλατφόρμα για την ελεγχόμενη απελευθέρωση φαρμάκων, τεχνική που βασίζεται στην τεχνολογία μικροενθυλάκωσης (Mozejko-Ciesielska & Kiewisz, 2016).

Ακόμα τα πολυμερή PHAs μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοκαύσιμα μέσω της τεχνικής μεθυλεστεροποίησής τους. Πιο συγκεκριμένα, τόσο το PHB όσο και τα *mcI*-PHA μπορούν να εστεροποιηθούν και να δώσουν τους αντίστοιχους μεθυλεστέρες (μεθυλεστέρας του R-3-υδροξυβουτυρικού οξέος (3HBME) και μεθυλεστέρες υδροξυαλκανοϊκών οξέων μεσαίου μήκους αλύσσου (3HAME)) οι οποίοι μάλιστα έχουν τιμές θερμότητας καύσης 20 και 30 kJ/g αντίστοιχα. Οι τιμές αυτές είναι συγκρίσιμες με αυτήν της αιθανόλης, και μάλιστα μικρή προσθήκη 3HBME ή 3HAME, προκαλεί αύξηση στην τιμή θερμότητας καύσης αυτής (Chen, 2011).

Λόγω της βιοσυμβατότητας τους με τους ανθρώπινους ιστούς, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εμφυτεύματα. Πιο συγκεκριμένα ορθοπεδικά εμφυτεύματα βασισμένα στο πολυμερές PHB έχουν χρησιμοποιηθεί σε γάτες, ενώ μίγματα PHB με υδροξυαπατίτη έχουν αναφερθεί πως είναι συμβατά για την αντικατάσταση οστών σε κουνέλια. Ακόμα τα PHAs βρίσκουν εφαρμογές στην νανοτεχνολογία. Για παράδειγμα συγκεκριμένα φάρμακα μπορούν να ενσωματωθούν σε νανοσωματίδια (10–100 nm). Τα νανοσωματίδια προτιμώνται σε σχέση με τα μικροσωματίδια ειδικά σε ιατρικές και φαρμακευτικές εφαρμογές καθώς προσλαμβάνονται γρηγορότερα και κινούνται πιο γρήγορα προς το στόχο. Μικρο- και νάνο-σφαιρίδια PHA χρησιμοποιούνται ως εξωτερικό κέλυφος μέσα στο οποίο ενσωματώνονται τα

φάρμακα και απελευθερώνονται καθώς η επικάλυψη πολυμερούς αρχίζει να αποικοδομείται. Ακόμα τα PHAs μπορούν να χρησιμοποιηθούν, λόγω της πιεζοηλεκτρικότητάς που παρουσιάζουν, στην επιδιόρθωση κατεστραμμένων νευρώνων (Raza et al., 2018).

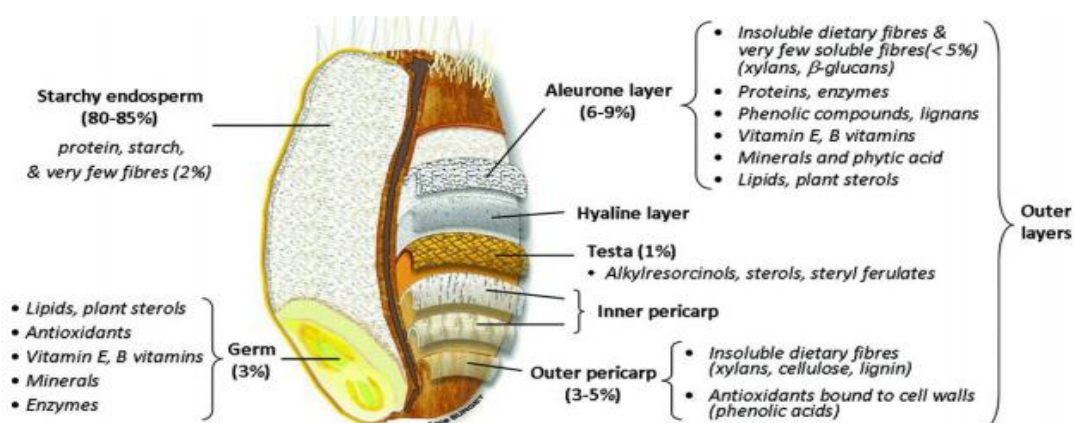


**Σχήμα 1.8** Εφαρμογές των πολυ(υδροξυαλκανοϊκών) εστέρων (Chen, 2011).

## 1.9 Κόκκος σίτου

Το σιτάρι (*Triticum aestivum*) (Onipe et al., 2015) είναι το δεύτερο πιο σύνηθες δημητριακό μετά το ρύζι που χρησιμοποιείται στην ανθρώπινη διατροφή (Chalamacharla et al., 2018). Μαζί με τον αραβόσιτο και το ρύζι αποτελεί περίπου το 90% της παγκόσμιας παραγωγής δημητριακών. Πάνω από 650 εκατομμύρια τόνοι σίτου παράγονται ετησίως σε ολόκληρο τον κόσμο με το 69% αυτών, να χρησιμοποιείται στη διατροφή (Prückler et al., 2014). Παράγεται κυρίως στην Ινδία, Ρωσία, Καναδά, Η.Π.Α, Αυστραλία, Κίνα, Ευρώπη (Γαλλία, Γερμανία, Ουκρανία). Το 2017 η παραγωγή σε αυτές τις χώρες έφτασε τους 760 εκατομμύρια τόνους. Χρησιμοποιείται για την παραγωγή αιθανόλης και μύρας από σιτάρι, ως πρώτη ύλη σε καλλυντικά ενώ η πρωτεΐνη που περιέχει, χρησιμοποιείται ως υποκατάστατο του κρέατος και ως συστατικό διαφόρων ζωοτροφών. Ο κόκκος σίτου είναι καρύωση που απαρτίζεται από έναν μεγάλο αριθμό ιστών που χωρίζεται σε τρία κυρίως μέρη: το

πίτυρο, το φύτρο και το ενδοσπέρμιο. Ο κόκκος αποτελείται κατά 13-17% από πίτυρο, κατά 2-3% από φύτρο και κατά 80-85% από ενδοσπέρμιο το οποίο περιέχει κυρίως άμυλο (Chalamacharla et al., 2018) και γλουτένη (Koutinas et al., 2016). Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 1.9, τα εξωτερικά στρώματα είναι μέρη του πιτύρου (Onipe et al., 2015). Πιο συγκεκριμένα τα εξώτερα στρώματα, τα οποία είναι γνωστά ως εξωτερικό και εσωτερικό περικάρπιο συνιστούν περίπου το 3,3%–5,6% του κόκκου επί ξηράς βάσης. Μεταξύ του εσωτερικού περικαρπίου και του στρώματος αλευρώνης (πυκνό στρώμα που συνιστά περίπου το 7% του κόκκου επί ξηράς βάσης) υπάρχουν και άλλοι ιστοί των οποίων η λειτουργία είναι να παρέχουν μία κάλυψη τόσο στο ενδοσπέρμιο όσο και στο έμβryo (Koutinas et al., 2016).



Σχήμα 1.9 Δομή κόκκου σίτου (Onipe et al., 2015).

### 1.9.1 Πίτυρο σίτου

Το πίτυρο σιταριού είναι το κλάσμα του εξωτερικού στρώματος του περικαρπίου που παραμένει ως υποπροϊόν μετά την διαδικασία άλεσης σίτου (Chalamacharla et al., 2018). Είναι πολυστρωματικό και αποτελείται από πολλούς διαφορετικούς τύπους κυττάρων με διαφορετική χημική σύσταση (Apprich et al., 2014). Η ανθρώπινη κατανάλωση πιτύρου σίτου συνεχώς αυξάνεται λόγω της περιεκτικότητάς του σε βιοδραστικά συστατικά, μεταλλικά στοιχεία, φυτικές ίνες και βιταμίνες κυρίως του συμπλέγματος Β (Chalamacharla et al., 2018). Το πίτυρο σίτου αποτελεί υποπροϊόν της βιομηχανίας δημητριακών και παράγεται σε τεράστιες ποσότητες (Annamalai & Sivakumar, 2016). Περίπου το 90% του πιτύρου



χρησιμοποιείται ως ζωοτροφή ενώ το υπόλοιπο έχει εφαρμογές ως πρόσθετο τροφίμων αποτελώντας πηγή φυτικών ινών, ενώ υπάρχει και η περίπτωση άλεσής του μαζί με τον κόκκο προς παραγωγή αλεύρου ολικής άλεσης (Onipe et al., 2015). Πιο συγκεκριμένα το κύριο ρεύμα υποπροϊόντος παράγεται κατά το άλεσμα και κοσκίνισμα του σίτου και περιέχει κατά κύριο λόγο πίτυρο μαζί με προσμίξεις ενδοσπερμίου. Το ποσοστό των προσμίξεων εξαρτάται από τον τύπο του αλευριού που πρόκειται να παραχθεί. Το συγκεκριμένο ρεύμα υποπροϊόντος έχει διάφορες χρήσεις, κυρίως ως ζωοτροφή. Ωστόσο οι ποσότητες που περισσεύουν είναι απόβλητες. Τα υποπροϊόντα από την άλεση σίτου μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή ενζύμων μέσω ζύμωσης στερεάς κατάστασης με τη χρήση συγκεκριμένων μυκητών όπως ο *Aspergillus awamori* (Tsakona et al., 2014). Ακόμα το πίτυρο θα μπορούσε να αποτελέσει πρώτη ύλη για την ανάπτυξη βιοδιύλιστηρίου. Πιο συγκεκριμένα, η ενζυμική υδρόλυση του αμύλου του πιτύρου, μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή γλυκόζης (Πίνακας 1.4) η οποία μπορεί περαιτέρω να ζυμωθεί προς άλλα προϊόντα προστιθέμενης αξίας, μεταξύ των οποίων είναι το ηλεκτρικό οξύ και η αιθανόλη. Ακόμα, από το πίτυρο είναι δυνατή η απομόνωση τόσο πρωτεϊνών, και η παραγωγή αμινοξέων όπως το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA), όσο και άλλων ουσιών όπως το φερουλικό οξύ το οποίο έχει αντιοξειδωτική δράση (Apprich et al., 2014).

**Πίνακας 1.4** Σύσταση υδρολύματος πιτύρου σίτου (Obruca et al., 2015).

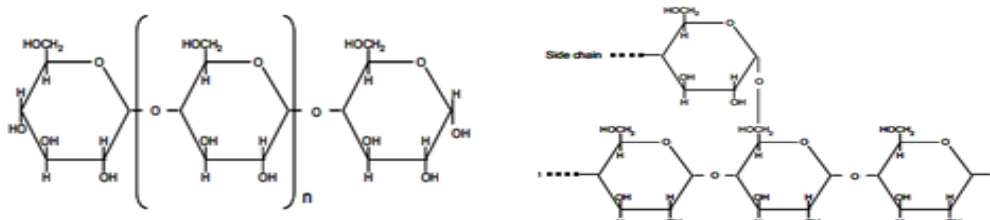
Υλικό	Υδρόλυση	Συγκέντρωση σακχάρων (g/L)			
		Γλυκόζη	Αραβινόζη	Ξυλόζη	Μαννόζη
<b>Πίτυρο σίτου</b>	Ενζυμική	12,7	3,1	4,1	4,1

Η κατανάλωση πιτύρου σίτου έχει συσχετιστεί με σημαντικά οφέλη στην υγεία του ανθρώπου. Έχει αποδειχθεί πως η κατανάλωσή του μειώνει τον κίνδυνο καρδιαγγειακών παθήσεων, προκαλεί μείωση της χοληστερόλης, ρυθμίζει τα επίπεδα πείνας των καταναλωτών και γενικότερα επηρεάζει την συνολική υγεία τους θετικά (Prückler et al., 2014). Επιπλέον η κατανάλωσή του σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης παχυσαρκίας και άλλων ασθενειών όπως ο διαβήτης (Onipe et al., 2015). Έχει πρε-βιοτική δράση και σε συνδυασμό με τις αντιοξειδωτικές του ιδιότητες - οι

οποίες κατά βάση οφείλονται στα φαινολικά οξέα, τις τοκοφερόλες, τις φυτοστερόλες, τα φλαβονοειδή και τα καρετονοειδή - παρέχει έντονη προστατευτική δράση έναντι διαφόρων ειδών καρκίνου και ιδιαιτέρως του κόλου. Το πίτυρο προστατεύει από τον καρκίνο του κόλου είτε 'διαλύοντας' τις δυνητικά καρκινογόνες ενώσεις είτε επιταχύνοντας τη διέλευση των κοπράνων μέσω του παχέως εντέρου (έτσι πιθανές καρκινογόνες ενώσεις που περιέχονται στα κόπρανα δεν έρχονται σε επαφή με τα κύτταρα του εντέρου για πολλή ώρα) (Chalamacharla et al., 2018).

Το πίτυρο σίτου περιέχει κυρίως άμυλο (που προέρχεται από το αμυλώδες ενδοσπέρμιο), διαιτητικές ίνες, πρωτεΐνη, υγρασία, τέφρα και σε μικρότερες ποσότητες άλλα συστατικά όπως φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, φυτικό οξύ, λιγνάνες, (Apprich et al., 2014) και μεταλλικά στοιχεία (σίδηρος, μαγνήσιο, ψευδάργυρος, φωσφόρος). Συγκεκριμένα το 60–90% του φωσφόρου είναι αποθηκευμένο στο φυτικό οξύ υπό την μορφή φυτίνης που σχηματίζει σύμπλοκες ενώσεις με διάφορα μέταλλα (Onipe et al., 2015). Το μεγαλύτερο μέρος του φυτικού οξέος στο σίτο, βρίσκεται στο πίτυρο, σε ποσότητα 25–58 mg/g (Koutinas et al., 2016). Όσον αφορά την πρωτεΐνη στο πίτυρο, αυτή συνιστά το 15,2-16,9% με τα αμινοξέα γλουταμικό οξύ και ασπαρτικό οξύ να κυριαρχούν (Chalamacharla et al., 2018). Το ποσοστό του αμύλου στο πίτυρο σίτου ποικίλλει από 14-25% και αυτό εξαρτάται από τον βαθμό αλέσματος (Apprich et al., 2014). Το άμυλο αποτελείται από δύο τύπους πολυμερών, την αμυλόζη και την αμυλοπηκτίνη. Η αμυλόζη αποτελείται από κατάλοιπα γλυκόζης ενωμένων γραμμικά μέσω  $\alpha$ -(1→4) γλυκοσιδικών δεσμών ενώ η αμυλοπηκτίνη είναι ένας διακλαδισμένος πολυσακχαρίτης που απαρτίζεται από μονάδες γλυκόζης ενωμένες μεταξύ τους με δεσμούς  $\alpha$ (1→4) και  $\alpha$ (1→6). Στο πίτυρο το ποσοστό της αμυλοπηκτίνης είναι περίπου 75% (Koutinas et al., 2016). Το άμυλο οργανώνεται σε κόκκους λόγω της ιδιότητας της αμυλοπηκτίνης να σχηματίζει ελικοειδείς δομές οι οποίες κρυσταλλώνονται (Shen et al., 2009). Τέλος, οι αραβινοξυλάνες αποτελούν βασικό δομικό συστατικό των κυτταρικών τοιχωμάτων του πιτύρου και συνιστούν το 10,9-26,0% του πιτύρου επί ξηράς βάσης (Apprich et al., 2014). Σε ότι αφορά τη δομή αποτελούνται από ένα σκελετό  $\beta$ -D-ξυλάνης με πλευρικές αλυσίδες αραβινόζης συνδεδεμένες μέσω  $\alpha$ -1,2 και  $\alpha$ -1,3 γλυκοσιδικών δεσμών (Onipe et al., 2015). Ακόμα στον κύριο σκελετό απαντούν και άλλοι υποκαταστάτες, η συχνότητα και η αλληλουχία των οποίων στις πλευρικές αλυσίδες, είναι ενδεικτικές της προέλευσης

του στρώματος σίτου (Arrrich et al., 2014). Το μεγαλύτερο μέρος τους είναι αδιάλυτο και επίσης έχει αναφερθεί πως έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες, γεγονός που οφείλεται στις φαινολικές ενώσεις που είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένες μαζί τους (Chalamacharla et al., 2018).



**Σχήμα 1.10** Η δομή της αμυλόζης (αριστερά) και της αμυλοπηκτίνης (δεξιά) (Shen et al., 2009).

Η συμβατική διεργασία παραγωγής λευκού αλευριού περιλαμβάνει αρχικά καθαρισμό του κόκκου σίτου, κατεργασία με νερό ή ατμό (Koutinas et al., 2016) (μέχρι οι κόκκοι να αποκτήσουν περίπου 15% υγρασία), (Onipe et al., 2015) και στη συνέχεια παραμονή σε ειδικούς κάδους για 4-20 ώρες. Σκοπός της κατεργασίας με νερό είναι η σκλήρυνση και το μαλάκωμα του πιτύρου και των στρωμάτων ενδοσπερμίου αντίστοιχα (Koutinas et al., 2016) αλλά και η προστασία του πιτύρου από το σπάσιμο κατά τη διάρκεια του διαχωρισμού (Onipe et al., 2015). Σειρά έχουν διαδοχικές διαδικασίες αλέσματος και κοσκινίσματος που σκοπό έχουν το διαχωρισμό του ενδοσπερμίου από τα κλάσματα πιτύρου και φύτρου. Στα υποπροϊόντα που παράγονται από το άλεσμα του σίτου και που περιέχουν κατά κύριο λόγο τα κλάσματα πιτύρου, συνυπάρχει ένα κλάσμα αμύλου, περίπου 20% επί ξηρής βάσης, γεγονός που οφείλεται στο ότι ο πλήρης διαχωρισμός των κλασμάτων του σίτου, δεν είναι δυνατός κατά τη συμβατική μέθοδο άλεσης. Υπάρχουν και άλλοι μέθοδοι απομάκρυνσης του πιτύρου, μία εκ των οποίων επιτυγχάνεται μέσω διαδοχικών σταδίων τριβής που σκοπό έχουν την διαδοχική απομάκρυνση των εξωτερικών στρωμάτων και του πιτύρου χωρίς να επηρεαστεί το ενδοσπέρμιο (pearling) (Koutinas et al., 2016).

**Πίνακας 1.5** Παραγωγή PHB από υδρόλυμα πιτύρου σίτου από διάφορους μικροοργανισμούς.

Στέλεχος	PHB (g/L)	Βιομάζα (g/L)	Y <sub>P/S</sub> (g/g)	Συσσώρευση (%)	Παραγωγικότητα (g/(L×h))	Αναφορά
<i>Halomonas boliviensis</i> LC1	4	9	-	-	-	Tembadmani et al., 2015
<i>Halomonas boliviensis</i>	4	8	0,2	50%	-	Obruca et al., 2015
<i>Bacillus sphaericus</i> NCIM 5149	1,065	15,5	-	6,8	-	Ramadas et al., 2009
<i>Halomonas boliviensis</i>	-	6,6	-	43	0,14	Lopes et al., 2014
<i>Ralstonia eutropha</i> NCIMB 11599	24,5	-	0,319	62,5	0,255	Annamalai & Sivakumar, 2016

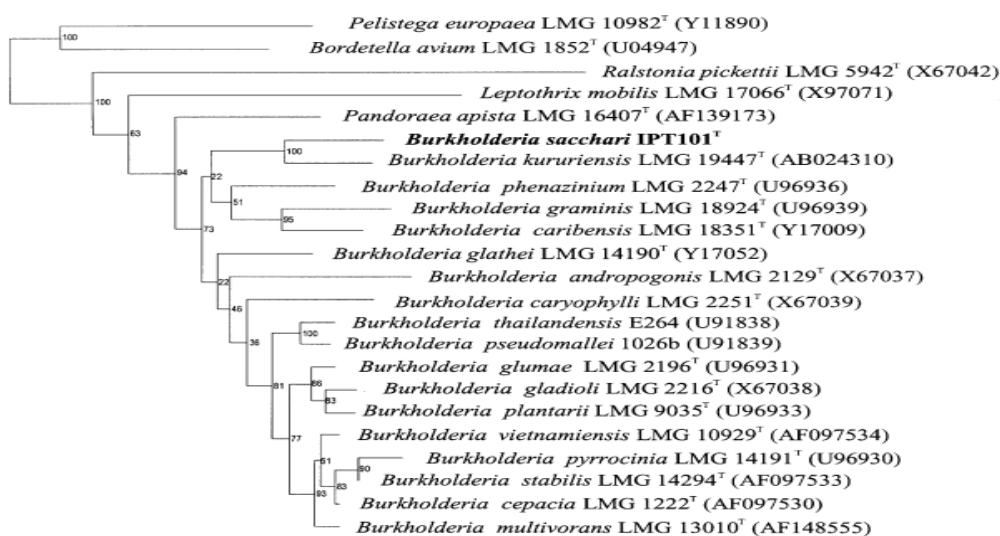
### 1.10 Βακτήριο *Burkholderia sacchari*

Ο μικροοργανισμός *Burkholderia sacchari* είναι ένα αρνητικό κατά Gram βακτήριο που απομονώθηκε από το έδαφος μίας φυτείας σακχαροκάλαμου στη Βραζιλία (Mendonça et al., 2017) με σημαντική δυνατότητα βιομηχανικής παραγωγής βιοπλαστικών από διάφορα υποστρώματα (Nascimento et al., 2016). Ανήκει στο φύλο των πρωτεοβακτηρίων και είναι ευκίνητο λόγω των πολικών μαστιγίων που διαθέτει. Τα κύτταρα του εν λόγω μικροοργανισμού έχουν σχήμα ράβδου (0,5–0,8 μm σε πλάτος, 1,5–3,0 μm σε μήκος) και αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες 25–37 °C με το βέλτιστο να παρατηρείται μεταξύ 28–30 °C. Το στέλεχος *Burkholderia sacchari* IPT 101 παρουσιάζει ευαισθησία στα αντιβιοτικά χλωραμφαινικόλη (100 μg mL<sup>-1</sup>), αμπικιλίνη (15 μg mL<sup>-1</sup>), καναμυκίνη (50 μg mL<sup>-1</sup>) και τετρακυκλίνη (100 μg mL<sup>-1</sup>) (Brämer et al., 2001). Ο συνηθέστερος περιορισμός σε θρεπτικό συστατικό προκειμένου να παραχθούν PHAs είναι το άζωτο στην περίπτωση του *B.sacchari* (De Sousa Dias et al., 2017). Ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός μπορεί να χρησιμοποιήσει τα σάκχαρα (κυρίως γλυκόζη και ξυλόζη) που απαντούν στα λιγνοκυτταρινούχα υδρολύματα αλλά και άλλα υποστρώματα όπως μπαγκάσσα σακχαροκάλαμου και άχυρο σίτου (Al Battashi et al., 2018). Ο μικροοργανισμός σε πειράματα σε φιάλες έδειξε πως μεταβόλιζε τη ξυλόζη

προς παραγωγή PHB και ξυλιτόλης. Σε πειράματα βελτιστοποίησης σε fed-batch ζυμώσεις η ξυλιτόλη έφτασε έως και τα 17 g/L (Kumar & Kim, 2018).`

Στα μέλη του γένους *Burkholderia* το φαινόμενο της καταβολικής καταστολής δεν είναι πλήρως κατανοητό. Παρόλα αυτά, σε μίγματα γλυκόζης, ξυλόζης, αραβινόζης ο μικροοργανισμός *B.sacchari* καταναλώνει πρώτα τη γλυκόζη και καθυστερεί τη χρήση των πεντοζών (Raposo et al., 2016), με αποτέλεσμα να αυξάνεται έτσι ο χρόνος της διεργασίας και να μειώνεται η παραγωγικότητα (η επιλεκτική αυτή κατανάλωση συγκεκριμένων υδατανθράκων σε σχέση με κάποιους άλλους είναι γνωστή ως καταβολική καταστολή) (Lopes et al., 2011). Παρόλα αυτά, το φαινόμενο της καταβολικής καταστολής στον εν λόγω μικροοργανισμό μπορεί να χαρακτηριστεί «ήπιας μορφής» λόγω του ότι, εν αντιθέσει με άλλους μικροοργανισμούς, εδώ η κατανάλωση των πεντοσακχάρων ξεκινά πριν την πλήρη εξάντληση της γλυκόζης (Raposo et al., 2016).

Έχει αναφερθεί πως όταν παρέχονται κατάλληλες πρόδρομες ενώσεις, ο μικροοργανισμός *B.sacchari* μπορεί να ενσωματώσει 4-υδροξυβουτυρικό, 3-υδροξυβαλερικό, ή 3-υδροξυεξανοϊκό οξύ σε πολυμερή που απαρτίζονται κυρίως από 3-υδροξυβουτυρικό οξύ. (Mendonça et al., 2013). Επιπλέον έχει αναφερθεί η παραγωγή του συμπολυεστέρα P(3HB-co-4HB) έπειτα από τροφοδοσία γλυκόζης (ή υδρολύματος από άχυρο σίτου) μαζί με γ-βουτυρολακτόνη (De Sousa Dias et al, 2017).



**Σχήμα 1.11** Φυλογενετικό δέντρο βασισμένο στη 16S ριβοσωμική RNA αλληλουχία του μικροοργανισμού *Burkholderia sacchari* και συγγενών βακτηρίων.

## 1.10.1 Ανασκόπηση βιβλιογραφίας

**Πίνακας 1.6** Βιβλιογραφική ανασκόπηση παραγωγής PHAs από διαφορετικά στελέχη του μικροοργανισμού *Burkholderia sacchari*.

Πηγή άνθρακα	Στέλεχος	Τύπος PHA	Βιομάζα (g/L)	[PHA] (g/L)	Συσσωρευση PHA (%)	Y <sub>PS</sub> (g/g)	Ρα (g/(L×h))	Είδος ζύμωσης	Αναφορά
Γλυκόζη	<i>B.sacchari</i> IPT 101	PHB	6,37	-	63,14	0,29	0,11	Καλλιέργεια διαλ.έργου-Κωνικές φιάλες	Lopes et al., 2009
Γλυκόζη	<i>B.sacchari</i> LFM 101	PHB	2,87	1,18	41,2	-	0,054	Καλλιέργεια διαλ.έργου-Κωνικές φιάλες	Nascimento et al., 2016
Γλυκόζη	<i>B.sacchari</i> DSM 17165	PHB	6,3	3,8	60,3	0,25	0,13	Καλλιέργεια διαλ.έργου-Κωνικές φιάλες	Cesário et al., 2014
Γλυκόζη	<i>B.sacchari</i> DSM 17165	PHB	5	2,2	44	0,26	0,09	Καλλιέργεια διαλ.έργου-Κωνικές φιάλες	Cesário et al., 2014
Γλυκόζη	<i>B.sacchari</i> DSM 17165	PHB	5,9	2,9	49,2	-	-	Καλλιέργεια διαλ.έργου-Κωνικές φιάλες	Cesário et al., 2014
Γλυκόζη	<i>B.sacchari</i> DSM 17165	PHB	138	101	73	-	2,4	Ημισυνεχής τροφ/νη καλλιέργεια	Cesário et al., 2014
Ξυλόζη	<i>B.sacchari</i> IPT 101	PHB	5,53	3,2	58,1	0,26	0,07	Καλλιέργεια διαλ.έργου-Κωνικές φιάλες	Obruca et al., 2015 & Lopes et al., 2009
Ξυλόζη	<i>B.sacchari</i> IPT 101	PHB	6,03	-	56,13	0,25	0,09	Καλλιέργεια διαλ.έργου-Κωνικές φιάλες	Lopes et al., 2011

Ξυλόζη	<i>B.sacchari</i> DSM 17165	PHB	6,3	2,8	44,4	0,24	0,08	Καλλιέργεια διαλ.έργου- Κωνικές φιάλες	Cesário et al., 2014
Ξυλόζη	<i>B.sacchari</i> DSM 17165	PHB	5,2	2,4	46,7	0,24	0,08	Καλλιέργεια διαλ.έργου- Κωνικές φιάλες	Cesário et al., 2014
Ξυλόζη	<i>B.sacchari</i> LFM 828	PHB	5,34	-	50,01	0,17	0,07	Καλλιέργεια διαλ.έργου- Κωνικές φιάλες	Lopes et al., 2011
Αραβινόζη	<i>B.sacchari</i> DSM 17165	PHB	7,4	4,7	62	0,24	0,09	Καλλιέργεια διαλ. έργου- Κωνικές φιάλες	Cesário et al., 2014
Σακχαρόζη	<i>B.sacchari</i> IPT 189	PHB	150	-	42	0,22	1,7	Ημισυνεχής τροφ/νη καλλιέργεια- Βιοαντ/ρας	Pradella et al., 2010
Σακχαρόζη	<i>B.sacchari</i> LFM 101	PHB	2,654	0,879	33,12	-	0,044	Καλλιέργεια διαλ.έργου- Κωνικές φιάλες	Nascimento et al., 2016
Σακχαρόζη	<i>B.sacchari</i> DSM 17165	PHB	70	36,5	-	0,08	1,29	Βιοαντιδρασ τήρας	Dias et al., 2017
Γλυκόζη & γλυκερόλη	<i>B.sacchari</i> DSM 17165	PHB	43,79	4,48	10,22	0,41	0,08	Ημισυνεχής τροφ/νη καλλιέργεια- Βιοαντ/ρας	Rodríguez- Contreras et al., 2014
Γλυκόζη & ξυλόζη	<i>B.sacchari</i> LFM828	PHB	5,43	-	51,62	0,22	0,1	Καλλιέργεια διαλ.έργου- Κωνικές φιάλες	Lopes et al., 2011
Γλυκόζη & ξυλόζη	<i>B.sacchari</i> DSM 17165	PHB	7,4	4,4	58,9	0,25	0,06	Καλλιέργεια διαλ.έργου- Κωνικές φιάλες	Cesário et al., 2014
Γλυκόζη &	<i>B.sacchari</i>	PHB	60	34,8	58	0,22	0,47	Καλλιέργεια	Favaro et al.,

Ξυλόζη	IPT 101							διαλ.έργου- Βιοαντ/ρας	2019 & Silva et al., 2004
Γλυκόζη & ξυλόζη	<i>B.sacchari</i> IPT 101	PHB	5,82	-	53,42	0,25	0,09	Καλλιέργεια διαλ.έργου- Κωνικές φιάλες	Lopes et al., 2009
Γλυκόζη & ξυλόζη	<i>B.sacchari</i> IPT 101	PHB	6,32	-	57,32	0,27	0,09	Καλλιέργεια διαλ.έργου- Κωνικές φιάλες	Lopes et al., 2011
Γλυκόζη ξυλόζη, αραβινόζη	<i>B.sacchari</i> DSM 17165	PHB	6	4,4	72	0,18	-	Καλλιέργεια διαλ.έργου- Κωνικές φιάλες	Cesário et al., 2014
Γλυκόζη, ξυλόζη, αραβινόζη	<i>B.sacchari</i> IPT 101	PHB	5,72	-	47,49	0,22	0,08	Καλλιέργεια διαλ.έργου- Κωνικές φιάλες	Lopes et al., 2009
Γλυκόζη, ξυλόζη, αραβινόζη	<i>B.sacchari</i> IPT 101	PHB	6,22	-	53,49	0,25	0,11	Καλλιέργεια διαλ.έργου- Κωνικές φιάλες	Lopes et al., 2009
Γλυκόζη, ξυλόζη, αραβινόζη	<i>B.sacchari</i> LFM828	PHB	5,93	-	55,73	0,23	0,12	Καλλιέργεια διαλ.έργου- Κωνικές φιάλες	Lopes et al., 2009
Γλυκόζη + γ-GBL <sup>b</sup>	<i>B.sacchari</i> DSM 17165	P(3HB- <i>co</i> -1.4 mol% 4HB)	5,8	2,4	41,4	-	-	Καλλιέργεια διαλ.έργου- Κωνικές φιάλες	Cesário et al., 2014
Γλυκόζη + γ-GBL	<i>B.sacchari</i> DSM 17165	P(3HB- <i>co</i> -4.7 mol% 4HB)	78	37	45	-	0,7	Ημισυνεχής τροφ/νη καλλιέργεια	Cesário et al., 2014
γ- GBL	<i>B.sacchari</i> DSM 17165	P(3HB- <i>co</i> -4.6 mol% 4HB)	2,8	0,2	7,1	-	-	Καλλιέργεια διαλ.έργου- Κωνικές φιάλες	Cesário et al., 2014
Γλυκόζη + γ-GBL +	<i>B.sacchari</i> DSM	P(3HB- <i>co</i> -6.3	82	32	39	-	0,6	Ημισυνεχής τροφ/νη	Cesário et al., 2014



προπιονικό οξύ	17165	mol%						καλλιέργεια		
Σακχαρόζη και 4-GBL	<i>B.sacchari</i> DSM 17165	P(3HB-co-4HB)	75,1	53,7	71,5	-	1,87	Βιοαντιδρασ τήρας	Dias et al., 2017	
ΥΑΣ <sup>c</sup>	<i>B.sacchari</i> DSM 17165	PHB	7,7	4,4	57	0,19	-	Καλλιέργεια διαλ.έργου- Κωνικές φιάλες	Cesário et al., 2014	
ΥΑΣ	<i>B.sacchari</i> DSM 17165	PHB	145,8	105	72	0,22	-	Ημισυνεχής τροφ/νη καλλιέργεια	Cesário et al., 2014	
ΥΑΣ	<i>B.sacchari</i> DSM 17165	PHB	125	71	57	-	1,5	Ημισυνεχής τροφ/νη καλλιέργεια	Cesário et al., 2014	
ΥΑΣ	<i>B.sacchari</i> DSM 17165	P(3HB-co-5.5 mol% 4HB)	80	18	22	-	0,4	Ημισυνεχής τροφ/νη καλλιέργεια	Cesário et al., 2014	
Απόβλητο χαρτί	<i>B.saccari</i>	PHB	3,63	1,6	44,2	0,15	-	Καλλιέργεια διαλ.έργου- Κωνικές φιάλες	Al-Battashi et al., 2018	
ΥΜΣ <sup>d</sup>	<i>Burkholderia</i> sp F24	PHB	25	12,25	49	-	0,28	Ημισυνεχής τροφ/νη καλλιέργεια- Βιοαντ/ρας	Lopes et al., 2014	
ΥΜΣ	<i>B.sacchari</i> IPT 101	PHB	4,4	2,73	62	0,39	0,11	Καλλιέργεια διαλ.έργου- Βιοαντ/ρας	Al-Battash et al., 2018 & Silva et al., 2004	

<sup>a</sup>Παραγωγικότητα

<sup>b</sup>γ-β ουτυρολακτόνη

<sup>c</sup>Υδρόλυμα άχυρου σίτου

<sup>d</sup>Υδρόλυμα μπαγκάσσας σακχαροκάλαμου

## 1.11 Ζύμωση στερεάς κατάστασης (SSF)

Η ζύμωση στερεάς κατάστασης είναι μια διεργασία η οποία πραγματοποιείται απουσία ελεύθερου νερού (Lam et al., 2013). Ωστόσο πρέπει να υπάρχει κατάλληλη υγρασία προκειμένου να υποστηριχθεί τόσο η αύξηση όσο και η μεταβολική δραστηριότητα του μικροοργανισμού. Ζύμωση στερεάς κατάστασης χρησιμοποιείται για την παραγωγή ενζύμων (β-γλυκοσιδάση, πρωτεάσες, ξυλανάσες, φυτάση κ.α), οργανικών οξέων, χρωστικών και άλλων δευτερογενών μεταβολιτών (Thomas et al., 2013). Είναι συνηθισμένη μέθοδος όταν είναι επιθυμητή η βιομηχανική παραγωγή ενζύμων, αφού τα παραγόμενα ένζυμα δεν διαλύονται από το νερό που προστίθεται (σε σχέση με αυτό που των βυθισμένων ζυμώσεων). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τα ένζυμα που παράγονται να βρίσκονται σε πολύ μεγαλύτερη συγκέντρωση εφόσον είναι πιο συμπυκνωμένα (Lam et al., 2013). Επιπλέον, τα πλεονεκτήματα της ζύμωσης στερεάς κατάστασης έναντι ζυμώσεων βυθισμένου τύπου, είναι οι χαμηλότερες ενεργειακές απαιτήσεις, η παραγωγή μικρότερου όγκου απορριμμάτων που απορρέουν από τη διεργασία, ο μικρότερος κίνδυνος επιμόλυνσης της ζύμωσης και οι υψηλότερες τιμές παραγωγικότητας προϊόντος. Η επιλογή του στερεού υλικού, το οποίο είτε είναι αδρανές υλικό που απλά υποστηρίζει την αύξηση, είτε αποτελεί πηγή άνθρακα και άλλων θρεπτικών συστατικών, είναι ζωτικής σημασίας για την μέγιστη απόδοση της διεργασίας (Kachrimanidou, 2016).

Οι καταλληλότεροι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται για τη ζύμωση στερεάς κατάστασης είναι οι μύκητες και οι ζύμες λόγω χαμηλότερων απαιτήσεων ενεργότητας νερού. Πιο συγκεκριμένα η ενεργότητα νερού στην περίπτωση των ζυμών και των μυκητών πρέπει να είναι μεταξύ 0,5–0,6 ενώ στην περίπτωση των βακτηρίων 0,8–0,9 (Thomas et al., 2013).

Ζύμωση στερεάς κατάστασης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή γλυκοαμυλάσης. Η γλυκοαμυλάση ανήκει στα αμυλολυτικά ένζυμα και καταλύει τη διάσπαση των α-(1,4) γλυκοσιδικών δεσμών που υπάρχουν στο άμυλο, με τελικό προϊόν τη γλυκόζη η οποία αποτελεί κύρια πηγή άνθρακα για διάφορες βιοτεχνολογικές διεργασίες (παραγωγή ηλεκτρικού οξέος, αιθανόλης και βιοπλαστικών). Έτσι λοιπόν, ο μικροοργανισμός *Aspergillus awamori*, γνωστός παραγωγός του εν λόγω ενζύμου (Lam et al., 2013), μπορεί μέσω ζύμωσης στερεάς κατάστασης - σε υποπροϊόντα από την άλεση σίτου - να χρησιμοποιηθεί για την

παραγωγή αμυλολυτικών και πρωτεολυτικών ενζύμων (Tsakona et al., 2015). Αυτό το «κοκτέιλ» ενζύμων μπορεί εν συνεχεία να χρησιμοποιηθεί για την υδρόλυση κυρίως του αμύλου που περιέχεται στο σίτο (τόσο η γλουτένη όσο και το φυτικό οξύ υδρολύονται εν μέρει) (Xu et al., 2010) και την παραγωγή ενός υδρολύματος πλούσιου σε θρεπτικά συστατικά (Tsakona et al., 2015) το οποίο μπορεί να αποτελέσει θρεπτικό υλικό για την παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας μέσω ζύμωσης (Apprich et al., 2014).

## 1.12 Σκοπός εργασίας

Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν λίγες μελέτες που εξετάζουν την αξιοποίηση αλευρούχων αποβλήτων, τα οποία αφθονούν στην νότια Ευρώπη, προς παραγωγή PHB. Αντικείμενο λοιπόν της μελέτης αποτέλεσε η βιοτεχνολογική αξιοποίηση αλευρούχων αποβλήτων για την παραγωγή πολυ(3-υδροξυβουτυρικού) εστέρα (PHB) μέσω ζυμώσεων με χρήση του μικροοργανισμού *B.sacchari* IPT 101.

Αρχικά διεξήχθησαν πειράματα διαλείποντος έργου σε κωνικές φιάλες, με και χωρίς πηγή οργανικού αζώτου από εκχύλισμα ζύμης, προκειμένου να καταδειχθεί η σημασία της εν λόγω πηγής αζώτου στην μικροβιακή αύξηση. Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις διαλείποντος έργου σε κωνικές φιάλες με πηγή άνθρακα διαφορετικά εμπορικά σάκχαρα. Πειράματα έγιναν τόσο σε φιάλες των 250 mL (γλυκόζη, ξυλόζη, γαλακτόζη, μαννόζη, αραβινόζη) όσο και σε φιάλες των 500 mL (γλυκόζη, ξυλόζη, αραβινόζη). Ο ενεργός όγκος ήταν σε όλες τις περιπτώσεις 100 mL και μελετήθηκαν η κινητική ανάπτυξη της βιομάζας, η κατανάλωση του υποστρώματος (HPLC), του αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN) και του ανόργανου φωσφόρου (IP) καθώς και η παραγωγή του PHB (GC).

Σε ένα δεύτερο επίπεδο πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε κωνικές φιάλες, σε διαφορετικά εμπορικά σάκχαρα αλλά για διαφορετικούς αρχικούς λόγους C/FAN. Αυτή τη φορά μελετήθηκε η επίδραση του αρχικού λόγου C/FAN τόσο στην ανάπτυξη της βιομάζας και στον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης, όσο και στην παραγωγή και συσσώρευση του προϊόντος. Οι λόγοι που εξετάστηκαν ήταν 40 και 80 g/g.

Ακολούθως, έλαβαν χώρα ζυμώσεις ημισυνεχούς τροφοδοσίας σε βιοαντιδραστήρα, με πηγή άνθρακα διαφορετικά εμπορικά σάκχαρα (γλυκόζη, ξυλόζη) στο βέλτιστο λόγο C/FAN.

Ζύμωση στερεάς κατάστασης σε πίτυρο σίτου έλαβε χώρα με σκοπό κυρίως την παραγωγή γλυκοαμυλάσης και σε μικρότερο βαθμό πρωτεολυτικών ενζύμων με χρήση του μύκητα *Aspergillus awamori*. Ακολούθησε μέτρηση και μελέτη της κινητικής της ενεργότητας της γλυκοαμυλάσης. Τα παραγόμενα ένζυμα χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή υδρολύματος πιτύρου σίτου πλούσιου σε πηγές άνθρακα και άλλα θρεπτικά συστατικά. Το εν λόγω υδρόλυμα συμπληρώθηκε με κάποια εμπορικά σάκχαρα και πηγή αζώτου, προκειμένου να επιτευχθεί ο βέλτιστος λόγος C/FAN= 30 g/g, ο οποίος καταδείχθηκε από τα προηγούμενα πειράματα. Ακολούθως, το υδρόλυμα (συνολική συγκέντρωση σακχάρων 46,72 g/L) χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή PHB σε βιοαντιδραστήρα μέσω ζύμωσης ημισυνεχούς τροφοδοσίας.

Τέλος πραγματοποιήθηκε ανάκτηση του τελικού προϊόντος με τη μέθοδο χλωροφορμίου-υποχλωριώδους νατρίου από την τελική βιομάζα των ζυμώνσεων διαλείποντος έργου που έλαβαν χώρα στον βιοαντιδραστήρα.

## 2 Υλικά και μέθοδοι

### 2.1 Βιολογικό υλικό

Στην παρούσα μελέτη, για την παραγωγή PHB, χρησιμοποιήθηκε το βακτηριακό στέλεχος *Burkholderia sacchari* IPT 101 το οποίο ανήκει στην οικογένεια *Burkholderiaceae*. Το εν λόγω στέλεχος ανήκει στην τράπεζα του εργαστηρίου μηχανικής και επεξεργασίας τροφίμων του τμήματος επιστήμης και τεχνολογίας τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Τα κύτταρα του συγκεκριμένου στελέχους ήταν λυοφιλιωμένα. Για την επανενεργοποίησή τους, αυτά καλλιεργήθηκαν σε κωνικές φιάλες 250 mL (με τη σύσταση που παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.1) και τοποθετήθηκαν σε ανακινούμενο θάλαμο επώασης (ZHWY-211C, Series Floor Model Incubator PR, China) με ταχύτητα ανάδευσης 180 rpm και θερμοκρασία 30 °C για 24 ώρες. Μέρος από την αναπτυγμένη προκαλλιέργεια τοποθετήθηκε σε φιαλίδια ειδικού τύπου χωρητικότητας 2 mL στους -80 °C σε μέσο που περιείχε και 50% (v/v) καθαρή γλυκερόλη (Sigma-Aldrich). Η σύσταση της προκαλλιέργειας που χρησιμοποιήθηκε στις κύριες καλλιέργειες (περιγράφεται παρακάτω) είναι διαφορετική από αυτή που χρησιμοποιήθηκε για την ενεργοποίηση των κυττάρων.

**Πίνακας 2.1** Σύνθεση του θρεπτικού υλικού για την ενεργοποίηση των κυττάρων του μικροοργανισμού *B.sacchari* IPT 101.

Συστατικά	Σύσταση (g/L)
Εκχύλισμα ζύμης (Sigma-Aldrich)	0,5
Βακτηριολογική πεπτόνη (Sigma-Aldrich)	0,5
Γλυκόζη (Pan Reac Applichem ITW Reagents)	0,5
Διαλυτό άμυλο (Sigma-Aldrich)	0,5
MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O (PENTA)	0,3
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (PENTA)	0,05

## 2.2 Σύσταση πιτύρου σίτου

Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκε χοντρόκοκκο πίτυρο σίτου το οποίο προμηθεύτηκε από μία ελληνική βιομηχανία παραγωγής προϊόντων αρτοποιίας και ζαχαροπλαστικής στη Θήβα. Η σύσταση του παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 2.2** Σύσταση χοντρόκοκκου πιτύρου σίτου.

Συστατικά	Χοντρόκοκκο πίτυρο
Υγρασία	9,2±0,2
Λιπίδια	3
Πρωτεΐνη	16±0,1
Άμυλο	19,7±0,4
Άζωτο ελεύθερων αμινομάδων	0,013±0,007
Ανόργανος φωσφόρος	0,374±0,024

### 2.3 Παρασκευή εμβολίου του βακτηριακού στελέχους *Burkholderia sacchari* IPT 101 και σύσταση του θρεπτικού μέσου

Η παρασκευή του εμβολίου του μικροοργανισμού *Burkholderia sacchari*, έλαβε χώρα μεταφέροντας το περιεχόμενο των cryovial σε κωνικές φιάλες των 500 mL που περιείχαν 100 mL θρεπτικού μέσου (επόμενη παράγραφος) και 10 g/L γλυκόζη (στην περίπτωση των κωνικών φιαλών) ή 20 g/L (στην περίπτωση του βιοαντιδραστήρα). Οι φιάλες τοποθετήθηκαν σε ανακινούμενο θάλαμο επώασης (ZHWHY-211C, Series Floor Model Incubator PR, China) με ταχύτητα ανάδευσης 180 rpm και θερμοκρασία 30 °C για 12 ώρες. Το αρχικό pH της προκαλλιέργειας ρυθμίστηκε στην τιμή του 6,8.

Πιο αναλυτικά, η σύσταση του θρεπτικού μέσου τόσο του εμβολίου όσο των κωνικών φιαλών ήταν: 1,0 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (PENTA), 4,5 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  (Fluka), 1,5 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (PENTA), 0,2 g/L  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  (PENTA), και 1,0 mL/L διάλυμα ιχνοστοιχείων (Πίνακας 2.3). Επίσης περιεχόταν και εκχύλισμα ζύμης 1 g/L. Ωστόσο στα πειράματα όπου μελετήθηκε ο αρχικός λόγος C/FAN, η συγκέντρωση εκχυλίσματος ζύμης ποίκιλλε ώστε να μεταβάλλεται ο αρχικός λόγος C/FAN. Η συγκεκριμένη σύσταση ήταν σχεδιασμένη ώστε το άζωτο να αποτελέσει το περιοριστικό θρεπτικό συστατικό. Όπως φαίνεται υπήρχε τόσο οργανική (εκχύλισμα ζύμης) όσο και ανόργανη πηγή αζώτου  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Η πηγή άνθρακα, το εκχύλισμα ζύμης, το διάλυμα ιχνοστοιχείων (Πίνακας 2.3) και αλάτων ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), και το διάλυμα  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  αποστειρώθηκαν ξεχωριστά. Για την παρασκευή του εμβολίου τα παραπάνω ενώθηκαν μεταξύ τους υπό ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής (Telstar Bio Advance) προκειμένου να συμπληρώσουν έναν ενεργό όγκο 100 mL μέσα στον οποίο προστέθηκε και το περιεχόμενο του cryovial.

Η σύσταση του θρεπτικού μέσου στην περίπτωση του βιοαντιδραστήρα ήταν η ίδια με αυτή που περιγράφεται στην πρώτη παράγραφο με τη διαφορά ότι περιεχόταν 1,0 mL/L διάλυμα ιχνοστοιχείων (Πίνακας 2.3). Επίσης η συγκέντρωση yeast extract προσαρμοζόταν προκειμένου να επιτευχθεί ο βέλτιστος λόγος C/FAN.

**Πίνακας 2.3** Σύσταση διαλύματος ιχνοστοιχείων.

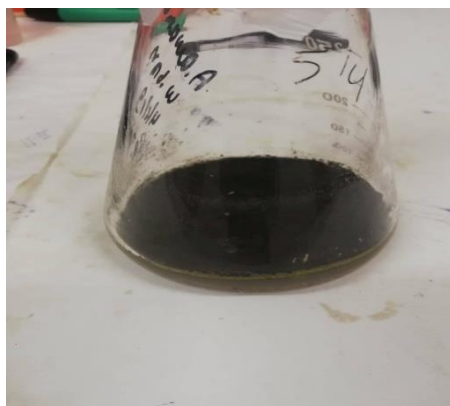
Συστατικά	Σύσταση
FeSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O (Sigma-Aldrich)	10 g/L
ZnSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O (Sigma-Aldrich)	2,25 g/L
CuSO <sub>4</sub> ×5H <sub>2</sub> O (Sigma-Aldrich)	1 g/L
MnSO <sub>4</sub> ×4-5H <sub>2</sub> O (Sigma-Aldrich)	0,5 g/L
CaCl <sub>2</sub> ×2H <sub>2</sub> O (Sigma-Aldrich)	2 g/L
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ×10H <sub>2</sub> O	0,23 g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub>	0,1 g/L
35% HCl	10 mL

### 2.3.1 Παρασκευή εμβολίου του μύκητα *Aspergillus awamori*

Για τη ζύμωση στερεάς κατάστασης χρησιμοποιήθηκε ένα στέλεχος του μύκητα *Aspergillus awamori* 2B.361 U 2/1. Το στέλεχος αρχικά ήταν αποθηκευμένο υπό ξηρή μορφή σπορίων σε άμμο στους 4 °C. Στη συνέχεια το στέλεχος ενυδατώθηκε και απομονώθηκε για να διαπιστωθεί η καθαρότητά του. Αποθηκεύτηκε στη συνέχεια σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 2% w/v άγαρ (PENTA) και 5% w/v πίτυρο σίτου και σε cryovials χωρητικότητας 2 mL. Η ανανέωση του στελέχους πραγματοποιούταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα προκειμένου να διασφαλιστεί η ζωτικότητα του. Το εν λόγω στέλεχος εν συνεχεία αναπτύχθηκε σε στερεό μέσο (5% w/v πίτυρο σίτου, 2% w/v άγαρ και 50 mL απιοντισμένο νερό) σε κωνικές φιάλες των 250 mL. Πιο συγκεκριμένα μετά την αποστείρωση σε αυτόκαυστο (121 °C για 20 min) των κωνικών φιαλών με το στερεό μέσο, ακολούθησε η διασπορά του μύκητα στο μέσο. Οι κωνικές φιάλες έπειτα οδηγήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο (ZHWHY-211C, Series Floor Model Incubator PR, China) στους 30 °C για πέντε περίπου μέρες προκειμένου να αναπτυχθεί ο μύκητας σε όλη την επιφάνεια (Σχήμα 2.1). Ως εμβόλιο για τη ζύμωση στερεάς κατάστασης, χρησιμοποιήθηκε εναιώρημα σπορίων του μύκητα. Η απαιτούμενη συγκέντρωση σπορίων στη ζύμωση στερεάς κατάστασης ( $2 \times 10^6$  σπόρια/mL) επιτεύχθηκε μετά από προσθήκη 50 mL αποστειρωμένου νερού (μαζί με λίγες σταγόνες Tween 80), και



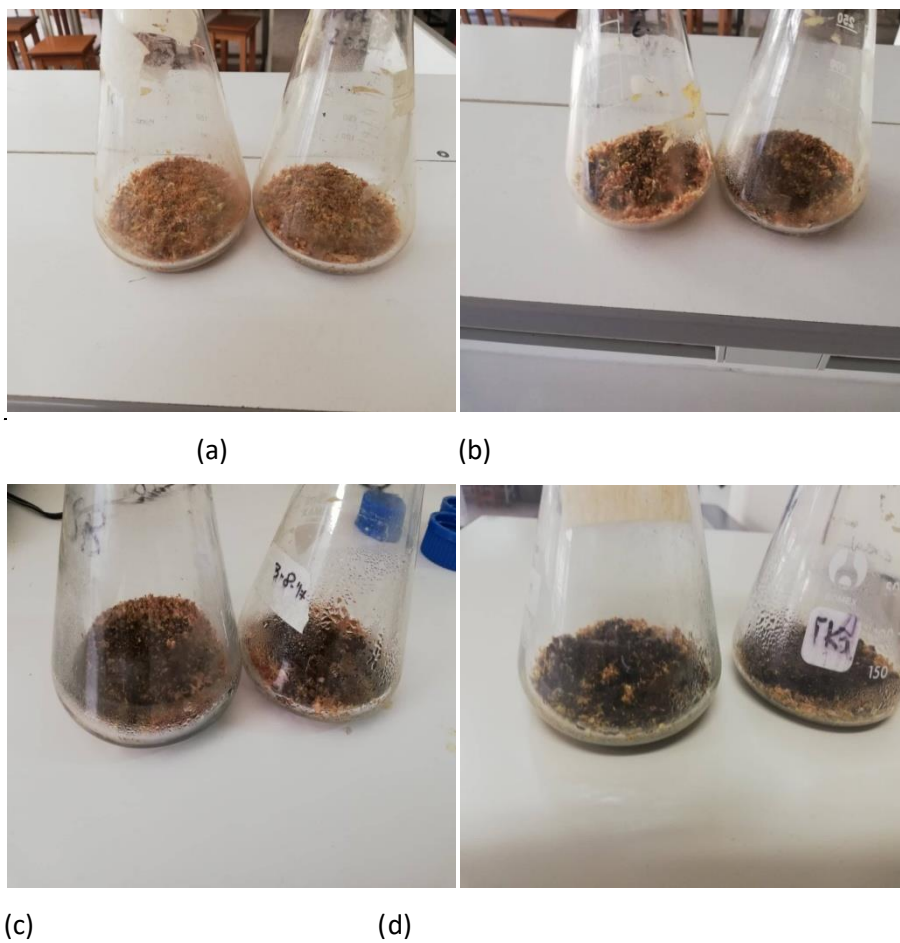
γυάλινες μπίλιες διασποράς (glassbeads, 2mm) υπό ασηπτικές συνθήκες. Ακολούθησε έντονο ανακάτεμα.



**Σχήμα 2.1** Εμβόλιο *Aspergillus awamori* αναπτυγμένο σε πίτυρο σίτου και άγαρ.

## 2.4 Ζυμώσεις στερεάς κατάστασης

Η ζύμωση στερεάς κατάστασης του μικροοργανισμού *A. awamori* για την παραγωγή των ενζύμων (κυρίως γλυκοαμυλάσης) διεξήχθη σε κωνικές φιάλες των 250 mL στους 30 °C. Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκαν 5 g πιτύρου σίτου. Η αποστείρωση κάθε κωνικής φιάλης πραγματοποιήθηκε σε αυτόκαυστο στους 121 °C για 20 λεπτά. Στις φιάλες ως εμβόλιο χρησιμοποιήθηκε εναιώρημα σπορίων με συγκέντρωση ( $2 \times 10^6$  σπόρια/mL, Υποενότητα 2.3.1). Επιπλέον κατάλληλη ποσότητα αποστειρωμένου νερού προστέθηκε σε κάθε φιάλη προκειμένου να ρυθμιστεί το αρχικό ποσοστό υγρασίας στο 65% w/w, σε ξηρά βάση. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα λαμβάνονταν δείγματα για μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας (Υποενότητα 2.4.1) και μελέτη κινητικής. Τα πειράματα διεξήχθησαν εις διπλούν.



**Σχήμα 2.2** Ζύμωση στερεάς κατάστασης (SSF) του μικροοργανισμού *Aspergillus awamori* σε πίτυρο σίτου στις (a) 45 ώρες, (b) 60 ώρες, (c) 70 ώρες, (d) 90 ώρες ζύμωσης.

### 2.4.1 Μέτρηση ενεργότητας γλυκοαμυλάσης

Από τα ένζυμα που παράχθηκαν από τη ζύμωση στερεάς κατάστασης, μετρήθηκε η ενεργότητα της γλυκοαμυλάσης. Η εν λόγω ενζυμική ενεργότητα προσδιορίστηκε στους 60 °C μετά από μίξη 1 mL 2% διαλυτού αμύλου (που βρισκόταν εν διαλύσει σε buffer οξικού, pH 4,8), με 0,5 mL ενζυμικό εκχύλισμα και 0,5 απιοντισμένο νερό. Δείγματα ελήφθησαν στον χρόνο μηδέν (Time Zero) και δέκα λεπτά μετά την έναρξη της αντίδρασης. Μετά την πάροδο των 10 λεπτών τα ένζυμα απενεργοποιήθηκαν με την προσθήκη ίσης ποσότητας (2mL) TCA (5%). Η διαδικασία της απενεργοποίησης έγινε σε παγόλουτρο. Χρησιμοποιήθηκε και τυφλό δείγμα στο οποίο αντί ενζυμικού εκχυλίσματος, υπήρχε 0,5 mL απιοντισμένο νερό. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

Το ενζυμικό εκχύλισμα, που περιείχε τα παραχθέντα από τη ζύμωση στερεάς κατάστασης ένζυμα, ελήφθη ως εξής: Το περιεχόμενο των φιαλών που περιείχε τα στερεά της ζύμωσης στερεάς κατάστασης χωρίστηκε στα δύο. Το ένα μέρος οδηγήθηκε για μέτρηση υγρασίας ενώ στο άλλο προστέθηκαν 40 mL απιοντισμένο νερό. Το νερό μαζί με τα στερεά της ζύμωσης στερεής κατάστασης αναμίχθηκαν μεταξύ τους (blender) τουλάχιστον για πέντε λεπτά και έπειτα ακολούθησε φυγοκέντριση για απομάκρυνση των στερεών. Το υπερκείμενο αποτέλεσε το εκχύλισμα ενζύμων στο οποίο πραγματοποιήθηκε η μέτρηση της ενεργότητας. Αμέσως ελήφθησαν 2 mL από αυτό και 2 mL TCA 5% προστέθηκαν, προκειμένου να απενεργοποιηθούν τα ένζυμα και να ληφθεί η μέτρηση «χρόνος μηδέν». Το υπόλοιπο χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση ενεργότητας με τον τρόπο που περιγράφεται στην πρώτη παράγραφο της ενότητας. Η συγκέντρωση της παραγόμενης γλυκόζης προσδιορίστηκε με HPLC. Το TCA διατηρήθηκε στο ψυγείο (4 °C) και η παρασκευή του ανανεωνόταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Επίσης πριν από τον προσδιορισμό της ενζυμικής ενεργότητας, το άμυλο θερμάνθηκε σε υδατόλουτρο στους 80 °C για είκοσι λεπτά προκειμένου να ζελατινοποιηθεί.

Τα αποτελέσματα ενεργότητας εκφράστηκαν σε U/g. Ορισμός μονάδας ενζυμικής ενεργότητας (1Unit=U): Ένα (U) ενζυμικής ενεργότητας είναι η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται προκειμένου να απελευθερωθεί 1 mg γλυκόζης/min στις συγκεκριμένες συνθήκες.

Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε για διαφορετικές ώρες της ζύμωσης στερεάς κατάστασης προκειμένου να γίνει κινητική της ενζυμικής ενεργότητας της γλυκοαμυλάσης.

## 2.5 Υδρόλυση πιτύρου σίτου και παραγωγή υδρολύματος

Ζύμωση στερεάς κατάστασης πραγματοποιήθηκε δύο φορές: την μία με σκοπό τη μέτρηση ενεργότητας της γλυκοαμυλάσης και την άλλη για παραγωγή υδρολύματος πιτύρου σίτου. Τρεις μέρες μετά από τον εμβολιασμό της ζύμωσης στερεάς κατάστασης (71h), κατάλληλη ποσότητα στερεών της ζύμωσης, εναιωρήθηκαν σε 500 mL αποστειρωμένο νερό και αναμίχθηκαν έντονα σε ένα μίξερ (blender). Ακολούθησε φυγοκέντριση (5.000g, 10 min) του εναιωρήματος, και μετά το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε μπουκάλες Duran του 1 L που περιείχαν 150 g/L πίτυρο σίτου. Μέσα στις φιάλες είχαν τοποθετηθεί μαγνήτες προκειμένου να εξασφαλιστεί η καλή τους ανάδευση κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης. Η υδρόλυση πραγματοποιήθηκε στους 60 °C για 24 ώρες και υπό μη ελεγχόμενες συνθήκες pH. Μετά το πέρας της υδρόλυσης, το υπερκείμενο φιλτραρίστηκε για να απομακρυνθούν τα στερεά, συλλέχθηκε και αποθηκεύτηκε στην κατάψυξη για να χρησιμοποιηθεί εν συνεχεία ως θρεπτικό μέσο για την παραγωγή PHB (Υποενότητα 2.7.3). Στο υπερκείμενο πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις FAN, ανόργανου φωσφόρου και σακχάρων στις 24 ώρες. Λόγω μη επαρκούς υδρόλυσης, έγινε εξωτερική προσθήκη εμπορικών σακχάρων και εκχυλίσματος ζύμης υπό ασηπτικές συνθήκες προκειμένου να επιτευχθεί μία αρχική συγκέντρωση ολικών σακχάρων ίση με 46,72 g/L και ένας αρχικός λόγος C/FAN ίσος με 30g/g. Τα πειράματα της υδρόλυσης και οι σχετικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

## 2.6 Συνθήκες ζυμώσεων υγρής κατάστασης διαλείποντος έργου για την παραγωγή PHB

Για την παραγωγή PHB στις κωνικές φιάλες, το θρεπτικό μέσο είχε την σύσταση που περιγράφεται στην *Υποενότητα 2.3*. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε κωνικές φιάλες των 250 mL, των 500 mL και των 2 L. Στις δύο πρώτες περιπτώσεις ο ενεργός όγκος ήταν 100 mL ενώ στην τελευταία, ο ενεργός όγκος ήταν 800 mL όπως θα παρουσιαστεί και παρακάτω. Η πηγή άνθρακα, το εκχύλισμα ζύμης (Sigma-Aldrich), το διάλυμα ιχνοστοιχείων και αλάτων (*Υποενότητα 2.3*), και το διάλυμα  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (PENTA) αποστειρώθηκαν ξεχωριστά σε αυτόκαυστο στους 121 °C για 20 min. Ενώθηκαν μεταξύ τους υπό ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής (Telstar Bio Advance) για να συμπληρώσουν έναν ενεργό όγκο 100 mL (ή 800 mL στην περίπτωση που ο συνολικός όγκος ήταν 2 L) μέσα στον οποίο προστέθηκε και το περιεχόμενο της προκαλλιέργειας (10%). Το αρχικό pH των καλλιιεργειών ρυθμίστηκε μεταξύ των τιμών 6,7-7.0 και κατά τη διάρκεια των ζυμώσεων ελέγχθηκε με προσθήκη NaOH 10 M ή H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5M. Οι φιάλες τοποθετήθηκαν σε ανακινούμενο θάλαμο επώασης (ZHWHY-211C, Series Floor Model Incubator PR, China) με ταχύτητα ανάδευσης 180 rpm και θερμοκρασία 30 °C.

Τα δείγματα που λήφθηκαν ανά τακτά χρονικά διαστήματα φυγοκεντρήθηκαν στις 9.000 στροφές για δέκα λεπτά (Heraeus-Biofuge Pico) Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και χρησιμοποιήθηκε για την αναλύσεις (σάκχαρα, FAN, IP). Το ίζημα ελαιωρήθηκε σε μικρό όγκο απιοντισμένου νερού προκειμένου να ξεπλυθούν τα κύτταρα και ξαναφυγοκεντρήθηκαν. Ακολούθησε προσθήκη μικρής ποσότητας ακετόνης στο στερεό κλάσμα, μεταφορά σε προζυγισμένα μπουκαλάκια McCartney (14 mL) και ξήρανση για προσδιορισμό της βιομάζας. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

### 2.6.1 Επίδραση πηγής yeast extract

Πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις σε κωνικές φιάλες 250 mL με και χωρίς προσθήκη εκχυλίσματος ζύμης, χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα γλυκόζη. Τα

πειράματα έλαβαν χώρα προκειμένου να καταδειχθεί η αναγκαιότητα οργανικής πηγής αζώτου στην ανάπτυξη βιομάζας. Η σύσταση του μέσου είναι αυτή που περιγράφεται στην *Υποενότητα 2.3*. (για την περίπτωση που υπήρχε προσθήκη οργανικής πηγής αζώτου). Στην περίπτωση που δεν υπήρχε οργανική πηγή αζώτου, απλά δεν προστέθηκε το εκχύλισμα ζύμης ενώ τα υπόλοιπα συστατικά του μέσου (*Υποενότητα 2.6*) ενώθηκαν ασηπτικά μεταξύ τους. Η αρχική συγκέντρωση γλυκόζης ήταν περίπου 40 g/L και ο ενεργός όγκος των φιαλών 100 mL.

### 2.6.2 Καλλιέργειες υγρής κατάστασης διαλείποντος έργου για την παραγωγή PHB

Αρχικά πειράματα σε διαφορετικά εμπορικά σάκχαρα πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες των 250 mL με ενεργό όγκο 100 mL και αρχική συγκέντρωση σακχάρων περίπου 40 g/L. Τα σάκχαρα που μελετήθηκαν ως πηγή άνθρακα ήταν γλυκόζη ( $C_6H_{12}O_6$ ), γαλακτόζη ( $C_6H_{12}O_6$ ), μαννόζη ( $C_6H_{12}O_6$ ), ξυλόζη ( $C_5H_{10}O_5$ ) και αραβινόζη ( $C_5H_{10}O_5$ ) (Pan Reac AppliChem ITW Reagents). Στην περίπτωση της γλυκόζης πραγματοποιήθηκαν και άλλα πειράματα ακριβώς στις ίδιες συνθήκες με αυτές που περιγράφονται, με την μόνη διαφορά ότι στα τελευταία πειράματα ο ενεργός όγκος ήταν 800 mL σε ένα συνολικό όγκο 2 L.

Στη συνέχεια έλαβαν χώρα ζυμώσεις σε κωνικές φιάλες των 500 mL. Ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκαν γλυκόζη, αραβινόζη και ξυλόζη πάλι με αρχική συγκέντρωση περίπου 40 g/L. Ο ενεργός όγκος ήταν 100 mL σε ένα συνολικό όγκο 500 mL.

Σε όλα τα προαναφερθέντα πειράματα ο λόγος C/FAN ήταν περίπου 160 g/g και η σύσταση του μέσου αυτή που περιγράφεται στην *Υποενότητα 2.3*.

### 2.6.3 Επίδραση αρχικού λόγου C/FAN

Πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις διαλείποντος έργου σε κωνικές φιάλες 500 mL και ενεργό όγκο 100 mL με την ίδια πάντα σύσταση μέσου (το μόνο που μεταβαλλόταν ήταν η αρχική συγκέντρωση yeast extract προκειμένου να μεταβάλλεται και ο αρχικός λόγος C/FAN). Τα πειράματα έλαβαν χώρα προκειμένου

να μελετηθεί η επίδραση του λόγου C/FAN τόσο στην ανάπτυξη της βιομάζας και στον ειδικό ρυθμό αύξησης του μικροοργανισμού *B.sacchari*, όσο και στην παραγωγή και συσσώρευση του προϊόντος. Ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά σάκχαρα (γλυκόζη, ξυλόζη, γαλακτόζη, αραβινόζη) σε διαφορετικούς αρχικούς λόγους C/FAN. Πιο συγκεκριμένα οι λόγοι που εξετάστηκαν ήταν 40, 80 g/g. Η ρύθμιση του λόγου κάθε φορά πραγματοποιήθηκε με αλλαγή της αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων ή της οργανικής πηγής αζώτου όπως παρουσιάζεται πιο αναλυτικά στην *Υποενότητα 3.3.3*.

## 2.7 Ζυμώσεις σε βιοαντιδραστήρα για παραγωγή PHB

Σε αυτό το πειραματικό στάδιο μελετήθηκε η παραγωγή PHB σε υποστρώματα εμπορικών σακχάρων (ξυλόζη, γλυκόζη) καθώς και σε θρεπτικό υπόστρωμα υγρού αποβλήτου μέσω ζυμώσεων ημισυνεχούς λειτουργίας (fed-batch). Για την παραγωγή PHB σε βιοαντιδραστήρα, το θρεπτικό μέσο είχε την σύσταση που περιγράφεται στην *Υποενότητα 2.3*. Τα πειράματα στον βιοαντιδραστήρα έλαβαν χώρα προκειμένου να συγκριθούν με τα αντίστοιχα των κωνικών φιαλών. Ο βιοαντιδραστήρας (που περιείχε την πηγή άνθρακα), το εκχύλισμα ζύμης, το διάλυμα ιχνοστοιχείων και αλάτων (*Υποενότητα 2.3*), και το διάλυμα  $MgSO_4 \times 7H_2O$  αποστειρώθηκαν ξεχωριστά σε αυτόκαυστο στους  $121\text{ }^\circ C$  και για 20 min. Το διάλυμα  $MgSO_4 \times 7H_2O$  και το διάλυμα ιχνοστοιχείων και αλάτων ενώθηκαν μεταξύ τους υπό ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής και έπειτα τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένο εμβολιαστήριο. Το εκχύλισμα ζύμης και το εμβόλιο (10%) τοποθετήθηκαν επίσης σε άλλα διαφορετικά εμβολιαστήρια. Το περιεχόμενο των εμβολιαστηρίων μεταφέρθηκε στο εσωτερικό του βιοαντιδραστήρα υπό ασηπτικές συνθήκες με τη βοήθεια φλογίστρου. Η τιμή του pH ρυθμίστηκε μεταξύ των τιμών 6,7-7,0 χρησιμοποιώντας διαλύματα NaOH 10 M ή  $H_2SO_4$  5M μέσω αυτοματοποιημένου συστήματος αντλίας. Το ηλεκτρόδιο του πεχαμέτρου αφού βαθμονομήθηκε με πρότυπα διαλύματα με pH 4 & 7 σε θερμοκρασία δωματίου, τοποθετήθηκε στο βιοαντιδραστήρα και αποστειρώθηκε στο αυτόκαυστο μαζί με αυτόν. Σε όλες τις περιπτώσεις, η ταχύτητα ανάδευσης στο βιοαντιδραστήρα ήταν ρυθμισμένη στα 900 rpm, η θερμοκρασία στους  $30\text{ }^\circ C$  και ο αερισμός στο 1,5

vvm. Σε περίπτωση έντονου αφρισμού πραγματοποιήθηκε προσθήκη αποστειρωμένης αντιαφριστικής ουσίας μέσα από το σέπτο.

Τα δείγματα που ελήφθησαν ανά τακτά χρονικά διαστήματα φυγοκεντρήθηκαν στις 9.000 στροφές για δέκα λεπτά (Heraeus-Biofuge Pico). Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε με αποστειρωμένη σύριγγα. Μετά τον εμβολιασμό, το δείγμα που λήφθηκε αποτέλεσε το μηδενικό σημείο ( $t_0$ ). Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και χρησιμοποιήθηκε για τις αναλύσεις (σάκχαρα, FAN, IP). Το ίζημα εναιωρήθηκε σε μικρό όγκο απιοντισμένου νερού προκειμένου να ξεπλυθούν τα κύτταρα και ξαναφυγοκεντρήθηκαν. Ακολούθησε προσθήκη μικρής ποσότητας ακετόνης στο στερεό κλάσμα, μεταφορά σε προζυγισμένα μπουκαλάκια McCartney (14 mL) και ξήρανση για προσδιορισμό της βιομάζας.

### 2.7.1 Τεχνικά χαρακτηριστικά βιοαντιδραστήρα

Ο εργαστηριακός βιοαντιδραστήρας που χρησιμοποιήθηκε ήταν Ελβετικής προέλευσης, της εταιρίας Infors HT Labfors 4. Η λειτουργία του ρυθμίστηκε με τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος V.2.0.2 της ίδιας εταιρίας. Το δοχείο του βιοαντιδραστήρα αποτελούταν από διπλότοιχο βοριοπυριτικό γυαλί στο εσωτερικό του οποίου κυκλοφορούσε νερό που χρησίμευε στην εναλλαγή θερμότητας με το υγρό ζύμωσης. Ο βιοαντιδραστήρας διέθετε αναδευτήρα 2 πτερωτών, θέση για πεχάμετρο, οξυγονόμετρο και θερμόμετρο, αντλίες (παροχής θρεπτικού μέσου, οξέος, βάσεως και αντιαφριστικού), σέπτο, αισθητήρα αφρισμού και δειγματολήπτη. Οι ανωτέρω παράμετροι (θερμοκρασία, ανάδευση, κ.α) ρυθμίστηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού.

### 2.7.2 Ζυμώσεις ημισυνεχούς τροφοδοσίας σε διαφορετικά εμπορικά σάκχαρα

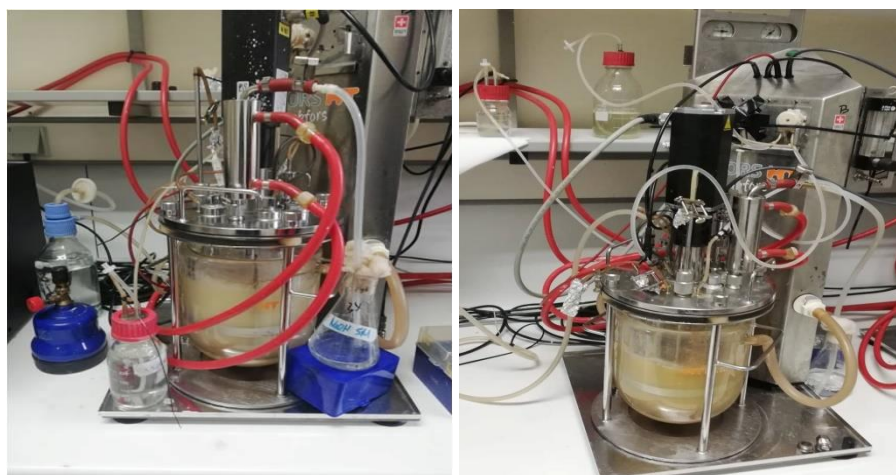
Δύο διαφορετικές ζυμώσεις ημισυνεχούς τροφοδοσίας (fed-batch) έλαβαν χώρα στο βιοαντιδραστήρα χρησιμοποιώντας τη μία φορά ως πηγή άνθρακα ένα εξοσάκχαρο, (γλυκόζη) και την άλλη ένα πεντοσάκχαρο (ξυλόζη). Η αρχική συγκέντρωση σακχάρων ήταν 29,5 g/L (για την ξυλόζη) και 36,5 g/L (για την



γλυκόζη), ο αρχικός λόγος C/N=30 g/g και ο ενεργός όγκος της ζύμωσης ήταν 1,5 L. Η ζύμωση ξεκίνησε αρχικά ως ασυνεχής και όταν η συνολική συγκέντρωση σακχάρων μειωνόταν περίπου στα 10-15 g/L, πυκνό διάλυμα γλυκόζης η ξυλόζης (600 g/L) τροφοδοτούταν στον βιοαντιδραστήρα.

### 2.7.3 Ζύμωση ημισυνεχούς τροφοδοσίας σε υδρόλυμα πιτύρου σίτου στον βέλτιστο λόγο C/FAN

Η ημισυνεχής τροφοδοτούμενη ζύμωση έλαβε χώρα με χρήση υδρολυμάτων πιτύρου σίτου ως αποκλειστική πηγή θρεπτικών συστατικών. Ο ενεργός όγκος της ζύμωσης ήταν 1,5 L αυτή τη φορά, η αρχική συγκέντρωση των συνολικών σακχάρων (γλυκόζη, αραβινόζη, μαννόζη, γαλακτόζη, ξυλόζη) ήταν 46,72 g/L και ο αρχικός λόγος C/FAN περίπου 30 g/g. Η ζύμωση ξεκίνησε αρχικά ως ασυνεχής και όταν η συνολική συγκέντρωση σακχάρων μειωνόταν περίπου στα 10-15 g/L, πυκνό διάλυμα σακχάρων τροφοδοτούταν στον βιοαντιδραστήρα.



(a)

(b)

**Σχήμα 2.3** (a) Ημισυνεχής τροφοδοτούμενη καλλιέργεια για παραγωγή PHB σε γλυκόζη (b) Ημισυνεχής τροφοδοτούμενη καλλιέργεια για παραγωγή PHB σε υδρόλυμα πιτύρου σίτου.

## 2.8 Αποστείρωση

Όλα τα διαλύματα, τα σκεύη και τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν σε όλες τις ζυμώσεις, αποστειρώθηκαν πριν τον εμβολιασμό σε αυτόκαυστο στους 121 °C για 20 min. Το εκχύλισμα ζύμης (yeast extract) αποστειρώθηκε ξεχωριστά από τα υπόλοιπα συστατικά του μέσου προκειμένου να αποφευχθεί η αντίδρασή του με σάκχαρα (αντιδράσεις Maillard) και η κρυστάλλωση των σακχάρων. Στη συνέχεια ωστόσο αναμίχθηκε με τα υπόλοιπα συστατικά υπό ασηπτικές συνθήκες. Τέλος όλοι οι χειρισμοί έγιναν είτε σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής είτε με τη βοήθεια φλόγιστρου. Το υδρόλυμα πιτύρου σίτου αποστειρώθηκε με φίλτρο (Σχήμα 2.4) και όχι με θερμότητα προκειμένου να αποφευχθούν φαινόμενα καταστροφής θρεπτικών συστατικών, βιταμινών, εκφυλισμός πρωτεϊνών και καραμελοποίηση σακχάρων που μπορεί να συμβούν με την θέρμανση. Για την μεταφορά του υδρόλυματος χρησιμοποιήθηκε αντλία (Gilson Miniplus 3).



**Σχήμα 2.4** Αποστείρωση υδρόλυματος πιτύρου σίτου μέσω φίλτρου.

## 2.9 Αναλυτικές μέθοδοι

### 2.9.1 Προσδιορισμός βιομάζας

Για τον υπολογισμό της συνολικής ξηρής βιομάζας, τα κύτταρα συλλέχθηκαν ύστερα από φυγοκέντριση του δείγματος (9.000 στροφές, 10 λεπτά) σε φυγόκεντρο (Heraeus-Biofuge Pico). Στην συνέχεια ακολούθησε ένα πρώτο ξέπλυμα με ελάχιστο όγκο νερού καθώς και ξέπλυμα με ακετόνη. Η καθαρή βιομάζα μεταφέρθηκε έπειτα σε προζυγισμένα φιαλίδια bijou των 14 mL ή σε φιαλίδια McCartney. Ακολούθησε

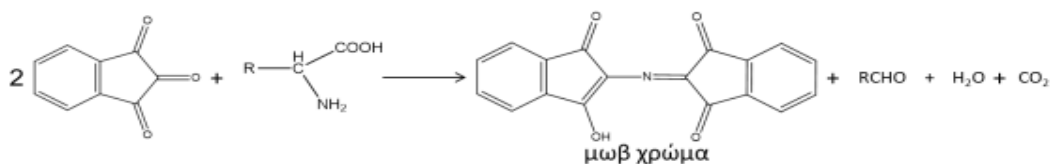
ξηράνση της βιομάζας στους 55-60 °C και μεταφορά στον αφυγραντήρα μέχρι σταθερού βάρους. Η συνολική ξηρή βιομάζα υπολογίστηκε από τη διαφορά μεταξύ των ξηραμένων φιαλιδίων που περιείχαν τη βιομάζα και των προζυγισμένων φιαλιδίων. Η υπολειπόμενη βιομάζα σε κάθε δείγμα προσδιορίστηκε έπειτα από αφαίρεση της συγκέντρωσης PHB που προέκυψε από την αέρια χρωματογραφία (GC) από την συνολική ξηρή βιομάζα. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε g/L καλλιέργειας.

### 2.9.2 Προσδιορισμός σακχάρων και άλλων μεταβολιτών

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των σακχάρων (γλυκόζη, αραβινόζη, ξυλόζη, μαννόζη, γαλακτόζη) και άλλων μεταβολιτών χρησιμοποιήθηκε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) με το σύστημα HPLC SHIMADZU UFLC XR συζευγμένο με ανιχνευτή RI (RID-10A, Shimadzu, Ιαπωνία). Η ταυτοποίηση των ενώσεων στηρίχθηκε στο χρόνο κατακράτησής τους, ο οποίος συγκρίθηκε με τον αντίστοιχο γνωστών πρότυπων ουσιών. Η προετοιμασία των δειγμάτων περιλάμβανε αρχικά φυγοκέντριση αυτών, εν συνεχεία κατάλληλη αραιώση με διάλυμα 10 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και εν συνεχεία φιλτράρισμά τους μέσω φίλτρων whatmann με διάμετρο σπών 0,2 μm (Whatman Polycap TC).

Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό των μιγμάτων ήταν τύπου Phenomenex Rezex ROA (300 mm×7,8mm). Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε υδατικό διάλυμα θειϊκού οξέος (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 mM) με ροή 0,6 mL/min στους 65 °C. Ο όγκος κάθε ένεσης ήταν 10 μL και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε g/L καλλιέργειας.

### 2.9.3 Προσδιορισμός συγκέντρωσης αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN)



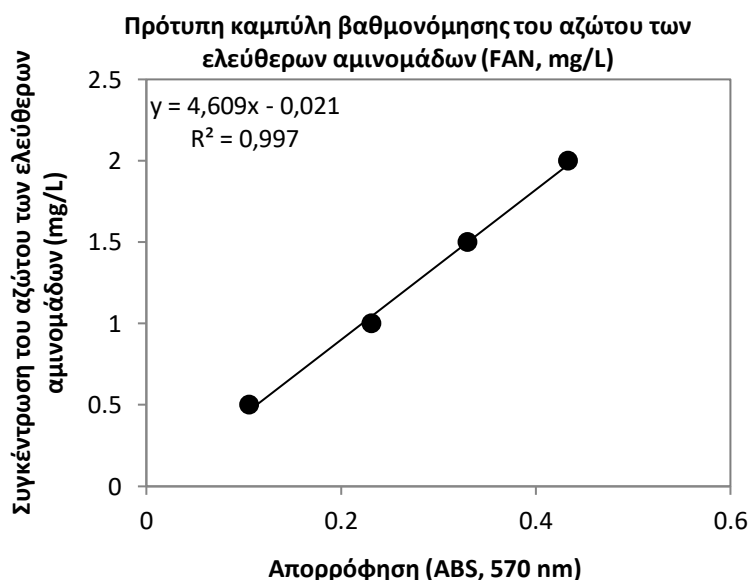
Για τον προσδιορισμό του άζωτου των ελεύθερων αμινομάδων χρησιμοποιήθηκε η φωτομετρική μέθοδος της νινυδρίνης, βάσει της οποίας τα α-αμινοξέα αποκαρβοξυλιώνονται οξειδωτικά από τη νινυδρίνη σε συνθήκες θέρμανσης και pH 6,7. Η μέθοδος προσδιορίζει ποσοτικά το άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων των αμινοξέων και των πεπτιδίων μέσω της αντίδρασης με νινυδρίνη (Καχριμανίδου, 2016). Η πορεία της αντίδρασης παρουσιάζεται με τα επόμενα στάδια. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα παρακάτω:

1. Αντιδραστήριο χρώσης (Color reagent): Παρασκευάστηκε με ανάμιξη 49,71 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  (Pan Reac Applichem ITW Reagents), 5 g νινυδρίνης (Sigma-Aldrich), 3 g φρουκτόζης (Pan Reac Applichem ITW Reagents) και περίπου 60 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (PENTA) έως ότου το pH του αντιδραστηρίου χρώσης να είναι μεταξύ 6,6.-6,8 σε ένα λίτρο απεσταγμένου νερού. Το αντιδραστήριο αποθηκεύτηκε στους 4 °C σε σκουρόχρωμο μπουκάλι ενώ πραγματοποιούταν συχνός έλεγχος του pH. Όταν κρινόταν σκόπιμο διορθωνόταν με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .
2. Αντιδραστήριο αραιώσης (Dilution reagent): Παρασκευάστηκε με διάλυση 2 g  $\text{KIO}_3$  (Sigma-Aldrich) σε 616 mL απιοντισμένου νερού και συνακόλουθη προσθήκη 384 mL καθαρής αιθανόλης (99% vol/vol Sigma-Aldrich) έτσι ώστε ο τελικός όγκος να είναι 1 λίτρο. Το διάλυμα αυτό αποθηκεύτηκε στους 4 °C.
3. Αποθεματικό διάλυμα γλυκίνης: Παρασκευάστηκε ύστερα από διάλυση 0,1072 g γλυκίνης σε 100 mL απεσταγμένου νερού. Το διάλυμα αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία 4 °C.
4. Πρότυπο διάλυμα γλυκίνης: Το συγκεκριμένο διάλυμα χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης και παρασκευάστηκε μετά από διάλυση 1 mL αποθεματικού διαλύματος γλυκίνης σε 100 mL απεσταγμένου νερού με αποτέλεσμα να προκύψει τελική συγκέντρωση FAN ίση με 2 mg/L.

Η πειραματική διαδικασία είχε ως εξής: Μετά από τη φυγοκέντριση των δειγμάτων, το υπερκείμενο διάλυμα συλλέχθηκε και αραιώθηκε κατάλληλα. Ένα mL από κάθε αραιωμένο δείγμα μεταφέρθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα και ακολούθησε

προσθήκη 0,5 mL αντιδραστηρίου χρώσης. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες πωματίστηκαν με αλουμινόχαρτο προκειμένου να αποφευχθεί εξάτμιση και τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 100 °C για ακριβώς 16 min. Τα δείγματα μετά το πέρας του βρασμού τοποθετήθηκαν σε παγόλουτρο για 20 min. Ακολούθησε προσθήκη 2,5 mL αντιδραστηρίου αραίωσης και ανάδευση (vortex) για 20 δευτερόλεπτα. Τέλος τα δείγματα οδηγήθηκαν στο φασματοφωτόμετρο (Hitachi U-2000) προκειμένου να μετρηθεί η απορρόφησή τους στα 570 nm. Σε περίπτωση που η λαμβανόμενη απορρόφηση του αγνώστου δείγματος ήταν μεγαλύτερη από την απορρόφηση της πρότυπης καμπύλης πραγματοποιήθηκε μεγαλύτερη αραίωση ώστε να ληφθεί μέτρηση εντός των ορίων απορρόφησης των πρότυπων διαλυμάτων. Για τον μηδενισμό του φασματοφωτόμετρου χρησιμοποιήθηκε και τυφλό δείγμα στο οποίο ακολουθήθηκε ακριβώς η ίδια διαδικασία, με τη μόνη διαφορά πως αντί για 1 mL δείγματος περιείχε 1 mL απιοντισμένο νερό.

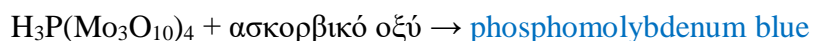
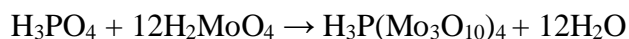
Η συγκέντρωση των δειγμάτων σε άζωτο υπολογίστηκε βάση πρότυπης καμπύλης αναφοράς, για την κατασκευή της οποίας ακολουθήθηκε η ανωτέρω διαδικασία για διαφορετικές συγκεντρώσεις πρότυπου διαλύματος γλυκίνης (0,5, 1, 1,5, 2 mg/L). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε mg/L. Τα πειράματα έγιναν εις διπλούν.



**Σχήμα 2.5** Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN).

### 2.9.4 Προσδιορισμός συγκέντρωσης ανόργανου φωσφόρου (IP)

Ο ανόργανος φωσφόρος προσδιορίστηκε με την φασματοφωτομετρική μέθοδο του μολυβδαινικού αμμωνίου. Τα φωσφορικά εύκολα αντιδρούν με μολυβδαινικά ιόντα σε ασθενές όξινο περιβάλλον, παρουσία κατάλληλου αναγωγικού παράγοντα, προς σχηματισμό ενός έγχρωμου μπλε συμπλόκου, η ένταση του οποίου είναι ευθέως ανάλογη με τη συγκέντρωση των φωσφορικών στο διάλυμα. Η αναγωγή του σχηματιζόμενου φωσφορομολυβδαινικού οξέος προκαλείται από το ασκορβικό οξύ, οπότε σχηματίζεται το μπλε του φωσφομολυβδαινίου (phosphomolybdenum blue (PMB)).



Για τον προσδιορισμό του ανόργανου φωσφόρου τα δείγματα αραιώθηκαν μέχρι 5 mL τελικό όγκο σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Σε κάθε σωλήνα προστέθηκαν 0,4 mL υπερχλωρικού οξέος (HClO<sub>4</sub>, 60%, v/v) (PENTA) και ακολούθησε ανάδευση για 10 sec. Ακολούθησε προσθήκη 0,3 mL ασκορβικού οξέος (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>, 1%, w/v) (Sigma-Aldrich) και έντονη ανάδευση για 10 sec. Τέλος 0,4 mL μολυβδαινικού αμμωνίου (PENTA) προστέθηκαν σε κάθε σωλήνα και ξαναέγινε έντονη ανάδευση για 10 sec. Οι σωλήνες αφέθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για δέκα min προκειμένου να αναπτυχθεί το μπλε χρώμα και ύστερα η απορρόφηση μετρούταν στα 730 nm σε φασματοφωτόμετρο (Hitachi U-2000). Για τον μηδενισμό του φασματοφωτόμετρου χρησιμοποιήθηκε και τυφλό δείγμα στο οποίο ακολουθήθηκε ακριβώς η ίδια διαδικασία, με τη μόνη διαφορά πως αντί για 5 mL δείγματος, ο δοκιμαστικός σωλήνας περιείχε 5 mL απιοντισμένο νερό. Η συγκέντρωση των δειγμάτων σε φωσφόρο υπολογίστηκε βάση πρότυπης καμπύλης αναφοράς. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε mg/L. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

### 2.9.5 Προσδιορισμός pH

Στις ζυμώσεις που θα παρουσιαστούν το pH προσδιορίστηκε με pH-μετρο τύπου Checker by Hanna Instruments. Η τιμή του καταγράφηκε για κάθε σημείο της κινητικής. Στα αρχικά πειράματα το pH ήταν μη ελεγχόμενο, ωστόσο στα υπόλοιπα η τιμή του ρυθμίστηκε μεταξύ των τιμών 6,6-7,0. Η διόρθωσή του έγινε είτε με προσθήκη NaOH 10 M είτε με προσθήκη HCl 5M.

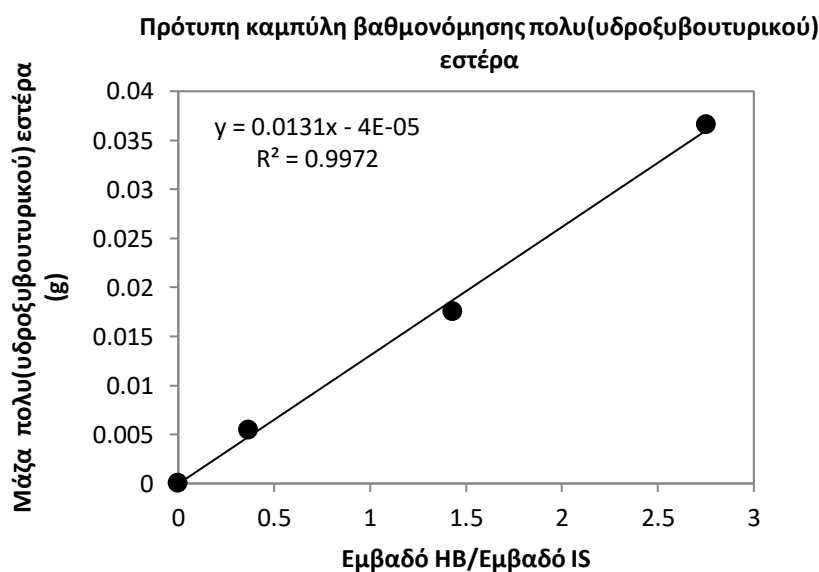
### 2.9.6 Προσδιορισμός υγρασίας

Ο υπολογισμός της υγρασίας του πιτύρου περιλάμβανε προσθήκη ενός γραμμαρίου αυτού σε προζυγισμένα αλουμινένια δισκάκια και τοποθέτησή τους σε φούρνο με αέρα στους  $105 \pm 3$  °C για τουλάχιστον 8 ώρες. Ακολούθησε μεταφορά σε αφυγραντήρα μέχρι να σταθεροποιηθεί η μάζα και ξανά ζύγιση. Η διαφορά μεταξύ της μάζας των αλουμινένιων δίσκων με το δείγμα, πριν και μετά την ξήρανση αποτέλεσε την υγρασία που απομακρύνθηκε από το δείγμα. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

### 2.9.7 Καθορισμός και ποσοτικοποίηση συγκέντρωσης ενδοκυτταρικού PHB

Η ποσοτικοποίηση του PHB στηρίχθηκε στη μέθοδο που περιγράφηκε από τους Riis & Mai (1988) που βασίζεται στην μετατροπή του 3-υδροξυβουτυρικού οξέος σε προπυλεστέρα. Το PHB υδρολύεται στο μονομερές 3-υδροξυβουτυρικό υπό όξινη συνθήκη το οποίο στη συνέχεια εστεροποιείται με προπανόλη (Sigma-Aldrich). Πιο συγκεκριμένα στα μπουκαλάκια McCartney, όπου βρισκόταν η ξηρή βιομάζα, προστέθηκαν διαδοχικά 2 mL 1,2-διγλωροαιθανίου (PENTA), 2 mL διαλύματος όξινης προπανόλης (1 όγκος πυκνού υδροχλωρικού οξέος + 4 mL προπανόλης) και 200  $\mu$ L διαλύματος βενζοϊκού οξέος (εσωτερικό πρότυπο) (Sigma-Aldrich). Για την παρασκευή του εσωτερικού προτύπου, 2 γραμμάρια βενζοϊκού

οξέος διαλύθηκαν σε 50 mL προπανόλης. Τα δείγματα εν συνεχεία τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο (Memmert WNB 14) για δύο ώρες στους 100 °C. Έπειτα αφέθηκαν να έλθουν σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την προσθήκη 4 mL απεσταγμένου νερού, τα δείγματα αναδεύτηκαν για 20-30 δευτερόλεπτα και ύστερα αφέθηκαν για να επιτευχθεί ο διαχωρισμός φάσεων. Στη συνέχεια 1  $\mu$ L εισήχθησε στον αέριο χρωματογράφο για ανάλυση. Ο αέριος χρωματογράφος (Fisons GC 8130) ήταν εφοδιασμένος με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (Flame Ionization Detector, FID) και μία στήλη Chrompack column (60 m  $\times$  0,25 mm, film thickness 0,25  $\mu$ m, J&W Scientific). Το ήλιο χρησιμοποιήθηκε ως φέρον αέριο με ροή 2 mL/min. Η αρχική θερμοκρασία του φούρνου ήταν 100 °C για ένα λεπτό. Στη συνέχεια με ένα ρυθμό 25 °C/min ανήλθε στους 160 °C, όπου και έμεινε σταθερή για ακόμα 1 min, και μετά με ένα ρυθμό 10 °C/min αυξήθηκε στους 188 °C. Αμέσως μετά με ένα θερμοκρασιακό ρυθμό 25 °C/min, η θερμοκρασία ανήλθε στους 250 °C όπου και παρέμεινε σε αυτή την τιμή για 5 min. Η ταυτοποίηση του PHB στηρίχθηκε στο χρόνο κατακράτησής του, ο οποίος συγκρίθηκε με τον αντίστοιχο χρόνο εμπορικού PHB (Sigma-Aldrich). Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζεται η πρότυπη καμπύλη αναφοράς.



**Σχήμα 2.6** Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης του πολυ(3-υδροξυβουτυρικού) εστέρα με εσωτερικό πρότυπο (βενζοϊκό οξύ).



## 2.10 Ανάκτηση ενδοκυτταρικού PHB

Η εξαγωγή του PHB από το εσωτερικό των βακτηριακών κυττάρων πραγματοποιήθηκε με μία ελαφρά τροποποιημένη μέθοδο από αυτή που περιγράφεται στη Καχριμανίδου (2016). Πιο συγκεκριμένα, μετά το πέρας της ζύμωσης, ακολούθησε φυγοκέντριση του υγρού της ζύμωσης στις 9.000 στροφές για δέκα λεπτά (Hettich Universal 320-R, Germany) για διαχωρισμό των κυττάρων. Ακολούθησε ξέπλυμα των κυττάρων μία φορά με απιοντισμένο νερό, μία φορά με ακετόνη και έπειτα λυοφιλίωσή τους. Για κάθε γραμμάριο ξηρής βακτηριακής μάζας προστέθηκαν 30 mL χλωροφορμίου (Sigma-Aldrich) και 30 mL διαλύματος υποχλωριώδους νατρίου (20%, v/v σε νερό) (Sigma-Aldrich). Στη συνέχεια το μίγμα αυτό τοποθετήθηκε σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο (ZHWHY-211C, Series Floor Model Incubator PR, China) για δύο ώρες σε ανάδευση 150 rpm και σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε φυγοκέντριση του μίγματος στις 9.000 στροφές για 10 min (Hettich Universal 320-R, Germany) και σχηματισμός τριών διακριτών φάσεων. Η ανώτερη φάση ήταν το διάλυμα του υποχλωριώδους νατρίου, ενώ η κατώτερη ήταν η φάση του χλωροφορμίου μέσα στο οποίο βρισκόταν διαλυμένο το PHA. Η ενδιάμεση φάση περιείχε υπολείμματα βιομάζας. Η ανώτερη φάση απομακρύνθηκε με μια πιπέτα και οι άλλες δύο φάσεις αφέθηκαν να διαχωριστούν σε μία διαχωριστική χοάνη. Η κατώτερη φάση εν συνεχεία συλλέχθηκε σε προζυγισμένα φιαλίδια McCartney. Ακολούθησε προσθήκη παγωμένης μεθανόλης (για καταβύθιση του PHB), φυγοκέντριση στις 9.000 στροφές για 10 λεπτά (Hettich Universal 320-R, Germany) και συλλογή της μεθανόλης μετά από απόχυσή της. Το στερεό υπόλειμμα (PHB) οδηγήθηκε στο φούρνο προκειμένου να εξατμιστεί η εναπομείνασα μεθανόλη.

Στα υπολείμματα βιομάζας ακολούθησε προσθήκη περίπου 10 mL χλωροφορμίου (για 1g ξηρής αρχικής βιομάζας) και φιλτράρισμα υπό κενό (Whatman N°1, VWR Scientific, Η.Π.Α) προκειμένου να ανακτηθεί το χλωροφόρμιο. Εν συνεχεία, το χλωροφόρμιο που συλλέχθηκε, μεταφέρθηκε σε προζυγισμένα φιαλίδια McCartney και η πορεία που ακολουθήθηκε ήταν η ίδια με αυτή που περιγράφεται στην πρώτη παράγραφο της ενότητας. Το ξέπλυμα των υπολειμμάτων της βιομάζας με χλωροφόρμιο έγινε με σκοπό τη μεγαλύτερη ανάκτηση του PHB.



**Σχήμα 2.7** Ανακτημένο PHB με τη μέθοδο του χλωροφορμίου-υποχλωριώδους νατρίου.

## 3 Αποτελέσματα

### 3.1 Ζυμώσεις στερεάς κατάστασης του μύκητα *Aspergillus awamori* για την παραγωγή ενζύμων

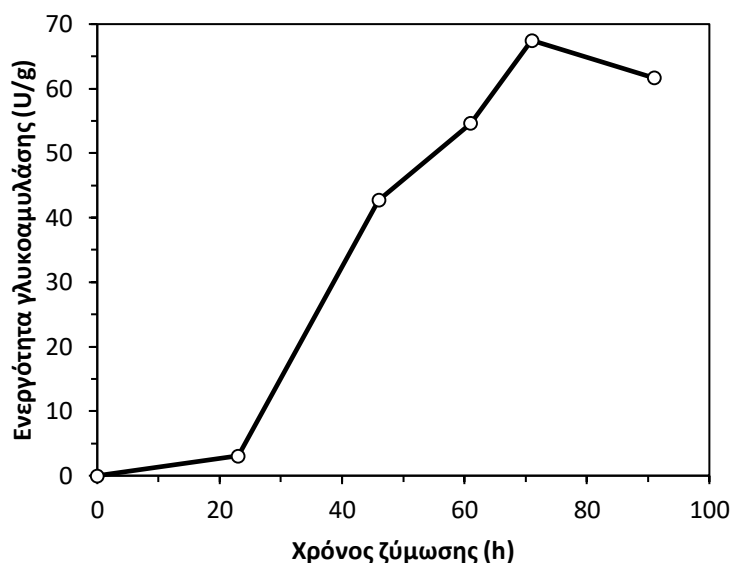
Η ζύμωση στερεάς κατάστασης πραγματοποιήθηκε με σκοπό την παραγωγή αμυλολυτικών (κυρίως) και (σε μικρότερο βαθμό) πρωτεολυτικών ενζύμων από τον μύκητα *A. awamori* σε υπόστρωμα πιτύρου σίτου. Σκοπός ήταν τα παραγόμενα ακατέργαστα ένζυμα, να υδρολύσουν το υποπροϊόν του πιτύρου σίτου και να παράξουν ένα θρεπτικό μέσο ζύμωσης πλούσιο σε γλυκόζη αλλά και άλλα θρεπτικά συστατικά που θα αποτελέσει υπόστρωμα για την ανάπτυξη του *B. sacchari* και την παραγωγή PHB.

#### 3.1.1 Κινητική ενεργότητας γλυκοαμυλάσης

Προκειμένου να γίνει η υδρόλυση, έπρεπε να καθοριστεί πρώτα σε πόσο χρόνο μετά την εκκίνηση της ζύμωσης στερεάς κατάστασης, η παραγόμενη γλυκοαμυλάση είχε την μέγιστη ενεργότητα. Για το σκοπό αυτό, μελετήθηκε η ενεργότητα του παραγόμενου ενζύμου σε διάφορες χρονικές στιγμές.

Ορισμός μονάδας ενζυμικής ενεργότητας (1Unit=U): Η ποσότητα ενζύμου που παράγει 1  $\mu\text{mol}$  προϊόντος ανά λεπτό ή μετατρέπει 1  $\mu\text{mol}$  υποστρώματος ανά λεπτό. Εν προκειμένω, ένα (U) ενζυμικής ενεργότητας γλυκοαμυλάσης είναι η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται προκειμένου να απελευθερωθεί 1mg γλυκόζης/min στις συγκεκριμένες συνθήκες. Η υγρασία του υποστρώματος ρυθμίστηκε στο 65% και η ζύμωση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 30 °C. Τα αποτελέσματα ενεργότητας εκφράστηκαν σε U/g υποστρώματος ζύμωσης στερεάς κατάστασης (πίτυρο σίτου).

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.1, η μέγιστη ενεργότητα της γλυκοαμυλάσης (67,5 U/g) επιτεύχθηκε στις 71 h ζύμωσης. Από τις 71 h και μετά, η ενεργότητα άρχισε σταδιακά να μειώνεται.



**Σχήμα 3.1** Ενεργότητα γλυκοαμυλάσης κατά τη διάρκεια ζύμωσης στερεάς κατάστασης του μύκητα *A. awamori* σε πίτυρο σίτου με υγρασία 65% και σε θερμοκρασία 30 °C.

### 3.2 Παραγωγή υδρολυμάτων πιτύρου σίτου

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα κινητικής ενεργότητας της γλυκοαμυλάσης, επαναλήφθηκαν πειράματα ζύμωσης στερεάς κατάστασης με σκοπό, τα ακατέργαστα ένζυμα να χρησιμοποιηθούν για την υδρόλυση πιτύρου σίτου και την παραγωγή υδρολύματος. Το υδρόλυμα έπειτα, ως πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά χρησιμοποιήθηκε σε ζύμωση ημισυνεχούς τροφοδοσίας για την παραγωγή PHB. Όπως φαίνεται και στο *Σχήμα 3.1*, η μέγιστη ενεργότητα γλυκοαμυλάσης επιτεύχθηκε στις 71 h ζύμωσης. Στη συνέχεια ακολούθησε η διαδικασία της υδρόλυσης, η οποία πραγματοποιήθηκε σε υδατόλουτρο στους 58-60 °C για 24 h και σε υπόστρωμα πιτύρου σίτου με συγκέντρωση 150 g/L.

Κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης δεν πραγματοποιήθηκε μελέτη κινητικής παραγωγής σακχάρων ή FAN. Η συγκέντρωσή τους προσδιορίστηκε μόνο στην αρχή της υδρόλυσης και στο τέλος της (24 h). Η συγκέντρωση των σακχάρων στην αρχή

της υδρόλυσης αφαιρέθηκαν από την τελική για να προκύψει η καθαρή παραγωγή, η οποία παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.1).

**Πίνακας 3.1** Καθαρή συγκέντρωση σακχάρων στο υδρολύμα πτύρου σίτου μετά το τέλος της υδρόλυσης, και διορθωμένη συγκέντρωσή τους μετά από κατάλληλη προσθήκη σακχάρων.

<b>Σάκχαρο</b>	<b>Καθαρή συγκέντρωση στο τέλος υδρόλυσης (g/L)</b>	<b>Διορθωμένη συγκέντρωση (g/L)</b>
Γλυκόζη	24,7	33,98
Ξυλόζη	7,2	7,82
Αραβινόζη	1,75	1,8
Μαννόζη	3,12	3,12
<b>Συνολικά</b>	<b>36,77</b>	<b>46,72</b>

Κατά την υδρόλυση ενός γραμμαρίου αμύλου, αποδίδονται περίπου 1,11 γραμμάρια γλυκόζης. Στην υδρόλυση χρησιμοποιήθηκε πτύρο σίτου (συγκέντρωσης 150 g/L) με περιεκτικότητας σε άμυλο 19,7%. Στην θεωρητική περίπτωση όπου επιτυγχάνεται 100% υδρόλυση, η γλυκόζη που θα αναμενόταν να παραχθεί θα ήταν:

- $150 \text{ g/L} \times 19,7\% \text{ άμυλο} = 29,55 \text{ g/L άμυλο} \times 1,11 \frac{\text{γλυκόζη}}{\text{άμυλο}} = 32,80 \text{ g/L γλυκόζης}$

Ωστόσο κάτι τέτοιο είναι πολύ δύσκολο. Στην περίπτωσή μας, όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα του παραπάνω πίνακα, η απόδοση σε γλυκόζη μέσω υδρόλυσης είναι 75,3 %.

Ωστόσο η συγκεντρώσεις των σακχάρων μετά το τέλος της υδρόλυση δεν ήταν αυτές στις οποίες πραγματοποιήθηκε η ζύμωση προς παραγωγή PHB (Υποενότητα 3.4.2). Καθαρή ποσότητα σακχάρων προστέθηκε έως συνολικής συγκέντρωσης σακχάρων 46,72 g/L σύμφωνα με τον Πίνακα 3.1. Τέλος όσον αφορά το καθαρό παραχθέν FAN, αυτό ήταν περίπου 170 mg/L. Η τιμή αυτή ήταν πολύ μικρή και για αυτό προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα yeast extract μέχρι το FAN να φτάσει έως τα 680 mg/L.

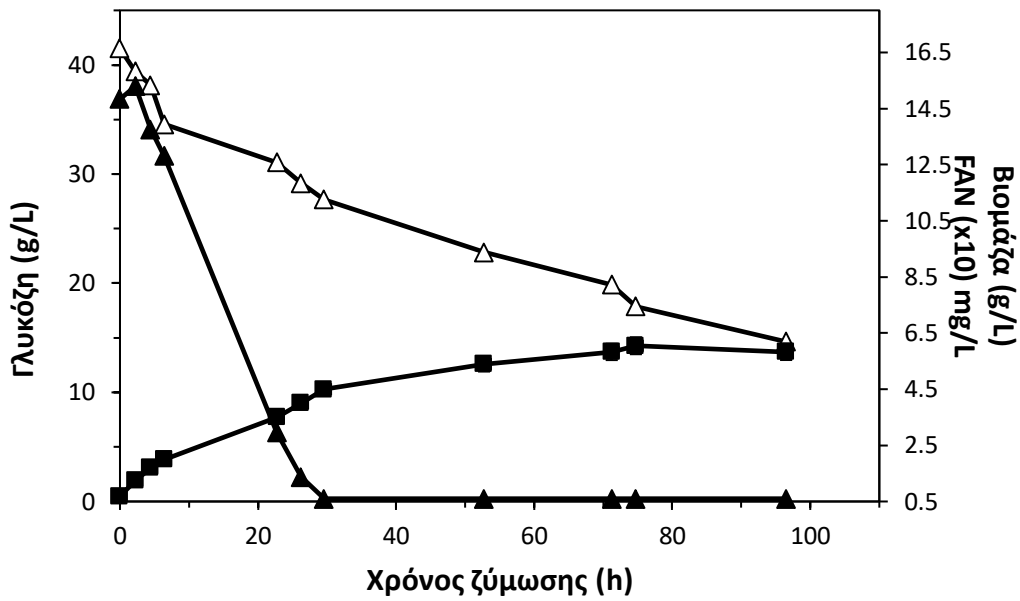
### 3.3 Καλλιέργειες υγρής κατάστασης διαλείποντος έργου για την παραγωγή PHB

#### 3.3.1 Επίδραση πηγής εκχυλίσματος ζύμης

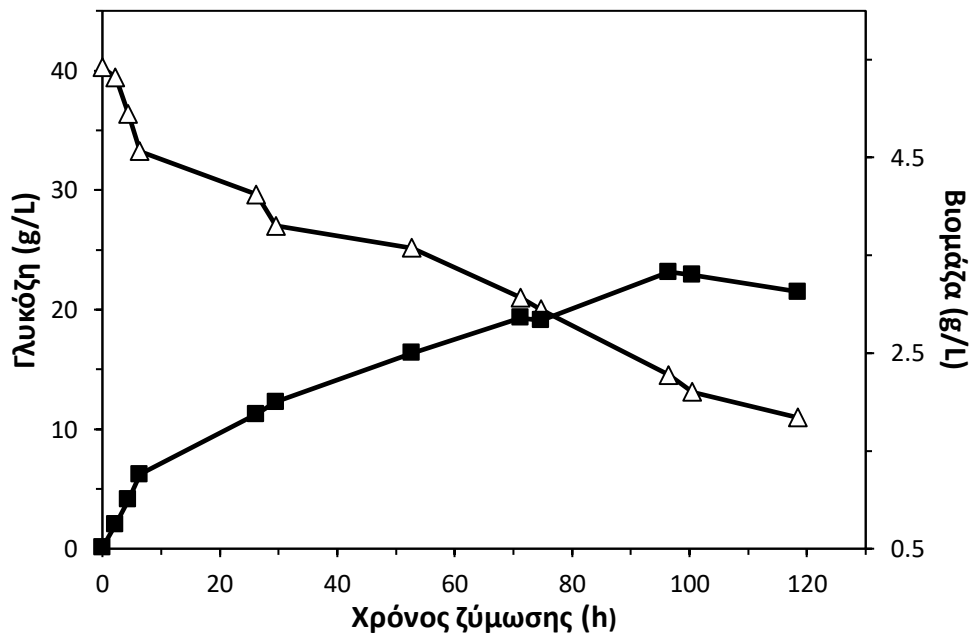
Η πηγή αζώτου αποτελεί εξαιρετικά σημαντικό παράγοντα τόσο για την μικροβιακή αύξηση όσο και για την παραγωγή και ενδοκυτταρική συσσώρευση του PHB. Όπως έχει ήδη αναφερθεί η συσσώρευση του PHB συμβαίνει σε ένα δεύτερο στάδιο, έπειτα από την ανάπτυξη του μικροοργανισμού *B.sacchari* και την εξάντληση του αζώτου.

Στην παρούσα ενότητα διεξήχθησαν πειράματα διαλείποντος έργου σε κωνικές φιάλες (Υποενότητα 2.6.1) των 250 mL ενεργού όγκου 100 mL, με και χωρίς πηγή εκχυλίσματος ζύμης, προκειμένου να καταδειχθεί η σημασία της εν λόγω πηγής αζώτου τόσο στην μικροβιακή αύξηση όσο και στην παραγωγή του PHB. Η ποσότητα του PHB καθορίστηκε μόνο για το τελικό σημείο της ζύμωσης. Στην περίπτωση προσθήκης yeast extract η συγκέντρωσή του στην αρχή της ζύμωσης ήταν 1 g/L. Στα συγκεκριμένα πειράματα δεν πραγματοποιήθηκε ρύθμιση του pH κατά τη διάρκεια των ζυμώσεων και η αρχική συγκέντρωση σακχάρων ήταν περίπου 40 g/L.

Όπως φαίνεται στα παρακάτω σχήματα (Σχήματα 3.2-3.3), δεν παρατηρείται μεγάλος χρόνος λανθάνουσας φάσης του μικροοργανισμού. Προσθήκη yeast extract είχε ως αποτέλεσμα μεγαλύτερες τιμές βιομάζας (TDW=6,05 g/L), μεγαλύτερο ρυθμό κατανάλωσης σακχάρων και παραγωγή PHB=2,42 g/L (Tf=74,74 h). Αντίθετα στην περίπτωση που δεν υπήρξε προσθήκη yeast extract η τιμή της βιομάζας ήταν μικρότερη (TDW=3,33 g/L), η εκθετική φάση επετεύχθη σε μεγαλύτερο χρόνο ενώ δεν παρατηρήθηκε καθόλου παραγωγή PHB. Για τους παραπάνω λόγους όλες οι ζυμώσεις που ακολούθησαν περιείχαν 1 g/L yeast extract.



**Σχήμα 3.2** Κατανάλωση γλυκόζης (Δ), παραγωγή βιομάζας (■) και κατανάλωση FAN (▲) κατά τη διάρκεια ζύμωσης του μικροοργανισμού *B.sacchari* σε κωνικές φιάλες, σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 1 g/L yeast extract.



**Σχήμα 3.3** Κατανάλωση γλυκόζης (Δ) και παραγωγή βιομάζας (■) κατά τη διάρκεια ζύμωσης του μικροοργανισμού *B.sacchari* σε κωνικές φιάλες.

### 3.3.2 Καλλιέργειες διαλείποντος έργου σε κωνικές φιάλες με διαφορετικά σάκχαρα ως πηγή άνθρακα

Ένας παράγοντας που έχει μεγάλη επίδραση στο μεταβολισμό των κυττάρων της καλλιέργειας και επομένως στην ικανότητά τους να συσσωρεύουν PHAs, είναι η συγκέντρωση του διαλυτού οξυγόνου. Το οξυγόνο έχει μικρή διαλυτότητα στα υδατικά συστήματα των ζυμώσεων, γεγονός το οποίο καθιστά πολλές φορές το διαλυτό οξυγόνο περιοριστικό της ανάπτυξης παράγοντα. Στις ζυμώσεις που λαμβάνουν χώρα σε κωνικές φιάλες, το παραπάνω πρόβλημα γίνεται ακόμα πιο έντονο καθώς δεν υπάρχει παροχή αέρα-οξυγόνου μέσα από την καλλιέργεια. Σημαντικό ρόλο παίζει επίσης και ο ρυθμός μεταφοράς από το εξωτερικό περιβάλλον μέσα στο εσωτερικό των κωνικών φιαλών. Πιο συγκεκριμένα ο ρυθμός μεταφοράς οξυγόνου εξαρτάται από τη διαθέσιμη επιφάνεια μεταφοράς μέσα στη φιάλη και συνεπώς από το λόγο της ελεύθερης επιφάνειας μεταφοράς προς τον όγκο της καλλιέργειας.

Για τους παραπάνω λόγους πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε κωνικές φιάλες με πηγή άνθρακα διάφορα εμπορικά σάκχαρα. Πρώτα έγιναν πειράματα σε κωνικές φιάλες των 250 mL με ενεργό όγκο 100 mL και στη συνέχεια σε φιάλες των 500 mL με ενεργό όγκο 100 mL. Ακόμα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε κωνικές φιάλες των 2 L με ενεργό όγκο 800 mL (ενεργός όγκος/όγκος ζύμωσης=800/2000=100/250), προκειμένου να μην επηρεάζεται ο ενεργός όγκος και συνεπώς η επιφάνεια επαφής με οξυγόνο, εξαιτίας της δειγματοληψίας.

#### ***ι. Πειράματα σε κωνικές φιάλες των 250 mL με πηγή άνθρακα διαφορετικά εμπορικά σάκχαρα:***

Στα παρακάτω διαγράμματα (Σχήματα 3.4-3.7), παρουσιάζονται οι κινητικές παραγωγής βιομάζας, κατανάλωσης σακχάρων, παραγωγής και ενδοκυτταρικής συσσώρευσης PHB για ζυμώσεις που έλαβαν χώρα σε υπόστρωμα διαφορετικών εμπορικών σακχάρων. Πιο συγκεκριμένα ζυμώσεις διαλείποντος έργου έλαβαν χώρα σε κωνικές φιάλες των 250 mL και ενεργό όγκο 100 mL με το θρεπτικό μέσο που περιγράφεται στην Υποενότητα 2.3 και σε διαφορετικό υπόστρωμα κάθε φορά (γαλακτόζη, ξυλόζη, αραβινόζη, μαννόζη). Τα συγκεκριμένα σάκχαρα είναι αυτά που

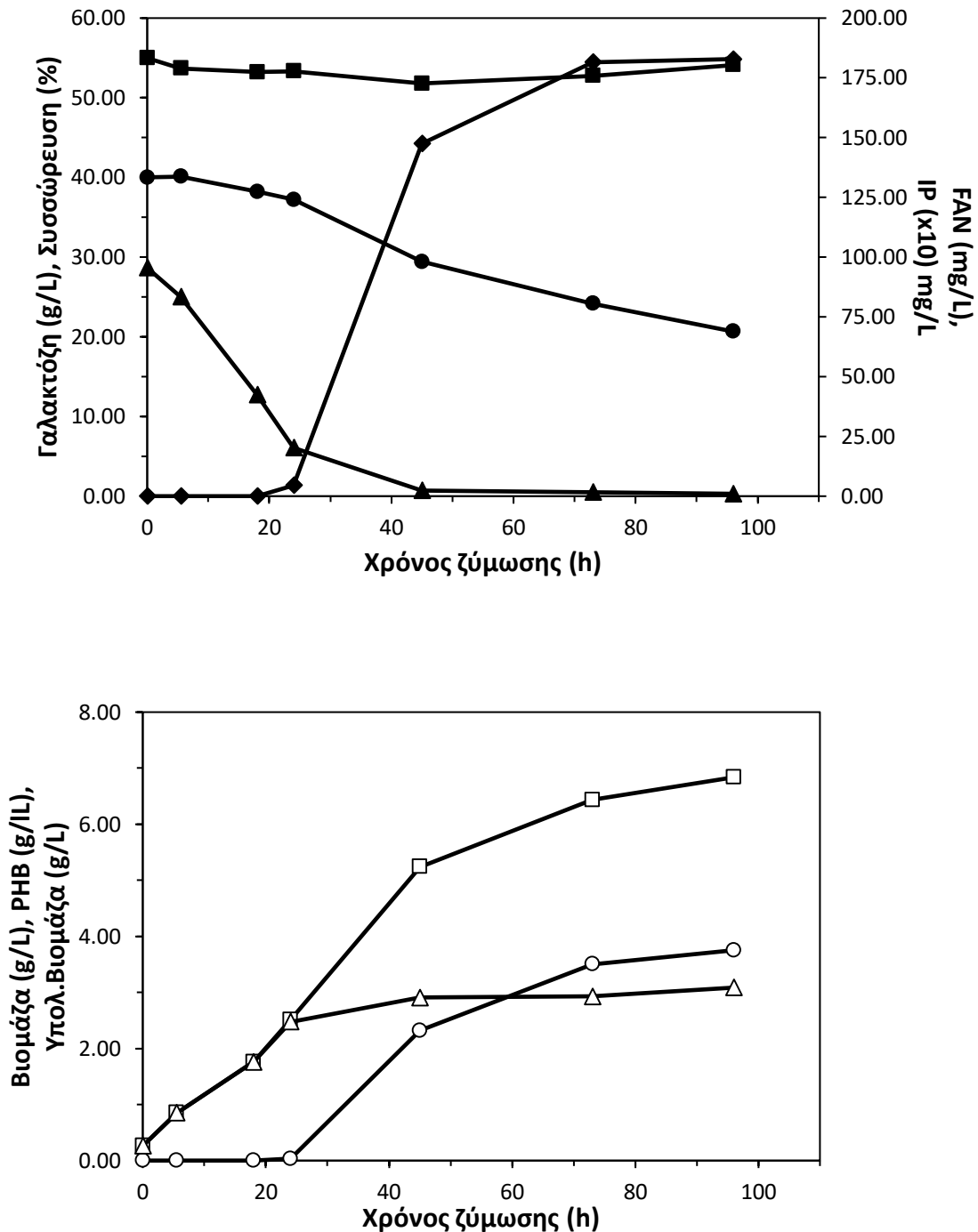


απαντούν στο υδρόλυμα πιτύρου σίτου. Σκοπός ήταν αρχικά να εξεταστεί τόσο η ανάπτυξη του *B.sacchari* όσο και η παραγωγή του PHB χρησιμοποιώντας τα διαφορετικά αυτά εμπορικά σάκχαρα με αρχική συγκέντρωση περίπου 40 g/L.

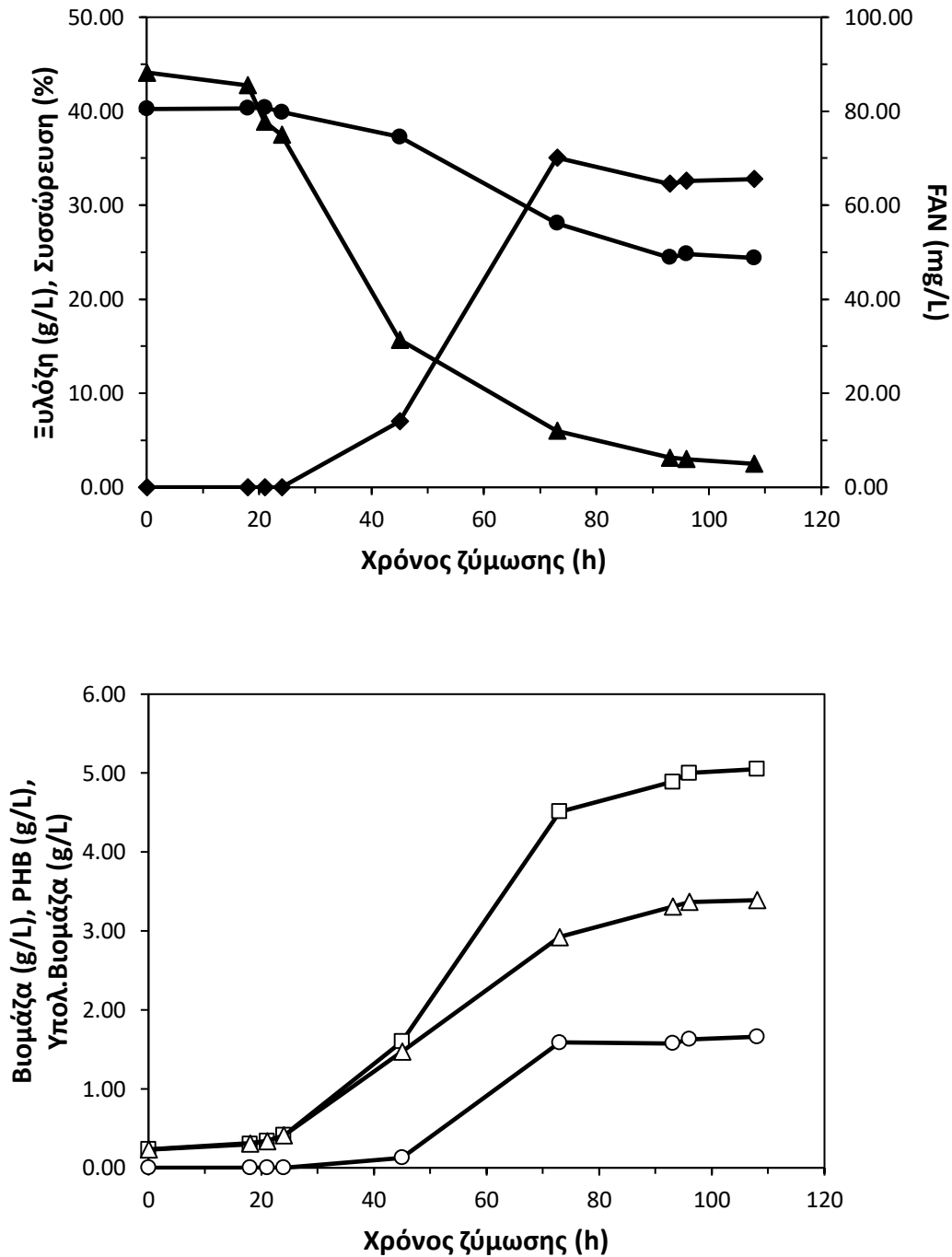
Στην περίπτωση της ξυλόζης (Σχήμα 3.5), ο μικροοργανισμός φαίνεται να έχει μεγάλο χρόνο λανθάνουσας φάσης αφού η κατανάλωσή του σακχάρου ξεκινά στις 40 h έπειτα από τον εμβολιασμό. Μάλιστα η κατανάλωσή της ξυλόζης σταματά περίπου 50 ώρες μετά, με τα ακατανάλωτα σάκχαρα να έχουν συγκέντρωση περίπου ίση με 25 g/L. Αξίζει να σημειωθεί η μεγάλη πτώση pH μετά την έναρξη της ζύμωσης και η δημιουργία ενός παραπροϊόντος στην περίπτωση της ξυλόζης.

Σε αντίθεση με τη ξυλόζη, κάτι τέτοιο δεν συμβαίνει στην περίπτωση της γαλακτόζης (Σχήμα 3.4). Στην εν λόγω εξόζη, η φάση υστέρησης του μικροοργανισμού είναι μικρή και οι μέγιστες τιμές της βιομάζας και του PHB επιτυγχάνονται στις 96 h. Στη δε ζύμωση της μαννόζης (Σχήμα 3.7), ο ρυθμός κατανάλωσής της, βαίνει μειούμενος και η ζύμωση σταματά στις 92 h. Στην αραβινόζη, τη μαννόζη και την ξυλόζη η παραγωγή βιομάζας σταμάτησε με τον τερματισμό κατανάλωσης σακχάρων. Ωστόσο στην περίπτωση της αραβινόζης (Σχήμα 3.6) η κατανάλωση σακχάρων συνεχίστηκε και μετά τις 113 h (δεν φαίνεται), χωρίς περαιτέρω παραγωγή βιομάζας. Πιθανώς η κατανάλωση αυτή να σχετίστηκε με διάφορους ενεργειακούς σκοπούς των κυττάρων.

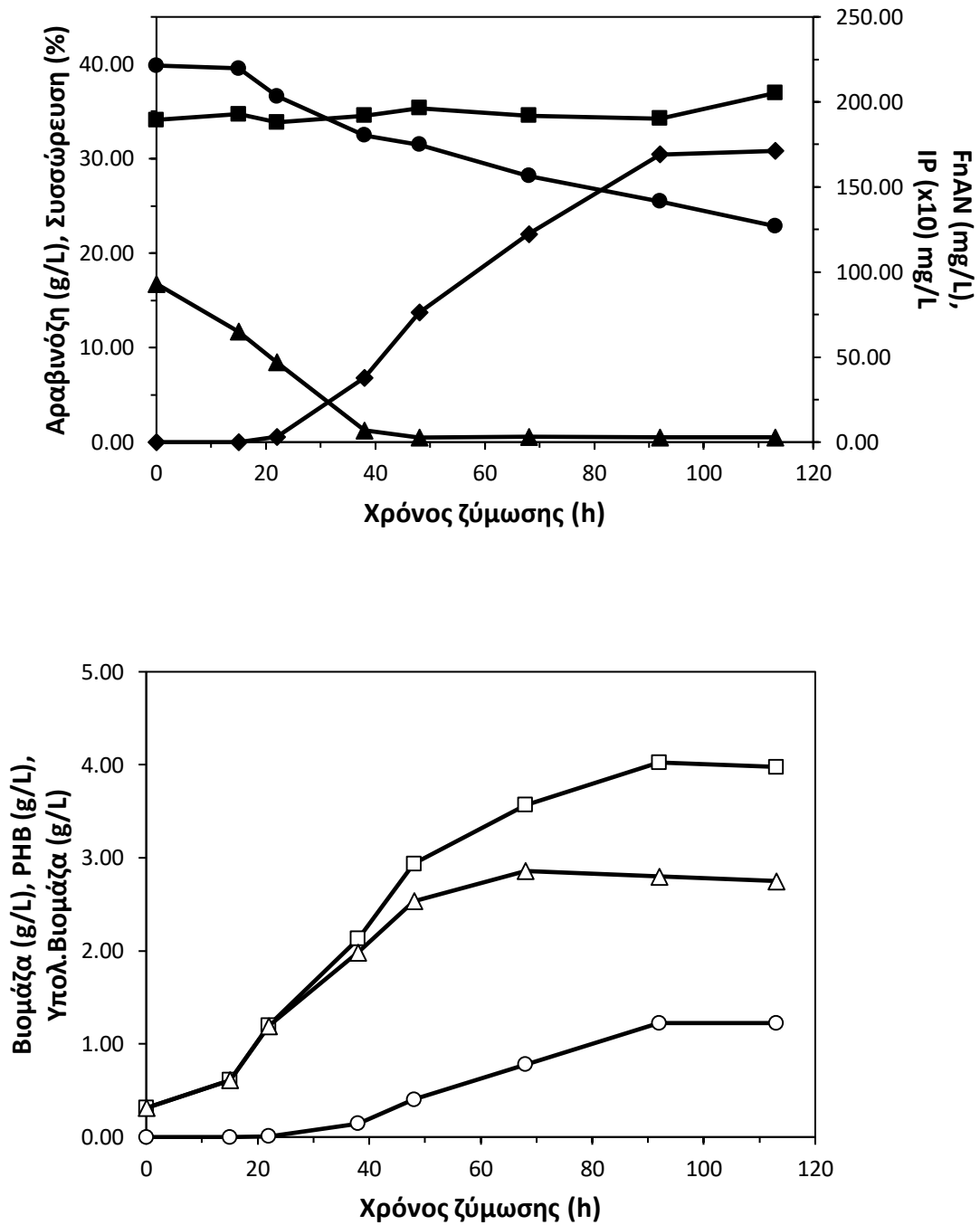
Όπως φαίνεται στα παρακάτω διαγράμματα ο ανόργανος φωσφόρος (IP) δεν καταναλώθηκε σε καμία περίπτωση κατά τη διάρκεια των ζυμώσεων. Στην περίπτωση της γαλακτόζης και της αραβινόζης, φαίνεται πως η κατανάλωση του FAN εγείρε την παραγωγή και συσσώρευση του PHB. Πιο συγκεκριμένα στις 24 h ζύμωσης της γαλακτόζης (Σχήμα 3.4), όπου το FAN είχε καταναλωθεί σε ποσοστό περίπου 80%, ξεκίνησε η παραγωγή του PHB. Στην περίπτωση της ξυλόζης (Σχήμα 3.5), η παραγωγή του PHB ξεκίνησε πριν την κατανάλωση του FAN, πράγμα που σημαίνει ότι ο αερισμός δεν ήταν επαρκής και πως πιθανώς η έλλειψη οξυγόνου να πυροδότησε την παραγωγή του PHB. Το ίδιο ισχύει και στην περίπτωση της μαννόζης (Σχήμα 3.7).



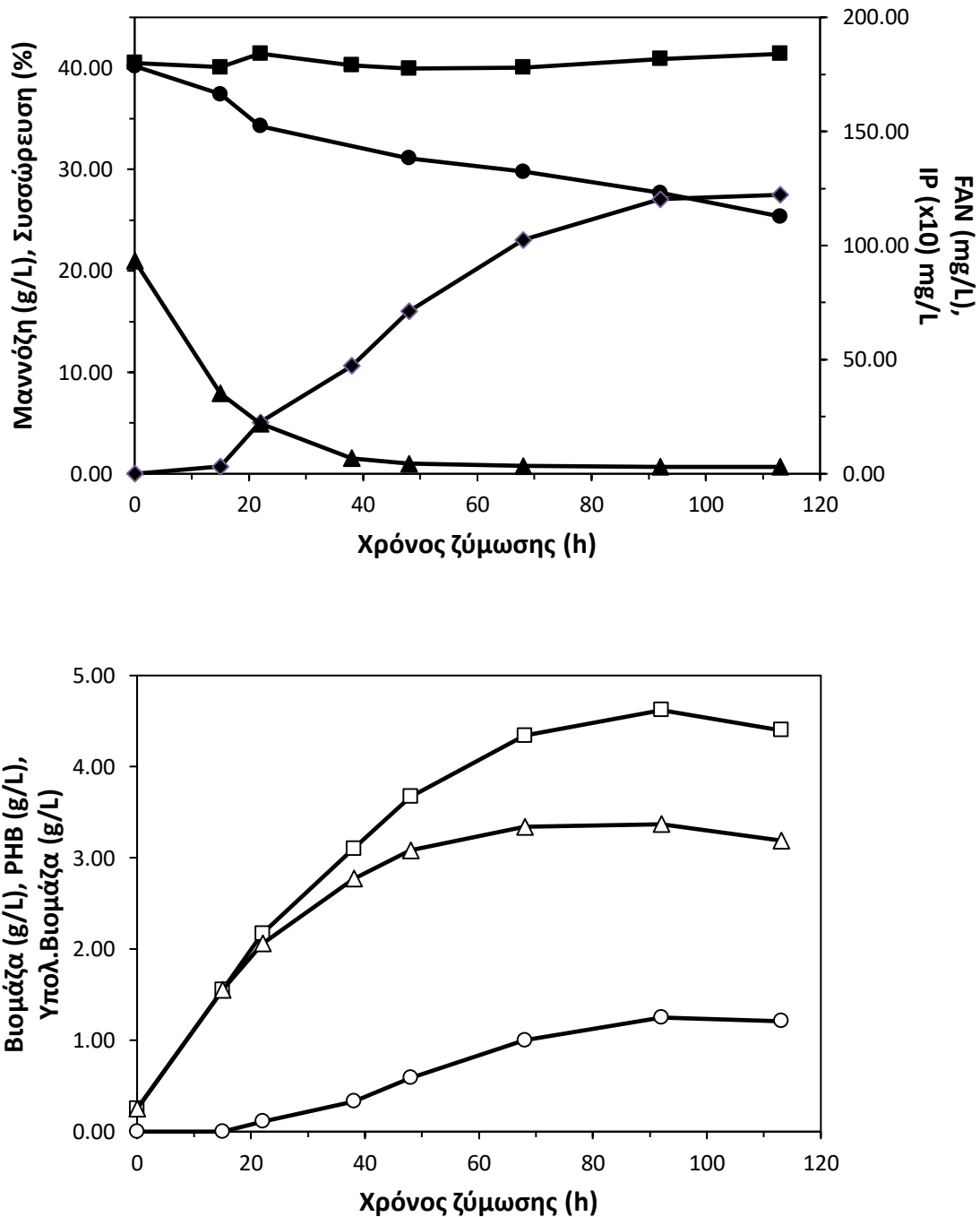
**Σχήμα 3.4** Κινητική της συγκέντρωσης σακχάρων (●), της ενδοκυτταρικής συσσώρευσης (◆), του FAN (▲) και του IP (■), της βιομάζας (□), του PHB (○) και της υπολειπόμενης βιομάζας (Δ) κατά τη διάρκεια ζύμωσης διαλείποντος έργου (κωνικές φιάλες 250 mL) από τον μικροοργανισμό *B.sacchari* σε υπόστρωμα γαλακτόζης.



**Σχήμα 3.5** Κινητική της συγκέντρωσης σακχάρων (●), της ενδοκυτταρικής συσσώρευσης (◆), του FAN (▲), της βιομάζας (□), του PHB (○) και της υπολειπόμενης βιομάζας (Δ) κατά τη διάρκεια ζύμωσης διαλείποντος έργου (κωνικές φιάλες 250 mL) από τον μικροοργανισμό *B.sacchari* σε υπόστρωμα ξυλόζης.



**Σχήμα 3.6** Κινητική της συγκέντρωσης σακχάρων (●), της ενδοκυτταρικής συσσώρευσης (◆), του FAN (▲) και του IP (■), της βιομάζας (□), του PHB (○) και της υπολειπόμενης βιομάζας (Δ) κατά τη διάρκεια ζύμωσης διαλείποντος έργου (κωνικές φιάλες 250 mL) από τον μικροοργανισμό *B.sacchari* σε υπόστρωμα αραβινόζης.



**Σχήμα 3.7** Κινητική της συγκέντρωσης σακχάρων (●), της ενδοκυτταρικής συσσώρευσης (◆), του FAN (▲) και του IP (■), της βιομάζας (□), του PHB (○) και της υπολειπόμενης βιομάζας (Δ) κατά τη διάρκεια ζύμωσης διαλείποντος έργου (κωνικές φιάλες 250 mL) από τον μικροοργανισμό *B.sacchari* σε υπόστρωμα μαννόζης.

Στον Πίνακα 3.2 παρουσιάζονται συνοπτικά κάποιοι παράμετροι και συντελεστές των τελικών σημείων των ζυμώσεων του μικροοργανισμού *B.sacchari* στα διάφορα εμπορικά σάκχαρα, στα οποία προσδιορίστηκαν η απόδοση του τελικού προϊόντος και της βιομάζας, η μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας και PHB.

**Πίνακας 3.2** Συνοπτικός πίνακας αποτελεσμάτων της καλλιέργειας διαλείποντος έργου του μικροοργανισμού *B.sacchari* στα διαφορετικά εμπορικά σάκχαρα, στο τελικό σημείο των ζυμώσεων και υπολογισμός συντελεστών.

Υπόστρωμα	Χρόνος (h)	[TDW] (g/L)	[PHB] (g/L)	Συσσωρευση (%)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	$P_{max}$ (g/(L×h))
Γαλακτόζη	96	6,84	3,75	54,85	0,17	0,094	0,048
Ξυλόζη	96	5,00	1,63	32,60	0,12	0,041	0,022
Αραβινόζη	92	4,03	1,22	30,42	0,10	0,031	0,013
Μαννόζη	92	4,62	1,25	27,10	0,12	0,031	0,014

[TDW]: Συγκέντρωση συνολικής παραχθείσας βιομάζας (g/L)

$Y_{X/S}$ : Συντελεστής απόδοσης παραχθείσας βιομάζας ανά μονάδα καταναλωθέντος υποστρώματος (g/g)

$Y_{P/S}$ : Συντελεστής απόδοσης παραχθέντος PHB ανά μονάδα καταναλωθέντος υποστρώματος (g/g)

$P_{max}$ : Μέγιστη παραγωγικότητα προϊόντος (g/(L×h))

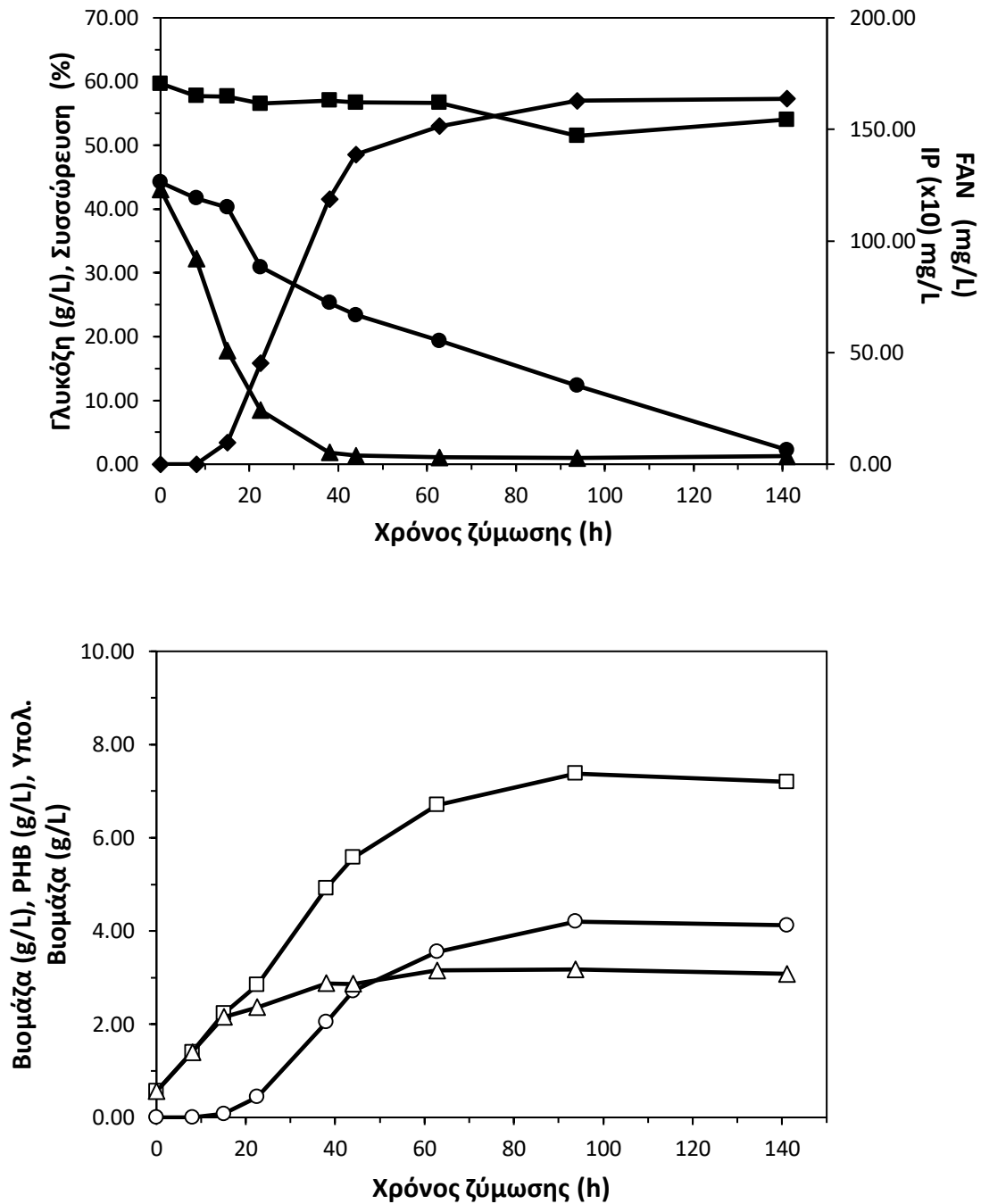
Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 3.2, η μεγαλύτερη απόδοση προϊόντος και βιομάζας αλλά και παραγωγικότητας προϊόντος, επετεύχθησαν στην περίπτωση της γαλακτόζης.

## ii. Πειράματα σε κωνικές φιάλες των 2 L με πηγή άνθρακα εμπορική γλυκόζη:

Στο Σχήμα 3.8, παρουσιάζονται οι κινητικές κατανάλωσης σακχάρων, ανάπτυξης βιομάζας, παραγωγής και ενδοκυτταρικής συσσωρευσης PHB, καθώς και οι κινητικές κατανάλωσης FAN και IP κατά τη ζύμωση διαλείποντος έργου του μικροοργανισμού *B.sacchari* σε συνθετικό υπόστρωμα γλυκόζης. Το pH της ζύμωσης δεν διορθώθηκε κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και είχε τιμή 5,7-6,0. Κατά τη πορεία της ζύμωσης δεν παρατηρήθηκε παραγωγή παραπροϊόντων.

Η διάρκεια της ζύμωσης ήταν 93,75 h. Ωστόσο, από τις 62,75 h έως τις 93,75 h, η συγκέντρωση του PHB μεταβάλλεται ελάχιστα και για αυτό, η παραγωγικότητα μπορεί να υπολογιστεί για τις 62,75 h.

Στις 22,5 h, όποτε έχει καταναλωθεί το 82% του FAN ξεκινά η παραγωγή PHB. Σε ότι αφορά τον ανόργανο φωσφόρο, η διακύμανσή του είναι πολύ μικρή κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, αποδεικνύοντας πως η κατανάλωσή του δεν σχετίζεται με την παραγωγή και την ενδοκυτταρική συσσώρευση του PHB.



**Σχήμα 3.8** Κινητική της συγκέντρωσης σακχάρων (●), της ενδοκυτταρικής συσσώρευσης (◆), του FAN (▲) και του IP (■), της βιομάζας (□), του PHB (○) και της υπολειπόμενης βιομάζας (Δ) κατά τη διάρκεια ζύμωσης διαλείποντος έργου (κωνικές φιάλες 2 L) από τον μικροοργανισμό *B.sacchari* σε υπόστρωμα γλυκόζης.



Στον Πίνακα 3.3 παρουσιάζονται συνοπτικά κάποιο παράμετροι και συντελεστές του τελικού σημείου της ζύμωσης, στο οποίο προσδιορίστηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν η μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας και PHB, η απόδοση του τελικού προϊόντος και της βιομάζας.

**Πίνακας 3.3** Συνοπτικός πίνακας αποτελεσμάτων της καλλιέργειας διαλείποντος έργου του μικροοργανισμού *B.sacchari*, στο τελικό σημείο της ζύμωσης.

Χρόνος (h)	[TDW] (g/L)	PHB (g/L)	Συσσωρευση (%)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	$P_{max}$ (g/L×h)
93,75	7,37	4,2	57	0,17	0,10	0,057

[TDW]: Συγκέντρωση συνολικής παραχθείσας βιομάζας (g/L)

$Y_{X/S}$ : Συντελεστής απόδοσης παραχθείσας βιομάζας ανά μονάδα καταναλωθέντος υποστρώματος (g/g)

$Y_{P/S}$ : Συντελεστής απόδοσης παραχθέντος PHB ανά μονάδα καταναλωθέντος υποστρώματος (g/g)

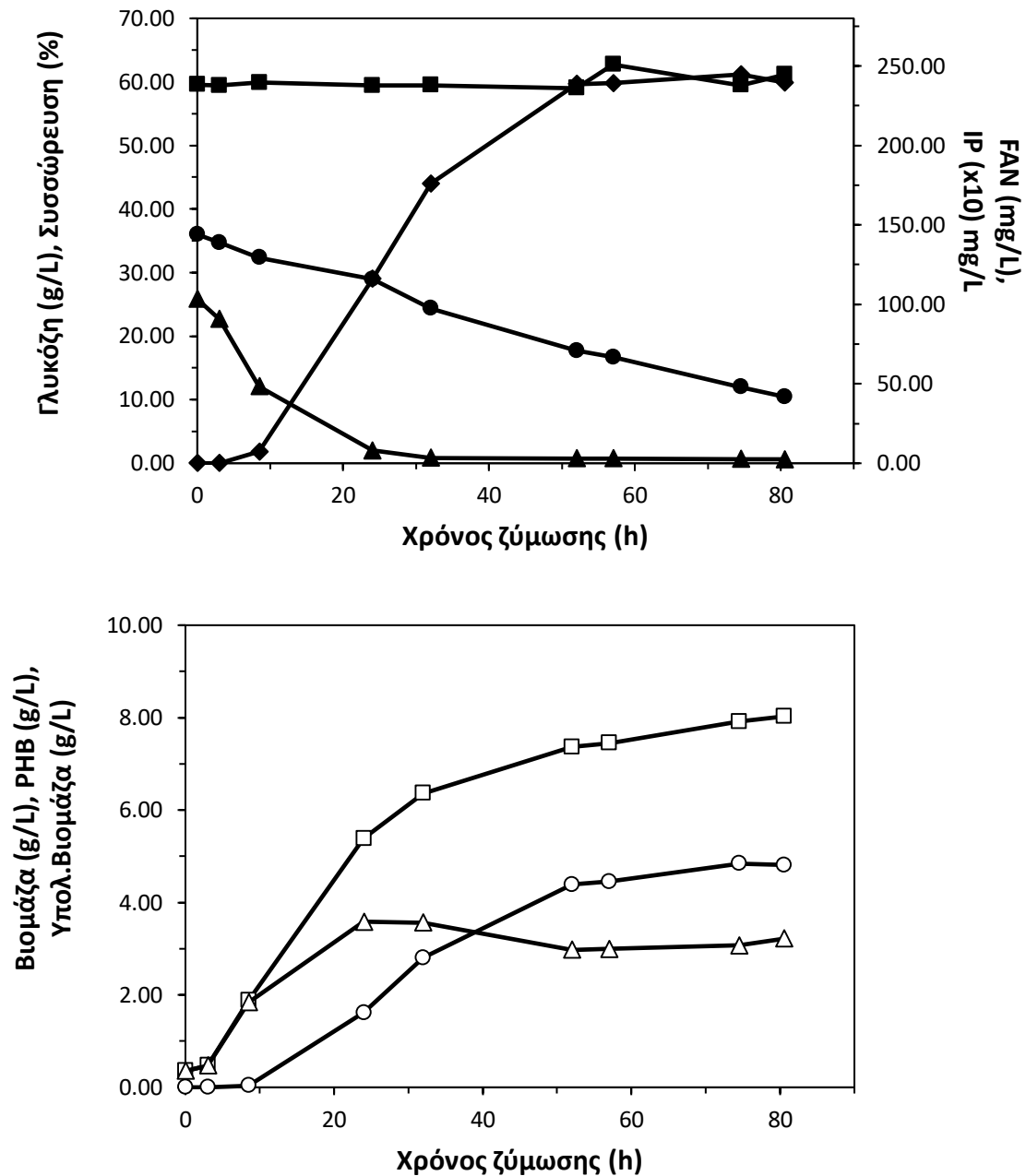
$P_{max}$ : Μέγιστη παραγωγικότητα προϊόντος (g/(L×h))

Όπως φαίνεται από τον παραπάνω πίνακα, τόσο η συγκέντρωση βιομάζας όσο και PHB, εμφανίζουν μεγαλύτερες τιμές σε σχέση με τη ζύμωση που πραγματοποιήθηκε σε φιάλες των 250 mL και ενεργό όγκο 100 mL (*Υποενότητα 3.3.1*).

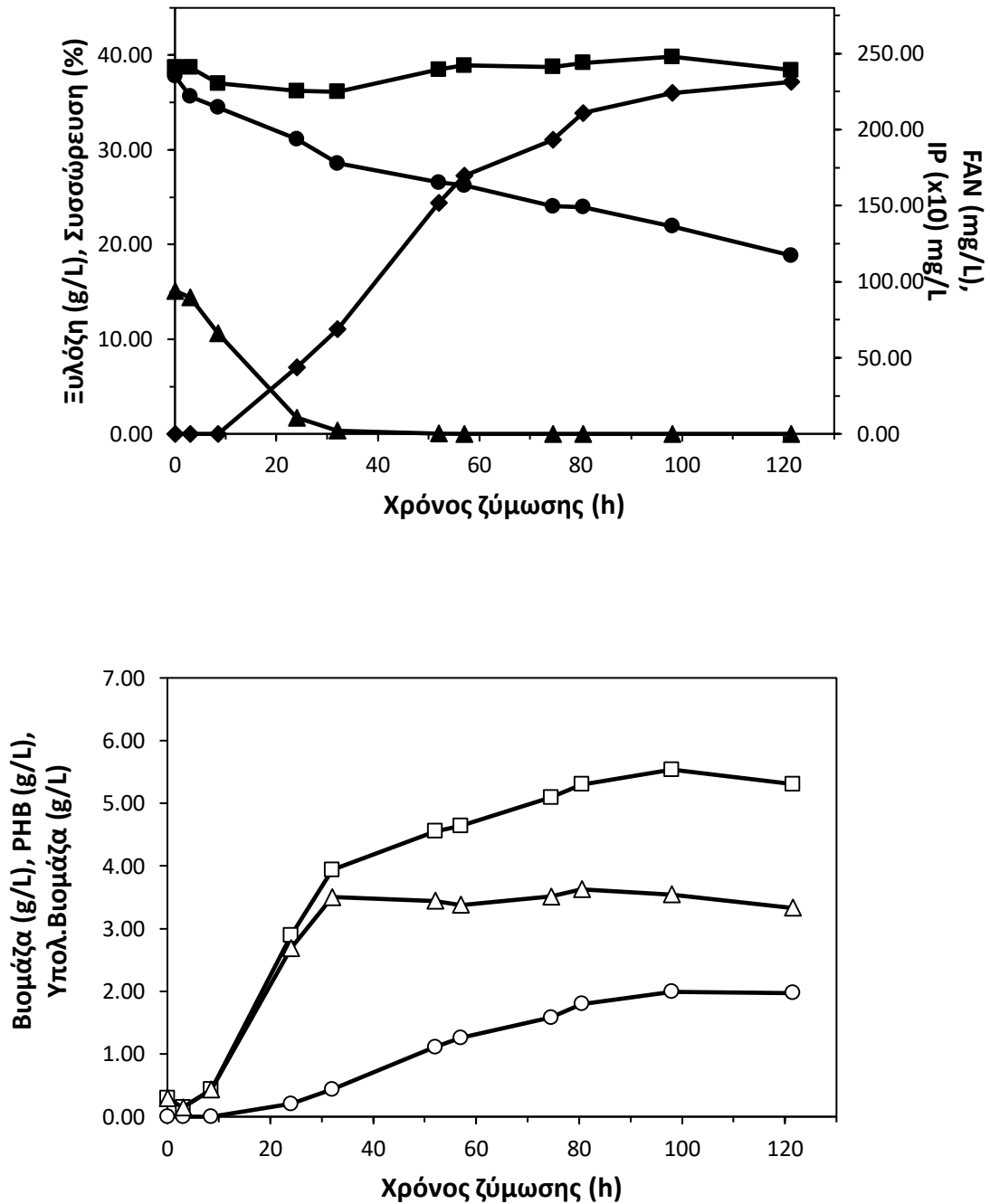
### ***iii. Πειράματα σε κωνικές φιάλες των 500 mL με πηγή άνθρακα διαφορετικά εμπορικά σάκχαρα:***

Στα παρακάτω διαγράμματα (*Σχήματα 3.9-3.11*), παρουσιάζονται οι κινητικές παραγωγής βιομάζας, κατανάλωσης σακχάρων, παραγωγής και ενδοκυτταρικής συσσωρευσης PHB για ζυμώσεις που έλαβαν χώρα σε υπόστρωμα διαφορετικών εμπορικών σακχάρων. Πιο συγκεκριμένα οι ζυμώσεις έλαβαν χώρα σε κωνικές φιάλες των 500 mL και ενεργό όγκο 100 mL με το θρεπτικό μέσο που περιγράφεται στην *Υποενότητα 2.3* και σε διαφορετικό υπόστρωμα κάθε φορά (γλυκόζη, ξυλόζη, αραβινόζη) με αρχική συγκέντρωση σακχάρων περίπου 40 g/L. Η τιμή του pH καθ' ολη τη διάρκεια των ζυμώσεων παρέμενε μεταξύ 6,6-7,0.

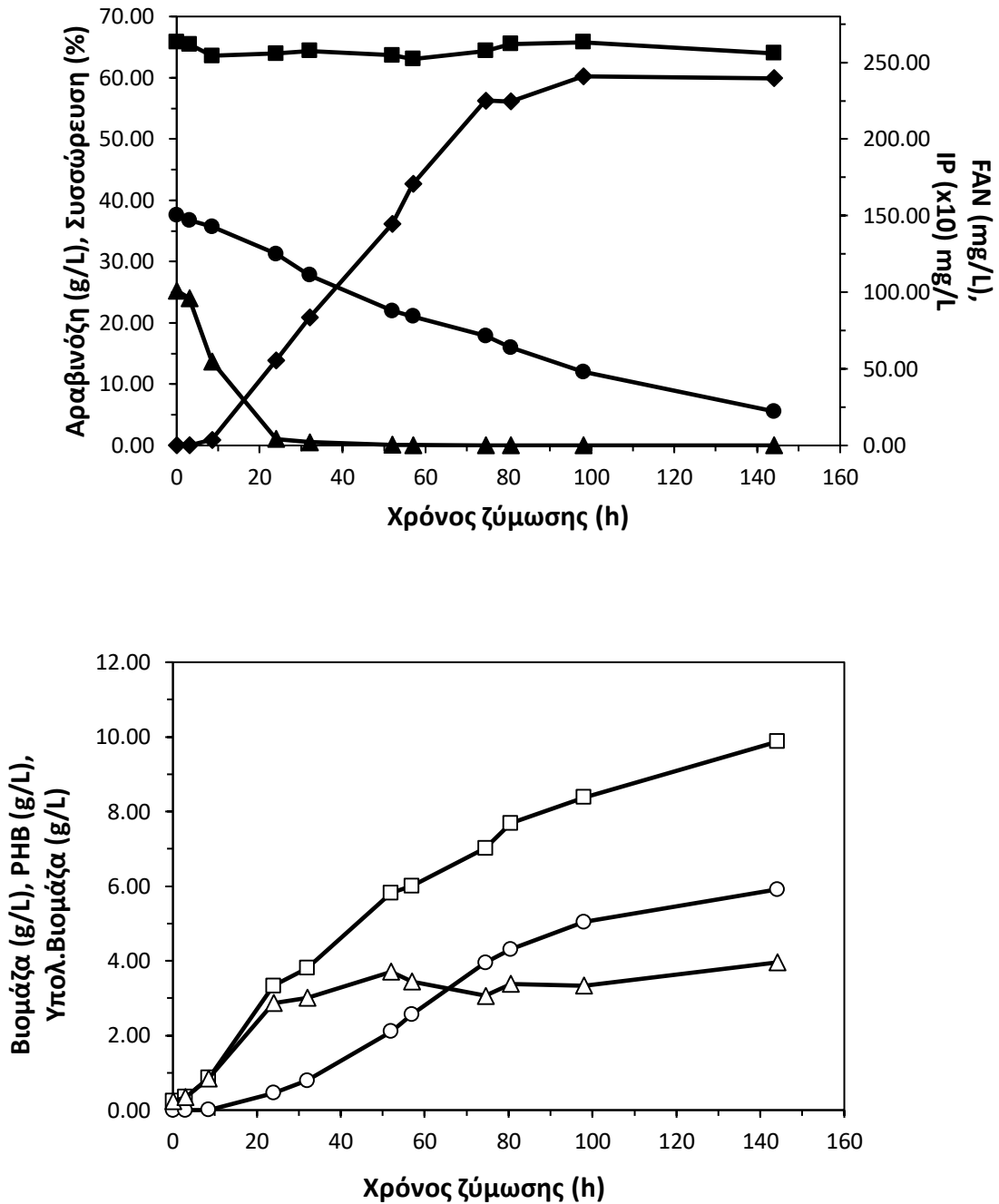
Όπως φαίνεται στα *Σχήματα 3.9-3.11*, η φάση υστέρησης του μικροοργανισμού είναι αμελητέα και στις τρεις περιπτώσεις. Ο ρυθμός κατανάλωσης γλυκόζης είναι μεγαλύτερος σε σχέση με τα άλλα δύο πεντοσάκχαρα. Η μέγιστη τιμή PHB στην περίπτωση της γλυκόζης (*Σχήμα 3.9*) επιτυγχάνεται στις 74,5 h, στην περίπτωση της ξυλόζης στις 98 h και στην περίπτωση της αραβινόζης στις 144 h. Στην περίπτωση της αραβινόζης (*Σχήμα 3.11*) η παραγωγή PHB ξεκινά μετά την κατανάλωση του μεγαλύτερου ποσοστού του FAN (24 h). Όπως και στα πειράματα των προηγούμενων ενοτήτων, η μεταβολή της συγκέντρωσης του ανόργανου φωσφόρου είναι ελάχιστη καθ'όλη τη διάρκεια της ζύμωσης.



**Σχήμα 3.9** Κινητική της συγκέντρωσης σακχάρων (●), της ενδοκυτταρικής συσσώρευσης (◆), του FAN (▲) και του IP (■), της βιομάζας (□), του PHB (○) και της υπολειπόμενης βιομάζας (Δ) κατά τη διάρκεια ζύμωσης διαλείποντος έργου (κωνικές φιάλες 500 mL) από τον μικροοργανισμό *B.sacchari* σε υπόστρωμα γλυκόζης.



**Σχήμα 3.10** Κινητική της συγκέντρωσης σακχάρων (●), της ενδοκυτταρικής συσσώρευσης (◆), του FAN (▲) και του IP (■), της βιομάζας (□), του PHB (○) και της υπολειπόμενης βιομάζας (Δ) κατά τη διάρκεια ζύμωσης διαλείποντος έργου (κωνικές φιάλες 500 mL) από τον μικροοργανισμό *B.sacchari* σε υπόστρωμα ξυλόζης.



**Σχήμα 3.11** Κινητική της συγκέντρωσης σακχάρων (●), της ενδοκυτταρικής συσσώρευσης (◆), του FAN (▲) και του IP (■), της βιομάζας (□), του PHB (○) και της υπολειπόμενης βιομάζας (Δ) κατά τη διάρκεια ζύμωσης διαλείποντος έργου (κωνικές φιάλες 500 mL) από τον μικροοργανισμό *B.sacchari* σε υπόστρωμα αραβινόζης.

**Πίνακας 3.4** Συνοπτικός πίνακας αποτελεσμάτων και υπολογισμός συντελεστών για την καλλιέργεια διαλείποντος έργου του μικροοργανισμού *B.sacchari* στα διαφορετικά εμπορικά σάκχαρα, στο τελικό σημείο των ζυμώσεων.

Υπόστρωμα	Χρόνος (h)	[TDW] (g/L)	[PHB] (g/L)	Συσσώρευση (%)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	$P_{max}$ (g/(L×h))
Γλυκόζη	74,5	7,91	4,84	61,17	0,22	0,13	0,084
Ξυλόζη	98	5,53	1,99	36,02	0,15	0,053	0,022
Αραβινόζη	144	9,87	5,91	59,91	0,26	0,16	0,051

[TDW]: Συγκέντρωση συνολικής παραχθείσας βιομάζας (g/L)

$Y_{X/S}$ : Συντελεστής απόδοσης παραχθείσας βιομάζας ανά μονάδα καταναλωθέντος υποστρώματος (g/g)

$Y_{P/S}$ : Συντελεστής απόδοσης παραχθέντος PHB ανά μονάδα καταναλωθέντος υποστρώματος (g/g)

$P_{max}$ : Μέγιστη παραγωγικότητα προϊόντος (g/ (L×h))

Όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.4, η απόδοση προϊόντος στην περίπτωση της γλυκόζης (0,13 g/g), έχει παρόμοια τιμή με αυτή της αραβινόζης (0,16 g/g). Η ενδοκυτταρική συσσώρευση επίσης είναι ίδια (60%), ενώ η παραγωγικότητα είναι μεγαλύτερη στην περίπτωση της γλυκόζης (0,084 g/(L×h)). Πάντως οι τιμές της συνολικής βιομάζας, της ενδοκυτταρικής συσσώρευσης, των αποδόσεων και της παραγωγικότητας προϊόντος είναι ψηλότερες σε σχέση με αυτές που παρουσιάζονται στους Πίνακες 3.2 και 3.3, αποδεικνύοντας πως η ζύμωση σε φιάλες των 500 mL και ενεργό όγκο 100 mL αποδίδει καλύτερα αποτελέσματα.

### 3.3.3 Επίδραση αρχικού λόγου C/FAN

Ο αρχικός λόγος C/FAN παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού και στην παραγωγή PHB. Στην συγκεκριμένη εργασία, μελετήθηκε η επίδραση διαφορετικών λόγων C/FAN τόσο στην ανάπτυξη και στον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης του μικροοργανισμού *B.sacchari*, όσο και στην παραγωγή και συσσώρευση PHB. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις σε κωνικές φιάλες των 500 mL ενεργού όγκου 100 mL, σε διαφορετικά συνθετικά εμπορικά σάκχαρα (γλυκόζη, αραβινόζη, γαλακτόζη, ξυλόζη) για διαφορετικούς αρχικούς λόγους C/FAN. Όλοι οι παράμετροι εκτός από τον αρχικό λόγο C/FAN, παρέμειναν σταθεροί. Στα πειράματα της Υποενότητας 3.3.2 (περίπτωση iii) ο αρχικός λόγος C/FAN ήταν περίπου 160 g/g (κυμαινόταν από 140-160 g/g για τα διαφορετικά σάκχαρα). Στα ακόλουθα πειράματα μελετώνται δύο επιπλέον λόγοι (40 g/g και 80 g/g) για κάθε ένα από τα εμπορικά σάκχαρα. Η αρχική συγκέντρωση σακχάρων ποίκιλλε και το pH διατηρήθηκε μεταξύ 6,5-6,9.

Σκοπός ήταν να μελετηθεί η επίδραση των διαφόρων αρχικών λόγων C/FAN στον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης του μικροοργανισμού *B.sacchari*, προκειμένου μετέπειτα ο βέλτιστος λόγος C/FAN να εφαρμοστεί σε πειράματα βιοαντιδραστήρα και να βελτιστοποιηθεί η παραγωγή PHB. Όπως έχει ήδη αναφερθεί το PHB αποτελεί δευτερογενή μεταβολίτη πράγμα που σημαίνει πως συντίθεται σε ένα δεύτερο στάδιο. Πιο συγκεκριμένα κατά το πρώτο στάδιο, παρατηρείται η ανάπτυξη του μικροοργανισμού και η παραγωγή βιομάζας και κατά το δεύτερο στάδιο (όπου πλέον το μεγαλύτερο ποσοστό αζώτου έχει καταναλωθεί από τον μικροοργανισμό), παρατηρείται παραγωγή του PHB. Εφόσον λοιπόν το PHB συντίθεται σε ένα δεύτερο στάδιο, μεγαλύτερος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης του μικροοργανισμού συνεπάγεται μεγαλύτερη συγκέντρωση βιομάζας κατά το πρώτο στάδιο ανάπτυξής του. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, και την μεγαλύτερη συγκέντρωση PHB.

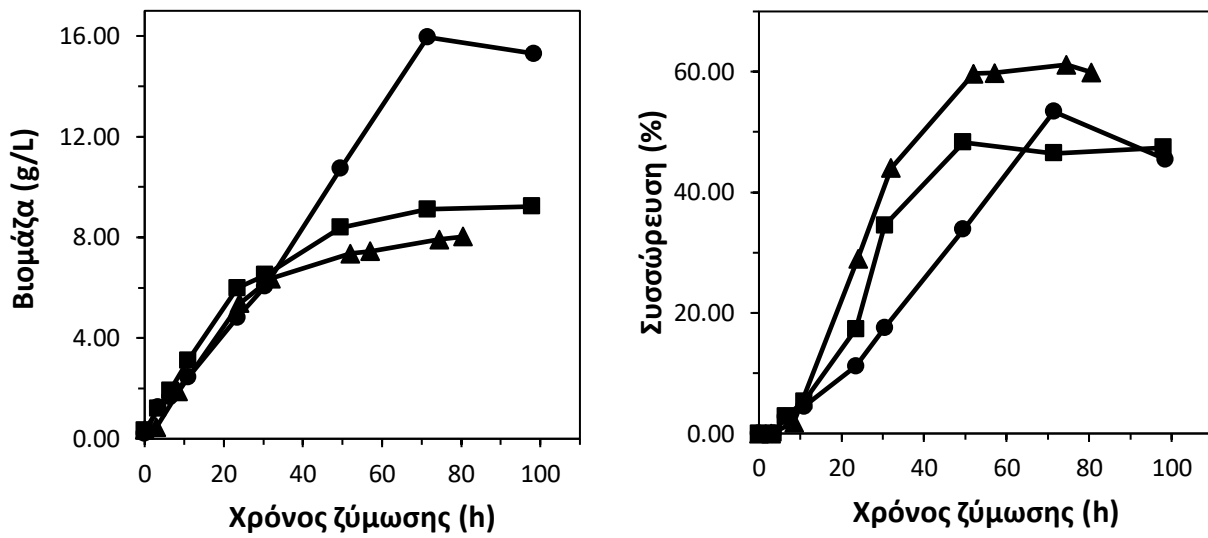
Γενικότερα μεγαλύτεροι λόγοι C/N προωθούν την ενδοκυτταρική συσσώρευση ενώ το αντίθετο ισχύει για την κυτταρική αύξηση (Raza et al., 2018).

Στα παρακάτω διαγράμματα (Σχήματα 3.12-3.13) συγκρίνεται η παραγωγή βιομάζας και ενδοκυτταρικής συσσώρευσης για τους διαφορετικούς αρχικούς λόγους C/FAN. Στο Σχήμα 3.14 γίνεται σύγκριση των ειδικών ρυθμών ανάπτυξης του

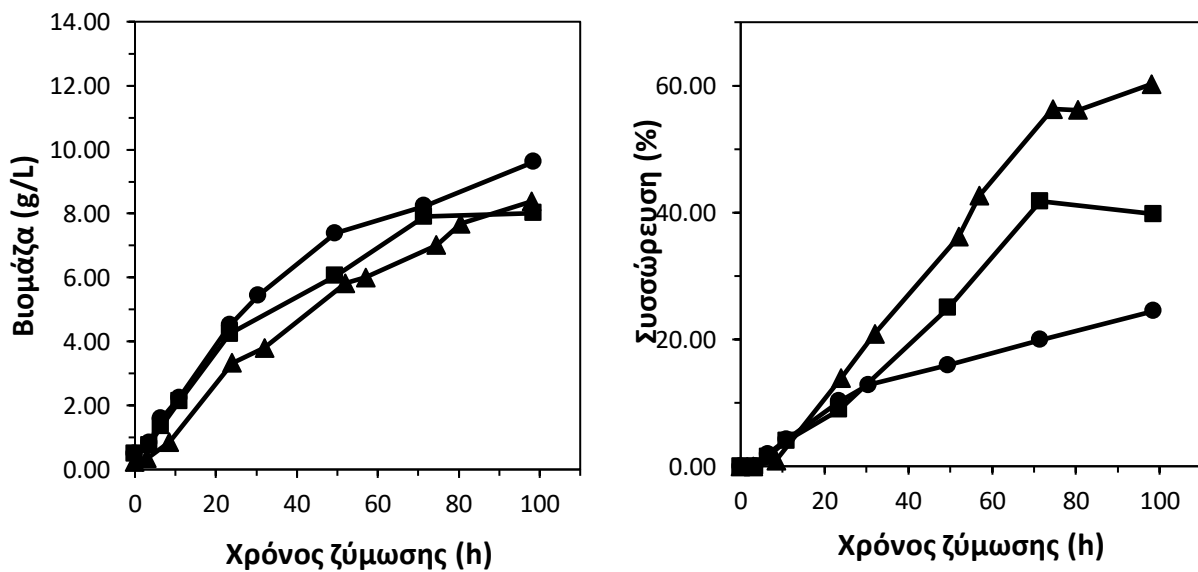
μικροοργανισμού *B.sacchari* για τους διαφορετικούς αρχικούς λόγους C/FAN, σε υπόστρωμα διαφορετικών εμπορικών σακχάρων.

Οι κινητικές της συγκέντρωσης βιομάζας και της ενδοκυτταρικής συσσώρευσης για το λόγο C/FAN $\approx$ 160 g/g είναι οι αυτές που περιγράφηκαν στην *Υποενότητα 3.3.2 (περίπτωση iii)*. Για σκοπούς σύγκρισης έχουν τοποθετηθεί στο ίδιο διάγραμμα με τις κινητικές που αναφέρονται στους λόγους της συγκεκριμένης ενότητας (40, 80 g/g). Για την περίπτωση της γαλακτόζης, επειδή δεν πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε κωνικές φιάλες των 500 mL, χρησιμοποιούνται οι κινητικές που προέκυψαν από ζυμώσεις σε φιάλες των 250 mL (*Υποενότητα 3.3.2, περίπτωση i*).



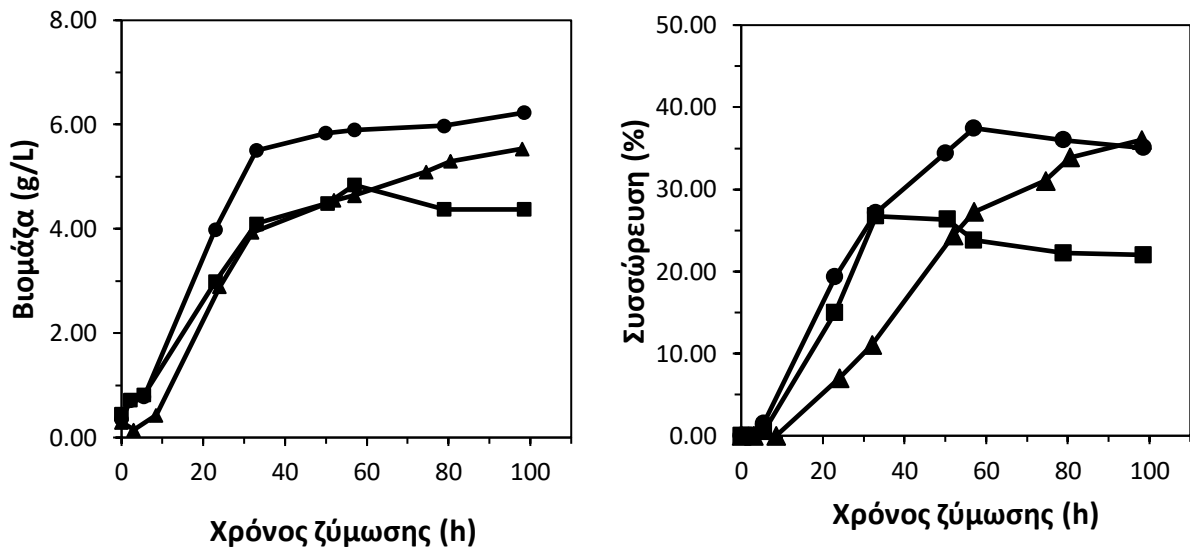


(a)

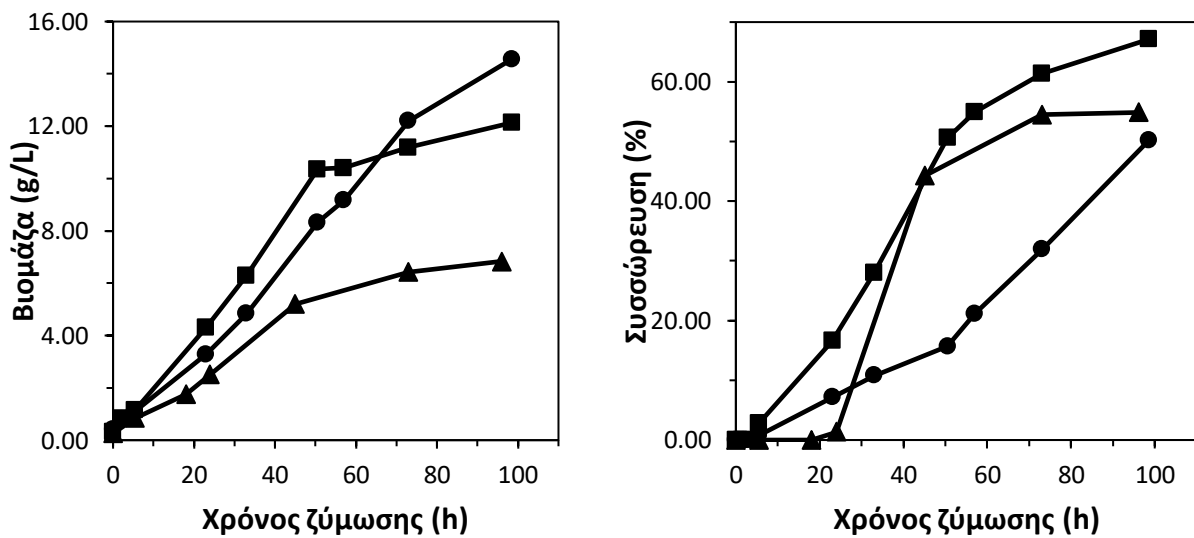


(b)

**Σχήμα 3.12** Κινητική συγκέντρωσης βιομάζας και ενδοκυτταρικής συσσώρευσης, σε αρχικό λόγο περίπου C/FAN 40 g/g (●), 80 g/g (■), 160 g/g (▲), κατά τη διάρκεια ζύμωσης διαλείποντος έργου από τον μικροοργανισμό *B.sacchari* (a) σε υπόστρωμα γλυκόζης και (b) σε υπόστρωμα αραβινόζης.

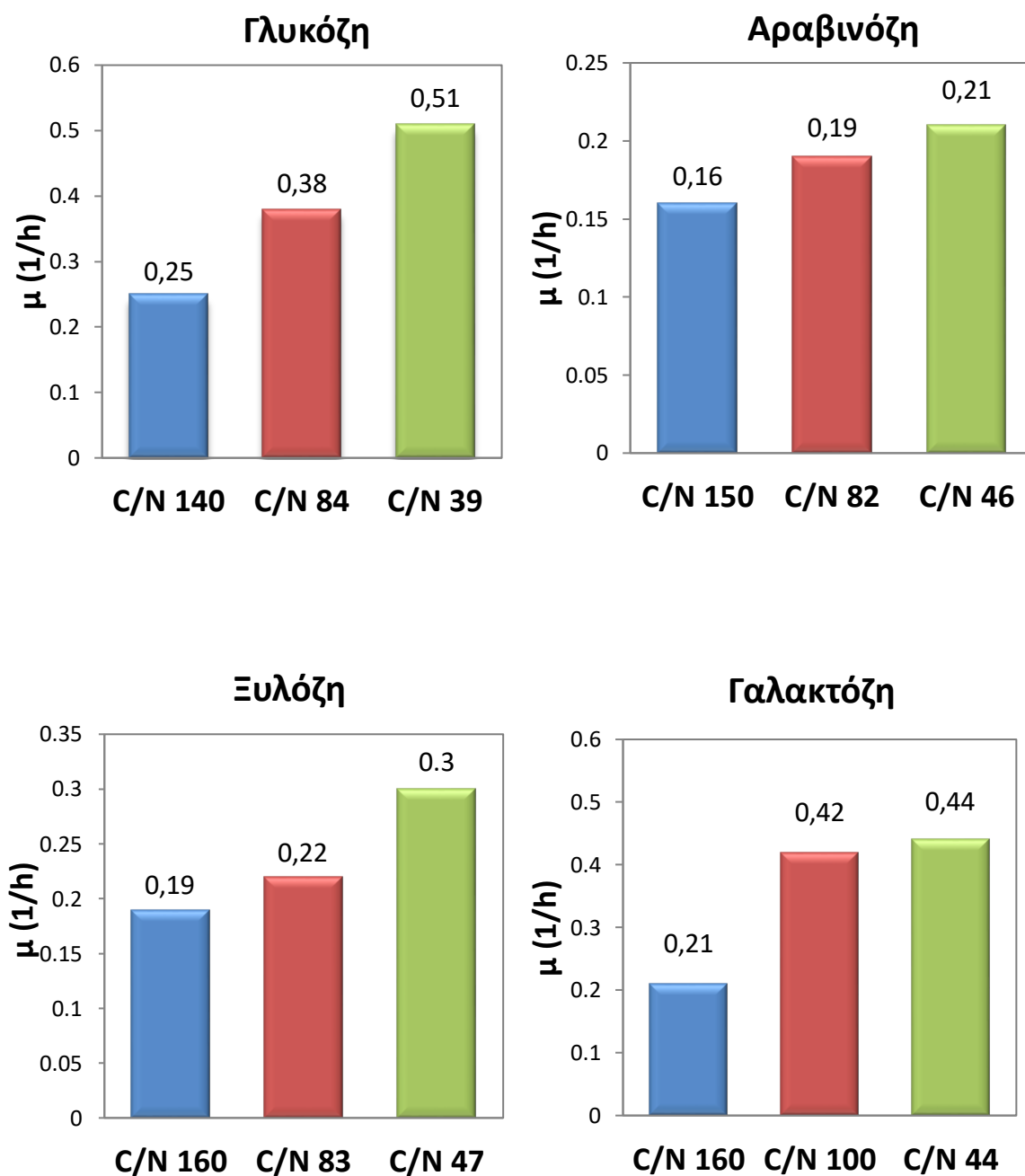


(a)



(b)

**Σχήμα 3.13** Κινητική συγκέντρωσης βιομάζας και ενδοκυτταρικής συσσώρευσης, σε αρχικό λόγο περίπου C/FAN 40 g/g (●), 80 g/g (■), 160 g/g (▲), κατά τη διάρκεια ζύμωσης διαλείποντος έργου από τον μικροοργανισμό *B.sacchari* (a) σε υπόστρωμα ξυλόζης και (b) σε υπόστρωμα γαλακτόζης.



**Σχήμα 3.14** Ειδικός ρυθμός ανάπτυξης του μικροοργανισμού *B.sacchari* για διαφορετικούς αρχικούς λόγους C/FAN, σε υπόστρωμα διαφορετικών εμπορικών σακχάρων.

Στον Πίνακα 3.5 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της καλλιέργειας του μικροοργανισμού *B.sacchari* στα διάφορα εμπορικά σάκχαρα στους λόγους C/FAN=40 g/g και C/FAN=80 g/g. Τα αποτελέσματα της καλλιέργειας του μικροοργανισμού για το λόγο C/FAN=160 g/g (με τα οποία γίνεται σύγκριση) έχουν ήδη παρουσιαστεί στον Πίνακα 3.4 της Υποενότητας 3.3.2, περίπτωση iii.

**Πίνακας 3.5** Υπολογισμός διαφόρων συντελεστών κατά τη καλλιέργεια διαλείποντος έργου του μικροοργανισμού *B.sacchari*, σε διαφορετικά εμπορικά σάκχαρα και σε διαφορετικούς αρχικούς λόγους C/FAN.

Υπόστρωμα	C/FAN (g/g)	T <sub>f</sub> (h)	S <sub>0</sub> (g/L)	[TDW] (g/L)	[PHB] (g/L)	Συσσώρευση (%)	Y <sub>X/S</sub> (g/g)	Y <sub>P/S</sub> (g/g)	P <sub>max</sub> (g/(L×h))	μ
Γλυκόζη	39	71,5	29,12	15,95	8,51	53,38	0,54	0,29	0,12	0,51
	84	98	40,75	9,22	4,37	47,43	0,23	0,11	0,045	0,38
Γαλακτόζη	44	98,5	37,97	14,56	7,29	50,14	0,38	0,19	0,074	0,44
	100	98,5	41,13	12,13	8,14	67,1	0,29	0,2	0,083	0,42
Ξυλόζη	47	57	20,05	5,9	2,20	37,45	0,29	0,11	0,038	0,30
	83	57	19,44	4,84	1,15	23,7	0,25	0,06	0,033	0,22
Αραβινόζη	46	98,5	30,3	9,61	2,35	24,44	0,32	0,077	0,024	0,21
	82	71,5	45,23	7,91	3,30	41,77	0,17	0,073	0,046	0,19

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω σχήματα, παρατηρείται μία αντίστροφη σχέση μεταξύ ειδικού ρυθμού ανάπτυξης και αρχικού λόγου C/FAN. Στην περίπτωση της γλυκόζης, στον λόγο C/FAN=140 g/g, το ποσοστό ενδοκυτταρικής συσσώρευσης έφτασε σε υψηλότερες τιμές (61,17%) σε σχέση με τους άλλους δύο λόγους (Πίνακας 3.4). Παρόλο που η αρχική συγκέντρωση αζώτου ήταν διαφορετική στους διαφορετικούς αρχικούς λόγους C/FAN, η παραγωγή και συσσώρευση PHB ξεκίνησαν στον ίδιο περίπου χρόνο. Ωστόσο, στους μικρότερους λόγους C/FAN η παραγωγή PHB διήρκησε περισσότερο καθώς το αρχικό FAN ήταν περισσότερο. Στον μικρότερο λόγο (C/FAN=39 g/g), παρατηρήθηκαν μεγαλύτερες τιμές στην απόδοση προϊόντος (0,29 g/g), στην απόδοση βιομάζας (0,54 g/g) και στην παραγωγικότητα προϊόντος (0,12 g/(L×h)) σε σχέση με τους άλλους δύο λόγους. Και στην περίπτωση της ξυλόζης οι αποδόσεις προϊόντος (0,11 g/g), βιομάζας (0,29 g/g) και παραγωγικότητας προϊόντος (0,038 g/L) είχαν υψηλότερες τιμές στον μικρότερο

αρχικό λόγο ( $C/FAN=47$  g/g) σε σχέση με τους άλλους δύο λόγους. Στους μικρότερους λόγους η ενδοκυτταρική συσσώρευση φαίνεται να χρειάζεται λιγότερο χρόνο για να φθάσει στη μέγιστη τιμή της, σε σχέση με τον λόγο  $C/FAN=160$  g/g, στον οποίο η αρχική συγκέντρωση FAN ήταν μικρότερη. Αυτό εξηγείται από την πιθανή έλλειψη οξυγόνου που προφανώς πυροδότησε την παραγωγή PHB πριν την εξάντληση του αζώτου από το μέσο καλλιέργειας (στους μικρότερους λόγους). Στην περίπτωση της γαλακτόζης, τόσο στον αρχικό λόγο  $C/FAN=44$  g/g όσο και στον λόγο  $C/FAN=100$  g/g, ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης του μικροοργανισμού, η απόδοση και η παραγωγικότητα προϊόντος παρουσιάζουν παρόμοιες τιμές (Πίνακας 3.5). Τέλος στην περίπτωση της αραβινόζης, όπως και στην περίπτωση της γλυκόζης, η παραγωγή και συσσώρευση PHB ξεκίνησαν στον ίδιο περίπου χρόνο. Ωστόσο, στους μικρότερους λόγους  $C/FAN$  η παραγωγή PHB διήρκησε περισσότερο καθώς το αρχικό FAN ήταν περισσότερο. Παρόλα αυτά, σε αντίθεση με την γλυκόζη, η μέγιστη απόδοση προϊόντος (0,16 g/g) και η μέγιστη παραγωγικότητα προϊόντος (0,051 g/(L×h)), επετεύχθησαν στον λόγο  $C/FAN=150$  g/g (Πίνακας 3.4).

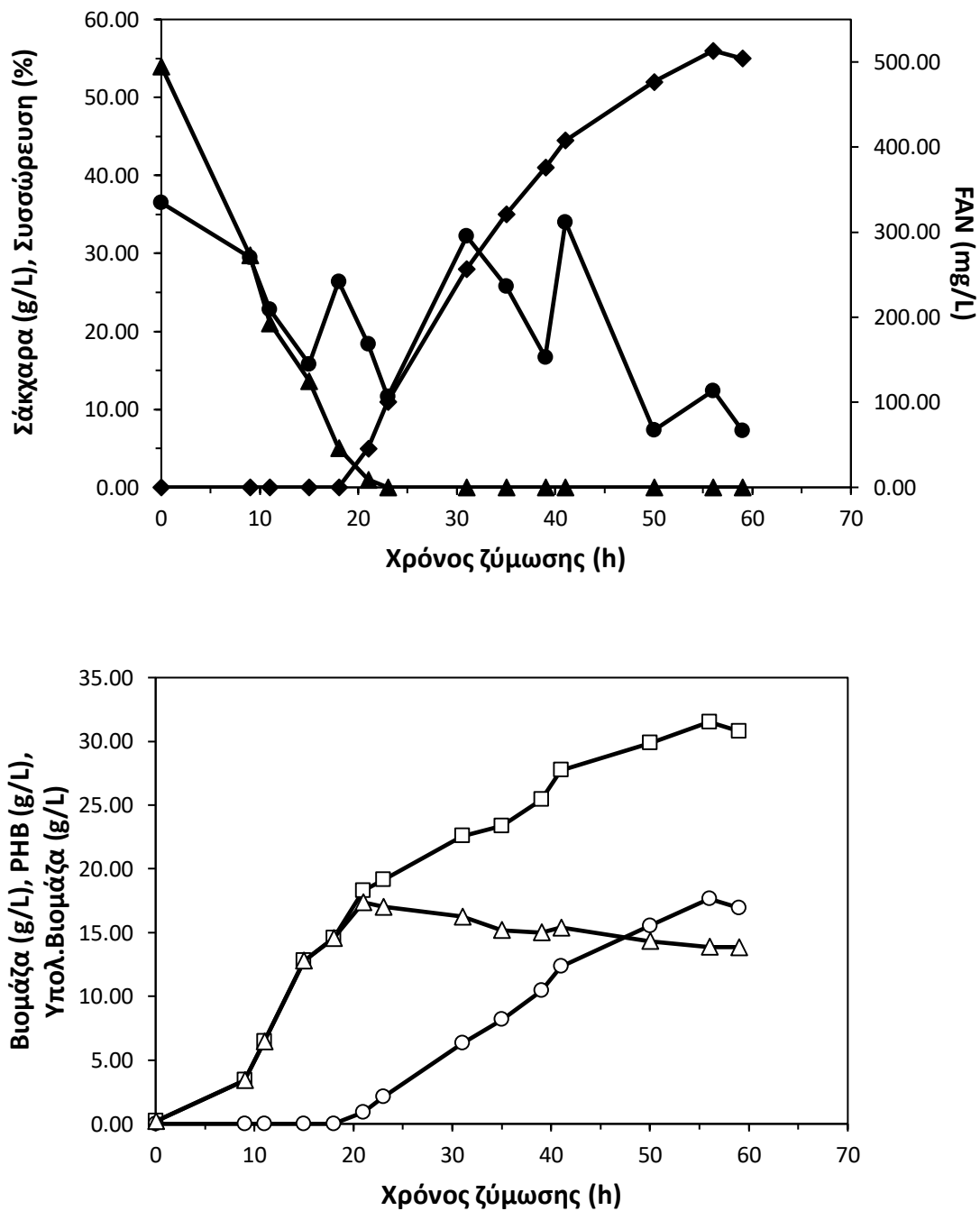
### 3.4 Ζυμώσεις σε βιοαντιδραστήρα για παραγωγή PHB

Η παραγωγή PHB μελετήθηκε και σε βιοαντιδραστήρα. Πιο συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκαν δύο ζυμώσεις ημισυνεχούς τροφοδοσίας σε συνθετικό υπόστρωμα καλλιέργειας και μία ζύμωση ημισυνεχούς τροφοδοσίας στο υδρόλυμα του πιτύρου σίτου. Ως συνθετικό υπόστρωμα στις ζυμώσεις ημισυνεχούς τροφοδοσίας χρησιμοποιήθηκε γλυκόζη και ξυλόζη σε διαφορετικά πειράματα. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η γλυκόζη αποτελεί το πιο σημαντικό εξοσάκχαρο που απαντά στο υδρόλυμα πιτύρου σίτου ενώ η ξυλόζη το σημαντικότερο πεντοσάκχαρο (Πίνακας 1.4).

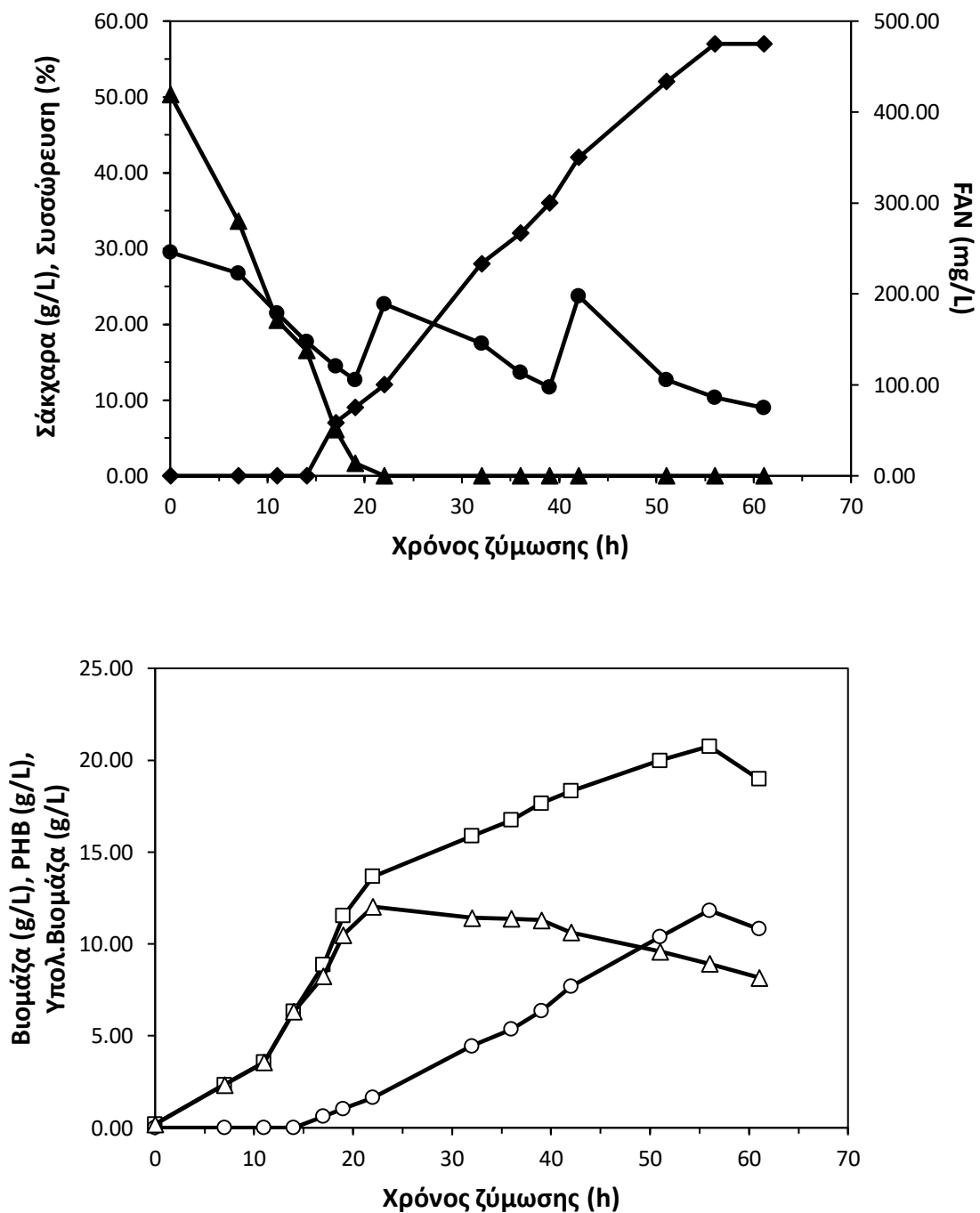
#### 3.4.1 Ζυμώσεις ημισυνεχούς τροφοδοσίας σε διαφορετικά εμπορικά σάκχαρα στον βέλτιστο λόγο C/FAN

Στην παρούσα ενότητα, πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις ημισυνεχούς τροφοδοσίας σε υπόστρωμα εμπορικής γλυκόζης και εμπορικής ξυλόζης (σε διαφορετικά πειράματα). Πιο συγκεκριμένα, οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε βιοαντιδραστήρα συνολικού όγκου 3,6 L, και ενεργού όγκου 1,5 L. Η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων ήταν 36,50 g/L στην περίπτωση της γλυκόζης και 29,50 g/L στην περίπτωση της ξυλόζης. Ο αρχικός λόγος C/FAN ήταν περίπου 30 g/g.

Στην περίπτωση της γλυκόζης η μέγιστη τιμή συνολικής βιομάζας (31,52 g/L) και του PHB (17,65 g/L) επετεύχθησαν στις 56 h με μία ενδοκυτταρική συσσώρευση 56%. Ο συντελεστής απόδοσης προϊόντος έφτασε 0,22 g/g και η παραγωγικότητα προϊόντος 0,31 g/(L×h). Στην περίπτωση της ξυλόζης η μέγιστη τιμή συνολικής βιομάζας (20,76 g/L) και του PHB (11,83 g/L) επετεύχθησαν στις 56 h με μία ενδοκυτταρική συσσώρευση 57%. Ο συντελεστής απόδοσης προϊόντος έφτασε 0,18 g/g και η παραγωγικότητα προϊόντος 0,21 g/(L×h).



**Σχήμα 3.15** Κινητική της συγκέντρωσης σακχάρων (●), της ενδοκυτταρικής συσσώρευσης (◆), του FAN (▲), της βιομάζας (□), του PHB (○) και της υπολειπόμενης βιομάζας (Δ) κατά τη διάρκεια ζύμωσης ημισυνεχούς τροφοδοσίας (βιοαντιδραστήρας) από τον μικροοργανισμό *B.sacchari* σε υπόστρωμα εμπορικής γλυκόζης.



**Σχήμα 3.16** Κινητική της συγκέντρωσης σακχάρων (●), της ενδοκυτταρικής συσσώρευσης (◆), του FAN (▲), της βιομάζας (□), του PHB (○) και της υπολειπόμενης βιομάζας (Δ) κατά τη διάρκεια ζύμωσης ημισυνεχούς τροφοδοσίας (βιοαντιδραστήρας) από τον μικροοργανισμό *B.sacchari* σε υπόστρωμα εμπορικής ξυλόζης.



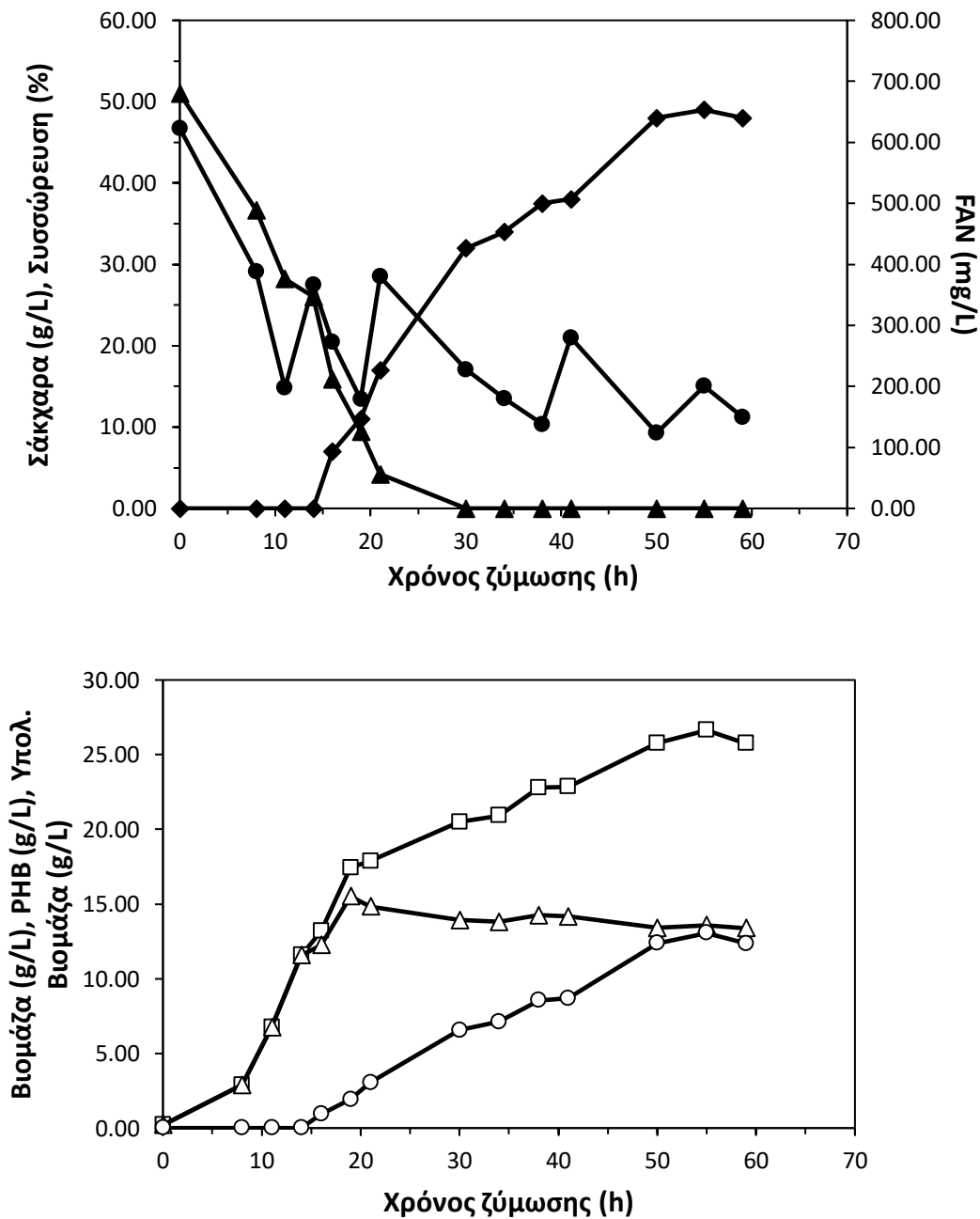
### 3.4.2 Ζύμωση ημισυνεχούς τροφοδοσίας σε υδρόλυμα πιτύρου σίτου στον βέλτιστο όγκο C/FAN

Στην παρούσα ενότητα, το υδρόλυμα που προέκυψε από το πύτυρο σίτου, χρησιμοποιήθηκε ως θρεπτικό μέσο για την παραγωγή PHB. Πιο συγκεκριμένα, ζύμωση ημισυνεχούς τροφοδοσίας πραγματοποιήθηκε σε βιοαντιδραστήρα συνολικού όγκου 3,6 L, και ενεργού όγκου 1,5 L, χρησιμοποιώντας ως πηγή θρεπτικών συστατικών το παραχθέν υδρόλυμα (η σύσταση του υδρολύματος περιγράφεται στην Υποενότητα 3.2). Η αρχική συνολική συγκέντρωση των σακχάρων ήταν 46,72 g/L, η τιμή του FAN 680 mg/L, και ο αρχικός λόγος C/FAN 30 g/g.

Στο Σχήμα 3.17 παρουσιάζονται οι κινητικές παραγωγής βιομάζας, PHB και ενδοκυτταρικής συσσώρευσης καθώς και οι κινητικές κατανάλωσης FAN και σακχάρων. Η κατανάλωση των σακχάρων ξεκινά αμέσως μετά τον εμβολιασμό με την παραγωγή του PHB να ξεκινά μετά την κατανάλωση του μεγαλύτερου ποσοστού του FAN.

Με την έναρξη της ζύμωσης, όλα τα σάκχαρα ξεκίνησαν να καταναλώνονται ταυτόχρονα, γεγονός που υποδεικνύει πως δεν παρατηρείται το φαινόμενο καταβολικής καταστολής στον μικροοργανισμό *B.sacchari* υπό αυτές τις συνθήκες. Ωστόσο ο ρυθμός κατανάλωσης γλυκόζης ήταν σαφώς μεγαλύτερος από αυτόν των υπόλοιπων σακχάρων.

Η μέγιστη τιμή συνολικής βιομάζας (26,63 g/L) και του PHB (13,05 g/L) επιτεύχθηκαν στις 55 h με μία ενδοκυτταρική συσσώρευση 49%. Η απόδοση PHB έφτασε 0,14 g/g και η παραγωγικότητα 0,25 g/(L×h). Όπως αποδεικνύεται στις βέλτιστες συνθήκες, τόσο η απόδοση όσο και η παραγωγικότητα προϊόντος έφτασαν σε αρκετά ικανοποιητικά επίπεδα.



**Σχήμα 3.17** Κινητική της συγκέντρωσης σακχάρων (●), της ενδοκυτταρικής συσσώρευσης (◆), του FAN (▲), της βιομάζας (□), του PHB (○) και της υπολειπόμενης βιομάζας (Δ) κατά τη διάρκεια ζύμωσης ημισυνεχούς τροφοδοσίας (βιοαντιδραστήρας) από τον μικροοργανισμό *B.sacchari* σε υπόστρωμα υδρολύματος σίτου.

### 3.5 Ανάκτηση ενδοκυτταρικού PHB

Για την ανάκτηση του PHB από το εσωτερικό των κυττάρων, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του υποχλωριώδους νατρίου –χλωροφορμίου ( $\text{NaClO}-\text{CH}_3\text{Cl}$ ). Όπως αναφέρεται παραπάνω, η εν λόγω μέθοδος παρότι απαιτεί μεγάλες ποσότητες διαλυτών, προτιμάται έναντι άλλων καθώς αποφέρει μεγάλο ποσοστό ανάκτησης PHB και προκαλεί πολύ μικρή αποικοδόμηση αυτού.

Στο συγκεκριμένο πείραμα μελετήθηκαν, το επί τοις εκατό (%) ποσοστό του πολυμερούς που εξήχθη με τη μέθοδο του υποχλωριώδους νατρίου – χλωροφορμίου ( $\text{NaClO}-\text{CH}_3\text{Cl}$ ) από το εσωτερικό των κυττάρων. Η ανάκτηση του PHB πραγματοποιήθηκε στη βιομάζα που παρέμεινε στο τέλος της ζύμωσης, για τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε βιοαντιδραστήρα. Σε βιοαντιδραστήρα πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις σε υπόστρωμα εμπορικής γλυκόζης, εμπορικής ξυλόζης, και υδρολύματος πιτύρου σίτου (*Υποενότητα 3.4*).

Για τον καθορισμό του ποσοστού ανάκτησης και του επί τοις εκατό (%) ποσοστού που εξήχθη από το εσωτερικό των κυττάρων, χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω τύποι:

- % πολυμερές που εξήχθη  $= \frac{m_{film}}{m_{cell}} * 100$  (σχέση 1)

όπου  $m_{film}$  είναι η μάζα (g) του PHB η οποία μετράται μετά την εξαγωγή και  $m_{cell}$  η συνολική μάζα (g) λυοφιλιωμένων κυττάρων που χρησιμοποιείται για την εξαγωγή.

- Ποσοστό ανάκτησης  $= \frac{\% \text{ πολυμερές που εξήχθη}}{\% \text{ ενδοκυτταρική συσσώρευση}} * 100$  (σχέση 2)

ή

$$\text{Ποσοστό ανάκτησης} = \frac{m_{film}}{m_{PHB (GC)}} \text{ (σχέση 3)}$$

όπου η επί τοις εκατό (%) ενδοκυτταρική συσσώρευση αναφέρεται στο ποσοστό του πολυμερούς μέσα στα κύτταρα, όπως αυτό μετράται με αέρια χρωματογραφία, και mPHB (GC), είναι η συνολική μάζα (g) PHB, όπως αυτή μετράται με αέρια χρωματογραφία.

**Πίνακας 3.6** Ποσοστό ανάκτησης και ποσοστό εξαγωγής PHB, που παρήχθη κατά την διάρκεια ζυμώσεων του μικροοργανισμού *B.sacchari* σε διαφορετικά υποστρώματα.

Υπόστρωμα	Είδος ζύμωσης	[PHB] <sub>f</sub> (g/L)	m film (g)	m cell (g)	Συσσώρευση (%)	Ποσοστό εξαγωγής (%)	Ανάκτηση (%)
Γλυκόζη	Fed batch - Βιοαντιδραστήρας	17,65	0,73	1,50	56	48,6	86,7
Ξυλόζη	Fed batch - Βιοαντιδραστήρας	11,83	0,69	1,50	57	46,0	80,7
Υδρόλυμα πιτύρου σίτου*	Fed batch - Βιοαντιδραστήρας	13,05	0,48	1,50	49	32,0	65,3

[PHB]<sub>f</sub>: Συγκέντρωση PHB μετά το πέρας της ζύμωσης (g/L).

\*: Το υδρόλυμα πιτύρου σίτου περιείχε γλυκόζη, μαννόζη, ξυλόζη, αραβινόζη με συνολική αρχική συγκέντρωση σακχάρων 46,72 g/L.

Όπως φαίνεται στον παραπάνω πίνακα, η ανάκτηση κυμαίνεται από 65,3-86,7% με τη μέγιστη τιμή (86,7%) να παρατηρείται στην περίπτωση παραγωγής PHB μέσω ζύμωσης ημισυνεχούς τροφοδοσίας σε θρεπτικό μέσο γλυκόζης.

## 4 Συμπεράσματα-Συζήτηση

Από τα πειράματα που διεξήχθησαν, συμπεραίνεται αρχικά πως η πηγή εκχυλίσματος ζύμης στο θρεπτικό μέσο ζύμωσης επιδρά καθοριστικά στην ανάπτυξη βιομάζας καθώς τα συστατικά που περιέχονται στο εκχύλισμα ζύμης είναι ευνοϊκά για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού.

Όπως έχει προαναφερθεί, στην παρούσα εργασία αρχικά διεξήχθησαν πειράματα διαλείποντος έργου σε κωνικές φιάλες τόσο των 250 mL (σε υπόστρωμα γλυκόζης, ξυλόζης, γαλακτόζης, μαννόζης, αραβινόζης) όσο και σε φιάλες των 500 mL (σε υπόστρωμα γλυκόζης, ξυλόζης, αραβινόζης). Ο ενεργός όγκος ήταν σε όλες τις περιπτώσεις 100 mL και η σύσταση του μέσου ίδια. Μελετήθηκαν η κινητική ανάπτυξης της βιομάζας, η κατανάλωση του υποστρώματος (HPLC), του αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN), του ανόργανου φωσφόρου (IP) καθώς και η παραγωγή του PHB (GC). Στην περίπτωση των καλλιιεργειών στις φιάλες των 500 mL, ο αρχικός λόγος C/FAN ήταν περίπου 160 g/g.

Στα αρχικά πειράματα (κωνικές φιάλες 250 mL) που έγιναν στα διαφορετικά εμπορικά σάκχαρα (γαλακτόζη, ξυλόζη, αραβινόζη, μαννόζη) τόσο οι τιμές της βιομάζας όσο και οι τιμές απόδοσης προϊόντος και παραγωγικότητας παρουσίασαν αρκετά χαμηλές τιμές. Τα καλύτερα αποτελέσματα παρουσίασε η γαλακτόζη σε σύγκριση με τα υπόλοιπα σάκχαρα. Οι χαμηλές τιμές στον συντελεστή απόδοσης προϊόντος και στην παραγωγικότητα πιθανώς οφείλονταν στον ελλιπή αερισμό και στην μικρή επιφάνεια επαφής του θρεπτικού μέσου με το οξυγόνο της ατμόσφαιρας. Για το λόγο αυτόν ακολούθησαν τα πειράματα στις κωνικές φιάλες των 500 mL. Στα πειράματα αυτά, οι τιμές του συντελεστή απόδοσης προϊόντος και παραγωγικότητας (Πίνακας 3.7) ήταν σαφώς μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες των πειραμάτων στις κωνικές φιάλες των 250 mL, παρόλα αυτά αρκετά μικρότερες σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές της βιβλιογραφίας.

Έτσι στα πειράματα που ακολούθησαν μελετήθηκε η επίδραση του αρχικού λόγου C/FAN τόσο στον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης του μικροοργανισμού όσο και στην παραγωγή του PHB. Οι λόγοι που εξετάστηκαν όπως έχει προαναφερθεί ήταν περίπου 40, 80 g/g (και συγκρίθηκαν με τα αποτελέσματα του λόγου 160 g/g). Στα

πειράματα αυτά, η απόδοση προϊόντος και η παραγωγικότητα ήταν σαφώς μεγαλύτερες σε σχέση με όλα τα προηγούμενα πειράματα δίνοντας καλύτερα αποτελέσματα (Πίνακας 3.7).

**Πίνακας 3.7** Σύγκριση του συντελεστή απόδοσης προϊόντος και της παραγωγικότητας προϊόντος σε διαφορετικούς αρχικούς λόγους C/FAN, σε καλλιέργειες του μικροοργανισμού *B.sacchari* σε διαφορετικά εμπορικά σάκχαρα.

	[C/FAN] $\approx$ 160 g/g (Καλλιέργειες σε φιάλες των 500 mL (εκτός από γαλακτόζη))		[C/FAN] $\approx$ 40g/g		Βιβλιογραφία	
	$Y_{\text{PHB/S}}$ (g/g)	P (g/(L×h))	$Y_{\text{PHB/S}}$ (g/g)	P (g/(L×h))	Y PHB/S (g/g)	P (g/(L×h))
Γλυκόζη	0,13	0,084	0,29	0,12	0,29	0,11
Ξυλόζη	0,053	0,022	0,11	0,038	0,26	0,09
Αραβινόζη	0,16	0,051	0,077	0,024	0,24	0,09
Γαλακτόζη	0,094	0,048	0,19	0,074	-	-

Όπως φαίνεται από τον παραπάνω πίνακα στην περίπτωση της γλυκόζης και της ξυλόζης, οι συντελεστές απόδοσης προϊόντος και παραγωγικότητας βελτιώνονται στον μικρότερο λόγο C/FAN=40 g/g και είναι περισσότερο συγκρίσιμοι με τις αντίστοιχες τιμές της βιβλιογραφίας. Τόσο στην περίπτωση της γλυκόζης όσο και στην περίπτωση της ξυλόζης, παρατηρείται σχεδόν διπλασιασμός του συντελεστή απόδοσης προϊόντος και αύξηση της παραγωγικότητας. Στην περίπτωση της αραβινόζης ωστόσο, οι βέλτιστες τιμές συντελεστή απόδοσης προϊόντος και παραγωγικότητας προϊόντος παρατηρούνται στο λόγο C/FAN=150 g/g.

Στους τρεις διαφορετικούς λόγους (C/FAN=40, 80, 160 g/g) που εξετάστηκαν για τα διαφορετικά εμπορικά σάκχαρα (γλυκόζη, ξυλόζη, αραβινόζη, γαλακτόζη), ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης του μικροοργανισμού ( $\mu$ ) κυμάνθηκε από 0,25-0,51  $\text{h}^{-1}$  στην περίπτωση της γλυκόζης, από 0,19-0,30  $\text{h}^{-1}$  στην περίπτωση της ξυλόζης, από 0,21-0,44  $\text{h}^{-1}$  στην περίπτωση της γαλακτόζης και από 0,16-0,21  $\text{h}^{-1}$  στην περίπτωση της αραβινόζης. Σε όλες τις περιπτώσεις σακχάρων, παρατηρήθηκε μία αντίστροφη

σχέση μεταξύ του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης του μικροοργανισμού κατά την εκθετική φάση και του αρχικού λόγου C/FAN. Επίσης, στον λόγο C/FAN=160 g/g, το ποσοστό ενδοκυτταρικής συσσώρευσης ήταν μεγαλύτερο σε σύγκριση με τους υπόλοιπους δύο λόγους (40 g/g, 80 g/g) για όλα τα σάκχαρα (δεν παρουσιάζεται στον πίνακα). Αυτό είναι λογικό και σύμφωνο με τη βιβλιογραφία καθώς μεγαλύτεροι λόγοι C/N προωθούν την ενδοκυτταρική συσσώρευση.

Στα πειράματα μέτρησης ενεργότητας της γλυκοαμυλάσης η μέγιστη ενεργότητα (67,5 U/g) επετεύχθη στις 71 h ζύμωσης στερεάς κατάστασης του μύκητα *Aspergillus awamori* σε πίτυρο σίτου. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ενεργότητα ίση με 48 U/g έχει επιτευχθεί έπειτα από 96 h ζύμωσης στερεάς κατάστασης του ίδιου μύκητα στο ίδιο υπόστρωμα (Du et al., 2008).

Κατά τη ζύμωση ημισυνεχούς τροφοδοσίας του μικροοργανισμού *B.sacchari* στο πίτυρο σίτου δεν παρατηρήθηκε το φαινόμενο καταβολικής καταστολής (επιλεκτική κατανάλωση σακχάρων), καθώς με την έναρξη της ζύμωσης τα σάκχαρα ξεκίνησαν να καταναλώνονται σχεδόν ταυτόχρονα. Ωστόσο ο ρυθμός κατανάλωσης της γλυκόζης ήταν σαφώς μεγαλύτερος σε σχέση με αυτόν των υπολοίπων σακχάρων. Ο αρχικός λόγος C/FAN έπρεπε να είναι 40 g/g (βέλτιστος), ωστόσο ρυθμίστηκε στα 30 g/g. Ο συντελεστής απόδοσης προϊόντος έφτασε 0,14 g/g, η παραγωγικότητα 0,25 g/(L×h) και η μέγιστη τιμή ενδοκυτταρικής συσσώρευσης (49%) επετεύχθη έπειτα από 55 h ζύμωσης. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, σε fed-batch καλλιέργειες του ίδιου μικροοργανισμού σε άχυρο πίτυρου σίτου, ο συντελεστής απόδοσης προϊόντος ήταν 0,22 g/g, η παραγωγικότητα 1,6 g/(L×h) και η ενδοκυτταρική συσσώρευση έφτασε σε ποσοστό 72% (Cesario et al., 2014). Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συμπεραίνεται πως απαιτείται βελτιστοποίηση της διεργασίας (συνθήκες ζύμωσης, βελτιστοποίηση υδρόλυσης) προκειμένου να επιτευχθούν υψηλότεροι συντελεστές απόδοσης προϊόντος και παραγωγικότητας.

Η ανάκτηση του PHB από τις τελικές βιομάζες που προέκυψαν από τα πειράματα του βιοαντιδραστήρα, κυμάνθηκε από 65,3-86,7%. Η ανάκτηση του ενδοκυτταρικού PHB με τη μέθοδο χλωροφορμίου-υποχλωριώδους, αποδίδει αρκετά ικανοποιητικά αποτελέσματα. Ωστόσο στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί ποσοστά ανάκτησης μεγαλύτερα από 90% σε κύτταρα του μικροοργανισμού *R.eutropha*

(Jacquel et al., 2008). Πιθανώς τα χαμηλότερα ποσοστά ανάκτησης να οφείλονται σε μερική αποικοδόμηση του PHB εντός των κυττάρων μετά το πέρας της ζύμωσης.



## Βιβλιογραφία

- Ahn, J., Jho, E.H., Nam, K., (2015). Effect of C/N ratio on polyhydroxyalkanoates (PHA) accumulation by *Cupriavidus necator* and its implication on the use of rice straw hydrolysates. *Environmental Engineering Research*, **20**(3), 246-253.
- Al-Battashi, H., Annamalai, N., Al-Kindi, S., Nair, A.S., Al-Bahry, S., Verma, J.P., Sivakumar, N., (2018). Production of bioplastic (poly-3-hydroxybutyrate) using waste paper as a feedstock: Optimization of enzymatic hydrolysis and fermentation employing *Burkholderia sacchari*. *Journal of Cleaner Production*, **214**, 236-247. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.12.239>.
- Anjum, A., Zuber, M., Zia, K.M., Noreen, A., Anjum, M.N., Tabasum, S., (2016). Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. *International Journal of Biological Macromolecules*, **89**, 161–174. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.069>.
- Annamalai, N., Sivakumar, N., (2016). Production of polyhydroxybutyrate from wheat bran hydrolysate using *Ralstonia eutropha* through microbial fermentation. *Journal of Biotechnology*, **237**, 13–17. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.09.001>.
- Apprich, S., Tirpanalan, Ö., Hell, J., Reisinger, M., Böhmendorfer, S., Siebenhandl-Ehn, S., Novalin, S., Kneifel, W., (2014). Wheat bran-based biorefinery 2: Valorization of products. *LWT - Food Science and Technology*, **56**, 222-231. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.12.003>.
- Babel, W., Ackermann, J.U., Breuer, U., (2001). Physiology, Regulation, and Limits of the Synthesis of Poly(3HB). *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, **71**, 125-157.
- Brämer, C.O., Vandamme, P., Silva, L.F., Gomez, J.G.C., Steinbuechel, A., (2001). *Burkholderia sacchari* sp. nov., a polyhydroxyalkanoate-accumulating bacterium isolated from soil of a sugar-cane plantation in Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **51**, 1709–1713.
- Bugnicourt, E., Cinelli, P., Lazzeri, A., Alvarez, V., (2014). Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and

potential applications in packaging. *eXPRESS Polymer Letters*, **8**(11), 791–808. DOI: 10.3144/expresspolymlett.2014.82.

- Chalamacharla, R.B., Harsha, K., Sheik, K.B., Viswanatha, C.K., (2018). Wheat Bran-Composition and Nutritional Quality: A Review. *Adv Biotech & Micro*, **9**(1): 555754. DOI: 10.19080/AIBM.2018.09.555754.
- Cesário, M.T., Raposo, R.S., M.D. de Almeida, M.C., van Keulen, F., Ferreira, B.S., Telo, J.P., R. da Fonseca, M.M., (2014). Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by *Burkholderia sacchari* using wheat straw hydrolysates and gamma-butyrolactone. *International Journal of Biological Macromolecules*, **71**, 59-67. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.04.054>.
- Cesário, M.T., Raposo, R.S., M.D.de Almeida, M.C., van Keulen, F., Ferreira, B.S., R. da Fonseca, M.M., (2014). Enhanced bioproduction of poly-3-hydroxybutyrate from wheat straw lignocellulosic hydrolysates. *New Biotechnology*, **31**(1), 104-113. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2013.10.004>.
- Chen, G-Q., (2011). Biofunctionalization of Polymers and Their Applications. *Adv Biochem Engin/Biotechnol*, **125**, 29-45. DOI: 10.1007/10\_2010\_89.
- De Sousa Dias, M.M., Koller, M., Puppi, D., Morelli, A., Chiellini, F., Braunegg, G., (2017). Fed-Batch Synthesis of Poly(3-Hydroxybutyrate) and Poly(3-Hydroxybutyrate-co-4-Hydroxybutyrate) from Sucrose and 4-Hydroxybutyrate Precursors by *Burkholderia sacchari* Strain DSM 17165. *Bioengineering* **4**:36. doi:10.3390/bioengineering4020036.
- Dietrich, K., Dumont, M.J., Rio, L.F.D., Orsat, V., (2016). Producing PHAs in the bioeconomy — Towards a sustainable bioplastic. *Sustainable Production and Consumption*, **9**, 58-70. <https://doi.org/10.1016/j.spc.2016.09.001>.
- Du, C., Lin, S.K.C., Koutinas, A., Wang, R., Dorado, P., Webb, C., (2008). A wheat biorefining strategy based on solid-state fermentation for fermentative production of succinic acid. *Bioresource Technology*, **99**, 8310–8315. doi:10.1016/j.biortech.2008.03.019.
- Ekiert, M., Mlyniec, A., Uhl, T., (2015). The influence of degradation on the viscosity and molecular mass of poly(lactide acid) biopolymer. *Diagnostyka*, **16**(4), 63-70. <https://www.researchgate.net/publication/284419165>.
- Favaro, L., Basaglia, M., Casella, S., (2019). Improving polyhydroxyalkanoate production from inexpensive carbon sources by genetic

approaches: a review. *Biofuels, Bioprod. Bioref.*, **13**, 208-227. DOI: 10.1002/bbb.1944.

- 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. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.11.029>.
- Jiang, G., Hill, D.J., Kowalczyk, M., Johnston, B., Adamus, G., Irorere, V., Radecka, I.,(2016). Carbon Sources for Polyhydroxyalkanoates and an Integrated Biorefinery. *Int. J. Mol. Sci.*, **17**, 1157. doi:10.3390/ijms17071157.
- Jiang, L., Zhang, J., (2017). Biodegradable and Biobased Polymers. In M. Kutz (Ed.), *Applied Plastics Engineering Handbook*. (pp. 127-143). <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-39040-8.00007-9>.
- Kachrimanidou, V., (2016). Microbial production of poly(hydroxyalkanoates) and biorefinery development using by-product streams from sunflower-based biodiesel production processes. Doctor of Philosophy, *Agricultural University of Athens*, Athens, Greece.
- Kapritchkoff, F.M., Viotti, A.P., Alli, R.C.P., Zuccolo, M., Pradella, J.G.C., Maiorano, A.E., Miranda, E.A., Bonomi, A., (2006). Enzymatic recovery and purification of polyhydroxybutyrate produced by *Ralstonia eutropha*. *Journal of Biotechnology*, **122**, 453–462. doi:10.1016/j.jbiotec.2005.09.009.
- Kourmentza, C., Plácido, J., Venetsaneas, N., Burniol-Figols, A., Varrone, C., Gavala, H.N., Reis, M.A.M., (2017). Recent Advances and Challenges towards Sustainable Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production. *Bioengineering*, **4**(2). doi:10.3390/bioengineering4020055.
- Koutinas, A.A., Lin, C., Du, C., & Webb, C., (2014). Whole-Crop Biorefinery. In L. Wang (Ed.), *Sustainable Bioenergy Production* (pp. 501-534). CRC Press/Balkema. <https://doi.org/10.1201/b16764>.
- Kumar, P., Kim, B.S., (2018). Valorization of polyhydroxyalkanoates production process by co-synthesis of value-added products. *Bioresource Technology*, **269**, 544-556. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.08.120>.
- Kunasundari, B., Sudesh, K., (2011). Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. *eXPRESS Polymer Letters*, **5**(7), 620–634. DOI: 10.3144/expresspolymlett.2011.60.

- Lam, W.C., Pleissner, D., Lin, C.S.K., (2013). Production of Fungal Glucoamylase for Glucose Production from Food Waste. *Biomolecules*, **3**, 651-661. doi:10.3390/biom3030651.
- Lopes, M.S.G, Gomez, J.G.C., Taciro, M.K., Mendonça, T.T., Silva, L.F., (2014). Polyhydroxyalkanoate biosynthesis and simultaneous remotion of organic inhibitors from sugarcane bagasse hydrolysate by *Burkholderia* sp. *J Ind Microbiol Biotechnol*, **41**, 1353–1363. DOI10.1007/s10295-014-1485-5.
- Lopes, M.S.G., Gosset, G., Rocha, R.C.S., Gomez, J.G.C., Silva, L.F., (2011). PHB Biosynthesis in Catabolite Repression Mutant of *Burkholderia sacchari*. *Curr Microbiol*, **63**, 319–326. DOI 10.1007/s00284-011-9981-6.
- Lopes, M.S.G., Rocha, R.C.S., Zanotto, S.P., Gomez, J.G.C., Silva, L.F., (2009). Screening of bacteria to produce polyhydroxyalkanoates from xylose. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **25**, 1751–1756. DOI 10.1007/s11274-009-0072-9.
- Mendonça, T.T., Gomez, J.G.C., Buffoni, E., Sanchez Rodriguez, R.J., Schripsema, J., Lopes, M.S.G., Silva, L.F.,(2013). Exploring the potential of *Burkholderia sacchari* to produce polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology*, **116**, 815-829. doi:10.1111/jam.12406.
- Mendonça, T.T., Tavares, R.R., Cespedes, L.G., Sanchez Rodriguez, R.J., Schripsema, J., Taciro, M.K., Gomez, J.G.C., Silva, L.F., (2017). Combining molecular and bioprocess techniques to produce poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) with controlled monomer composition by *Burkholderia sacchari*. *International Journal of Biological Macromolecules*, **98**, 654-663. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.02.013>.
- Mozejko-Ciesielska, J., Kiewisz, R., (2016). Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous?. *Microbiological Research*, **192**, 271–282. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.07.010>.
- Nascimento, V.M., Silva, L.F., Gomez, J.G.C., Fonseca, G.G., (2016). Growth of *Burkholderia sacchari* LFM 101 cultivated in glucose, sucrose and glycerol at different temperatures. *Scientia. Agricola*, **73**(5), 429-433. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-9016-2015-0196>.

- Obruca, S., Benesova, P., Marsalek, L., Marova, I., (2015). Use of Lignocellulosic Materials for PHA Production. *Chem. Biochem. Eng. Q.*, **29**(2), 135–144. doi: 10.15255/CABEQ.2014.2253.
- Onipe, O.O., Jideani A.I.O., Beswa, D., (2015). Composition and functionality of wheat bran and its application in some cereal food products. *International Journal of Food Science and Technology*, **50**, 2509–2518.
- Polyhydroxyalkanoate (PHA) Market. <<https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/pha-market-395.html>>, τελευταία επίσκεψη: 02/02/2020.
- Pradella, J.G.C., Taciro, M.K., Mateus, A.Y.P., (2010). High-cell-density poly (3-hydroxybutyrate) production from sucrose using *Burkholderia sacchari* culture in airlift bioreactor. *Bioresource Technology*, **101**, 8355–8360. doi:10.1016/j.biortech.2010.05.046.
- Prückler, M., Siebenhandl-Ehn, S., Apprich, S., Höltinger, S., Haas, C., Schmid, E., Kneifel, W., (2014). Wheat bran-based biorefinery 1: Composition of wheat bran and strategies of functionalization. *LWT - Food Science and Technology*, **56**, 211-221. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.12.004>.
- Ramadas, N.V., Singh, S.K., Soccol, C.R., Pandey, A., (2009). Polyhydroxybutyrate Production using Agro-industrial Residue as Substrate by *Bacillus sphaericus* NCIM 5149. *Braz.Arch. Biol. Technol.*, **52**(1), 17-23.
- Raposo, R.S., de Almeida, M.C., da Fonseca, M.M., Cesario, M.T., (2017). Feeding strategies for tuning Poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) monomeric composition and productivity using *Burkholderia sacchari*. *International Journal of Biological Macromolecules*, **105**(1), 825-833. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.111>.
- Raposo, R.S., de Almeida, M.C., de Oliveira, M.D., da Fonseca, M.M., Cesario, M.T., (2016). A *Burkholderia sacchari* cell factory: production of poly-3-hydroxybutyrate, xylitol and xylonic acid from xylose-rich sugar mixtures. *New Biotechnology*, **34**, 12-22. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.10.001>.
- Raza, Z.A., Abid, S., Banat, I.M., (2018). Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **126**, 45–56. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.10.001>.

- Riis, V., Mai, W., (1988). Gas chromatographic determination of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis. *Journal of Chromatography*, **445**, 285-289.
- Rodríguez-Contreras, A., Koller, M., Dias M.M.S., Calafell-Monfort, M., Braunegg, G., Marqués-Calvo, M.S., (2015). Influence of glycerol on poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* and *Burkholderia sacchari*. *Biochemical Engineering Journal*, **94**, 50-57. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.11.007>.
- Saharan, B.S., Grewal, A., Kumar, P., (2014). Biotechnological Production of Polyhydroxyalkanoates: A Review on Trends and Latest Developments. *Chinese Journal of Biology*, Review article. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/802984>.
- Sanguanchaipaiwong, V., (2006). Biosynthesis and Characterization of Polyhydroxyalkanoate Based Natural-Synthetic Hybrid Copolymers. PhD Thesis, University of New South Wales, Sydney, Australia.
- Shen, L., Haufe, J., Patel, M.K., (2009). Product overview and market projection of emerging bio-based plastics. PRO-BIP 2009 final report, *European Polysaccharide Network of Excellence and European Bioplastics*, Utrecht, The Netherlands.
- Silva, L.F., Taciro, M.K., Michelin Ramos, M.E., Carter, J.M., Pradella, J.G.C., Gomez, J.G.C., (2004). Poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) production by bacteria from xylose, glucose and sugarcane bagasse hydrolysate. *J Ind Microbiol Biotechnol*, **31**, 245–254. DOI 10.1007/s10295-004-0136-7.
- Sudesh, K., Abe, H., Doi, Y., (2000). Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Prog. Polym. Sci.*, **25**, 1503 – 1555.
- Tembadmani, K., Shankar, A., D'Souza, S., Narvekar, M., Rao, P., (2015). Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHA) from novel sources: A Review. *International Journal of Research in Biosciences*, **4(4)**, 16-28.
- Thomas, L., Larroche, C., Pandey, A., (2013). Current developments in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, **81**, 146–161.
- Tsakona, S., Kopsahelis, N., Chatzifragkou, A., Papanikolaou, S., Kookos, I.K., Koutinas, A.A., (2014). Formulation of fermentation media from flour-rich waste streams for microbial lipid production by *Lipomyces starkeyi*. *Journal of Biotechnology*, **189**, 36-45. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.08.011>.

- Tsakona, S., Skiadaresis, A.G., Kopsahelis, N., Chatzifragkou, A., Papanikolaou, S., Kookos, I.K., Koutinas, A.A., (2015). Valorisation of side streams from wheat milling and confectionery industries for consolidated production and extraction of microbial lipids. *Food Chemistry*, **198**, 85-92. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.031>.
- Verlinden, R.A.J., Hill, D.J., Kenward, M.A., Williams, C.D., Radecka, I., (2007). Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology*, **102**, 1437–1449. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03335.x .
- Waters, B.R., (2007). Molecular Weight Modulation in Polyhydroxybutyrate Fermentations. Doctor of Philosophy, Massachusetts Institute of Technology, Massachusetts, U.S.A.
- Xu, Y., Wang, R.H., Koutinas, A.A., Webb, C., (2010). Microbial biodegradable plastic production from a wheat-based biorefining strategy. *Process Biochemistry*, **45**, 153–163. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.09.001>.
- Yamane, T., (1992). Yield of Poly-D(-)-3-Hydroxybutyrate from Various Carbon Sources: A Theoretical Study. *Biotechnology and Bioengineering*, **41**, 165-170.
- Σαμαρίδου, Ε., (2012). Κλωνοποίηση και μελέτη ενζύμων της βιοσυνθετικής οδού των πολυ-υδροξυαλκανοϊκών οξέων (PHAs) του βακτηρίου *Thermus thermophilus* HB8. Μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία, *Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης*, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα.
- Παπανεοφύτου, Χ.Φ., 2008. Μελέτη ρύθμισης της παραγωγής και της δομής πολυμερών στο βακτήριο *Thermus thermophilus*: νανοτεχνολογικές εφαρμογές. Διδακτορική διατριβή, *Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης*, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα.
- Πενλόγλου, Ι.Σ., (2010). Μικροβιακή Παραγωγή του Βιοαποικοδομήσιμου Πολύ(3-υδροξυ βουτυρικού) Εστέρα (PHB) με Στοχευμένες Μοριακές Ιδιότητες: Πειραματική Βελτιστοποίηση και Μαθηματική Προσομοίωση. Διδακτορική διατριβή, *Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης*, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα.
- Χατζάκης, Ι., (2016). Βιοπλαστικά: Υλικά, αγορές και διαχείριση. Διπλωματική εργασία, *Α.Ε.Ι Πειραιά*, Αθήνα, Ελλάδα. Βιοπλαστικά.