



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ & ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μελέτη της παραγωγής πολυ(3-υδροξυ-βουτυρικού) εστέρα μέσω
μικροβιακών ζυμώσεων με χρήση του *Azohydromonas lata*

Γεωργία-Αγγελική Κ. Κοσμοπούλου

Επιβλέπων καθηγητής:

Απόστολος Κουτίνας, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ

2022

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ & ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μελέτη της παραγωγής πολυ(3-υδροξυ-βουτυρικού) εστέρα μέσω
μικροβιακών ζυμώσεων με χρήση του *Azohydromonas lata*

“Study of poly(3-hydroxy-butyrates) production through microbial
fermentations using *Azohydromonas lata*”

Γεωργία-Αγγελική Κ. Κοσμοπούλου

Εξεταστική επιτροπή:

Απόστολος Κουτίνας, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Σεραφείμ Παπανικολάου, Καθηγητής ΓΠΑ

Θεοφανία Τσιρώνη, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ

Μελέτη της παραγωγής πολυ(3-υδροξυ-βουτυρικού) εστέρα μέσω μικροβιακών ζυμώσεων με χρήση του *Azohydromonas lata*

ΠΜΣ Επιστήμη & Τεχνολογία Τροφίμων

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου

Εργαστήριο Μηχανικής & Επεξεργασίας Τροφίμων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην εποχή μας -περισσότερο από ποτέ- διακυβεύεται το μέλλον του πλανήτη σε επίπεδο διαθεσιμότητας αποθεμάτων ενέργειας, αλλά και όσον αφορά την κλιματική αλλαγή, που ήδη έχει αρχίσει να υφίσταται ορατά. Η επιστημονική κοινότητα καλείται, αν μη τι άλλο να συνδράμει, ανοίγοντας και εδραιώνοντας το δρόμο προς την αιεφόρα ανάπτυξη, την κυκλική οικονομία και τη χρήση ανανεώσιμων πηγών ενέργειας και πρώτων υλών, ώστε η ανθρώπινη δραστηριότητα να είναι όσο το δυνατόν λιγότερο επιζήμια για το φυσικό περιβάλλον. Στον αντίποδα, ένα μείζον πρόβλημα των ημερών μας είναι η υπέρογκη παραγωγή οργανικών αποβλήτων, τα οποία επιβαρύνουν σημαντικά την ήδη υπάρχουσα κατάσταση. Με το βλέμμα στραμμένο προς αυτή την κατεύθυνση και στόχο την πράσινη ανάπτυξη, η αξιοποίηση αποβλήτων προς παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας και συνάμα φιλικών προς το περιβάλλον, όπως τα βιοπλαστικά, αποτελεί την επιτομή της συμβολής της επιστήμης δίνοντας ταυτόχρονη λύση σε δύο από τα βασικότερα ζητήματα που απασχολούν την επικαιρότητα.

Στην παρούσα μελέτη αξιοποιήθηκαν διάφορα χαμηλού κόστους εμπορικά σάκχαρα καθώς και εκχύλισμα ελεύθερων σακχάρων αποβλήτων φρούτων και υδρόλυμα πιτύρου σίτου, για την βιοτεχνολογική παραγωγή πολυ(3-υδροξυ-βουτυρικού) εστέρα (PHB), μέσω μικροβιακών ζυμώσεων. Ο μικροοργανισμός που χρησιμοποιήθηκε ήταν το βακτηριακό στέλεχος *A. lata* DSM 1123 και αξιολογήθηκε ως προς την ικανότητά του να αναπτύσσεται στα συγκεκριμένα υποστρώματα και να συσσωρεύει ενδοκυτταρικά τον εν λόγω πολυεστέρα. Η μεγαλύτερη τιμή παραγωγής ξηρής βιομάζας ήταν 44,7 g/L με συσσώρευση PHB σε ποσοστό 54,7%, κατά την ημι-συνεχή ζύμωση με ελεύθερα σάκχαρα αποβλήτων φρούτων, ως πηγή άνθρακα. Επιπλέον, σε ημι-συνεχείς ζυμώσεις με ελεύθερα σάκχαρα αποβλήτων φρούτων και υδρόλυμα πιτύρου σίτου, ως πηγές άνθρακα, σημειώθηκε υψηλή παραγωγικότητα PHB της τάξης των 0,70 και 0,51 g/L/h, αντίστοιχα.

Επιστημονική περιοχή: Αξιοποίηση αποβλήτων βιομηχανιών τροφίμων

Λέξεις κλειδιά: Αξιοποίηση αποβλήτων, απόβλητα φρούτων, υδρόλυμα πιτύρου σίτου, PHAs, PHB, μικροβιακές ζυμώσεις

Study of poly(3-hydroxy-butyrates) production through microbial fermentations using *Azohydromonas lata*

MSc Food Science & Technology
Department of Food Science & Human Nutrition
Laboratory of Food Processing & Engineering

ABSTRACT

In our time - more than ever before - the future of the planet is at stake, in terms of the availability of energy reserves, but also in terms of climate change, which has already begun to visibly occur. The scientific community is called to help by opening and consolidating the way to sustainable development, circular economy and utilization of renewable energy sources and raw materials, so that human activity is as little harmful as possible to the natural environment. On the contrary, a major problem nowadays is the excessive production of organic waste, which significantly burdens the already existing situation. With the eye turned in this direction and the goal of green development, the waste valorization to produce value-added and environmentally friendly products, such as bioplastics, is the epitome of the contribution of science, providing a simultaneous solution to two of the most basic issues that concern the current affairs.

In the present study, various commercial low-cost sugars, as well as fruit waste derived free sugar extract and wheat bran hydrolyzate were valorized for the biotechnological production of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB), via microbial fermentation. The microorganism used was the bacterial strain *A. lata* DSM 1123 and was evaluated as far as its capability to grow on the specific substrates and accumulate the PHB is concerned. The highest dry biomass production value was 44.7 g/L with PHB accumulation at 54.7%, during fed-batch fermentation with fruit waste free sugars as carbon source. Furthermore, in fed-batch cultures with fruit waste derived free sugars and wheat bran hydrolyzate as carbon sources, important PHB productivity of 0.70 and 0.51 g/L/h, respectively, was noted.

Scientific area: Food waste valorization

Keywords: Waste valorization, fruit waste, wheat bran hydrolysate, PHAs, PHB, microbial fermentation

Πνευματικά δικαιώματα

Copyright © Γεωργία-Αγγελική Κοσμοπούλου, 2022

Με την άδειά μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της

Στους γονείς μου

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη διεκπεραιώθηκε στο Εργαστήριο Μηχανικής και Επεξεργασίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου: Επεξεργασία, Συντήρηση και Βιοτεχνολογικές Διεργασίες Τροφίμων – Ανάπτυξη Προϊόντων Βιο-οικονομίας».

Ολοκληρώνοντας τον κύκλο των μεταπτυχιακών μου σπουδών, αισθάνομαι την ανάγκη και την υποχρέωση να ευχαριστήσω ειλικρινά τον Αναπληρωτή Καθηγητή κο Κουτίνα Απόστολο, ως επιβλέποντα της μεταπτυχιακής μου μελέτης, για την εποικοδομητική συνεργασία, μέσω της ανάθεσης της, καθώς και για την καθοδήγηση και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κο Παπανικολάου Σεραφείμ και την Επίκουρη Καθηγήτρια κα Τσιρώνη Θεοφανία για τη συμμετοχή τους στην τριμελή εξεταστική επιτροπή.

Ένα μεγάλο «ευχαριστώ» θα ήθελα επίσης να πω, στην Υποψήφια διδάκτορα Ψάκη Όλγα για την αμέριστη βοήθεια και στήριξη που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια της παρούσας μελέτης, καθώς επίσης και στον Μεταδιδάκτορα ερευνητή Λαδάκη Δημήτριο για την αρωγή του οποτεδήποτε τη χρειάστηκα και την καταλυτική συμβολή του στην ολοκλήρωση τη εργασίας. Δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω ξεχωριστά και ιδιαιτέρως όλο το υπόλοιπο δυναμικό του εργαστηρίου, που ο καθένας εξ' αυτών ήταν διαθέσιμος προς επίλυση αποριών και προσφορά κάθε είδους βοήθειας.

Τέλος, χρωστάω θερμές ευχαριστίες σε υλικό και πνευματικό επίπεδο στους γονείς μου, οι οποίοι μου έδειξαν από κοινού το δρόμο προς την πρόοδο και την επίτευξη των στόχων μου, αλλά και στα αγαπημένα μου πρόσωπα, που υπομονετικά στάθηκαν δίπλα μου και με εμπύχωναν, όποτε το είχα ανάγκη στη διάρκεια του δεύτερου αυτού κύκλου σπουδών μου.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ.....	vi
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	viii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	ix
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ	xii
ΑΠΟΔΟΣΗ ΟΡΩΝ	xv
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1. Συμβατικά πετροχημικά πλαστικά	2
1.2. Βιοπολυμερή - Βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά	6
1.3. Πολυ(ύδροξυ αλκανοϊκοί) εστέρες (PHAs)	9
1.3.1. Μεταβολικές οδοί βιοσύνθεσης PHAs	12
1.3.2. Βακτηριακό στέλεχος <i>Azohydromonas lata</i>	13
1.3.3. Ιδιότητες των PHAs.....	15
1.3.4. Εφαρμογές PHAs.....	17
1.3.5. Βιοαποικοδόμηση των PHAs.....	18
1.3.6. Πολυ(3-υδροξυ-βουτυρικός) εστέρας (PHB)	19
1.4. Αγροβιομηχανικά απόβλητα ως υπόστρωμα παραγωγής PHB μέσω βακτηριακών ζυμώσεων.....	22
1.4.1. Απόβλητα φρούτων.....	23
1.4.2. Απόβλητα πιτύρου σίτου	25
2. ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	27
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	28
3.1. Βιολογικό υλικό	28
3.2. Σύσταση πηγής άνθρακα	28
3.3. Παρασκευή υγρού εμβολίου	29
3.4. Θρεπτικό μέσο και συνθήκες ζυμώσεων για την παραγωγή PHB σε κωνικές φιάλες	29
3.5. Θρεπτικό μέσο για την παραγωγή PHB σε βιοαντιδραστήρα	31
3.6. Αποστείρωση υλικών	32

4.	ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	34
4.1.	Ποσοτικός προσδιορισμός ξηρής μάζας κυττάρων.....	34
4.2.	Προσδιορισμός συγκέντρωσης σακχάρων.....	34
4.3.	Προσδιορισμός συγκέντρωσης αζώτου ελεύθερων αμινομάδων – Free Amino Nitrogen (FAN).....	35
4.4.	Προσδιορισμός συγκέντρωσης αμμωνιακών αλάτων - Inorganic Nitrogen.....	38
4.5.	Προσδιορισμός συγκέντρωσης φωσφορικών αλάτων – Inorganic Phosphorus (IP)	40
4.6.	Ποσοτικός προσδιορισμός ενδοκυττάρου PHB.....	41
5.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	43
5.1.	Ασυνεχείς ζυμώσεις σε κωνικές φιάλες για την παραγωγή PHB	43
5.1.1.	<i>Κινητική εμβολίου του βακτηρίου A. lata.....</i>	<i>43</i>
5.1.2.	<i>Ασυνεχείς ζυμώσεις με το βακτηριακό στέλεχος A. lata με διαφορετικά σάκχαρα ως πηγή άνθρακα</i>	<i>45</i>
5.1.3.	<i>Ασυνεχείς ζυμώσεις με υδρόλυμα πιτύρου ως πηγή άνθρακα</i>	<i>58</i>
5.1.4.	<i>Ασυνεχείς ζυμώσεις με ελεύθερα σάκχαρα ως πηγή άνθρακα.....</i>	<i>61</i>
5.2.	Ημι-συνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα.....	67
5.2.1.	<i>Ημι-συνεχής ζύμωση με εκχύλισμα ελεύθερων σακχάρων αποβλήτων φρούτων ως πηγή άνθρακα</i>	<i>67</i>
5.2.2.	<i>Ημι-συνεχής ζύμωση με υδρόλυμα πιτύρου σίτου ως πηγή άνθρακα</i>	<i>70</i>
6.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	74
7.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	76

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Ενδεικτικό εύρος τιμών για κάποιες εκ των τυπικών ιδιοτήτων των PHAs [Πηγή: Bugnicourt et al., 2014].	16
Πίνακας 2. Σύγκριση φυσικών ιδιοτήτων του PHB με τις αντίστοιχες, συμβατικών πολυμερών [Πηγή: Τροποποιημένο από Manikandan et al., 2020].....	22
Πίνακας 3. Σύσταση διαφόρων ενδεικτικών αποβλήτων φρούτων (ανά 100 g αποβλήτου) [Πηγή: Joshi et al., 2012]......	24
Πίνακας 4. Ενδεικτική σύσταση του πίτυρου σίτου [Πηγή: Apprich et al., 2014].....	26
Πίνακας 5. Σύσταση ελεύθερων σακχάρων από φρούτα και υδρόλυμα πίτυρου σίτου.	28
Πίνακας 6. Σύσταση κυρίως καλλιέργειας για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού <i>A. lata</i>	30
Πίνακας 7. Σύσταση διαλύματος τροφοδοσίας στις ημισυνεχείς ζυμώσεις σε βιοαντιδραστήρα.....	32
Πίνακας 8. Συνοπτικά αποτελέσματα ασυνεχών ζυμώσεων με τον μικροοργανισμό <i>A. lata</i> DSM 1123, σε κωνικές φιάλες με διαφορετικές πηγές άνθρακα για την παραγωγή PHB.....	47
Πίνακας 9. Βιβλιογραφική ανασκόπηση ζυμώσεων με τον μικροοργανισμό <i>A. lata</i> , DSM 1123 σε κωνικές φιάλες με διαφορετικές πηγές άνθρακα για την παραγωγή PHB.	66
Πίνακας 10. Συνοπτικά αποτελέσματα ημι-συνεχών ζυμώσεων με τον μικροοργανισμό <i>A. lata</i> DSM 1123, σε βιοαντιδραστήρα για την παραγωγή PHB.	67
Πίνακας 11. Βιβλιογραφική ανασκόπηση ζυμώσεων με τον μικροοργανισμό <i>A. lata</i> , σε βιοαντιδραστήρα, με διαφορετικές πηγές άνθρακα για την παραγωγή PHB.	73

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.α. Τεράστιος όγκος πλαστικών σε χώρο εναπόθεσης απορριμμάτων στις Μαλδίβες [Πηγή: Kaza et al., 2018], β. Μπλε ίνα πλαστικού στο εσωτερικό θαλάσσιου ζωοπλαγκτού [Πηγή: The Guardian].	1
Εικόνα 2. Παγκόσμια παραγωγή πλαστικών ετησίως (σε εκατομμύρια τόνους) [Πηγή: Tiseo, 2022].	2
Εικόνα 3. Απεικόνιση των κυριότερων πλαστικών και τα υλικά, που παρασκευάζονται μέσω αυτών καθώς και της ποσοστιαίας ετήσιας παραγωγής του καθενός, για το έτος 2015, σύμφωνα με στοιχεία της Ευρωπαϊκής Επιτροπής [Πηγή: Caterbow & Speranskaya, 2019].	3
Εικόνα 4. Συντακτικός τύπος των μονομερών από τα κυρίως χρησιμοποιούμενα πλαστικά παγκοσμίως	4
Εικόνα 5. Ταξινόμηση βιογενών και βιοδιασπώμενων πολυμερών [Πηγή: Bugnicourt et al., 2014].	7
Εικόνα 6. Διάσπαση πολυμερών υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες [Πηγή: Mohan, 2011].	8
Εικόνα 7. Γενικός συντακτικός τύπος PHAs [Πηγή: Ojumu et al., 2004].	10
Εικόνα 8. Φωτογραφία Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας (Transmission Electron Microscopy - TEM) κυττάρων του στελέχους <i>Alcaligenes eutrophus</i> , με κόκκους PHB με συσσώρευση σε ποσοστό πάνω από 80% επί της ξηρής μάζας. Η μπάρα εκτείνεται σε μήκος 2μm [Πηγή: Xu et al., 2010].	11
Εικόνα 9. Εναλλακτικές μεταβολικές οδοί βιοσύνθεσης PHAs	13
Εικόνα 10. α. Μικροσκοπική παρατήρηση κυττάρων του βακτηριακού στελέχους <i>A. lata</i> DSM 1123 σε οπτικό μικροσκόπιο (μεγέθυνση x100), σε διαμόρφωση αλυσίδας. Τα μαύρα στίγματα εντός των κυττάρων είναι το πολυμερές PHB που έχει συσσωρευτεί σε αυτά [Εργαστήριο Μηχανικής & Επεξεργασίας Τροφίμων, ΓΠΑ]. β. Ηλεκτρονική μικρογραφία μεμονωμένου κυττάρου του βακτηριακού στελέχους <i>A. lata</i> ATCC 29712 (μεγέθυνση x30.000), ύστερα από φωσφοβολφραμική χρώση [Πηγή: Palleroni & Palleroni, 1978].	14
Εικόνα 11. Αποικίες του βακτηριακού στελέχους <i>A. lata</i> ATCC 29712 (μεγέθυνση x10), ύστερα από επώαση 1 εβδομάδας σε στερεό θρεπτικό μέσο ιχνοστοιχείων, υπό θερμοκρασία 30 °C [Πηγή: Palleroni & Palleroni, 1978].	15

Εικόνα 12. Διάφορες εφαρμογές των PHAs [Πηγή: τροποποιημένο από Choi et al., 2020].	18
Εικόνα 13. Αξιοποίηση των αποβλήτων φρούτων και παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας για τις βιομηχανίες τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών [Πηγή: Jiménez-Moreno et al., 2019].	25
Εικόνα 14. Απεικόνιση της δομής του κόκκου σιταριού, αποτελούμενου από το ενδοσπέρμιο, το φύτρο και τα εξωτερικά στρώματα, που συνιστούν το πίτυρο [Πηγή: Onipe et al., 2015].	26
Εικόνα 15. Καλλιέργειες σε κωνικές φιάλες με το βακτηριακό στέλεχος <i>A. lata</i> DSM 1123 σε κωνικές φιάλες α. με πηγή άνθρακα την εμπορική σακχαρόζη και β. σε υπόστρωμα υδρολύματος πιτύρου σίτου [Εργαστήριο Μηχανικής & Επεξεργασίας Τροφίμων, ΓΠΑ].	30
Εικόνα 16. Διάταξη ημι-συνεχούς ζύμωσης σε βιοαντιδραστήρα με στο βακτηριακό στέλεχος <i>A. lata</i> DSM 1123, σε υπόστρωμα αποβλήτων φρούτων [Εργαστήριο Μηχανικής & Επεξεργασίας Τροφίμων, ΓΠΑ].	31
Εικόνα 17. α. Αποστείρωση εκχυλίσματος ελεύθερων σακχάρων αποβλήτων φρούτων και β. υδρολύματος πιτύρου σίτου, με τη χρήση φίλτρου.	33
Εικόνα 18. Στάδια αντίδρασης της νινυδρίνης με το άζωτο ελεύθερων αμινομάδων και σχηματισμός χρωμοφόρου συμπλόκου νινυδρίνης, κατά τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης αζώτου ελεύθερων αμινομάδων.	36
Εικόνα 19. Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης της μεθόδου και εξίσωση ποσοτικοποίησης FAN (mg/L) με χρήση προτύπου διαλύματος του αμινοξέος γλυκίνη. Η γραμμική συσχέτιση έγινε με βάση το γραμμικό μοντέλο, με συντελεστή γραμμικής παλινδρόμησης $R^2=0,9997$.	37
Εικόνα 20. Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης της μεθόδου και εξίσωση ποσοτικοποίησης αμμωνιακού αζώτου (mg N/L) με χρήση προτύπου διαλύματος του θεικού αμμωνίου. Η γραμμική συσχέτιση έγινε με βάση το γραμμικό μοντέλο, με συντελεστή γραμμικής παλινδρόμησης $R^2= 0,9945$.	39
Εικόνα 21. Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης της μεθόδου και εξίσωση ποσοτικοποίησης IP (mg/L) με χρήση διαλυμάτων γνωστών συγκεντρώσεων IP. Η γραμμική συσχέτιση έγινε με βάση το γραμμικό μοντέλο, με συντελεστή γραμμικής παλινδρόμησης $R^2= 0,9982$.	41
Εικόνα 22. Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης της μεθόδου και εξίσωση ποσοτικοποίησης PHB (mg) με χρήση βενζοϊκού οξέος, ως εσωτερικό πρότυπο. Η	

γραμμική συσχέτιση έγινε με βάση το γραμμικό μοντέλο, με συντελεστή γραμμικής παλινδρόμησης $R^2 = 0,9999$42

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

- Γράφημα 1 .α.** Κινητική ανάπτυξης υγρού εμβολίου με το **θεραπευτικό μέσο Α** .
Κατανάλωση γλυκόζης (■), FAN (▲), Ανόργανος φώσφορος IP (●), **β.** παραγωγή βιομάζας (◆), οπτική πυκνότητα (○).44
- Γράφημα 2.α.** Κινητική ανάπτυξης υγρού εμβολίου με το **θεραπευτικό μέσο Β** .
Κατανάλωση γλυκόζης (■), FAN (▲), Ανόργανος φώσφορος IP (●), **2.β** παραγωγή βιομάζας (◆), οπτική πυκνότητα (○).45
- Γράφημα 3.** Κατανάλωση σακχάρων (●), FAN (x), IP (◇), ανόργανου αζώτου (Δ), παραγωγή βιομάζας (□) και ενδοκυτταρική συσσώρευση PHB (▲) κατά τη διάρκεια ασυνεχούς ζύμωσης σε κωνικές φιάλες με τον μικροοργανισμό *A. lata*, σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα την εμπορική σακχαρόζη.48
- Γράφημα 4.** Κινητική παραγωγής βιομάζας (□), υπολειπόμενης βιομάζας (ο) και PHB (Δ) του μικροοργανισμού *A. lata*, σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα την εμπορική σακχαρόζη.....49
- Γράφημα 5.** Κατανάλωση σακχάρων (●), FAN (x), IP (◇), ανόργανου αζώτου (Δ), παραγωγή βιομάζας (□) και ενδοκυτταρική συσσώρευση PHB (▲) κατά τη διάρκεια ασυνεχούς ζύμωσης σε κωνικές φιάλες με τον μικροοργανισμό *A. lata*, σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα την εμπορική γλυκόζη.....50
- Γράφημα 6.** Κινητική παραγωγής βιομάζας (□), υπολειπόμενης βιομάζας (ο) και PHB (Δ) του μικροοργανισμού *A. lata*, σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα την εμπορική γλυκόζη.51
- Γράφημα 7.** Κατανάλωση σακχάρων (●), FAN (x), IP (◇), ανόργανου αζώτου (Δ), παραγωγή βιομάζας (□) και ενδοκυτταρική συσσώρευση PHB (▲) κατά τη διάρκεια ασυνεχούς ζύμωσης σε κωνικές φιάλες με τον μικροοργανισμό *A. lata*, σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα την εμπορική φρουκτόζη.....52
- Γράφημα 8.** Κινητική παραγωγής βιομάζας (□), υπολειπόμενης βιομάζας (ο) και PHB (Δ) του μικροοργανισμού *A. lata*, σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα την εμπορική φρουκτόζη.....53
- Γράφημα 9.** Κατανάλωση σακχάρων (●), FAN (x), IP (◇), ανόργανου αζώτου (Δ), παραγωγή βιομάζας (□) και ενδοκυτταρική συσσώρευση PHB (▲) κατά τη διάρκεια ασυνεχούς σε κωνικές φιάλες με τον μικροοργανισμό *A. lata*, σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα την εμπορική μαννόζη.54

Γράφημα 10. Κινητική παραγωγής βιομάζας (□), υπολειπόμενης βιομάζας (ο) και PHB (Δ) του μικροοργανισμού <i>A. lata</i> , σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα την εμπορική μαννόζη.....	55
Γράφημα 11. Κατανάλωση σακχάρων (●), FAN (x), IP (◇), ανόργανου αζώτου (Δ), παραγωγή βιομάζας (□) κατά τη διάρκεια ασυνεχούς ζύμωσης σε κωνικές φιάλες με τον μικροοργανισμό <i>A. lata</i> , σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα την εμπορική γαλακτόζη.....	56
Γράφημα 12. Κατανάλωση σακχάρων (●), FAN (x), IP (◇), ανόργανου αζώτου (Δ), παραγωγή βιομάζας (□) κατά τη διάρκεια ασυνεχούς ζύμωσης σε κωνικές φιάλες με τον μικροοργανισμό <i>A. lata</i> , σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα την εμπορική αραβινόζη.....	57
Γράφημα 13. Κατανάλωση σακχάρων (●), FAN (x), IP (◇), ανόργανου αζώτου (Δ), παραγωγή βιομάζας (□) κατά τη διάρκεια ασυνεχούς ζύμωσης σε κωνικές φιάλες με τον μικροοργανισμό <i>A. lata</i> , σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα την εμπορική ξυλόζη.....	58
Γράφημα 14. Κατανάλωση σακχάρων (●), FAN (x), IP (◇), παραγωγή βιομάζας (□) και ενδοκυτταρική συσσώρευση PHB (▲) κατά τη διάρκεια ασυνεχούς ζύμωσης σε κωνικές φιάλες με τον μικροοργανισμό <i>A. lata</i> , σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα το υδρόλυμα πιτύρου σίτου, αρχικής συγκέντρωσης 15,5 g/L	59
Γράφημα 15. Κατανάλωση γλυκόζης (●), ξυλόζης (□) και αραβινόζης (x), κατά τη διάρκεια ασυνεχούς ζύμωσης σε κωνικές φιάλες με τον μικροοργανισμό <i>A. lata</i> , σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα το υδρόλυμα πιτύρου σίτου.....	60
Γράφημα 16. Κινητική παραγωγής βιομάζας (□), υπολειπόμενης βιομάζας (ο) και PHB (Δ) του μικροοργανισμού <i>A. lata</i> , σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα το υδρόλυμα πιτύρου σίτου, αρχικής συγκέντρωσης 15,5 g/L.	60
Γράφημα 17. Κατανάλωση σακχάρων (●), FAN (x), IP (◇), ανόργανου αζώτου (Δ), παραγωγή βιομάζας (□) και ενδοκυτταρική συσσώρευση PHB (▲) κατά τη διάρκεια ασυνεχούς ζύμωσης σε κωνικές φιάλες με τον μικροοργανισμό <i>A. lata</i> , σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα το εκχύλισμα ελεύθερων σακχάρων αποβλήτων φρούτων, αρχικής συγκέντρωσης 20 g/L.	62
Γράφημα 18. Κατανάλωση φρουκτόζης (ο), γλυκόζης (□) και σακχαρόζης (x), κατά τη διάρκεια ασυνεχούς ζύμωσης σε κωνικές φιάλες με τον μικροοργανισμό <i>A. lata</i> , σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα το εκχύλισμα ελεύθερων σακχάρων αποβλήτων φρούτων, αρχικής συγκέντρωσης 20 g/L.....	63

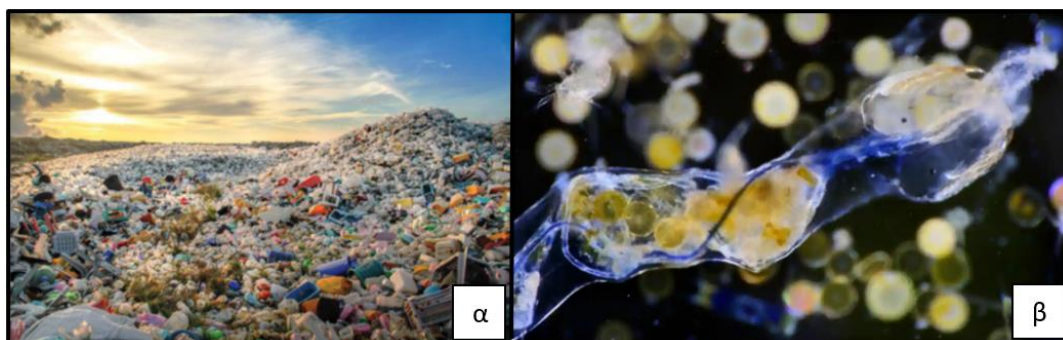
Γράφημα 19. Κινητική παραγωγής βιομάζας (□), υπολειπόμενης βιομάζας (ο) και PHB (Δ) του μικροοργανισμού <i>A. lata</i> , σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα το εκχύλισμα ελεύθερων σακχάρων αποβλήτων φρούτων, αρχικής συγκέντρωσης 20 g/L.	63
Γράφημα 20. Κατανάλωση σακχάρων (●), FAN (x), IP (◇), ανόργανου αζώτου (Δ), παραγωγή βιομάζας (□) κατά τη διάρκεια ασυνεχούς ζύμωσης σε κωνικές φιάλες με τον μικροοργανισμό <i>A. lata</i> , σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα το εκχύλισμα ελεύθερων σακχάρων αποβλήτων φρούτων, αρχικής συγκέντρωσης 60 g/L.....	64
Γράφημα 21. Κατανάλωση σακχάρων (●), FAN (x), IP (◇), ανόργανου αζώτου (Δ), παραγωγή βιομάζας (□) κατά τη διάρκεια ασυνεχούς ζύμωσης σε κωνικές φιάλες με τον μικροοργανισμό <i>A. lata</i> , σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα το εκχύλισμα ελεύθερων σακχάρων αποβλήτων φρούτων, αρχικής συγκέντρωσης 40 g/L.....	65
Γράφημα 22. Κινητική παραγωγής ξηρής βιομάζας (□) και PHB (Δ) και κατανάλωσης σακχάρων (●), IP (◇), και ανόργανου αζώτου (Δ), σε συνάρτηση με το χρόνο, κατά τη διάρκεια ημι-συνεχούς ζύμωσης σε βιοαντιδραστήρα, με το μικροοργανισμό <i>A. lata</i> , με ελευθέρως σάκχαρα από φρούτα ως πηγή άνθρακα.	69
Γράφημα 23. Κινητική παραγωγής ξηρής βιομάζας (□), υπολειπόμενης βιομάζας (ο) και PHB (Δ) με ελευθέρως σάκχαρα από φρούτα ως πηγή άνθρακα σε συνάρτηση με το χρόνο, σε συνάρτηση με το χρόνο, κατά τη διάρκεια ημι-συνεχούς ζύμωσης σε βιοαντιδραστήρα, με το μικροοργανισμό <i>A. lata</i> , με ελευθέρως σάκχαρα από φρούτα ως πηγή άνθρακα.....	69
Γράφημα 24. Κινητική παραγωγής ξηρής βιομάζας (□), PHB (Δ) και κατανάλωσης σακχάρων (●), IP (◇), FAN (x) και ανόργανου αζώτου (Δ), σε συνάρτηση με το χρόνο, κατά τη διάρκεια ημι-συνεχούς ζύμωσης με τον μικροοργανισμό <i>A. lata</i> , σε βιοαντιδραστήρα, σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα υδρόλυμα πιτύρου σίτου.	72
Γράφημα 25. Κινητική κατανάλωσης γλυκόζης (ο), ξυλόζης (□), αραβινόζης (x) σε συνάρτηση με το χρόνο, κατά τη διάρκεια ημι-συνεχούς ζύμωσης με τον μικροοργανισμό <i>A. lata</i> , σε βιοαντιδραστήρα, σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα υδρόλυμα πιτύρου σίτου.	72

ΑΠΟΔΟΣΗ ΟΡΩΝ

PVC	Πολυ-βίνυλο χλωρίδιο
PP	Πολυ-προπυλένιο
PET	Τερεφθαλικό πολυ-αιθυλένιο
PS	Πολυ-στυρένιο
HDPE	Υψηλής πυκνότητας πολύ-αιθυλένιο
LDPE	Χαμηλής πυκνότητας πολύ-αιθυλένιο
PLA	Πολυ-γαλακτικό οξύ
PHAs	Πολυ(ύδροξυ-αλκανοϊκοί) εστέρες
PHB	Πολυ(3-υδροξυ-βουτυρικός) εστέρας
scl PHAs	Πολυ(ύδροξυ-αλκανοϊκοί) εστέρες μικρής αλύσεως
mcl PHAs	Πολυ(ύδροξυ-αλκανοϊκοί) εστέρες μεσαίας αλύσεως
lcl PHAs	Πολυ(ύδροξυ-αλκανοϊκοί) εστέρες μακράς αλύσεως
P(4HB)	Πολυ(4-ύδροξυ βουτυρικός) εστέρας
P(3HV)	Πολυ(3-ύδροξυ βαλερικός) εστέρας
P(3HB-co-3HV)	Πολυ(3-ύδροξυ βουτυρικός-4-ύδροξυ βαλερικός) εστέρας
P(3HHX)	Πολυ(3-ύδροξυ εξανοϊκός) εστέρας
P(3HO)	Πολυ(3-ύδροξυ οκτανοϊκός) εστέρας
TCA	Κύκλος των τρικαρβοξυλικών οξέων
ACP	Πρωτεΐνη μεταφοράς ακυλομάδας (Acyl carrier protein)
DCW	Ξηρή βιομάζα (Dry Cell Weight)
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
GC	Gas Chromatography

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

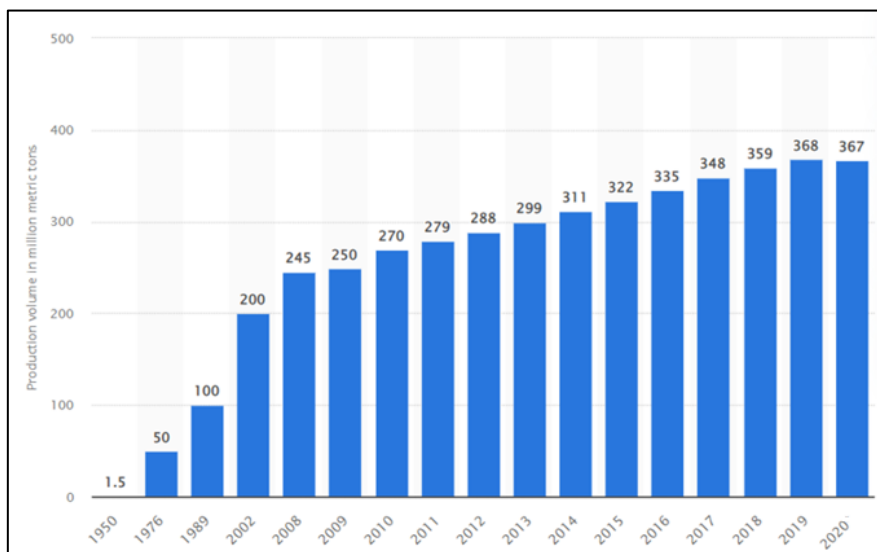
Η παραγωγή αποβλήτων παγκοσμίως βαίνει αυξανόμενη, αντίστοιχα και με την αύξηση του πληθυσμού, με τον πληθυσμό να ανέρχεται στα 7,8 δισεκατομμύρια για το έτος 2020 και τα απορρίμματα να υπολογίζονται περί τα 2,01 τρισεκατομμύρια κιλά, για το έτος 2016, με βάση σχετική μελέτη από το World Bank Group. Σύμφωνα με τον Οργανισμό Ηνωμένων Εθνών και τους στόχους βιώσιμης ανάπτυξης, που έχει θεσπίσει, η διαχείριση των αποβλήτων αποτελεί μείζον θέμα της σύγχρονης κοινωνίας, η επίλυση του οποίου είναι πρωταρχικής σημασίας για την επιβίωση της ανθρωπότητας (Kaza *et al.*, 2018). Η άκρατη εναπόθεση απορριμμάτων (Εικόνα 1.α) οδηγεί σε μόλυνση του εδάφους και υπεδάφους, των θαλάσσιων και ωκεάνιων αποδεκτών, ενώ η καύση τους, ως μέθοδος περιορισμού του όγκου των, προκαλεί σοβαρά αναπνευστικά και λοιπά προβλήματα υγείας, λόγω των αερίων, που απελευθερώνονται. Παράλληλα, οι χώροι εναπόθεσης των αποβλήτων λειτουργούν ως συστήματα εκκόλαψης και συντήρησης ασθενειών, οι οποίες εξαπλώνονται μέσω των τρωκτικών και εντόμων, που είθισται να εποίκίζουν τέτοια ενδιαιτήματα (Kavitha *et al.*, 2020). Έντονα παρατηρείται, τα τελευταία χρόνια, η παρουσία μικροπλαστικών, τόσο στο ωκεάνιο περιβάλλον όσο και συσσωρευμένα στο πεπτικό σύστημα των θαλάσσιων οργανισμών (Εικόνα 1.β), ενισχύοντας την άποψη περί περιορισμού της χρήσης των συμβατικών πλαστικών, της εκπόνησης προγραμμάτων ανακύκλωσης, αλλά κυρίως της εύρεσης εναλλακτικών μορφών βιοαποικοδομήσιμων ή κομποστοποιήσιμων πλαστικών, τα οποία θα έχουν μηδενικό περιβαλλοντικό αποτύπωμα, ουδέτερο ισοζύγιο άνθρακα, θα λειτουργήσουν ως αντίδοτο στην κλιματική αλλαγή, θα περιορίσουν το υγειονομικό, κοινωνικό και οικονομικό πρόβλημα και θα ενισχύσουν την πράσινη και βιώσιμη ανάπτυξη (Kaza *et al.*, 2018).



Εικόνα 1.α. Τεράστιος όγκος πλαστικών σε χώρο εναπόθεσης απορριμμάτων στις Μαλδίβες [Πηγή: Kaza *et al.*, 2018], **β.** Μπλε ίνα πλαστικού στο εσωτερικό θαλάσσιου ζωοπλαγκτού [Πηγή: The Guardian].

1.1. Συμβατικά πετροχημικά πλαστικά

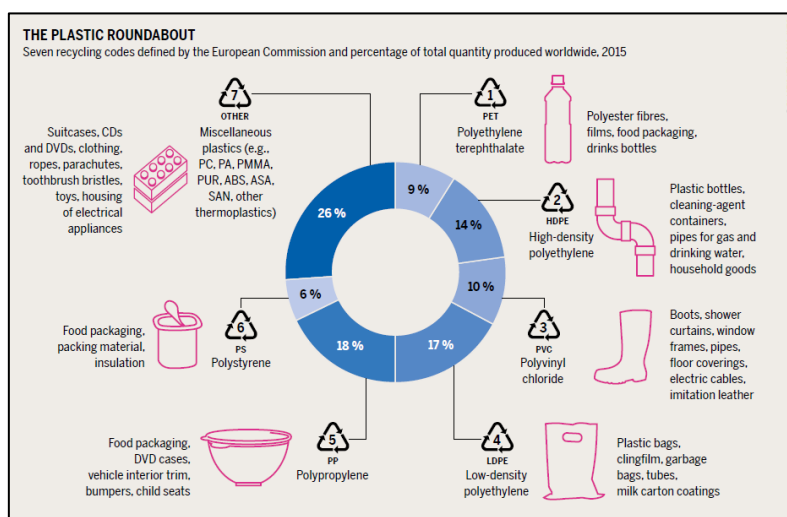
Τα πλαστικά είναι συνθετικά πολυμερή μακράς αλύσειας, ανθρώπινης κατασκευής και εκκινώντας περίπου έναν αιώνα πριν να αντικαθιστούν τα φυσικής προελεύσεως πολυμερή, πλέον έχουν γίνει αναπόσπαστο κομμάτι της καθημερινότητας. Τα πλαστικά, που χρησιμοποιούνται ευρέως σήμερα κατασκευάζονται από ανόργανες και οργανικές πρώτες ύλες, με κυρίαρχη πηγή να είναι οι υδρογονάνθρακες αλλά και το πυρίτιο, το άζωτο, το οξυγόνο και το χλώριο. Τα βασικά αυτά υλικά εξάγονται κατά κύριο λόγο από το πετρέλαιο, καθώς και από τον ορυκτό άνθρακα και το φυσικό αέριο (Shah *et al.*, 2008). Στη σημερινή εποχή, η παραγωγή συνθετικών πλαστικών, με πρώτη ύλη το πετρέλαιο, ξεπερνάει τα 400 εκατομμύρια τόνους, με τις Ηνωμένες Πολιτείες να βρίσκονται στην πρώτη θέση αναφορικά με την παραγωγή πλαστικών αποβλήτων (Tiseo, 2022). Όπως γίνεται αντιληπτό από την Εικόνα 2, τα τελευταία 20 χρόνια η παραγωγή πλαστικών είναι υπερπολλαπλάσια της παραγωγής του προηγούμενου αιώνα, ενώ εκτιμάται ότι θα αγγίξει τους 600 εκατομμύρια τόνους τα επόμενα άμεσα χρόνια (Shah *et al.*, 2008).



Εικόνα 2. Παγκόσμια παραγωγή πλαστικών ετησίως (σε εκατομμύρια τόνους) [Πηγή: Tiseo, 2022].

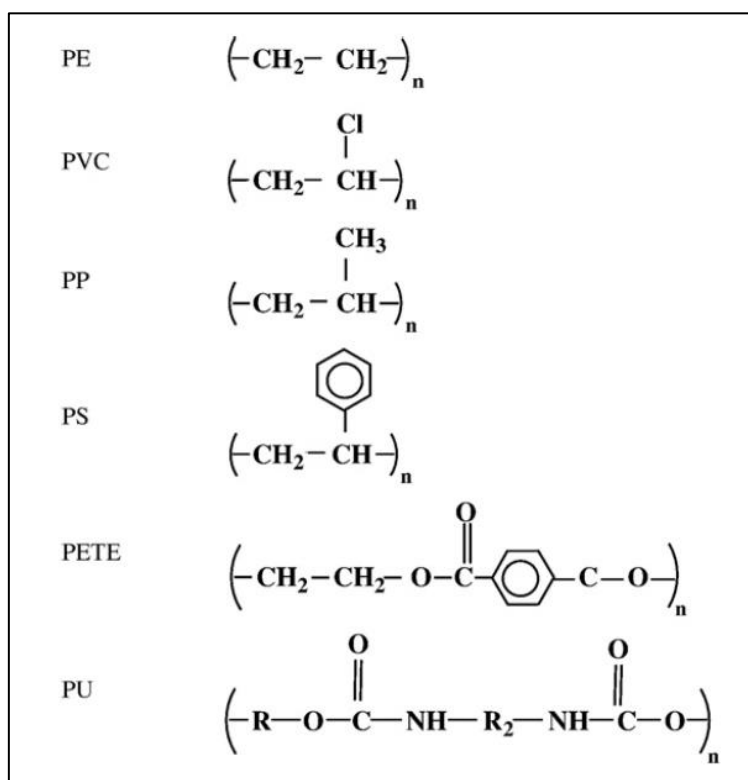
Αν και τα πρώτα πλαστικά εμφανίστηκαν περί τα μέσα του 19^{ου} αιώνα, η ανακάλυψη του πολύ-βινυλοχλωριδίου (PVC) από τον Fritz Klatte (1912) έμελλε να αλλάξει την αγορά, ειδικά όταν αυξήθηκαν οι ανάγκες για το συγκεκριμένο πλαστικό, κατά τη διάρκεια του 2^{ου} Παγκοσμίου Πολέμου. Το συγκεκριμένο πολυμερές προέκυψε λόγω των αποβλήτων της πετροχημικής βιομηχανίας και του χλωρίου, που απέμενε κατά την παρασκευή καυστικής σόδας, οπότε είχε πολύ φθηνές πρώτες ύλες. Από την περίοδο

εκείνη έως και σήμερα, το PVC αποτελεί ένα εκ των πλέον χρησιμοποιούμενων πλαστικών, τόσο σε οικιακό όσο και σε βιομηχανικό επίπεδο, καθώς με αυτό παρασκευάζονται πλαστικές μπότες, σωλήνες, επενδύσεις δαπέδου, καλώδια κ.ο.κ. (Caterbow & Speranskaya, 2019). Η μεγαλύτερη ποσότητα πλαστικών (περί το 1/3) προέρχεται από τις συσκευασίες, οι οποίες, εξαιτίας των προϊόντων, που εμπεριέχουν (λόγου χάρη τρόφιμα), παράγονται σε μεγάλες ποσότητες και χρησιμοποιούνται σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα, κατά μέσο όρο ένα έτος, λόγω του μικρού χρόνου ημιζωής του εμπεριέχοντος τροφίμου, οπότε συνεχώς παράγονται νέες και μετά τη χρήση, απορρίπτονται στο περιβάλλον (Geyer *et al.*, 2017). Οι συσκευασίες αποτελούνται κυρίως από πολύ-προπυλένιο (PP) και τερεφθαλικό πολύ-αιθυλένιο (PET). Το πρώτο, όντας και το πλαστικό με το υψηλότερο ποσοστό παραγωγής παγκοσμίως (περί το 18%) συμμετέχει και στη βιομηχανία αυτοκινήτων, την 3^η κατά σειρά βιομηχανία, στην οποία χρησιμοποιούνται τα πλαστικά, ενώ το PET απαντάται σε όλα τα πλαστικά μπουκάλια. Το πολύ-αιθυλένιο χρησιμοποιείται, επίσης, ευρέως τόσο στην υψηλής πυκνότητας μορφή του (HDPE) στις πλαστικές σωληνώσεις, αλλά και σε πλαστικούς περιέκτες καθαριστικών διαλυμάτων, ενώ το χαμηλής πυκνότητας ανάλογό του, χρησιμοποιείται σε πλαστικές σακούλες (Weber & Opp, 2020). Τα προαναφερθέντα πλαστικά είναι ως επί το πλείστο ανακυκλώσιμα (Εικόνα 3) και ο συντακτικός τύπος των μονομερών των κυριότερων και πιο εμπορικών εξ' αυτών παρουσιάζεται στην Εικόνα 4.



Εικόνα 3. Απεικόνιση των κυριότερων πλαστικών και τα υλικά, που παρασκευάζονται μέσω αυτών καθώς και της ποσοστιαίας ετήσιας παραγωγής του καθενός, για το έτος 2015, σύμφωνα με στοιχεία της Ευρωπαϊκής Επιτροπής [Πηγή: Caterbow & Speranskaya, 2019].

Τα συνθετικά πλαστικά έχουν αντικαταστήσει το χαρτί και τα κυτταρινούχα υλικά, ως μέσα συσκευασίας, λόγω καλύτερων φυσικών και χημικών ιδιοτήτων. Οι ιδιότητές τους, όπως η σταθερότητα, η ανθεκτικότητα, η ελαστικότητα και η διαπερατότητα βελτιώθηκαν άρδην με την πάροδο των ετών, με αποτέλεσμα τα πλαστικά πλέον να είναι ανθεκτικά σε κάθε είδους περιβαλλοντική καταπόνηση, γεγονός, που τα κάνει εύχρηστα στο σύνολο της καθημερινότητας αλλά και μείζον πρόβλημα ελέω της συσσώρευσής τους (Shah *et al.*, 2008). Παράλληλα, τα πλαστικά είναι ανθεκτικά έναντι της διάσπασης από τις μικροβιακές κοινότητες, καθώς απαντώνται στο περιβάλλον για λίγα χρόνια, οπότε εξελικτικά δεν έχουν προλάβει οι μικροοργανισμοί να αναπτύξουν τα κατάλληλα ενζυμικά συστήματα υδρόλυσης συνθετικών πολυμερών, με αποτέλεσμα να μην μπορούν να τα βιοδιασπάσουν και να εναποτίθενται στο περιβάλλον για μακρά χρονικά διαστήματα (Mueller, 2006).



Εικόνα 4. Συντακτικός τύπος των μονομερών από τα κυρίως χρησιμοποιούμενα πλαστικά παγκοσμίως [Πηγή: Shah *et al.*, 2007].

Το πρόβλημα συσσώρευσης των πλαστικών διογκώθηκε κυρίως λόγω της αποστροφής των καταναλωτών από τα επαναχρησιμοποιούμενα υλικά και της αποδοχής των περιεκτών μίας χρήσης, εξαιτίας της ευκολίας, που προσφέρει η άμεση απόρριψή τους. Τα μονομερή αυτών των πλαστικών, όμως, δεν είναι βιοδιασπώμενα με αποτέλεσμα

να συσσωρεύονται σε χώρους ταφής απορριμμάτων και, εν γένει, στο περιβάλλον. Ο μόνος τρόπος εξάλειψής τους είναι η θερμική επεξεργασία καύσης ή πυρόλυσης (Saptoadi *et al.*, 2016; Verma *et al.*, 2016; Eze *et al.*, 2021). Η ατμοσφαιρική ρύπανση λόγω της επεξεργασίας αυτής, συνάμα με την έκλυση επικίνδυνων, για τους ζώντες οργανισμούς, αερίων ενισχύει το φαινόμενο του θερμοκηπίου, την υπερθέρμανση, δηλαδή, του πλανήτη, επιταχύνει την κλιματική αλλαγή και θέτει σε κίνδυνο τη ζωή. Πλαστικά σωματίδια έχουν βρεθεί σε όλους του ωκεανούς, ενώ εκτιμάται ότι μόνο για το έτος 2010 περί τα 4 – 12 εκατομμύρια τόνοι πλαστικών απορριμμάτων, που παρήχθησαν στη στεριά, κατέληξαν στο θαλάσσιο περιβάλλον. Παράλληλα, οι αναφορές για παρουσία πλαστικών σωματιδίων και συνθετικών ινών σε γλυκέα ύδατα βαίνουν αυξανόμενες. Εν ολίγοις, τα πλαστικά απόβλητα είναι πανταχού παρόντα, που πλέον έχουν προταθεί ως δείκτης της σύγχρονης γεωλογικής περιόδου, της αποκαλούμενης και ως Ανθρωπόκαινο (Geyer *et al.*, 2017).

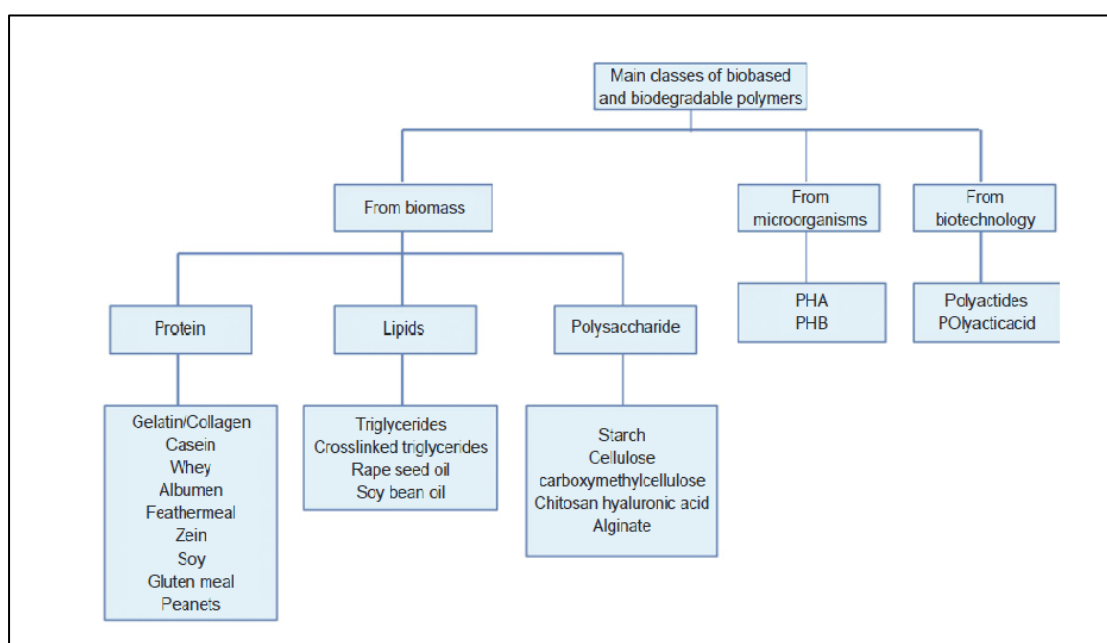
Η ευαισθητοποίηση της ανθρωπότητας σχετικά με τα αναδυόμενα αυτά πρόβλημα ολοένα και αυξάνεται τα τελευταία χρόνια, με την κοινωνία και την επιστημονική κοινότητα να αναζητούν λύσεις περιορισμού του φαινομένου. Πρωταρχικό στόχο πρέπει να αποτελέσει η αποφυγή δημιουργίας αποβλήτων, μέσω χρήσης επαναχρησιμοποιούμενων περιεκτών, ακολουθούμενη από την εφαρμογή προγραμμάτων ανακύκλωσης, με διαλογή των απορριμμάτων στην πηγή δημιουργίας τους, δηλαδή στο χώρο του καταναλωτή. Από τους 8300 εκατομμύρια τόνους πλαστικών, που εκτιμάται ότι έχουν παραχθεί καθ' όλη την ύπαρξή τους, μόλις οι 600 εκατομμύρια τόνοι έχουν ανακυκλωθεί και μόλις το 10% αυτών έχει ανακυκλωθεί άνω της μίας φορές. Τα πλαστικά αυτά κυρίως απορρίφθηκαν στο περιβάλλον (4900 εκ. τόνοι) ή αποτεφρώθηκαν (800 εκ. τόνοι) (Geyer *et al.*, 2017). Με βάση τα άνωθεν, η ανακύκλωση αποτελεί τρόπο περιορισμού του προβλήματος, αλλά όχι πανάκεια αυτού. Τις τελευταίες δύο δεκαετίες έχουν αναπτυχθεί διάφορα βιοδιασπώμενα πλαστικά και έχουν προταθεί ως πιθανοί αντικαταστάτες των συμβατικών. Τα βιολογικά παραγόμενα και βιοδιασπώμενα πλαστικά, όπως το πολύ-γαλακτικό οξύ (PLA) ή οι πολυ(ύδροξυ αλκανοϊκοί) εστέρες (PHAs) άπτονται της υψηλής επιστημονικής έρευνας και μελέτης, λόγω της ανανεώσιμης πηγής προέλευσής τους και της μετέπειτα αποικοδόμησής τους μέσω μικροβιακής δράσης, ενζυμικής ή χημικής υδρόλυσης, θερμικής επεξεργασίας ή φωτοοξειδωσης (De Gisi *et al.*, 2022).

1.2. Βιοπολυμερή - Βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά

Ως βιοπολυμερή ορίζονται μακρομόρια, που αποτελούν προϊόντα του κύκλου ανάπτυξης κάθε οργανισμού και η παραγωγή των οποίων είναι αποτέλεσμα πολύπλοκων μεταβολικών διεργασιών των κυττάρων, με συνέπεια να αποκαλούνται και φυσικά πολυμερή (Lisitsyn *et al.*, 2021). Για την παραγωγή τους δεν απαιτούνται συμβατικά ορυκτά καύσιμα, οπότε χαρακτηρίζονται ως περιβαλλοντικώς ουδέτερα, καθώς το ισοζύγιο άνθρακα μεταξύ της παραγωγής και πλήρους καύσης τους, παραμένει μηδενικό. Η παραγωγή των βιοπολυμερών μπορεί να έγκειται αποκλειστικά σε φυσικές διεργασίες και μετέπειτα απομόνωση τους από φυτά και φύκη, όπως στην περίπτωση του άγαρ από ερυθρά φύκη του γένους *Gelidium* sp. (Rao *et al.*, 2014; Lisitsyn *et al.*, 2021). Όσον αφορά την ελεγχόμενη παραγωγή των βιοπολυμερών, διακρίνονται 2 κατευθύνσεις παραγωγής τους, εκ των οποίων η πρώτη περιλαμβάνει την *in vitro* σύνθεση με χρήση εξειδικευμένων ενζύμων σε συστήματα, όπου δεν είναι απαραίτητη η παρουσία κυττάρων και η δεύτερη αφορά τη βιοτεχνολογική παραγωγή τους μέσω ζυμώσεων τόσο ως ένδο-, όσο και ως εξωκυτταρικά προϊόντα. Χαρακτηριστικά παραδείγματα των παραπάνω περιπτώσεων είναι η παραγωγή πολυμερών δεξτρανών χρησιμοποιώντας απομονωμένα ένζυμα και η παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης, πολύ-γαλακτικού οξέος ή πολυ(ύδροξυ αλκανοϊκών) εστέρων, αντίστοιχα (Rao *et al.*, 2014).

Τα βιοπολυμερή, ως υλικά, απαρτίζουν μια ξεχωριστή κατηγορία πλαστικών, καθώς προέρχονται από ανανεώσιμες πρώτες ύλες όπως η κυτταρίνη, τα φυτικά έλαια, το άμυλο ή οι πρωτεΐνες, είτε αποτελούν μικροβιακούς μεταβολίτες, ύστερα από αξιοποίηση διαφόρων ρευμάτων αποβλήτων από τους μικροοργανισμούς. Η κύρια διαφορά αυτών με τα συμβατικά πλαστικά είναι η πηγή προέλευσής τους, η οποία στην δεύτερη περίπτωση δεν είναι άλλη από το πετρέλαιο (Lisitsyn *et al.*, 2021). Σε αντίθεση με τα συμβατικά πλαστικά πετροχημικής προέλευσης, τα βιοπολυμερή συμβάλλουν στην αποφυγή εξάντλησης των ορυκτών πόρων καθώς και στον περιορισμό των εκπομπών ρύπων CO₂ και κατ' επέκταση στη μείωση του περιβαλλοντικού αποτυπώματος άνθρακα (Bugnicourt *et al.*, 2014). Η προέλευση των βιοπολυμερών δύναται να ποικίλει σημαντικά μεταξύ των ανανεώσιμων πηγών, στις οποίες περιλαμβάνονται ολοένα και περισσότερα απόβλητα. Η ποικιλία αυτή των διαθέσιμων αποβλήτων δίδει στους ερευνητές τη δυνατότητα να μεθοδεύσουν την παραγωγή των βιοπολυμερών με διάφορους τρόπους, χωρίς να είναι απαραίτητη η εκμετάλλευση

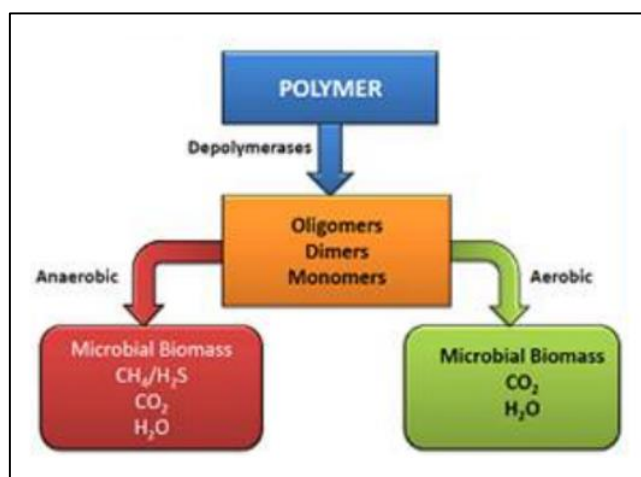
καλλιεργήσιμων εκτάσεων (αρόσιμης γης) παραγωγής βρώσιμων προϊόντων, όπως το σιτάρι, με στόχο τη χρήση τους ως πρώτες ύλες (building blocks) παραγωγής πολυμερών. Στην κατηγορία τέτοιων βιοπολυμερών ανήκουν αυτά, που δομούνται από μονάδες μονομερών βιολογικής προέλευσης, όπως μονομερή προερχόμενα από το σιτάρι και τα οποία, στη συνέχεια, υφίστανται πολυμερισμό, συνήθως με χημικές μεθόδους, αλλά και το μέχρι πρόσφατα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο βιοπολυμερές στην αγορά των πλαστικών, το πολύ-γαλακτικό οξύ (PLA). Ωστόσο, τα λιπίδια, τόσο ζωικής όσο και φυτικής προέλευσης, οι πρωτεΐνες και οι πολυσακχαρίτες, όπως το άμυλο και η κυτταρίνη, αποτελούν πρωταρχικούς και βασικούς τύπους βιοπολυμερών προερχόμενων από το σύνολο των μεταβολικών διεργασιών των οργανισμών (Εικόνα 5) (Bugnicourt *et al.*, 2014; Moradali & Rehm, 2020).



Εικόνα 5. Ταξινόμηση βιογενών και βιοδιασπώμενων πολυμερών [Πηγή: Bugnicourt *et al.*, 2014].

Τα βιογενή πολυμερή δε, διαθέτουν το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της εξ' ολοκλήρου βιολογικής προέλευσης, καθώς συσσωρεύονται φυσικά σε πολυμερική μορφή κατά την ανάπτυξη μικροβιακών καλλιεργειών. Οι κυριότερες κατηγορίες βιογενών πολυμερών από βακτήρια είναι οι πολυσακχαρίτες, τα πολυαμίδια, οι πολυ(ύδροξυ αλκανοϊκοί) εστέρες (PHAs) και τα πολυφωσφορικά (Moradali & Rehm, 2020). Υψηλό είναι το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας στην απομόνωση βιογενών πολυμερών και ιδιαίτερα βιοπλαστικών υλικών, ως δευτερεύοντα προϊόντα της βιομηχανίας παραγωγής βιοκαυσίμων, μέσω αξιοποίησης μικρο- και μακροφυκών (Bugnicourt *et al.*, 2014).

Όσον αφορά στην βιοαποικοδόμηση των παραπάνω, θα ήταν χρήσιμο να δοθεί το πλαίσιο που την ορίζει. Ως βιοαποικοδόμηση, νοείται η διάσπαση της οργανικής ύλης υπό αερόβιες ή αναερόβιες συνθήκες, από μικροοργανισμούς, όπως οι μύκητες, τα αρχαία και τα βακτήρια. Παρουσία οξυγόνου, οι μικροοργανισμοί που εμπλέκονται στην διάσπαση της σύνθετης ύλης είναι κατά κύριο λόγο αερόβιοι και τα τελικά προϊόντα της οξειδωτικής διάσπασης είναι διοξείδιο του άνθρακα (CO_2), νερό και βιομάζα. Υπό αναερόβιες συνθήκες, η αποικοδόμηση των πολυμερών πραγματοποιείται από μικτούς πληθυσμούς μικροοργανισμών (consortia), με παραγωγή των παραπάνω προϊόντων, παράλληλα με την έκλυση αερίου μεθανίου (CH_4) (Εικόνα 6). Η αναερόβια διάσπαση των πολυμερών καλείται και κομποστοποίηση, ενώ λαμβάνει χώρα σε χωματερές και εγκαταστάσεις κομποστοποίησης (Barlaz *et al.*, 1989). Έχει δειχθεί ότι ο βαθμός διάσπασης των πολυμερών, σπάνια είναι πλήρης, καθώς ένα μέρος τους ενσωματώνεται στα μικροβιακά κύτταρα, στο έδαφος και στα λοιπά φυσικά προϊόντα (Narayan & Balakrishnan, 2009). Όταν η διάσπαση δεν είναι πλήρης, τότε επισυμβαίνει βιομετατροπή προς παραγωγή οργανικών και ανόργανων μεταβολιτών (Singh & Sharma, 2008).



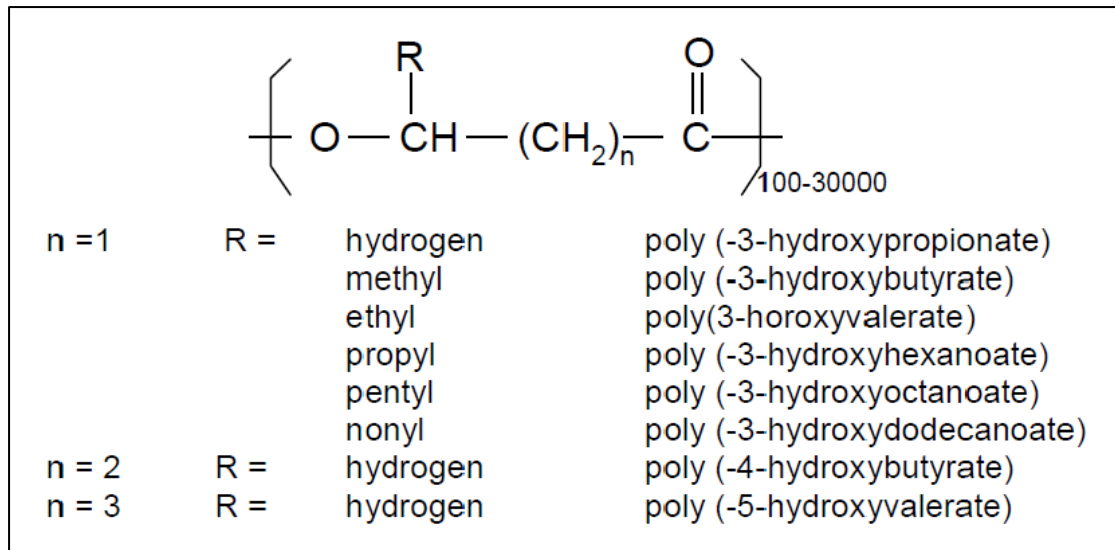
Εικόνα 6. Διάσπαση πολυμερών υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες [Πηγή: Mohan, 2011].

Η διαδικασία βιοαποικοδόμησης των βιοπολυμερών τελείται από ειδικά υδρολυτικά ένζυμα των προαναφερθέντων μικροοργανισμών, εξωκυτταρικά σε πρώτη φάση, λόγω του μεγάλου μεγέθους των προς διάσπαση ενώσεων. Στη συνέχεια, τα μικρού μεγέθους, πλέον, μόρια που απελευθερώνονται από τη διάσπαση των πολυμερών, μεταφέρονται εντός των μικροβιακών κυττάρων, όπου υφίστανται περαιτέρω αποικοδόμηση μέσω εξειδικευμένων ενδοκυτταρικών μικροβιακών ενζύμων, τις

αποπολυμεράσεις. Η παραπάνω διαδικασία αποτελεί την βιοτική αποικοδόμηση των βιοπολυμερών. Παράλληλα με αυτήν, λαμβάνει χώρα και η αβιοτική αποικοδόμηση, κατά την οποία τα βιοπολυμερή αποδομούνται φυσικώς και χημικώς, τόσο με την επίδραση ακτινοβολίας, όσο και με όξινη ή βασική υδρόλυση ή/και με υψηλές θερμικές επεξεργασίες. Τα άνωθεν συνθέτουν το συνολικό προφίλ της βιοαποικοδόμησης της οργανικής ύλης και κατ' επέκταση των βιοπολυμερών (Polman *et al.*, 2021).

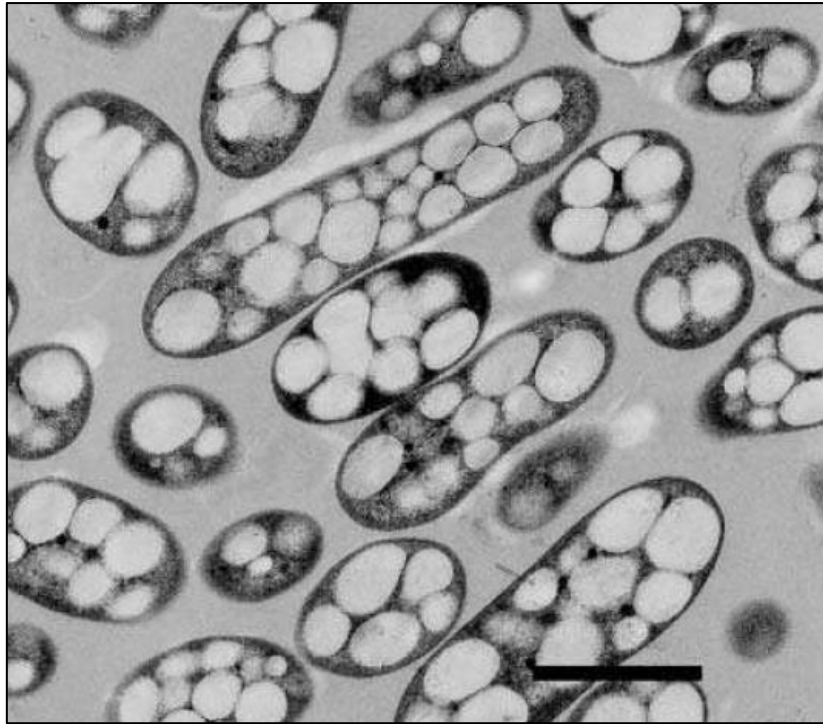
1.3. Πολυ(ύδροξυ αλκανοϊκοί) εστέρες (PHAs)

Ιστορικά, η πρώτη αναφορά σχετικά με τους πολυ(ύδροξυ αλκανοϊκούς) εστέρες χρονολογείται το 1926, όταν ο Γάλλος επιστήμονας Maurice Lemoigne ανακάλυψε τον πολυ(3-ύδροξυ βουτυρικό) εστέρα (PHB) σε μελέτη που αφορούσε τον μικροοργανισμό *Bacillus megaterium* (Lemoigne, 1926). Οι PHAs ανήκουν στην κατηγορία των βιοαποικοδομήσιμων πολυμερών και παράγονται από πληθώρα Gram θετικών και αρνητικών βακτηρίων. Η διεθνής βιβλιογραφία καταγράφει πάνω από 300 είδη βακτηρίων και κυανοβακτηρίων, που έχουν την ικανότητα παραγωγής PHAs, υπό διαφορετικές συνθήκες περιβάλλοντος και ανάπτυξης (Olivera *et al.*, 2001; Chanprateep, 2010). Τα εν λόγω πολυμερή κατατάσσονται στην κλάση των γραμμικών πολυεστέρων, με τα υδροξυοξέα (HA) να είναι τα μονομερή, που τα απαρτίζουν και τα οποία συνδέονται μεταξύ τους μέσω εστερικών δεσμών (Singh *et al.*, 2018). Ο συντακτικός τύπος των PHAs παρουσιάζεται στην Εικόνα 7, όπου η πλευρική αλκυλομάδα -R δύναται να υπάρξει ως κορεσμένη, ακόρεστη, ευθεία ή διακλαδισμένη αλυσίδα και να περιέχει αλειφατικές, χαρακτηριστικές αρωματικές ομάδες ή αλογονομένα, εποξειδωμένα και διακλαδισμένα μονομερή. Όσον αφορά τον αριθμό δομικών μονομερών (n), συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 100 – 30.000 και καθορίζεται από τη μορφή της πλευρικής ομάδας και τον εκάστοτε μικροοργανισμό, στον οποίο συμβαίνει η βιοσυσσώρευση του πολυμερούς (Mathuriya & Yakhmi, 2019).



Εικόνα 7. Γενικός συντακτικός τύπος PHAs [Πηγή: Ojumu *et al.*, 2004].

Ο βιολογικός ρόλος των PHAs έγκειται στη χρήση τους ως πηγή άνθρακα και ενέργειας, καθώς και στη συμβολή στην επιβίωση των κυττάρων, όταν βρεθούν σε στρεσογόνες περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως ωσμωτικό σοκ, υψηλή θερμοκρασία και υπεριώδης ακτινοβολία. Όπως αναφέρεται στη ανασκόπηση των Moradali και Rehm (2020), οι PHAs μπορούν να δράσουν ως δεξαμενές ηλεκτρονίων υπό συνθήκες αναεροβίωσης - ελλείπει τελικών αποδεκτών ηλεκτρονίων, όπως το οξυγόνο - δίνοντας τη δυνατότητα στα βακτηριακά κύτταρα να επιβιώσουν. Επιπλέον, ως απόκριση στην έλλειψη θρεπτικών συστατικών (συχνότερα πενία αζώτου ή φωσφόρου), παράλληλα με την παρουσία περίσσειας πηγής άνθρακα στο θρεπτικό μέσο, τα βακτήρια στρέφουν τον μεταβολισμό τους προς την παραγωγή PHAs με τη μορφή ενδοκυτταρικών κοκκίων λιπιδικής φύσεως (Εικόνα 8). Με τον συγκεκριμένο τρόπο, οι μικροοργανισμοί αποθηκεύουν την πηγή άνθρακα, με σκοπό την αξιοποίησή της, προς σχηματισμό νέων κυττάρων, όταν οι συνθήκες ανάπτυξης γίνουν ευνοϊκές (Mathuriya & Yakhmi, 2019; Manikandan *et al.*, 2020).



Εικόνα 8. Φωτογραφία Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας (Transmission Electron Microscopy - TEM) κυττάρων του στελέχους *Alcaligenes eutrophus*, με κόκκους PHB με συσσώρευση σε ποσοστό πάνω από 80% επί της ξηρής μάζας. Η μπάρα εκτείνεται σε μήκος 2μm [Πηγή: Xu *et al.*, 2010].

Από δομικής άποψης, τα PHAs ταξινομούνται, με βάση τον αριθμό των ατόμων άνθρακα, που εμπεριέχονται στην ανθρακική τους αλυσίδα, σε PHAs μικρής αλύσεως (short chain length, scl), PHAs μεσαίας αλύσεως (medium chain length, mcl) και PHAs μακράς αλύσεως (long chain length, lcl). Τα scl PHAs αποτελούνται από 3 – 5 άτομα άνθρακα και χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτών είναι ο πολυ(3-ύδροξυ-βουτυρικός) εστέρας P(3HB), ο πολυ(4-ύδροξυ-βουτυρικός) εστέρας P(4HB), ο πολυ(3-υδροξυ-βαλερικός) εστέρας P(3HV) και το συμπολυμερές πολυ(3-υδροξυ-βουτυρικός-4-υδροξυ-βαλερικός) εστέρας P(3HB-co-3HV). Τα mcl PHAs δομούνται από 6 – 14 άτομα άνθρακα και περιλαμβάνουν ομοπολυμερή, όπως πολυ(3-υδροξυ εξανοϊκός) εστέρας P(3HHx), πολυ(3-υδροξυ οκτανοϊκός) εστέρας P(3HO) καθώς και συμπολυμερή των 2 προαναφερθέντων P(3HHx-co-3HO). Τέλος, τα lcl PHAs περιέχουν 15 ή και περισσότερα άτομα άνθρακα στην ανθρακική τους αλυσίδα, όντας αποτέλεσμα συμπολυμερισμού πολυ-ύδροξυ αλκανοϊκών εστέρων μικρής και μεσαίας αλύσεως, με χαρακτηριστικό παράδειγμα το συμπολυμερές [P(3HB-co-3HV-co-3HHD-co-3HOD)] (Singh *et al.*, 2015; Anjum *et al.*, 2016; Singh *et al.*, 2018). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκαλεί η ικανότητα των βακτηρίων να συνθέτουν συμπολυμερή PHAs μικρής - μεσαίας αλύσεως (scl - mcl PHA co-polymers) ή μικρής

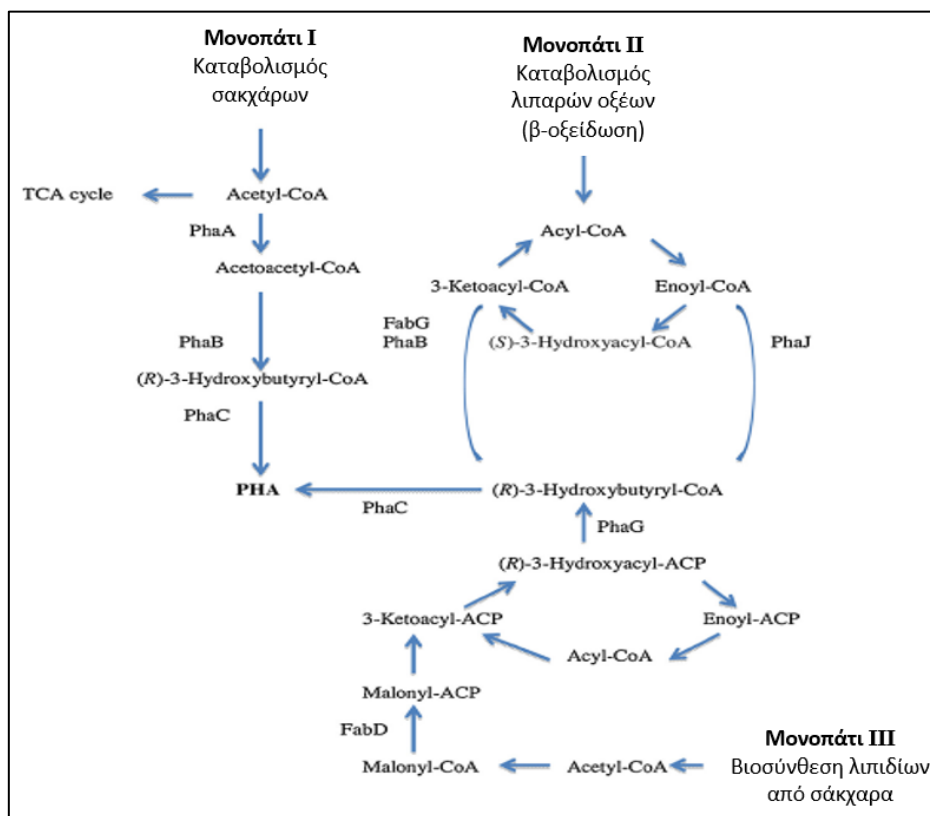
– μακράς αλύσειας (scl - lcl PHA co-polymers), εκτός από αμιγή ομοπολυμερή PHAs μικρής, μεσαίας ή μακράς αλύσειας, με την πλειοψηφία να έχει τάση προς σύνθεση συμπολυμερών μικρής - μεσαίας, ενώ σπανιότερα μικρής - μακράς αλύσειας PHAs (Singh *et al.*, 2018).

1.3.1. Μεταβολικές οδοί βιοσύνθεσης PHAs

Σύμφωνα με τις μελέτες των Nobes *et al.* (2000) και Grage *et al.* (2009) έχει παρατηρηθεί πως, όταν η συσσώρευση PHAs πραγματοποιείται από μικροοργανισμούς, που παράγουν αυτά τα πολυμερή φυσικά, διαλυτά ή δεσμευμένα στη μεμβράνη, ένζυμα που καλούνται συνθάσες PHA, καταλύουν τη μετατροπή των υδρόφιλων μονομερών υδροξυ-οξέων σε υδρόφοβα πολυμερή. Όπως αναφέρουν οι Anjum *et al.* (2016), υπάρχουν τρία εκτενώς μελετημένα μονοπάτια για τη βιοσύνθεση των PHAs (Εικόνα 9). Η σύνθεση δε των δομικών μονομερών αυτών, σχετίζεται με την πηγή άνθρακα, που καταναλώνει ο εκάστοτε μικροοργανισμός. Πιο αναλυτικά, το βιοσυνθετικό μονοπάτι I (Μονοπάτι I, Εικόνα 9) είναι εκείνο που έχει κατανοηθεί καλύτερα μεταξύ των τριών και χρησιμοποιείται μεταξύ άλλων και από τον μικροοργανισμό *Cupriavidus necator* για τη βιοσύνθεση PHAs. Στο βιοσυνθετικό αυτό μονοπάτι τα μονομερή (3HB) παράγονται από τη συμπύκνωση δύο μορίων ακέτυλο-CoA, μέσω του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων (TCA), ώστε να σχηματιστεί ακετοακέτυλο-CoA, με τη δράση του ενζύμου β-κετοθειολάση. Η αναγωγή του ακετοακέτυλο-CoA δρα στο σχηματισθέν ακετοακέτυλο-CoA προς σχηματισμό 3-υδροξυβουτυρύλ-CoA. Τέλος, το ένζυμο PHA συνθάση καταλύει τον πολυμερισμό μέσω εστεροποίησης και μετατροπής του 3-υδροξυβουτυρύλ-CoA σε πολύ(3-ύδροξυ βουτυρικό) εστέρα.

Μέσω των βιοσυνθετικών οδών, που εμπλέκονται στον μεταβολισμό των λιπαρών οξέων, δημιουργούνται διαφορετικά μονομερή υδροξυαλκανοϊκών εστέρων, που ύστερα χρησιμοποιούνται για τη βιοσύνθεση PHAs. Σύμφωνα με το βιοσυνθετικό μονοπάτι II (Μονοπάτι II, Εικόνα 9), ο σχηματισμός των μονομερών του PHB προϋποθέτει τη β-οξειδωση των λιπαρών οξέων, τα οποία υφίστανται, εν συνεχεία, πολυμερισμό από τα ένζυμα PHA συνθάσες, που διαθέτουν οι ψευδομονάδες, όπως το βακτήριο *Pseudomonas aeruginosa*. Το μονοπάτι III (Μονοπάτι III, Εικόνα 9), αποτελεί ιδιαίτερος ενδιαφέρουσα περίπτωση βιοσυνθετικής πορείας, καθώς μέσω αυτού παράγονται τα δομικά πρόδρομα μονομερή των PHAs από απλές και φθηνές

πηγές άνθρακα, όπως η γλυκόζη, η σακχαρόζη ή η φρουκτόζη. Τα (*R*)-3-υδροξυάκυλο-ACP ενδιάμεσα από την οδό βιοσύνθεσης των λιπαρών οξέων μετατρέπονται σε (*R*)-3-υδροξυβουτυρυλ-CoA, μέσω της δράσης των ενζύμων ακυλο-ACP-CoA ακυλοτρανσφερασών (Anjum *et al.*, 2016).



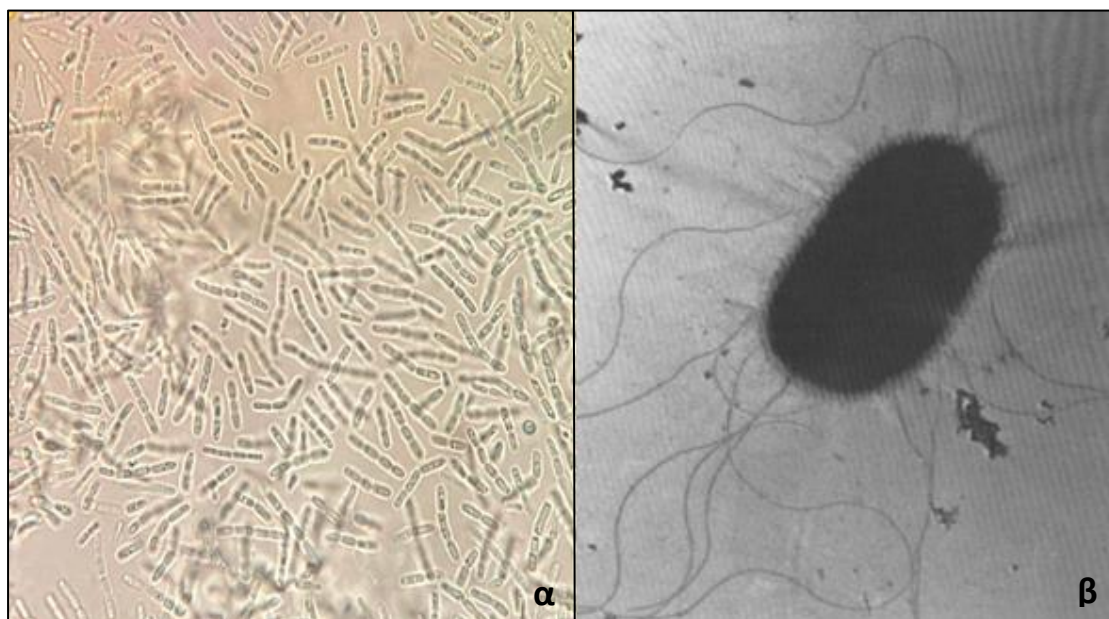
Εικόνα 9. Εναλλακτικές μεταβολικές οδοί βιοσύνθεσης PHAs

[Πηγή: τροποποιημένο από Anjum *et al.*, 2016].

1.3.2. Βακτηριακό στέλεχος *Azohydromonas lata*

Το βακτηριακό στέλεχος *Azohydromonas lata* (*A. lata*) είναι ένα υποχρεωτικά αερόβιο βακτήριο (Grothe *et al.*, 1999; Xie & Yokota, 2005), το οποίο έχοντας απομονωθεί από χώμα στην Αυστραλία και την Καλιφόρνια των Η.Π.Α, ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά μέσω φαινοτυπικών μελετών στην εργασία των Palleroni & Palleroni (1978). Η αρχική ονομασία, που του αποδόθηκε από τους εν λόγω ερευνητές, ήταν *Alcaligenes latus*, ωστόσο το 2005 το συγκεκριμένο στέλεχος επαναταξινομήθηκε και μετονομάστηκε με την έως σήμερα χρησιμοποιούμενη ονομασία *Azohydromonas lata* (Xie & Yokota, 2005). Επιπλέον, το βακτήριο έχει χαρακτηριστεί και ως αζωτοδεσμευτικό, έχει δηλαδή την ικανότητα να δεσμεύει το μοριακό άζωτο από το περιβάλλον ανάπτυξής του και να το μετατρέπει σε αμμωνία (Malik *et al.*, 1981).

Από φαινοτυπικής άποψης, τα βακτηριακά κύτταρα δίνουν αρνητική χρώση κατά Gram (Gram -), διακρίνονται μορφολογικά ως μικρές, ευθείες κοκκοειδείς ράβδοι ή ως κόκκοι με μήκος 1,6 – 2,4 μm και διάμετρο 1,1 – 1,4 μm , ενώ μπορεί να εμφανίζονται κατά μονάς, σε ζεύγη ή ως αλυσίδες μικρού μήκους (Εικόνα 10.α). Επιπλέον, διαθέτουν πέντε έως δέκα μαστίγια διατεταγμένα περίτριχα, με τη βοήθεια των οποίων δύνανται να έχουν υποτυπώδη κίνηση (Grothe *et al.*, 1999) (Εικόνα 10.β). Οι αποικίες, που αναπτύσσει το βακτήριο, είναι υποκίτρινες - γκρι, στρογγυλές και αδιαφανείς, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις ενδέχεται να έχουν πτυχώσεις εξωτερικά (Εικόνα 11). Το βακτηριακό στέλεχος *A. lata* έχει την ικανότητα ανάπτυξης σε θερμοκρασίες 15 - 42 $^{\circ}\text{C}$, με το θερμοκρασιακό εύρος 30 – 35 $^{\circ}\text{C}$ να αποτελεί το βέλτιστο για την ανάπτυξή του. Επίσης, δεν παρατηρείται ανάπτυξη, όταν η συγκέντρωση NaCl στο περιβάλλον του υπερβαίνει το 2,5 % w/v (Xie & Yokota, 2005). Το βέλτιστο pH για τον μικροοργανισμό κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 6,0 - 7,5 (Karbasi *et al.*, 2016).



Εικόνα 10. α. Μικροσκοπική παρατήρηση κυττάρων του βακτηριακού στελέχους *A. lata* DSM 1123 σε οπτικό μικροσκόπιο (μεγέθυνση x100), σε διαμόρφωση αλυσίδας. Τα μαύρα στίγματα εντός των κυττάρων είναι το πολυμερές PHB που έχει συσσωρευτεί σε αυτά [Εργαστήριο Μηχανικής & Επεξεργασίας Τροφίμων, ΓΠΑ]. **β.** Ηλεκτρονική μικρογραφία μεμονωμένου κυττάρου του βακτηριακού στελέχους *A. lata* ATCC 29712 (μεγέθυνση x30.000), ύστερα από φωσφοβολφραμική χρώση [Πηγή: Palleroni & Palleroni, 1978].



Εικόνα 11. Αποικίες του βακτηριακού στελέχους *A. lata* ATCC 29712 (μεγέθυνση x10), ύστερα από επώαση 1 εβδομάδας σε στερεό θρεπτικό μέσο ιχνοστοιχείων, υπό θερμοκρασία 30 °C [Πηγή: Palleroni & Palleroni, 1978].

Το βακτήριο *A. lata* συγκαταλέγεται μεταξύ των μικροοργανισμών που έχουν την ικανότητα παραγωγής πολυ(ύδροξυ)αλκανοϊκών εστέρων και συγκεκριμένα του πολυμερούς PHB. Μάλιστα, δύναται να συσσωρεύσει ενδοκυτταρικά το πολυμερές καθ' όλη τη διάρκεια της μικροβιακής ανάπτυξης, χωρίς τον περιορισμό κάποιου από τα απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία του μέσου ανάπτυξης. Σε κάθε περίπτωση, όμως, η επιβολή περιορισμού στην πηγή αζώτου ευνοεί την ικανότητα συσσώρευσης PHAs (Wang & Lee, 1997), με το ποσοστό του παραγόμενου πολυμερούς να ανέρχεται ακόμη και έως 80% επί της ξηρής βιομάζας (Grothe *et al.*, 1999). Τέλος, η ικανότητα του μικροοργανισμού να καταναλώνει απευθείας την σακχαρόζη, χωρίς πρότερη υδρόλυση, τον καθιστά ελκυστικό ως προς την παραγωγή PHB, από φθηνές πρώτες ύλες, όπως η ακατέργαστη ζάχαρη, τα ζαχαρότευτλα, η μελάσα ή απόβλητα προερχόμενα από τα παραπάνω (Wang & Lee, 1997).

1.3.3. Ιδιότητες των PHAs

Τα πολυμερή PHAs είναι θερμοπλαστικά και οι ιδιότητές τους μπορεί να διαφοροποιούνται σημαντικά ανάλογα με τη χημική τους σύνθεση, δηλαδή το είδος των δομικών μονάδων, από τα οποία αποτελούνται, αλλά και το αν είναι ομοπολυμερικά ή ετεροπολυμερικά μακρομόρια (Bugnicourt *et al.*, 2014). Μερικές

από τις γενικές ιδιότητες των πολυμερών, που ανήκουν στην οικογένεια των PHAs είναι οι ακόλουθες, ενώ οι τιμές για ορισμένες εξ αυτών παρατίθενται στον Πίνακα 1:

- Είναι αδιάλυτα στο νερό και εμφανίζουν αντίσταση στην αποικοδόμηση μέσω υδρόλυσης
- Έχουν καλή ανθεκτικότητα στην υπεριώδη ακτινοβολία, σε αντίθεση με την προσβολή από βάσεις και οξέα
- Είναι διαλυτά στο χλωροφόρμιο και σε άλλους χλωριωμένους υδρογονάνθρακες
- Είναι βιοσυμβατά υλικά και ως εκ τούτου, κατάλληλα για χρήση σε ιατρικές εφαρμογές
- Καταβυθίζονται στο νερό, διευκολύνοντας την αναερόβια αποικοδόμηση σε ιζηματική μορφή
- Είναι μη-τοξικά
- Είναι λιγότερο κολλώδη όταν τήκονται, συγκρινόμενα με τα παραδοσιακά πολυμερή

Πίνακας 1. Ενδεικτικό εύρος τιμών για κάποιες εκ των τυπικών ιδιοτήτων των PHAs [Πηγή: Bugnicourt *et al.*, 2014].

Ιδιότητα (μονάδες μέτρησης)	Τιμή
T_g - Θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης (°C)	2
T_m - Θερμοκρασία τήξεως (°C)	160 – 175
X_{cr} - Βαθμός κρυσταλλικότητας (%)	40 – 60
E- Δείκτης ελαστικότητας Young (GPa)	1 – 2
σ - Αντοχή στον εφελκυσμό (MPa)	15 – 40
ϵ - Σημείο θραύσης κατά την επιμήκυνση (%)	1 – 15
WVTR- Ρυθμός μεταφοράς υδρατμών (g·mm/m ² ·day)	2,36
OTR- Ρυθμός μεταφοράς οξυγόνου (cc·mm/m ² ·day)	55,12

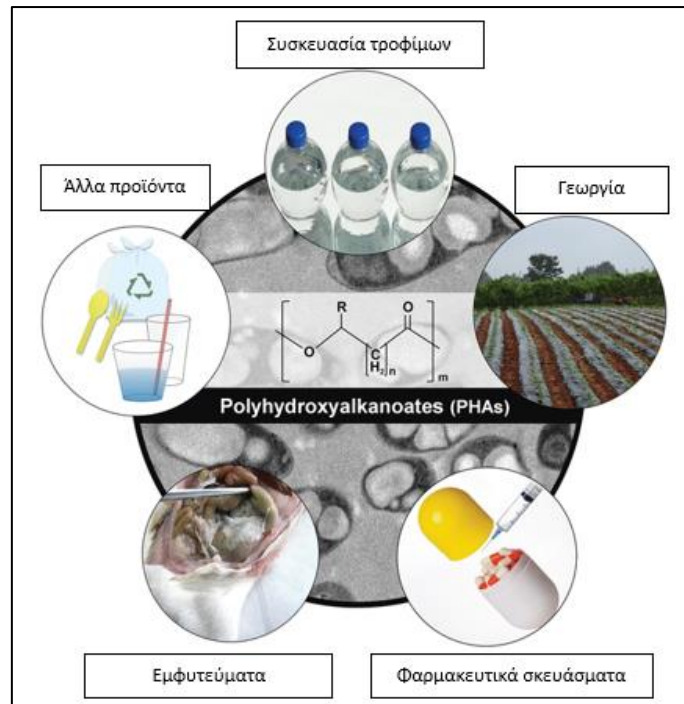
Έως σήμερα, η επιστημονική κοινότητα έχει καταφέρει να επιτύχει μέχρι κάποιο βαθμό την τροποποίηση των μηχανικών ιδιοτήτων των PHAs, με στόχο την βελτίωση όσων δεν πληρούν τις απαραίτητες προδιαγραφές. Οι αμιγώς φυσικά παραγόμενοι ομοπολυμερείς PHAs χαρακτηρίζονται από μεγάλη ευθραυστότητα και υψηλή κρυσταλλικότητα, όπως έχει ήδη αναφερθεί, ενώ πλέον τα αντίστοιχα συμπολυμερή,

όπως οι P(3HB-co-3HV) και P(3HB-co-3HHx), εμφανίζουν ευκαμψία και μικρότερη κρυσταλλικότητα. Η ελαστικότητα των πολυμερών έχει φτάσει σε επιθυμητές τιμές χάρη στην ανάπτυξη των συμπολυμερών P(3HB-co-4HB) και P(3-hydroxyoctanoate-co-3-hydroxydecanoate) (Kachrimanidou, 2016).

1.3.4. Εφαρμογές PHAs

Τα βιοπολυμερή και η παραγωγή τους αποτελούν ελκυστικό τομέα για την βιομηχανία, ειδικά τη σημερινή εποχή, όπου η παραγωγή προϊόντων φιλικών προς το περιβάλλον και η κυκλική οικονομία στοιχειοθετούν την αναγκαία και επιτακτική τάση για στροφή προς τη βιωσιμότητα, ως αντίδοτο στην άκρατη ρύπανση του πλανήτη και την ενίσχυση της κλιματικής αλλαγής. Ενδεικτικά, τόσο το πολυγαλακτικό οξύ (PLA), όσο και τα PHAs είναι δύο εκ των πλέον υποσχόμενων βιοπολυμερών, καθώς λόγω των ιδιοτήτων τους, θα μπορούσαν να ανταγωνιστούν τα συμβατικά πετροχημικά πλαστικά (Chanprateep, 2010).

Ένας από τους κυριότερους κλάδους, όπου η χρήση των βιοπολυμερών βρίσκει μεγάλη εφαρμογή, είναι τα υλικά συσκευασίας. Στον αντίποδα της τεράστιας περιβαλλοντικής μόλυνσης, εξ' αιτίας της ανεξέλεγκτης χρήσης συνθετικών πετροχημικών πλαστικών, έρχονται οι PHAs, ώστε να αντικαταστήσουν τα προαναφερθέντα και να μετριάσουν το πρόβλημα. Σύμφωνα με τους Bugnicourt *et al.* (2014), αν και οι PHAs καταλάμβαναν μικρό ποσοστό της αγοράς πλαστικών μέχρι το 2010, υπήρξε ανοδική τάση της χρήσης τους, σε σύγκριση με άλλα βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή, λόγω των καλών ιδιοτήτων αλλά και της δυνατότητας αποικοδόμησής τους σε ποικίλα περιβάλλοντα, πέραν των εγκαταστάσεων κομποστοποίησης. Κατά την τελευταία τριακονταετία, οι PHAs έχουν γίνει αποδεκτοί ως πιθανά βιοπολυμερή για χρήση σε τελικά προϊόντα συσκευασίας τροφίμων, επαναχρησιμοποιούμενα προϊόντα υγιεινής, κόλλες, καθώς επίσης και ως υλικά κατασκευής ανθρώπινων ιστών και, εν γένει, ως βιοσυνθετικά υλικά (Crank *et al.*, 2004) (Εικόνα 12).



Εικόνα 12. Διάφορες εφαρμογές των PHAs [Πηγή: τροποποιημένο από Choi *et al.*, 2020].

1.3.5. Βιοαποικοδόμηση των PHAs

Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των PHAs είναι ότι τα μονομερή υδροξυοξέα, από τα οποία δομούνται, απαντώνται στην $R(-)$ διαμόρφωση εξαιτίας της στερεοεκλεκτικότητας των ενζύμων PHA συνθασών, που εμπλέκονται στη βιοσύνθεσή τους. Κατά συνέπεια, η σύνθεση των PHAs μέσω μικροοργανισμών εξασφαλίζει το σχηματισμό των δομικών μονάδων με διαμόρφωση $R(-)$ στο χώρο, το οποίο συμβάλλει στην βιοσυμβατότητα και την βιοαποικοδόμηση τους (Singh *et al.*, 2018). Οι μικροοργανισμοί, που στρέφουν τον μεταβολισμό τους προς παραγωγή PHAs, λόγω κάποιου περιοριστικού παράγοντα κατά την ανάπτυξή τους, δύνανται, επίσης, να αποικοδομήσουν τα πολυμερή όταν οι συνθήκες γίνουν ξανά ευνοϊκές. Ωστόσο, η ικανότητα αποικοδόμησης των PHAs εξωκυτταρικά των μικροοργανισμών-παραγωγών PHAs, δεν είναι απαραίτητα μια κερτημένη ιδιότητά τους. Προκειμένου να τελείει η βιοαποικοδόμηση των PHAs μέσω αυτών, είναι αναγκαία η έκκριση εξειδικευμένων ενζύμων, των υδρολασών, οι οποίες υδρολύουν τα PHAs στα αντίστοιχα μονομερή τους (Gilmore *et al.*, 2018). Συγκεκριμένα, το PHB υδρολυόμενο αποδίδει (R)-3-υδροξυοξέα, ενώ το συμπολυμερές PHBV διασπάται εξωκυτταρικός στα μονομερή 3-υδροξυ βουτυρικό εστέρα και 3-υδροξυ βαλερικό εστέρα. Τα μονομερή αυτά αν και υδατοδιαλυτά, είναι μικρού μεγέθους, οπότε και μπορούν να διαχέονται παθητικά μέσω του κυτταρικού τοιχώματος, χωρίς τη δράση των

υδρολασών και στη συνέχεια να καταβολίζονται ενδοκυτταρικά, υπό αερόβιες συνθήκες, μέσω του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων (TCA), προς παραγωγή CO₂ και νερού (Shah *et al.*, 2008). Όσον αφορά την βιοαποικοδόμηση των PHAs, βιβλιογραφικά αναφέρεται πλήρης αποσύνθεση και μετατροπή σε CO₂ και νερό υπό συνθήκες κομποστοποίησης, ενώ στρέφοντας την προσοχή αποκλειστικά στο PHB, παρατηρήθηκε πλήρης αποσύνθεση μετά από 30 ημέρες σε συνθήκες κομποστοποίησης, με περιεχόμενη υγρασία περί το 25% w/w (Singh *et al.*, 2013; Kumar & Singh, 2020).

1.3.6. Πολυ(3-υδροξυ-βουτυρικός) εστέρας (PHB)

Όπως έχει αναφερθεί, ο πολυ(3-υδροξυ-βουτυρικός) εστέρας ανήκει στη οικογένεια των πολυ(υδροξυ αλκανοϊκών) εστέρων και, μάλιστα, ήταν ο πρώτος εξ' αυτών που προσδιορίστηκε. Έκτοτε, αποτελεί το περισσότερο μελετημένο μέλος της οικογένειας των PHAs. Εστιάζοντας στην ιστορία του PHB, αν και είχε αναγνωριστεί από το 1925, η προσοχή της επιστημονικής κοινότητας στράφηκε εντονότερα σε αυτό περί το 1982, οπότε και δημοσιεύτηκαν οι έρευνες των King και Howells, που καταδείκνυαν την ομοιότητα των ιδιοτήτων του PHB με εκείνων του πολυπροπυλενίου (King, 1982) και την βιοαποικοδομησιμότητα και βιοσυμβατότητά του (Howells, 1982), αντίστοιχα. Τότε έγινε η και η απαρχή της θεώρησης για τη χρήση των PHAs ως πιθανά βιοπλαστικά υλικά και ενδεχόμενους αντικαταστάτες των συμβατικών πετροχημικών πλαστικών. Συγκεκριμένα, εκείνη τη χρονική περίοδο διάφορες εταιρείες άρχισαν να εμπορεύονται μικροβιακώς παραγόμενα PHAs, ενώ κατά την επόμενη δεκαετία, η βιομηχανία στόχευσε στη μείωση του κόστους παραγωγής των PHAs, με σκοπό η παραγωγική διαδικασία αυτών να καταστεί οικονομικά βιώσιμη. Το επόμενο βήμα της επιστημονικής έρευνας, το οποίο εκτυλίσσεται έως και σήμερα, αφορά την αξιοποίηση της βιοτεχνολογίας και των δυνατοτήτων που προσφέρει η γενετική μηχανική σε συνδυασμό με την αξιοποίηση αποβλήτων μηδενικού κόστους ως πρώτη ύλη, κυρίως προερχόμενων από τη βιομηχανική πρακτική, προς παραγωγή PHAs με καινοτόμες μεθόδους (Palmeiro-Sánchez *et al.*, 2022).

Το PHB, όπως και η πλειοψηφία των PHAs, παράγεται κατά κύριο λόγο *in vivo*, ύστερα από καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων, σε συνθήκες, που ευνοούν τη βιοσυσσώρευσή του. Σε αντίθεση με άλλα βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή, που αποτελούν προϊόντα χημικών διεργασιών, όπως η συμύκνωση και ο πολυμερισμός με

διάνοιξη δακτυλίου β-λακτονών, τα μικροβιακής προέλευσης πολυμερή υπερτερούν όσον αφορά στην απουσία υπολειμμάτων καταλυτών και λοιπών ακαθαρσιών στο τελικό προϊόν, με αποτέλεσμα την ευκολότερη δημιουργία πυρήνων του πολυμερούς και ακολούθως τη επέκταση της κρυστάλλωσής τους (Di Lorenzo & Androsch, 2019). Ένα επιπρόσθετο μειονέκτημα, που εντοπίζεται κατά τη χημική σύνθεση των PHAs και κατ' επέκταση του PHB, είναι ο σχηματισμός πολυμερικών αλυσίδων όχι μόνο με *R(-)* αλλά και με *S(-)* διαμόρφωση στο χώρο, γεγονός που καθιστά τα πολυμερή μερικώς και όχι πλήρως βιοαποικοδομήσιμα. Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω αλλά και το υψηλό κόστος των χημικών και ενζυμικών τεχνικών παραγωγής του πολυμερούς, η πλέον διαδεδομένη μέθοδος για την παραγωγή PHB είναι οι μικροβιακές ζυμώσεις (Penloglou, 2011).

Το PHB, αποτελώντας υποκατηγορία των PHAs, τα οποία σε σχέση με άλλα βιοπολυμερή, όπως οι πολυσακχαρίτες ή οι πρωτεΐνες, είναι τα μόνα που διαθέτουν θερμοπλαστικές ιδιότητες, συγκαταλέγεται μεταξύ των πιθανών υλικών, που θα μπορούσαν να αντικαταστήσουν τα συμβατικά πλαστικά (Dawes & Senior, 1973; Braunegg *et al.*, 1998). Το πολυμερές PHB απαντάται είτε ως υψηλού είτε ως χαμηλού μοριακού βάρους ένωση, παρουσιάζοντας σημαντικές διαφορές ανά περίπτωση. Το υψηλού μοριακού βάρους PHB, εφόσον υπάγεται, από χημικής άποψης, στην κατηγορία των πολυεστέρων, χρησιμοποιούμενο ως θερμοπλαστικό υλικό, δύναται, εν διαλύσει σε συγκεκριμένους διαλύτες, να μορφοποιηθεί και να αποδώσει σταθερά προϊόντα με μεγάλη διάρκεια ζωής. Το δε χαμηλού μοριακού βάρους PHB αποτελεί υλικό κάθε ζώντος κυττάρου, καθώς έχει ταυτοποιηθεί η παρουσία του σε πληθώρα ευκαρυωτικών και προκαρυωτικών οργανισμών, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου (Valentino *et al.*, 2015; Rodríguez-Contreras *et al.*, 2016). Συνεπώς, διαφαίνεται η βιοσυμβατότητα του υλικού αυτού, καθώς έχει ανιχνευθεί σε κύτταρα ζώων, όπως τα πρόβατα, τα γουρούνια και τα πουλερικά (Lizarraga-Valderrama *et al.*, 2016).

Σχετικά με τις ιδιότητες του, το PHB παραμένει αδιάλυτο στο νερό, ενώ δεν αποικοδομείται ιδιαίτερα μέσω υδρόλυσης. Επιπλέον, εμφανίζει σχετικά χαμηλή διαπερατότητα στο οξυγόνο, συγκρινόμενο με πολυμερή πετροχημικής προέλευσης, όπως το πολυπροπυλένιο. Οι τιμές της πυκνότητας για το PHB στην κρυσταλλική και στην άμορφη φάση του είναι 1,26 και 1,18 g/cm³ αντίστοιχα. Ακόμη, έχει συμπαγή δομή και εμφανίζει υψηλή οπτική καθαρότητα (Manikandan *et al.*, 2020). Ως

θερμοπλαστικό υλικό ομοιάζει με τα συμβατικά θερμοπλαστικά, λαμβάνοντας υπόψιν το υψηλό σημείο τήξης του (175 °C) αλλά και τη σχετικά μεγάλη αντοχή του κατά τον εφελκυσμό (30-35 MPa). Ωστόσο, χαρακτηρίζεται από μεγάλη ψαθυρότητα, ενώ η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης (T_g) για το PHB προσδιορίζεται κοντά στη θερμοκρασία δωματίου καθιστώντας το υψηλά κρυσταλλικό, αν συνεκτιμηθούν και λοιποί παράγοντες, όπως η έναρξη της δευτερογενούς κρυστάλλωσης της άμορφης φάσης του κατά την αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου και η χαμηλή πυκνότητα των πυρήνων του. Κατά συνέπεια, αν και οι ιδιότητες του πολυμερούς ως θερμοπλαστικό υλικό είναι πολύ καλές, από σκοπιά μηχανικών ιδιοτήτων, όπως είναι το σημείο θραύσης κατά την επιμήκυνση και το δείκτη ελαστικότητας (Young's modulus), υστερεί σε σχέση με συμβατικά υλικά της βιομηχανίας πλαστικών (π.χ nylon, πολυαιθυλένιο, πολυπροπυλένιο, κ.α), σύμφωνα με τις μετρήσεις, όπως αυτές παρουσιάζονται στον Πίνακα 2. (Manikandan *et al.*, 2020). Προς βελτίωση των μηχανικών ιδιοτήτων του PHB, κρίνεται αναγκαία η προσθήκη λιπαντικών ουσιών κατά την επεξεργασία του, ώστε να αποφευχθεί η υποβάθμιση των πολυμερικών αλυσίδων και να δοθεί η δυνατότητα επεξεργασίας του υλικού σε θερμοκρασία περί τους 170-180 °C. Ένας επιπρόσθετος τρόπος μείωσης της θερμοκρασίας υαλώδους μετάπτωσης και της κρυσταλλικότητας είναι η ανάμειξη του με πλαστικοποιητές, με στόχο να αποκτήσει το PHB τις επιθυμητές θερμικές και μηχανικές ιδιότητες. Τέλος, η ανάπτυξη συμπολυμερών του PHB με άλλα PHAs χαμηλού μοριακού βάρους, όπως το 3-υδροξυ βαλερικό οξύ, εξυπηρετεί στη βελτίωση των μηχανικών ιδιοτήτων του πολυμερούς, μέσω μείωσης του σημείου τήξεως σε σχέση με το ομοπολυμερές PHB (Bugnicourt *et al.*, 2014).

Πίνακας 2. Σύγκριση φυσικών ιδιοτήτων του PHB με τις αντίστοιχες, συμβατικών πολυμερών
 [Πηγή: Τροποποιημένο από Manikandan *et al.*, 2020].

Πολυμερές	Δείκτης ελαστικότητας Young (GPa)	Αντοχή στον εφελκυσμό (MPa)	Σημείο θραύσης κατά την επιμήκν ση(%)	¹ T _m (°C)	² T _g (°C)
PHB	3,5 - 4,0	40	3,0 – 8,0	172 – 180	5 – 9
PP	1,0 - 1,7	29,3 – 38,6	500 – 900	170 – 176	-10
PLA	4,0	80	6,0	160	60
HDPE	0,4 – 1,0	17,9 – 33,1	12 – 700	112 – 132	-80
LDPE	0,05 – 0,1	15,2 – 78,6	150 – 600	88 – 130	-36
PS	3,0 – 3,1	50	3,0 -4,0	80 – 110	21
Nylon-6,6	2,8	83	60	265	50
PET	2,2	56	7.300	262	3.400

¹T_m: Θερμοκρασία τήξεως

²T_g: Θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης

1.4. Αγροβιομηχανικά απόβλητα ως υπόστρωμα παραγωγής PHB μέσω βακτηριακών ζυμώσεων

Τις τελευταίες δεκαετίες, η υπερεκμετάλλευση των μη ανανεώσιμων ορυκτών πόρων σε συνδυασμό με την παραγωγή πληθώρας οργανικών αποβλήτων, σε ένα ευρύ φάσμα της ανθρώπινης δραστηριότητας, εκτεινόμενο από την καθημερινή ζωή έως τη βιομηχανία, έχουν συνθέσει το κάδρο, που καταδεικνύει την άμεση ανάγκη για στροφή προς την αξιοποίηση των οργανικών αποβλήτων. Τα αγροτοβιομηχανικά απόβλητα οργανικής φύσεως αποτελούν συνήθως ρεύματα αρνητικού οικονομικού προσήμου για τις βιομηχανίες και κατέληγαν μέχρι πρότινος σε χωματερές, με αποτέλεσμα την επιβάρυνση του περιβάλλοντος, λόγω των εκπομπών αερίων, που εντείνουν το φαινόμενο του θερμοκηπίου, κατά τη διαδικασία της φυσικής αποσύνθεσής τους (Liu *et al.*, 2021).

Από την άλλη πλευρά, η χρήση φθηνών υποστρωμάτων κατά τις μικροβιακές βιοτεχνολογικές διεργασίες, συνάμα με την επιλογή του κατάλληλου μικροοργανισμού, είναι υψίστης σημασίας για την εξισορρόπηση του κόστους παραγωγής PHAs (Nath *et al.*, 2008). Το κόστος της παραγωγικής διαδικασίας είναι

βασικό τροχοπέδη αναχαίτησης της βιώσιμης παραγωγή PHAs σε βιομηχανικό επίπεδο (Koutinas *et al.*, 2007). Πράγματι, η πρόσφατη τιμή παραγωγής εμπορικών PHAs ανέρχεται στα 2,2 - 5,0 €/kg, σε αντίθεση με την αντίστοιχη τιμή του πολυπροπυλενίου που είναι περί το 1,0 €/kg (Berwig *et al.*, 2016; Ong *et al.*, 2018). Συνεπώς, είναι εμφανές το οικονομικό χάσμα μεταξύ του κόστους παραγωγής των συμβατικών πλαστικών και των PHAs. Όπως έχει δειχθεί από μελέτες, ποσοστό κυμαινόμενο μεταξύ 20-50% του συνολικού κόστους παραγωγής των PHAs οφείλεται στις πρώτες ύλες, με αποτέλεσμα το ενδιαφέρον των ερευνητών να στρέφεται ολοένα και περισσότερο στη χρήση εναλλακτικών πηγών οργανικής φύσεως, ως πιθανά υποστρώματα για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών - παραγωγών PHAs (Andler *et al.*, 2021).

Προσεγγίζοντας συνδυαστικά τα δύο θέματα που εθίγησαν παραπάνω, τα προερχόμενα από τη γεωργο-βιομηχανική δραστηριότητα απόβλητα, θα μπορούσαν να αποτελέσουν ιδανικά υποστρώματα, πιθανότατα ύστερα από προ-επεξεργασία (μηχανικός τεμαχισμός, χημική υδρόλυση κ.α.), με σκοπό τη απελευθέρωση αφομοιώσιμων από μικροοργανισμούς σακχάρων και ως εκ τούτου την αξιοποίησή τους, συμβάλλοντας έτσι ενεργά στη μείωση του κόστους της παραγωγικής διαδικασίας των PHAs σε μεγάλη κλίμακα (Zahari *et al.*, 2012).

1.4.1. Απόβλητα φρούτων

Τα φρούτα αποτελούνται κατά κύριο λόγο από το περικάρπιο, το οποίο είναι και το εδώδιμο μέρος και το οποίο συνίσταται από το εξωκάρπιο (φλούδα), το μεσοκάρπιο (η πούλπα) και το ενδοκάρπιο, το οποίο εμπεριέχει τα κουκούτσια. Τα φρούτα, σε επεξεργασμένη ή μη μορφή, είναι στενά συνδεδεμένα με την ανθρώπινη διατροφή, καθώς παρέχουν βιταμίνες και μέταλλα, που ενισχύουν το ανοσοποιητικό σύστημα και θωρακίζουν την υγεία. Η ραγδαία αύξηση του πληθυσμού παγκοσμίως και η ευαισθητοποίηση σε θέματα υγείας οδήγησαν σε αυξημένες ανάγκες για φρούτα, με την παραγωγή να εκτιμάται περί τα 887 εκατομμύρια τόνους, ετησίως, και την μπανάνα να είναι στην πρώτη θέση (119,83 εκ. τόνοι), ακολουθούμενη από τα καρπούζια (101,62 εκ. τόνοι), τα μήλα (86,44 εκ. τόνοι), τα σταφύλια (78,03 εκ. τόνοι) και τα πορτοκάλια (75,46 εκ. τόνοι) (Shahbandeh, 2022). Τα φρούτα είναι κατά κύριο λόγο ευαίσθητα και ευαλλοίωτα προϊόντα, που φθείρονται εύκολα και έχουν περιορισμένη διάρκεια ζωής μετά τη συγκομιδή. Παράλληλα, σημαντικό τμήμα του

κάθε καρπού απορρίπτεται, καθώς δεν είναι βρώσιμο. Κατά τις διαδικασίες παραγωγής, συγκομιδής, αποθήκευσης, διανομής, πώλησης και κατανάλωσης δημιουργείται μεγάλη ποσότητα απορριμμάτων, που περιλαμβάνουν τα κατεστραμμένα ή σάπια φρούτα, τη φλούδα, τον πυρήνα και λοιπά υπολείμματα, πλούσια σε οργανικό φορτίο. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας (Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO), τα απόβλητα φρούτων και λαχανικών παγκοσμίως για το έτος 2016 αντιστοιχούν σε ποσοστό 21,6%, ενώ, ανάλογα το προϊόν, το ποσοστό αυτό μπορεί να ανέλθει σε ποσοστό 40 – 50%. Το περιβάλλον επιβαρύνεται λόγω της εναπόθεσης τέτοιων υποπροϊόντων, η βιοαποικοδόμηση των οποίων ενισχύει φαινόμενα ευτροφισμού και υπερθέρμανσης του πλανήτη (Leong & Chang, 2022).

Τα απόβλητα φρούτων μπορούν να αξιοποιηθούν ως βιώσιμοι και ανανεώσιμοι πόροι για την ανάπτυξη νέων προϊόντων προστιθέμενης αξίας, στα πλαίσια της κυκλικής οικονομίας, ως εναλλακτικός τρόπος έναντι της εναπόθεσης σε χωματερές ή της καύσης. Η σύστασή τους ποικίλει ανάλογα το απορριφθέν τμήμα του φρούτου, με τις τιμές για την περιεκτικότητα σε υγρασία, πρωτεΐνες, λιπίδια, άλατα, φυτικές ίνες και υδατάνθρακες, ενδεικτικά για κάποια απόβλητα φρούτων, να αναγράφονται στον Πίνακα 3 (Joshi *et al.*, 2012).

Πίνακας 3. Σύσταση διαφόρων ενδεικτικών αποβλήτων φρούτων (ανά 100 g αποβλήτου) [Πηγή: Joshi *et al.*, 2012].

Waste	Moisture(g)	Protein(g)	Fat (g)	Minerals(g)	Fibre(g)	Carbohy-drate (g)
Apple pomace	–	2.99	1.71	1.65	16.16	17.35
Mango seed kernel	8.2	8.50	8.85	3.66	–	74.49
Jack fruit (inner and outer portion)	8.5	7.50	11.82	6.50	30.77	14.16
Jack fruit seeds	64.5	6.60	0.40	1.20	1.50	25.80
Jack seed flour	77.0	2.64	0.28	0.71	1.02	18.12
Passion fruit peel	81.9	2.56	0.12	1.47	5.01	–
Banana peel	79.2	0.83	0.78	2.11	1.72	5.00
Sweet orange seeds	4.00	15.80	36.90	4.00	14.00	–
Watermelon seeds	4.3	34.10	52.60	3.70	0.80	4.50
Muskmelon seeds	6.8	21.00	33.00	4.00	30.00	–
Pumpkin seeds	6.0	29.50	35.40	4.55	12.00	12.53
Banana stem						
Central core	93.1	0.30	0.03	1.04	0.68	1.20
Outer hard fibrous sheath	91.9	0.12	0.06	0.98	1.81	2.44
Press juice from stem	98.6	0.05	–	0.63	–	0.41

Τα απόβλητα φρούτων έχουν χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή βιοκαυσίμων, όπως βιοαιθανόλη (Jayaprakashvel *et al.*, 2014; Choi *et al.*, 2015), βιοαέριο μεθάνιο (Martín *et al.*, 2010; Masebinu *et al.*, 2018) ή υδρογόνο (Hwang *et al.*, 2011), ενώ παραπροϊόντα, όπως, οι φλούδες, έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε βιοενεργά συστατικά, όπως αντιοξειδωτικές ουσίες, έλαια, φαινολικά συστατικά, βιοχρωστικές

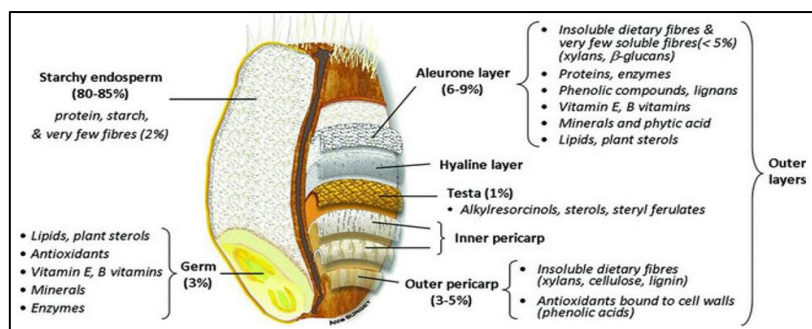
κ.α. (Derakhshan *et al.*, 2018; Martínez-Abad *et al.*, 2020; Chutia & Mahanta, 2021), με εφαρμογή σε βιομηχανίες τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών (Εικόνα 13). Εκτός των άνωθεν, τα απόβλητα φρούτων εξυπηρετούν και ως εναλλακτικό φθινό υπόστρωμα ανάπτυξης μικροοργανισμών, όπως τα βακτήρια, οι μύκητες και τα μικροφύκη, με σκοπό την παραγωγή μικροβιακής βιομάζας και μεταβολιτών υψηλής αξίας, όπως ένζυμα, πολύ-ύδροξυ αλκανοϊκοί εστέρες (Vega-Castro *et al.*, 2016; Maity *et al.*, 2020; Penkhrue *et al.*, 2020), λιπίδια (Katiyar *et al.*, 2019), εξωπολυσακχαρίτες (Vaishnav *et al.*, 2020), χρωστικές ή μονοκυτταρική πρωτεΐνη (Leong & Chang, 2022).



Εικόνα 13. Αξιοποίηση των αποβλήτων φρούτων και παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας για τις βιομηχανίες τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών
[Πηγή: Jiménez-Moreno *et al.*, 2019].

1.4.2. Απόβλητα πιτύρου σίτου

Το σιτάρι (*Triticum aestivum*) αποτελεί την κυρίαρχη καλλιέργεια δημητριακών για ανθρώπινη κατανάλωση και χρήση ως ζωοτροφή. Ένας κόκκος σιταριού περιλαμβάνει το ενδοσπέρμιο (80-85%), το φύτρο (3%) και το περικάρπιο με τα εξωτερικά στρώματα (13-19%), τα οποία συνιστούν και το πίτυρο (Εικόνα 14). Το πίτυρο προκύπτει ως παραπροϊόν της άλεσης των κόκκων, προς παραλαβή του αλεύρου και είναι πλούσιο σε φυτικές ίνες (53% - αποτελούμενες από ξυλάνες, λιγνίνη, κυτταρίνη, γαλακτάνες και φρουκτάνες), βιταμίνες, άλατα και βιοενεργά συστατικά (αλκυλ-ρεσορκινόλες, φερουλικό οξύ, φλαβονοειδή, καροτενοειδή, στερόλες) (Πίνακας 4), οπότε με την πάροδο των ετών γνωρίζει ολοένα και αυξανόμενη εφαρμογή στη βιομηχανία τροφίμων (10%), αν και κατά κύριο λόγο χρησιμοποιείται ως ζωοτροφή (90%) (Onipe *et al.*, 2015).



Εικόνα 14. Απεικόνιση της δομής του κόκκου σιταριού, αποτελούμενου από το ενδοσπέρμιο, το φύτρο και τα εξωτερικά στρώματα, που συνιστούν το πύτυρο [Πηγή: Onipe *et al.*, 2015]

Πίνακας 4. Ενδεικτική σύσταση του πτύρου σίτου [Πηγή: Apprich *et al.*, 2014].

Compound	Amount [%]
Water	12.1
Protein	13.2–18.4
Fat	3.5–3.9
Phytosterols	0.16–0.17
α -Linolenic acid	0.16
Total carbohydrates	56.8
Starch	13.8–24.9
Cellulose	11.0
Total arabinoxylans	10.9–26.0
Total β -glucan	2.1–2.5
Phenolic acids	1.1
Ferulic acid	0.02–1.5
Phytic acid	4.2–5.4
Ash	3.4–8.1

Με βάση τη σύσταση του πτύρου γίνεται αντιληπτό ότι μπορούν να εξαχθούν πολύτιμα κλάσματα υδατανθράκων και να αξιοποιηθούν, μετέπειτα, ως υποστρώματα μικροβιακών καλλιέργειών. Οι υδατάνθρακες αποτελούνται από άμυλο, το ποσοστό του οποίου εξαρτάται από τον τρόπο άλεσης του σίτου, από ημικυτταρίνες και κυτταρίνες. Σε αντίθεση με το άμυλο, που υδρολύεται εύκολα, τα κλάσματα των κυτταρινών και ημι-κυτταρινών, ως πιο ανθεκτικά, απαιτούν έντονη προεπεξεργασία, η οποία, συνήθως, περιλαμβάνει θερμική και χημική υδρόλυση. Σε πολλές περιπτώσεις

εφαρμόζεται η σαφώς πιο κοστοβόρα ενζυμική επεξεργασία, προς απελευθέρωση αφομοιώσεων μονομερών, από τα μακρομόρια. Το υδρόλυμα των προαναφερθέντων 3 υδατανθράκων μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα για μικροβιακές ζυμώσεις παραγωγής μεταβολιτών, όπως οργανικά οξέα (γαλακτικό, ηλεκτρικό οξύ, GABA), αλκοόλες (αιθανόλη, βουτανόλη) ή ένζυμα (Demir & Tari, 2014; Apprich *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2016; Galanakis, 2022). Οι αραβινοξυλάνες, πολυμερή αραβινόζης και ξυλόζης, συμμετέχουν σημαντικά στα κυτταρικά τοιχώματα, οπότε και συνιστούν μεγάλο κλάσμα του πτύρου. Τα μονομερή του υδρόλυματος μπορούν να αξιοποιηθούν ως συμπληρώματα διατροφής (ξυλιτόλη, ως γλυκαντική ουσία) ή ως πηγές άνθρακα για την ανάπτυξη μικροοργανισμών (Apprich *et al.*, 2014).

2. ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπό της παρούσας εργασίας αποτέλεσε η αξιοποίηση αποβλήτων της βιομηχανίας τροφίμων προς παραγωγή βιοαποικοδομήσιμων πολυμερών, μέσω μικροβιακών ζυμώσεων. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η παραγωγή πολύ(3-ύδροξυ-βουτυρικού) εστέρα (PHB) από το βακτηριακό στέλεχος *A. lata* DSM 1123 καθώς και η ικανότητά του μικροοργανισμού να αναπτύσσεται και να συσσωρεύει το πολυμερές σε θρεπτικά μέσα και σε υδρόλυμα παραγόμενα από απόβλητα βιομηχανίας τροφίμων, όπως τα απόβλητα φρούτων και το πίτυρο σίτου.

Σε πρώτο χρόνο, έλαβαν χώρα ασυνεχείς ζυμώσεις υγρής κατάστασης, σε κλίμακα κωνικών φιαλών και το επιλεγμένο βακτηριακό στέλεχος αξιολογήθηκε ως προς την απόκρισή του σε συνθετικά θρεπτικά υποστρώματα με πηγή άνθρακα διαφορετικά εμπορικά σάκχαρα (σακχαρόζη, γλυκόζη, φρουκτόζη, μανόζη, ξυλόζη, γαλακτόζη, αραβινόζη). Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν αντίστοιχες ζυμώσεις ώστε να εξεταστεί η ικανότητα του μικροοργανισμού να αφομοιώσει ως πηγές άνθρακα τα ελεύθερα σάκχαρα από απόβλητα φρούτων με αυξανόμενη συγκέντρωση αυτών (20, 40, 60 g/L) στο μέσο, καθώς επίσης και το υδρόλυμα από πίτυρο. Τέλος, ακολούθησαν διαφορετικές ημι-συνεχείς ζυμώσεις σε βιοαντιδραστήρες, χρησιμοποιώντας ως πηγές άνθρακα, τόσο τα προερχόμενα από απόβλητα φρούτων ελεύθερα σάκχαρα, όσο και υδρόλυμα πίτυρου σίτου, με στόχο την αύξηση της παραγωγής και της παραγωγικότητας της ζύμωσης.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Βιολογικό υλικό

Ο μικροοργανισμός που επιλέχθηκε να μελετηθεί για την παραγωγή PHB ήταν το βακτηριακό στέλεχος *Azohydromonas lata* DSM 1123, που ανήκει στην οικογένεια *Alcaligenaceae*. Η προμήθεια του μικροοργανισμού έγινε από τη γερμανική συλλογή μικροοργανισμών και κυττάρων DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Leibniz Institute, Germany).

3.2. Σύσταση πηγής άνθρακα

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δύο πηγές άνθρακα, ελεύθερα σάκχαρα αποβλήτων φρούτων, προερχόμενα από συνοικιακή λαϊκή αγορά και υδρόλυμα πιτύρου, παραγόμενο από ακατέργαστα ένζυμα με το μύκητα *Aspergillus awamori*, σε ζύμωση στερεάς κατάστασης.

Τα κύρια συστατικά που περιέχονται και στις δύο πηγές άνθρακα αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 5):

Πίνακας 5. Σύσταση ελεύθερων σακχάρων από φρούτα και υδρόλυμα πιτύρου σίτου.

	Ελεύθερα σάκχαρα φρούτων (g/L)	Υδρόλυμα πιτύρου σίτου (g/L)
Σακχαρόζη	4,9	-
Γλυκόζη	33,9	37,3
Φρουκτόζη	61,5	-
Ξυλόζη	-	9,4
Αραβινόζη	-	1,3
Μανόζη	-	-
FAN	-	0,36
Ανόργανος φώσφορος	-	0,68

3.3. Παρασκευή υγρού εμβολίου

Η προετοιμασία του υγρού εμβολίου, πραγματοποιήθηκε σε κωνικές φιάλες (Erlenmeyer flasks) χωρητικότητας 250 mL με ενεργό όγκο 50 mL με διαφορετικής σύστασης θρεπτικά μέσα για την μελέτη του υγρού εμβολίου. Συγκεκριμένα, η σύσταση των δύο θρεπτικών μέσων είναι η ακόλουθη: **Θρεπτικό μέσο Α** :1,0 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4,5 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,5 g/L KH_2PO_4 , 0,2 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g/L εκχύλισμα ζύμης (yeast extract) και 1,0 mL/L διάλυμα ιχνοστοιχείων (ανά λίτρο: 10 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,25 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 2,0 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,23 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 10 mL HCl 35%), **Θρεπτικό μέσο Β**: 5 g/L πεπτόνη και 3 g/L εκχυλίσματος κρέατος. Ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκε 5 g/L γλυκόζη και στις δύο περιπτώσεις. Ο εμβολιασμός έγινε εντός θαλάμου κάθετης νηματικής ροής, υπό ασηπτικές συνθήκες με ένα φιαλίδιο (cryovial) που περιείχε εναιώρημα κυττάρων. Στην συνέχεια, οι κωνικές φιάλες τοποθετήθηκαν σε ανακινούμενο θάλαμο επώασης (Shaker, New Brunswick Sc, USA) υπό σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας ($30 \pm 1^\circ\text{C}$) με ταχύτητα ανάδευσης 200 ± 5 rpm για 15- 17 ώρες και έπειτα υπό ασηπτικές συνθήκες, κατάλληλη ποσότητα εμβολίου (10% v/v) ενοφθαλμίστηκε στην κύρια καλλιέργεια. Τα δείγματα συλλέγονταν κάθε 2 ώρες για προσδιορισμό της οπτικής πυκνότητας και της ξηρής βιομάζας των κυττάρων προκειμένου να παρακολουθείται η βακτηριακή ανάπτυξη.

3.4. Θρεπτικό μέσο και συνθήκες ζυμώνσεων για την παραγωγή PHB σε κωνικές φιάλες

Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν ζυμώνσεις με διαφορετικές πηγές άνθρακα με σκοπό να εξεταστεί η επίδραση της πηγής άνθρακα ως προς την ανάπτυξη του μικροοργανισμού *A. lata* DSM 1123 και την παραγωγή του πολυμερούς. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τα εμπορικά σάκχαρα σακχαρόζη, γλυκόζη, φρουκτόζη, ξυλόζη, μανόζη, αραβινόζη, γαλακτόζη (Εικόνα 15.α). Η αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα ήταν 20 g/L και η σύσταση του θρεπτικού μέσου αναφέρεται στον Πίνακα 6. Στην συνέχεια, εξετάστηκε η ικανότητα του μικροοργανισμού να αφομοιώσει τις πηγές άνθρακα υδρόλυμα από πιτύρου και έπειτα ελεύθερα σάκχαρα από απόβλητα φρούτων με συνεχόμενη αύξηση στο μέσο (20, 40, 60 g/L) (Εικόνα 15.β).



Εικόνα 15. Καλλιέργειες σε κωνικές φιάλες με το βακτηριακό στέλεχος *A. lata* DSM 1123 σε κωνικές φιάλες **α.** με πηγή άνθρακα την εμπορική σακχαρόζη και **β.** σε υπόστρωμα υδρολύματος πιτύρου σίτου [Εργαστήριο Μηχανικής & Επεξεργασίας Τροφίμων, ΓΠΑ].

Τα πειράματα των ζυμώσεων πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 30 °C υπό ρυθμό ανάδευσης 180 rpm. Η ρύθμιση του pH στο 6,8 γινόταν με την προσθήκη 2 M HCl ή 5M NaOH. Ο τελικός όγκος του θρεπτικού μέσου ήταν 100 mL σε κωνικές φιάλες των 500 mL. Ο όγκος του εμβολίου ήταν σε κάθε περίπτωση 10%. Για την παρακολούθηση των ζυμώσεων λαμβάνονταν κατά διαστήματα υπό ασηπτικές συνθήκες δείγματα με σκοπό την παρακολούθηση των καταναλωθέντων σακχάρων και προσδιορισμό την παραγόμενης βιομάζας και τελικού προϊόντος.

Πίνακας 6. Σύσταση κυρίως καλλιέργειας για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού *A. lata*.

Θρεπτικά συστατικά	Περιεκτικότητα (g/L)
Εκχύλισμα ζύμης	1,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0
KH ₂ PO ₄	0,6
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	1,79
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,0
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,1
Κιτρικό οξύ	0,1
Διάλυμα ιχνοστοιχείων (Trace elements solution - TES)	3,0

3.5. Θρεπτικό μέσο για την παραγωγή PHB σε βιοαντιδραστήρα

Διεξήχθησαν ζυμώσεις ημι-συνεχούς καλλιέργειας χρησιμοποιώντας θρεπτικό μέσο όπως αναφέρεται στον Πίνακα 6. Οι ζυμώσεις έλαβαν χώρα σε βιοαντιδραστήρα συνολικού όγκου 2 L (Eppendorf BioFlo 120) με ενεργό όγκο 1 L υπό αερόβιες συνθήκες (Εικόνα 16).



Εικόνα 16. Διάταξη ημι-συνεχούς ζύμωσης σε βιοαντιδραστήρα με στο βακτηριακό στέλεχος *A. lata* DSM 1123, σε υπόστρωμα αποβλήτων φρούτων [Εργαστήριο Μηχανικής & Επεξεργασίας Τροφίμων, ΓΠΑ].

Ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκαν ελεύθερα σάκχαρα από απόβλητα φρούτων και υδρόλυμα πιτύρου με αρχική συγκέντρωση κυρίως 20 g/L. Στα εν λόγω πειράματα χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα τροφοδοσίας που περιείχαν ~600 g/L από συμπυκνωμένα σάκχαρα αποβλήτων φρούτων και εμπορικά σάκχαρα προσομοιωμένα με τα σάκχαρα, που περιέχονται στο υδρόλυμα πιτύρου. Και στις δύο περιπτώσεις τροφοδοσίας, έγινε επιπλέον προσθήκη ιχνοστοιχείων και αλάτων, έτσι ώστε να μην υπάρξει περιορισμός από κάποιο θρεπτικό συστατικό στο μέσο (Πίνακας 7). Η στρατηγική ήταν συνεχούς τροφοδοσίας και χρησιμοποιήθηκε όταν η συνολική συγκέντρωση σακχάρων στον βιοαντιδραστήρα ήταν περίπου στα 10 g/L. Το pH

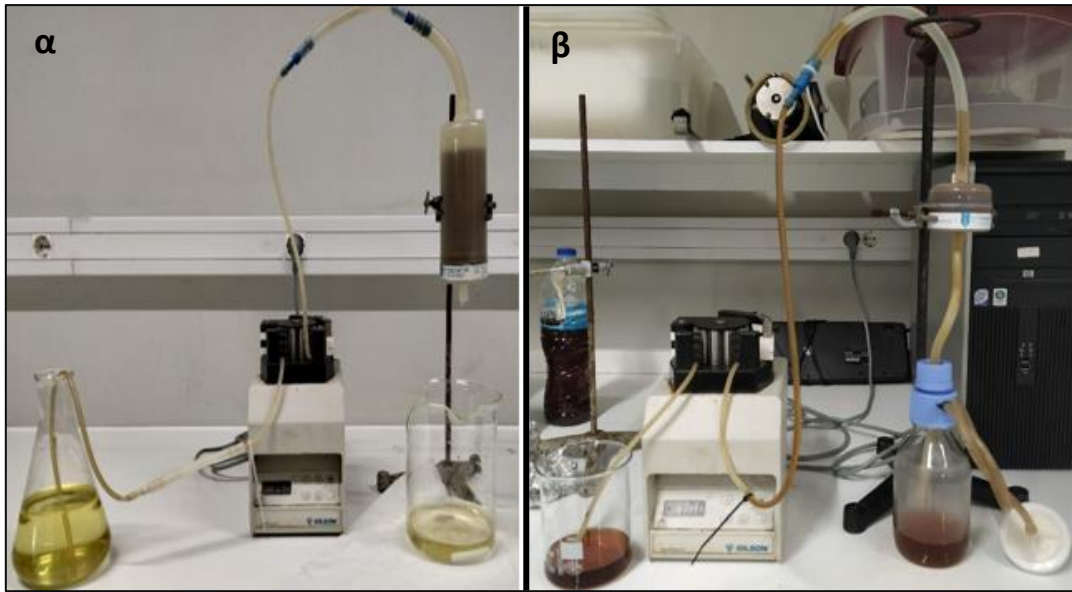
ρυθμίστηκε στο 6,8-7,0 χρησιμοποιώντας 28% διάλυμα NH_4OH και 2M HCl . Το μέγεθος του εμβολίου ήταν 10% (v/v). Ο ρυθμός αερισμού, που χρησιμοποιήθηκε, ήταν 2,5 vvm και η ανάδευση διατηρήθηκε σταθερή στις 700 rpm.

Πίνακας 7. Σύσταση διαλύματος τροφοδοσίας στις ημισυνεχείς ζυμώσεις σε βιοαντιδραστήρα

Θρεπτικά συστατικά (g/L)	Τροφοδοσία με ελεύθερα σάκχαρα	Τροφοδοσία με εμπορικά σάκχαρα προσομοιωμένα με τα σάκχαρα που περιέχονται στο υδρόλυμα πιτύρου
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	8,0	-
KH_2PO_4	2,0	15
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10,0	-
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4,5	4,5
Κιτρικό οξύ	0,2	0,2
Διάλυμα ιχνοστοιχείων (Trace elements solution - TES)	15,0	15,0
Εκχύλισμα ζύμης	-	10,0

3.6. Αποστείρωση υλικών

Η αποστείρωση των θρεπτικών μέσων, των σκευών και των αναλωσίμων, που χρησιμοποιήθηκαν κατά τις μικροβιακές ζυμώσεις, πραγματοποιήθηκε σε αυτόκαυστο στους 121 °C για 20 λεπτά. Ειδικότερα, τα εμπορικά σάκχαρα αποστειρώθηκαν ξεχωριστά από το λοιπό θρεπτικό μέσο αφού διαλυτοποιήθηκαν σε μικρή ποσότητα απιονισμένου νερού, για την αποφυγή αντίδρασης Maillard μεταξύ των σακχάρων και του περιεχόμενου αζώτου στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης. Το εκχύλισμα ελεύθερων σακχάρων αποβλήτων φρούτων (Εικόνα 17.α) και το υδρόλυμα πιτύρου σίτου (Εικόνα 17.β) αποστειρώθηκαν με τη χρήση φίλτρου διαμέτρου πόρων 0,2 μm (Polycap 36AS, Whatman), προς αποφυγή της θερμικής επεξεργασίας και πιθανή επακόλουθη υποβάθμιση των περιεχόμενων θρεπτικών συστατικών. Μετά την αποστείρωση αναμείχθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες με το εκάστοτε θρεπτικό μέσο ανάπτυξης μέσα σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής για αποφυγή επιμόλυνσης.



Εικόνα 17. α. Αποστείρωση εκχυλίσματος ελεύθερων σακχάρων αποβλήτων φρούτων και **β.** υδρολύματος πιτύρου σίτου, με τη χρήση φίλτρου.

4. ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1. Ποσοτικός προσδιορισμός ξηρής μάζας κυττάρων

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης βιομάζας στηρίχθηκε στη μέτρηση της ξηρής μάζας των κυττάρων (Dry Cell Weight, DCW). Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 10 min σε ταχύτητα 10.000 rpm σε φυγόκεντρο τύπου Heraeus – Biofuge Pico, με σκοπό το διαχωρισμό των κυττάρων από το υγρό της ζύμωσης. Μετά το διαχωρισμό των δύο φάσεων, το υπερκείμενο υγρό συλλέχθηκε για περαιτέρω αναλύσεις και η βιομάζα ξεπλύθηκε με απιονισμένο νερό, φυγοκεντρήθηκε εκ νέου, ξεπλύθηκε ξανά με ακετόνη και μεταφέρθηκε σε φιαλίδια McCartney, τα οποία είχαν προηγουμένως ξηρανθεί και ζυγιστεί. Το όλον παρέμεινε σε φούρνο ξήρανσης σε σταθερή θερμοκρασία 50 °C, για 24 ώρες και έως σταθερού βάρους των φιαλιδίων. Στη συνέχεια τα φιαλίδια τοποθετήθηκαν σε ξηραντήρα, έως ότου να σταθεροποιηθούν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ζυγίστηκαν σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας. Από τη διαφορά μεταξύ απόβαρου και μικτού βάρους φιαλιδίου – βιομάζας, προέκυψε το καθαρό βάρος της ξηρής μάζας κυττάρων και με αναγωγή της μέτρησης που ελήφθη, υπολογίστηκε η τελική τιμή συγκέντρωσης ξηρής μάζας κυττάρων σε g/L.

4.2. Προσδιορισμός συγκέντρωσης σακχάρων

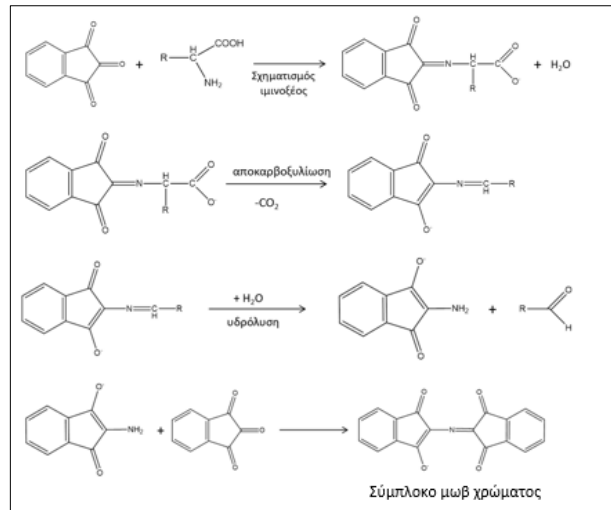
Ο προσδιορισμός των σακχάρων και των μεταβολιτών της ζύμωσης πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) με τη χρήση του συστήματος SHIMADZU UFLC XR. Συγκεκριμένα, η στήλη με την οποία επιτεύχθηκε ο διαχωρισμός του δείγματος ήταν τύπου Phenomenex rezex ROA (300 mm x 7.8 mm). Η ταυτοποίηση των διαφόρων χημικών ενώσεων, καταναλωθέντων σακχάρων και παραγόμενων προϊόντων ζύμωσης, βασίστηκε στο χρόνο κατακράτησης, ο οποίος συγκρίθηκε με γνωστά πρότυπα αυτών. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε διάλυμα H₂SO₄ (10 mM), η ροή κατά την ανάλυση των δειγμάτων ήταν καθορισμένη στο 0,6 mL/min με τη θερμοκρασία στήλης να είναι στους 65 °C. Από τη στήλη περνούσαν 10μL δείγματος και η διάρκεια της ανάλυσης ήταν 24 λεπτά.

4.3. Προσδιορισμός συγκέντρωσης αζώτου ελεύθερων αμινομάδων – Free Amino Nitrogen (FAN)

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του οργανικού αζώτου και ειδικότερα του αζώτου ελεύθερων αμινομάδων των αμινοξέων επιστρατεύτηκε η φωτομετρική μέθοδος ανάλυσης, που στηρίζεται στην ποσοτικοποίηση του αζώτου μέσω της αντίδρασης των ελεύθερων αμινομάδων των αμινοξέων με τη νινυδρίνη. Η νινυδρίνη ή (2,2-διϋδροξυϊνδανο-1,3-διόνη) έχει κίτρινο χρώμα και αποτελεί οξειδωτικό παράγοντα, που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση πρωτοταγών αμινών, α-αμινοξέων και αμινοτελικών άκρων πεπτιδίων και πρωτεϊνών, αφού δύναται να αντιδράσει με τις ελεύθερες αμινομάδες, αποκαρβοξυλιώνοντας τον ανθρακικό σκελετό και οδηγώντας στην ανάπτυξη μωβ χρωμοφόρου συμπλόκου (Lie, 1973).

Η αρχή της μεθόδου νινυδρίνης βασίζεται στο φωτομετρικό προσδιορισμό της έντασης του χρώματος του μωβ συμπλόκου που δημιουργείται και η οποία είναι ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης του αζώτου ελεύθερων αμινομάδων που περιέχεται στο προς ανάλυση δείγμα. Η φωτομέτρηση έλαβε χώρα σε μήκος κύματος 570 nm, το οποίο είναι και το μέγιστο απορρόφησης του χρωμοφόρου συμπλόκου. Η πορεία της αντίδρασης παρουσιάζεται σχηματικά στη συνέχεια (Εικόνα 18) και έχει ως εξής:

- Αρχικά, ένα μόριο νινυδρίνης το οποίο βρίσκεται σε ανηγμένη μορφή, αντιδρά με την διαθέσιμη αμινομάδα του αμινοξέος, στην οποία συνδέεται μέσω ενός ατόμου οξυγόνου. Έτσι προκύπτει μια ιμίνη και, πιο συγκεκριμένα, μια βάση Schiff.
- Στη συνέχεια, λαμβάνει χώρα αποκαρβοξυλίωση του αμινοξέος υπό συνθήκες θέρμανσης και απελευθέρωση διοξειδίου του άνθρακα.
- Ακολουθεί υδρόλυση προς σχηματισμό μιας αλδεΐδης, η οποία έχει ένα άτομο άνθρακα λιγότερο από το αρχικό αμινοξύ.
- Στο τελευταίο στάδιο της αντίδρασης, με την προσθήκη ενός επιπλέον μορίου νινυδρίνης, παράγεται ένα μόριο (2-(1,3-διοξοϊνδαν-2-υλ) ιμινοϊνδαν-1,3-διόνης), το οποίο αποτελεί το χρωμοφόρο σύμπλοκο νινυδρίνης, μωβ χρώματος.



Εικόνα 18. Στάδια αντίδρασης της νινυδρίνης με το άζωτο ελεύθερων αμινομάδων και σχηματισμός χρωμοφόρου συμπλόκου νινυδρίνης, κατά τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης αζώτου ελεύθερων αμινομάδων.

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο της ανάλυσης, σε δοκιμαστικούς σωλήνες μεταφέρθηκε ποσότητα (1 mL) κατάλληλα αραιωμένου δείγματος υγρού της ζύμωσης, ούτως ώστε το προσδιοριζόμενο FAN να βρίσκεται εντός των ορίων συγκέντρωσης της καμπύλης βαθμονόμησης της μεθόδου (0,2 – 2 mg FAN/L). Οι αραιώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία κυμάνθηκαν μεταξύ των τιμών 1:100, 1:50 και 1:10. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 0,5 mL αντιδραστήριου χρώσης (σύστασης, όπως αυτή αναγράφεται παρακάτω), ακολούθησε ήπια ανάδευση και οι δοκιμαστικοί σωλήνες οδηγήθηκαν σε βρασμό, για 16 λεπτά.

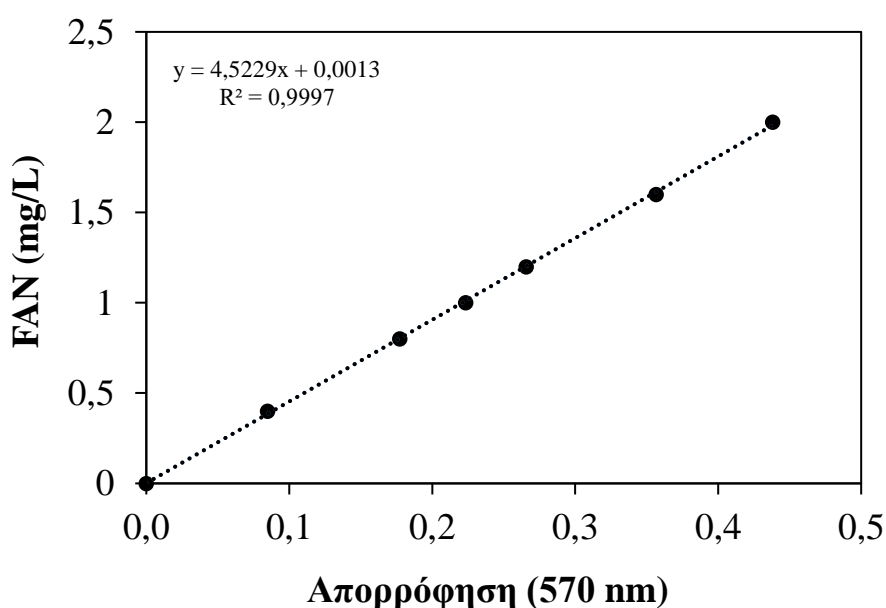
- *Αντιδραστήριο χρώσης (Color reagent): 49,71 g Na₂HPO₄*2H₂O, 5 g νινυδρίνης, 3 g φρουκτόζης και περίπου 60 g KH₂PO₄, διαλύονται σε 1 L απεσταγμένο νερό. Το KH₂PO₄ προστίθεται παράλληλα με τη ρύθμιση του pH, το οποίο πρέπει να κυμαίνεται από 6,6-6,8. Το διάλυμα αποθηκεύεται, εν συνεχεία, σε σκούρο μπουκάλι και σε θερμοκρασία 4 °C, ενώ κρίνεται σκόπιμος ο έλεγχος και η διόρθωση της τιμής pH ανά τακτά χρονικά διαστήματα με την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας KH₂PO₄.*

Μετά το πέρας των 16 λεπτών, οι δοκιμαστικοί σωλήνες ψύχθηκαν σε παγόλουτρο για 20 λεπτά, ώστε να διακοπεί όποια περαιτέρω αντίδραση. Έπειτα, προστέθηκαν 2,5 mL αντιδραστήριου αραιώσης, το όλον αναδεύτηκε επαρκώς σε vortex για 20 δευτερόλεπτα και ακολούθησε φωτομέτρηση σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης UV/VIS (Jasco V-530) και σε μήκος κύματος 570 nm, με τα αποτελέσματα να εκφράζονται σε συγκέντρωση αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (mg FAN/L) ανά

αναλυόμενο δείγμα, συνυπολιγίζοντας και τον κατάλληλο συντελεστή αραίωσης. Για την περίπτωση του μάρτυρα (τυφλό) ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία, αντικαθιστώντας το δείγμα με απιονισμένο νερό.

➤ *Αντιδραστήριο αραίωσης (Dilution reagent): 2g KIO_3 διαλύονται σε 616 mL απιονισμένο νερό και στη συνέχεια προστίθενται 384 mL καθαρής αιθανόλης, έως τελικού όγκου 1 L.*

Η πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης της μεθόδου σχηματίστηκε χρησιμοποιώντας διαδοχικές αραιώσεις από πρότυπο διάλυμα αμινοξέος γλυκίνης, γνωστής συγκέντρωσης. Το Πρότυπο Διάλυμα Γλυκίνης προέκυψε από τη διάλυση 1 mL Αποθεματικού Διαλύματος Γλυκίνης σε 100 mL απιονισμένου νερού, ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση FAN 2 mg/L. Η παρασκευή που Αποθεματικού Διαλύματος Γλυκίνης είχε προηγηθεί διαλύοντας 0,1072 g γλυκίνης σε 100 mL απιονισμένου νερού και αποθηκεύοντας το παρασκεύασμα σε θερμοκρασία 4 °C (Εικόνα 19).



Εικόνα 19. Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης της μεθόδου και εξίσωση ποσοτικοποίησης FAN (mg/L) με χρήση προτύπου διαλύματος του αμινοξέος γλυκίνη. Η γραμμική συσχέτιση έγινε με βάση το γραμμικό μοντέλο, με συντελεστή γραμμικής παλινδρόμησης $R^2=0,9997$.

4.4. Προσδιορισμός συγκέντρωσης αμμωνιακών αλάτων - Inorganic Nitrogen

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της αμμωνίας και κατ' επέκταση του αμμωνιακού αζώτου έγινε φωτομετρικά και στηρίχθηκε στην αντίδραση της αμμωνίας με υποχλωριώδη ιόντα, σχηματίζοντας μονοχλωραμίνη η οποία στη συνέχεια αντιδρά με φαινολικά ανιόντα προς σχηματισμό ενός παραγώγου της ινδοφαινόλης με χαρακτηριστικό μπλε – πράσινο χρώμα. Η ένταση με την οποία απορροφά το έγχρωμο σύμπλοκο είναι ευθέως ανάλογη με τη συγκέντρωση του παραγώγου της ινδοφαινόλης και συνεπώς της αμμωνίας που έχει αντιδράσει και η οποία ισοδυναμεί με τη συγκέντρωση του αμμωνιακού αζώτου (mg/L) στο εξεταζόμενο δείγμα.

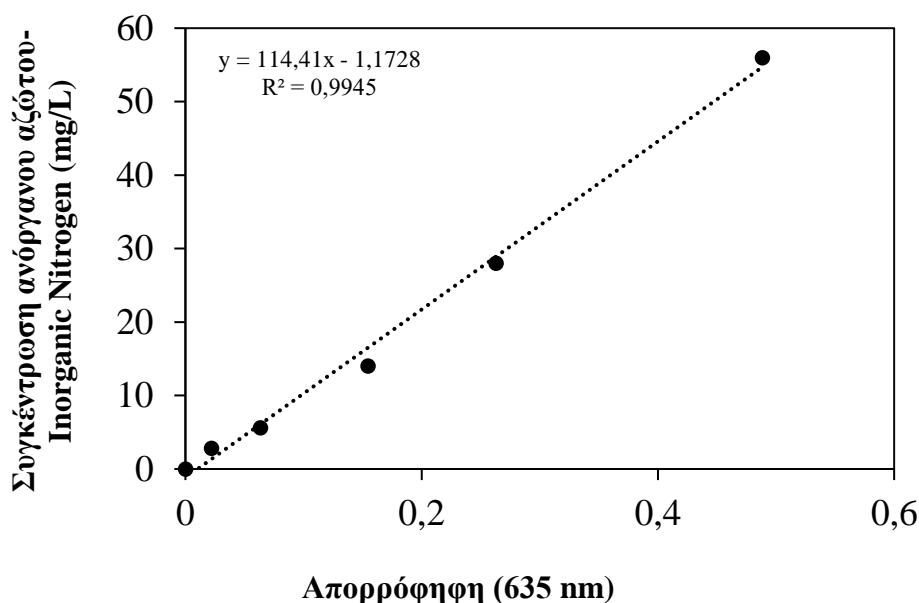
Η πειραματική διαδικασία ξεκίνησε μεταφέροντας σε δοκιμαστικούς σωλήνες 50 μ L κατάλληλα αραιωμένου δείγματος από το υπερκείμενο υγρό της ζύμωσης, ώστε η συγκέντρωση του αζώτου στα δείγματα να βρίσκεται εντός των ορίων της καμπύλης βαθμονόμησης της μεθόδου (2,8 – 56 mg N/L). Η αραιώση που χρησιμοποιήθηκε για τις καλλιέργειες της παρούσας εργασίας είναι 1:10. Έπειτα, προστέθηκαν με τη σειρά που αναφέρονται: 2 mL απιονισμένου νερού, 1 mL φαινολικού διαλύματος καταλύτη και 1,5 mL αλκαλικού διαλύματος υποχλωριώδους οξέος. Μετά από κάθε προσθήκη ακολούθησε επαρκής ανάδευση σε vortex. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες παρέμειναν σε ηρεμία σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 1 ώρα προς σχηματισμό του έγχρωμου συμπλόκου και στη συνέχεια μεταφέρθηκε κατάλληλη ποσότητα δείγματος σε κυψελίδα 10 mm και μετρήθηκε η απορρόφηση σε μήκος κύματος $\lambda=635$ nm, σε φασματοφωτόμετρο UV/VIS. Για το τυφλό δείγμα που εμπεριείχε 50 μ L απιονισμένου νερού, έχει ακολουθηθεί ακριβώς η ίδια πορεία όπως και για τα υπόλοιπα δείγματα (Scheiner, 1976). Σύμφωνα με τις ληφθείσες μετρήσεις και με τη χρήση της πρότυπης καμπύλης βαθμονόμησης της μεθόδου, τα αποτελέσματα των απορροφήσεων μεταφράστηκαν σε συγκέντρωση αμμωνιακού αζώτου (mg N/L) ανά αναλυόμενο δείγμα, συνυπολογίζοντας κάθε φορά το συντελεστή αραιώσης.

- *Φαινολικό διάλυμα καταλύτη: Για την παρασκευή 100 mL διαλύματος, ζυγίζονται 6 g φαινόλης και διαλύονται σε περίπου 80 mL ρυθμιστικού διαλύματος [(1,3 g φωσφορικού νατρίου (Na_3PO_4), 3 g τριβασικού κιτρικού νατρίου ($Na_3C_6H_5O_7$) και 0,3 g EDTA διαλύονται σε 80 mL απιονισμένου νερού και το διάλυμα αραιώνεται έως τελικού όγκου 100 mL και με τιμή pH περί το 9]. Έπειτα προστίθενται 20 mg*

νιτροπρωσσικού νατρίου (*sodium nitroprusside*) και ο όγκος του διαλύματος συμπληρώνεται έως τα 100 mL με ρυθμιστικό διάλυμα και επιθυμητή τιμή pH=9.

- *Αλκαλικό διάλυμα υποχλωριώδους οξέος:* Για την παρασκευή 200 mL του αντιδραστηρίου, διαλύονται 2 g υποχλωριώδους νατρίου (NaClO) σε 80 mL διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) 1N και ο όγκος συμπληρώνεται με απιονισμένο νερό έως τα 200 mL.

Η πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης της μεθόδου κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας διαδοχικές αραιώσεις από πρότυπο διάλυμα θειικού αμμωνίου συγκέντρωσης 4 mM. Το πρότυπο διάλυμα θειικού αμμωνίου προέκυψε από τη διάλυση 0,052 g (NH₄)₂SO₄ σε 80 mL απιονισμένου νερού και συμπληρώνοντας με απιονισμένο νερό έως τελικού όγκου του διαλύματος, 100 mL. Από το πρότυπο διάλυμα θειικού αμμωνίου δημιουργήθηκαν με διαδοχικές αραιώσεις διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων 2,8, 5,6, 14, 28 και 56 mg N/L και ακολουθήθηκε η πορεία της ανάλυσης που έχει περιγραφεί προηγουμένως. Με τον τρόπο αυτό κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης της μεθόδου συσχετίζοντας γραμμικά την απορρόφηση με τη συγκέντρωση αμμωνιακού αζώτου για τα διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης που χρησιμοποιήθηκαν (Εικόνα 20).



Εικόνα 20. Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης της μεθόδου και εξίσωση ποσοτικοποίησης αμμωνιακού αζώτου (mg N/L) με χρήση προτύπου διαλύματος του θειικού αμμωνίου. Η γραμμική συσχέτιση έγινε με βάση το γραμμικό μοντέλο, με συντελεστή γραμμικής παλινδρόμησης $R^2 = 0,9945$.

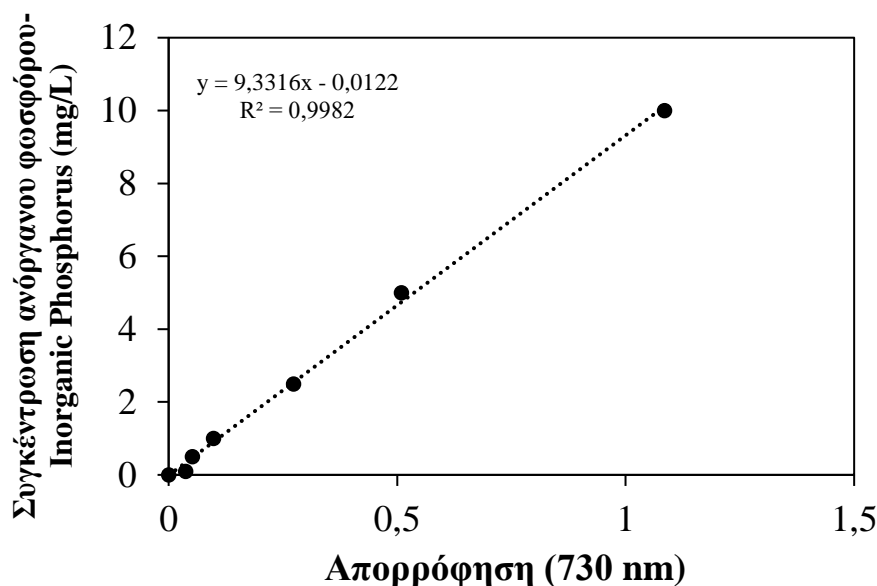
4.5. Προσδιορισμός συγκέντρωσης φωσφορικών αλάτων – Inorganic Phosphorus (IP)

Στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν ως πηγή φωσφόρου τα άλατα KH_2PO_4 και $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Συνεπώς, κρίθηκε σκόπιμος ο ποσοτικός προσδιορισμός του ανόργανου φωσφόρου (IP) που καταναλώθηκε από τον μικροοργανισμό κατά τη διάρκεια των ζυμώσεων, ως μέτρο παρακολούθησης της ανάπτυξης της καλλιέργειας.

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό του ανόργανου φωσφόρου (IP) είναι φωτομετρική και βαθμονομήθηκε με τη χρήση πρότυπης καμπύλης, συσχετίζοντας γραμμικά την απορρόφηση δειγμάτων γνωστών συγκεντρώσεων ανόργανου φωσφόρου, με τις τιμές των συγκεντρώσεων αυτών (Εικόνα 21). Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην αντίδραση των φωσφορικών ιόντων με μολυβδαινικά ιόντα σε ασθενές όξινο περιβάλλον, παρουσία κατάλληλου αναγωγικού παράγοντα. Το προϊόν της αντίδρασης είναι το φωσφορομολυβδαινικό οξύ, το οποίο ανάγεται στη συνέχεια από το ασκορβικό οξύ, δίνοντας ένα έγχρωμο σύμπλοκο μπλε χρώματος (μπλε του φωσφορομολυβδαινίου), η ένταση του οποίου είναι ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης των φωσφορικών ιόντων στο δείγμα.

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για την εν λόγω ανάλυση ορίζει την αραιώση του δείγματος υπερκείμενου υγρού της ζύμωσης σε δοκιμαστικούς σωλήνες με απιονισμένο νερό έως τελικού όγκου 5 mL, ακολουθώντας ανάδευση. Η τελική αραιώση που χρησιμοποιήθηκε για τις καλλιέργειες της παρούσας εργασίας ήταν 1:200, αφού είχαν προηγηθεί διαδοχικές αραιώσεις 1:20 και 1:10. Στη συνέχεια, σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκαν 0,4 mL διαλύματος υπερχλωρικού οξέος 60% v/v, 0,3 mL διαλύματος L – ασκορβικού οξέος συγκέντρωσης 10 g/L και 0,4 mL διαλύματος μολυβδαινικού αμμωνίου συγκέντρωσης 50 g/L. Μετά από κάθε προσθήκη αντιδραστήριου ακολούθησε ανάδευση σε vortex για ακριβώς 20 δευτερόλεπτα. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες αφέθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 10 λεπτά, ώστε να αναπτυχθεί το μπλε χρώμα του σχηματιζόμενου συμπλόκου, η απορρόφηση του οποίου μετρήθηκε σε μήκος κύματος $\lambda=730$ nm σε φασματοφωτόμετρο UV/VIS. Σύμφωνα με τις ληφθείσες μετρήσεις και με τη χρήση της πρότυπης καμπύλης βαθμονόμησης της μεθόδου, τα αποτελέσματα των απορροφήσεων μεταφράστηκαν σε

συγκέντρωση ανόργανου φωσφόρου (mg IP/L) ανά αναλυόμενο δείγμα, συνυπολογίζοντας κάθε φορά το συντελεστή αραιώσης.



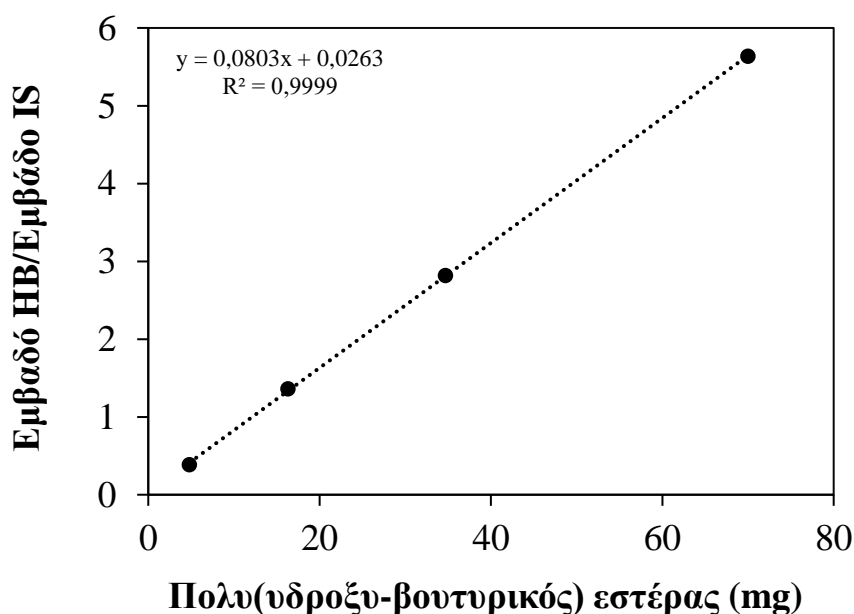
Εικόνα 21. Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης της μεθόδου και εξίσωση ποσοτικοποίησης IP (mg/L) με χρήση διαλυμάτων γνωστών συγκεντρώσεων IP. Η γραμμική συσχέτιση έγινε με βάση το γραμμικό μοντέλο, με συντελεστή γραμμικής παλινδρόμησης $R^2 = 0,9982$.

4.6. Ποσοτικός προσδιορισμός ενδοκυττάριου PHB

Η συγκέντρωση του PHB προσδιορίστηκε με βάση την παραγωγοποίηση του 3-υδροξυβουτυρικού οξέος σε προπυλεστέρα (Riis & Mai, 1988). Συγκεκριμένα, η αποξηραμένη βιομάζα κάθε δείγματος, επεξεργάστηκε ως εξής: Αρχικά, προστέθηκαν σε κάθε δείγμα 2 mL 1,2-διχλωροαιθάνιο. Ακολούθως, μεταφέρθηκαν 2 mL διαλύματος οξινισμένης προπανόλης (HCl:n-προπανόλη 1:4) στο ελαιώρημα με επακόλουθη προσθήκη 200 μ L βενζοϊκού οξέος, το οποίο χρησιμοποιήθηκε, ως εσωτερικό πρότυπο για την καμπύλη βαθμονόμησης της μεθόδου (Εικόνα 22). Μετά την προσθήκη κάθε αντιδραστηρίου ακολούθησε επαρκής ανάδευση σε vortex και στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 100 °C για 2 ώρες. Μετά το πέρας του χρονικού αυτού διαστήματος, τα δείγματα αφαιρέθηκαν από το υδατόλουτρο και αφήθηκαν να κρυώσουν. Ο διαχωρισμός φάσης επετεύχθη με την προσθήκη 4 mL απιονισμένου νερού, έντονη ανάδευση και ηρεμία του όλου. Κατ' αυτόν τον τρόπο δημιουργήθηκε μίγμα δύο φάσεων, με την οργανική φάση, η οποία περιείχε τους προπυλεστέρες του PHB, να βρίσκεται στον πυθμένα και την υδατική

φάση με την υπολειπόμενη βιομάζα να βρίσκεται στην επιφάνεια. Η οργανική φάση συλλέχθηκε και μεταφέρθηκε σε γυάλινο φιαλίδιο με άλας άνυδρου θειικού νατρίου (Na_2SO_4), ώστε να κατακρατηθεί τυχόν περιεχόμενη υγρασία και τέλος αναλύθηκε στον αέριο χρωματογράφο.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του ενδοκυττάριου PHB χρησιμοποιήθηκε Αέρια Χρωματογραφία (Gas Chromatography - GC). Ο αέριος χρωματογράφος (Shimadzu, Nexis GC 2030) ήταν εφοδιασμένος με αυτόματο δειγματολήπτη (AOC-20i plus), ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (Flame Ionization Detector, FID) και μία στήλη Mega-Wax column ($30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm}$, film thickness $0.25 \mu\text{m}$, MEGA S.r.l). Το ήλιο χρησιμοποιήθηκε ως φέρον αέριο με ροή 1 mL/min . Η αρχική θερμοκρασία του φούρνου ήταν 100°C για ένα λεπτό. Στη συνέχεια με ένα ρυθμό 25°C/min ανέβηκε 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 θερμοκρασιακό ρυθμό 25°C/min η θερμοκρασία ανήλθε στους 250°C όπου και παρέμεινε για 5 min . Το βενζοϊκό οξύ χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο σε συγκέντρωση 200 mg/L και η εμφάνιση των μονομερών (3HB) στη χρωματογραφία, επιβεβαιώθηκε με βάση τον χρόνο κατακράτησης από αντίστοιχα μονομερή από εμπορικά πρότυπα PHB.



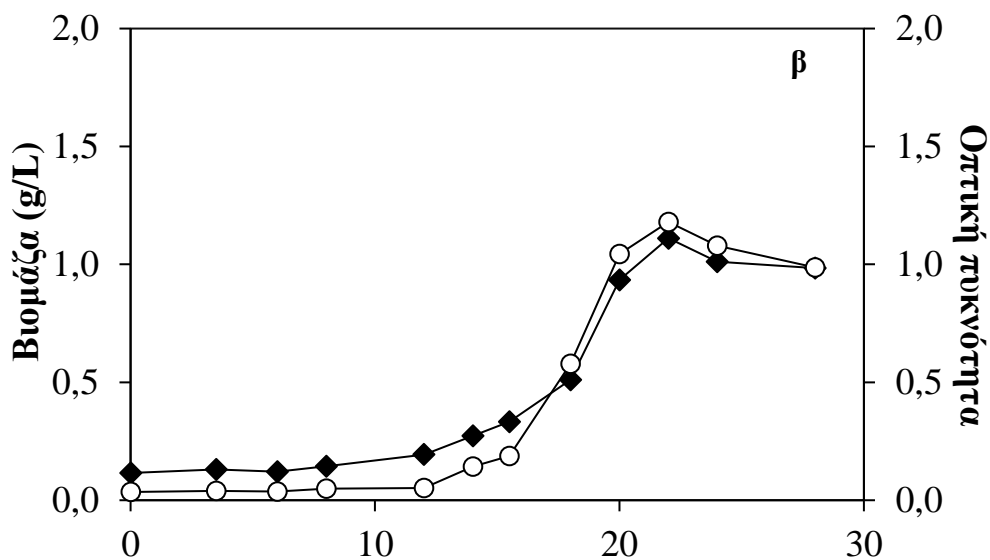
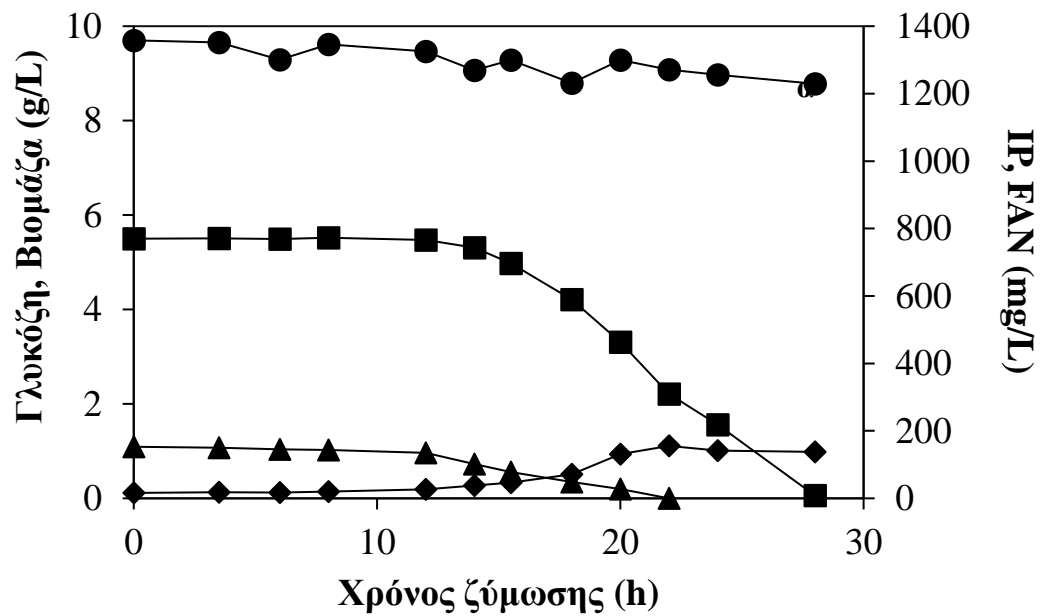
Εικόνα 22. Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης της μεθόδου και εξίσωση ποσοτικοποίησης PHB (mg) με χρήση βενζοϊκού οξέος, ως εσωτερικό πρότυπο. Η γραμμική συσχέτιση έγινε με βάση το γραμμικό μοντέλο, με συντελεστή γραμμικής παλινδρόμησης $R^2 = 0,9999$.

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

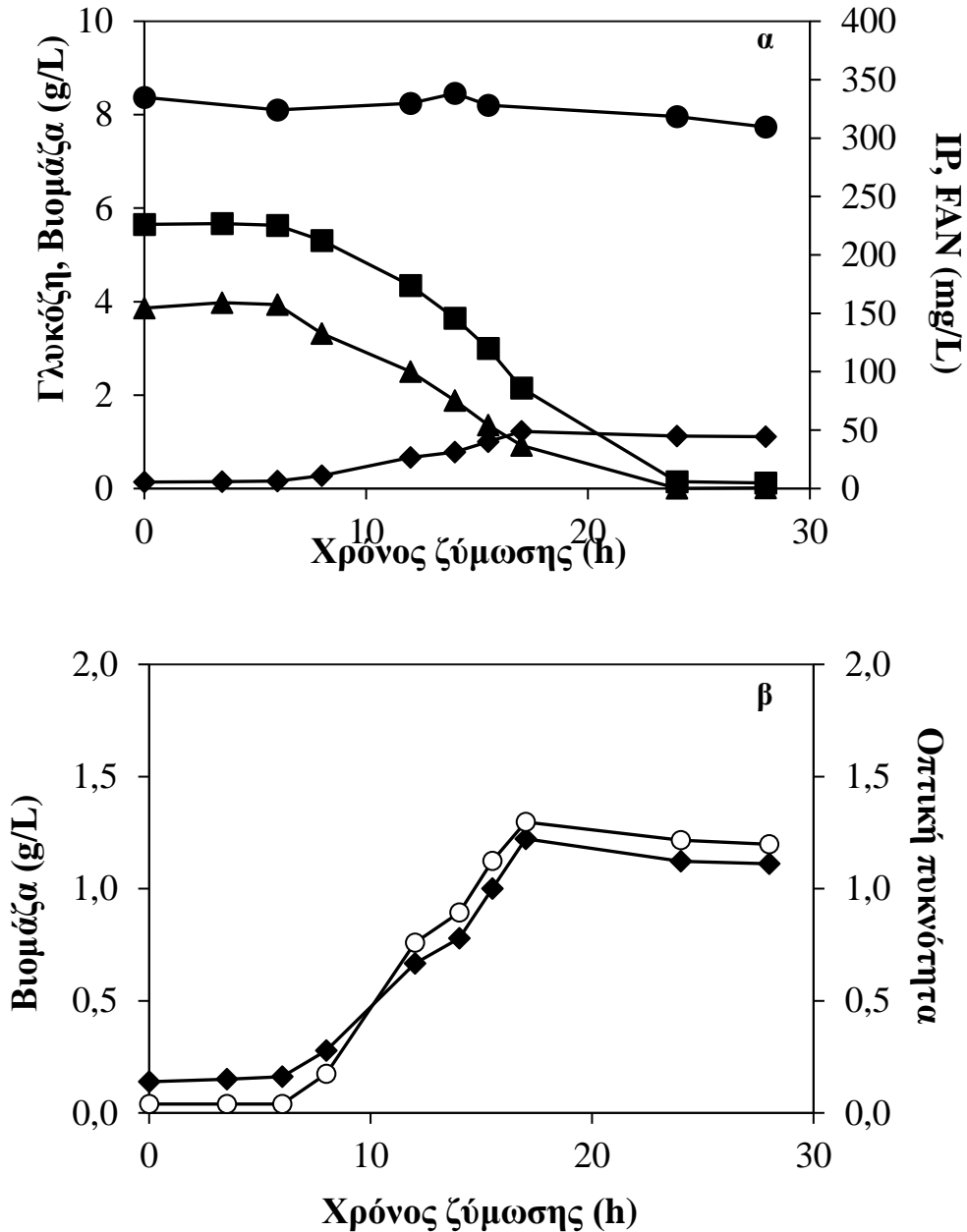
5.1. Ασυνεχείς ζυμώσεις σε κωνικές φιάλες για την παραγωγή PHB

5.1.1. Κινητική εμβολίου του βακτηρίου *A. lata*

Αρχικά μελετήθηκε η ανάπτυξη του μικροοργανισμού, μέσω οπτικής πυκνότητας και προσδιορισμού της ξηρής βιομάζας, κατά την διάρκεια καλλιέργειας σε διαφορετικής σύστασης θρεπτικά μέσα (A και B), όπως αναφέρεται στην υποενότητα 3.3. Κατά την διάρκεια των ζυμώσεων προσδιορίστηκε η κατανάλωση των πηγών άνθρακα και αζώτου, καθώς και η παραγωγή βιομάζας. Η κινητική αύξησης του μικροοργανισμού για το κάθε θρεπτικό μέσο παρουσιάζονται στα Γραφήματα 1 και 2. Από τα Γραφήματα παρατηρείται ότι η ανάπτυξη του μικροοργανισμού είναι πιο γρήγορη για το θρεπτικό μέσο B, που περιείχε κατά κύριο λόγο οργανική πηγή αζώτου, με την εκθετική φάση του μικροοργανισμού να επιτυγχάνεται μεταξύ 14 - 17 ωρών και την οπτική πυκνότητα να κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 0,89-1,23 (Γράφημα 2). Στο Γράφημα 1, όπου παρουσιάζεται η κινητική εμβολίου στο θρεπτικό μέσο A, παρατηρείται ότι ο μικροοργανισμός έχει πιο αργή ανάπτυξη σε σύγκριση με το μέσο B, καθώς η εκθετική φάση επιτυγχάνεται περίπου στις 18 - 22 ώρες. Συμπερασματικά, φαίνεται ότι ο μικροοργανισμός έχει πιο γρήγορη ανάπτυξη στην περίπτωση της προκαλλιέργειας, που αποτελείτο μόνο από οργανική πηγή αζώτου, σε αντίθεση με την ανάπτυξη σε υπόστρωμα με ανόργανη πηγή αζώτου, όπου η ανάπτυξη υστέρησε.



Γράφημα 1 .α. Κινητική ανάπτυξης υγρού εμβολίου με το θρεπτικό μέσο Α . Κατανάλωση γλυκόζης (■), FAN (▲), Ανόργανος φώσφορος IP (●), **β.** παραγωγή βιομάζας (♦), οπτική πυκνότητα (○).



Γράφημα 2.α. Κινητική ανάπτυξης υγρού εμβολίου με το **θρεπτικό μέσο Β**. Κατανάλωση γλυκόζης (■), FAN (▲), Ανόργανος φώσφορος IP (●), **2.β** παραγωγή βιομάζας (◆), οπτική πυκνότητα (○).

5.1.2. Ασυνεχείς ζυμώσεις με το βακτηριακό στέλεχος *A. lata* με διαφορετικά σάκχαρα ως πηγή άνθρακα

Για τη βιοτεχνολογική παραγωγή PHB έλαβαν χώρα ασυνεχείς ζυμώσεις σε κωνικές φιάλες, με χρήση του βακτηριακού στελέχους *A. lata* DSM 1123 (βλ. παράγραφο 3.4). Οι πηγές άνθρακα που μελετήθηκαν σε πρώτο χρόνο αφορούσαν τα εμπορικά σάκχαρα: σακχαρόζη, γλυκόζη, φρουκτόζη, μαννόζη, ξυλόζη, γαλακτόζη και

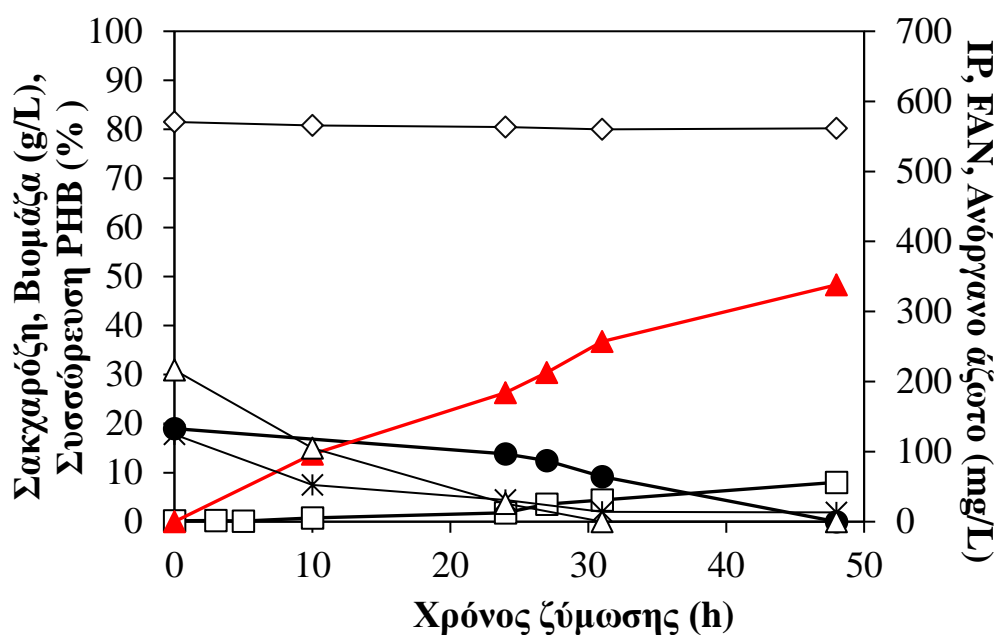
αραβινόζη, με αρχική συγκέντρωση 20 g/L. Ακολούθησαν ζυμώσεις με πηγή άνθρακα εκχύλισμα ελεύθερων σακχάρων αποβλήτων φρούτων και υδρόλυμα πιτύρου σίτου. Τα αποτελέσματα των ζυμώσεων παρουσιάζονται στον Πίνακα 8 και αναπτύσσονται αναλυτικά ακολούθως, ενώ στον Πίνακα 9 γίνεται βιβλιογραφική ανασκόπηση ζυμώσεων με τον μικροοργανισμό *A. lata*, σε κωνικές φιάλες με διαφορετικές πηγές άνθρακα για την παραγωγή ΡΗΒ. Κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας και με βάση τα αποτελέσματα των αναλύσεων προσδιορίστηκε ο συντελεστής απόδοσης ως προς το προϊόν, $Y_{\text{ΡΗΒ/S}}$ ($\text{g}_{\text{ΡΗΒ}}/\text{g}_{\text{υποστρώματος}}$), καθώς και η παραγωγικότητα του προϊόντος, $R_{\text{ΡΗΒ}}$ ($\text{g}_{\text{ΡΗΒ}}/\text{L/h}$).

Πίνακας 8. Συνοπτικά αποτελέσματα ασυνεχών ζυμώσεων με τον μικροοργανισμό *A. lata* DSM 1123, σε κωνικές φιάλες με διαφορετικές πηγές άνθρακα για την παραγωγή PHB.

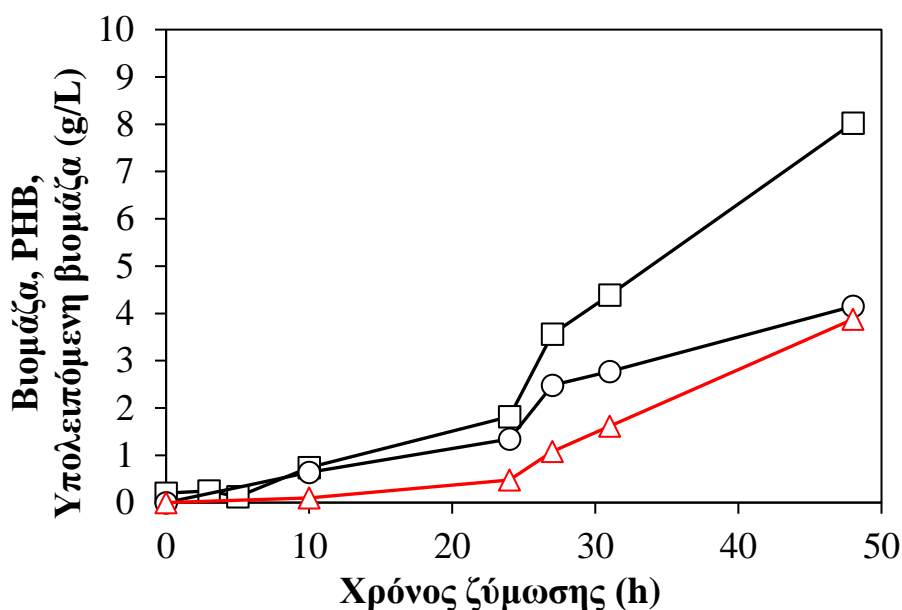
Πηγή άνθρακα	Συγκέντρωση εκκίνησης (g/L)	DCW (g/L)	PHB (g/L)	Συσσώρευση PHB (%)	Y _{PHB/S} (g/g)	P _{PHB} (g/L/h)
Σακχαρόζη	20,0	8,03	3,88	48,3	0,19	0,081
Γλυκόζη	20,0	5,89	2,62	44,5	0,13	0,037
Φρουκτόζη	20,0	4,26	1,71	40,1	0,09	0,023
Μαννόζη	20,0	3,30	0,29	8,79	0,02	0,002
Γαλακτόζη	20,0	1,31	-	-	-	-
Αραβινόζη	20,0	2,00	-	-	-	-
Ξυλόζη	20,0			Δεν αφομοιώθηκε		
Ελεύθερα σάκχαρα φρούτων (Φρουκτόζη-Γλυκόζη-Σακχαρόζη)	20,0	9,45	5,19	54,9	0,26	0,172
	40,0			Δεν αφομοιώθηκε		
	60,0			Δεν αφομοιώθηκε		
Υδρόλυμα πιτύρου σίτου (Γλυκόζη-Ξυλόζη-Αραβινόζη)	15,5	7,92	3,37	42,5	0,22	0,112

i. Υπόστρωμα με πηγή άνθρακα την εμπορική σακχαρόζη

Η κινητική της καλλιέργειας του *A. lata* σε θρεπτικό υπόστρωμα με πηγή άνθρακα την εμπορική σακχαρόζη, συγκέντρωσης 20 g/L, παρουσιάζεται στο Γράφημα 3 και, όπως γίνεται αντιληπτό, τόσο η πηγή άνθρακα, όσο και το FAN και το ανόργανο άζωτο, καταναλώθηκαν πλήρως εντός 48 ωρών. Η παραχθείσα βιομάζα έφτασε τα 8,03 g/L, με το πολυμερές να ξεκινάει να συσσωρεύεται περίπου στις 24 ώρες (Γράφημα 4), όταν πλέον είχε καταναλωθεί το μεγαλύτερο μέρος της οργανικής και της ανόργανης πηγής αζώτου, ενώ στο τέλος της ζύμωσης η περιεκτικότητα ανήλθε στο 48,3 % (3,88 g/L PHB επί ξηρής βιομάζας). Ο συντελεστής μετατροπής του καταναλωθέντος υποστρώματος ως προς το προϊόν στο τέλος της ζύμωσης, ήταν 0,20 g/g. Η παραγωγικότητα της συγκεκριμένης ζύμωσης προσδιορίστηκε στα 0,081 g/L/h. Η πηγή ανόργανου φωσφόρου πρακτικά δεν καταναλώθηκε.



Γράφημα 3. Κατανάλωση σακχάρων (●), FAN (x), IP (◇), ανόργανου αζώτου (Δ), παραγωγή βιομάζας (□) και ενδοκυτταρική συσσώρευση PHB (▲) κατά τη διάρκεια ασυνεχούς ζύμωσης σε κωνικές φιάλες με τον μικροοργανισμό *A. lata*, σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα την εμπορική σακχαρόζη.

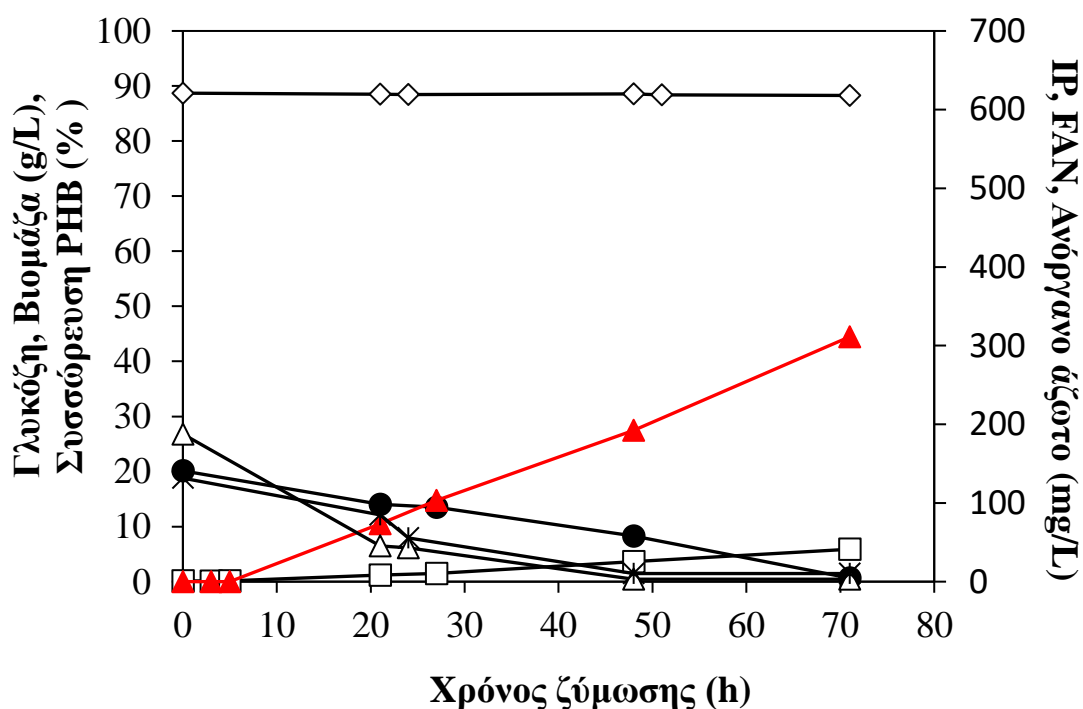


Γράφημα 4. Κινητική παραγωγής βιομάζας (□), υπολειπόμενης βιομάζας (○) και PHB (Δ) του μικροοργανισμού *A. lata*, σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα την εμπορική σακχαρόζη.

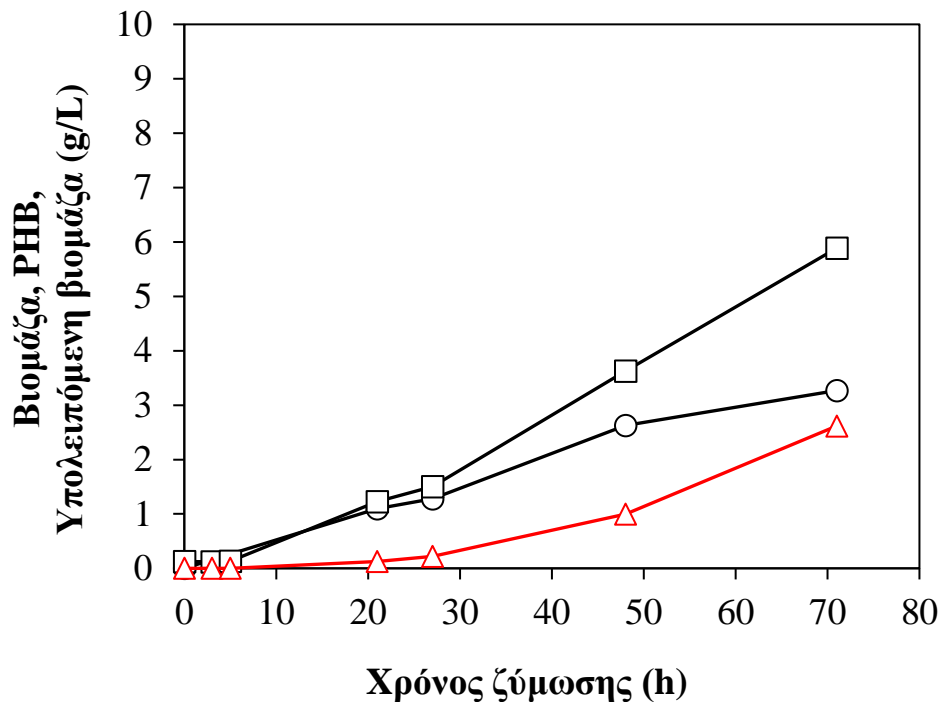
Στη μελέτη των Yezza *et al.* (2007), όπου χρησιμοποιήθηκε εμπορική σακχαρόζη αρχικής συγκέντρωσης 20 g/L ως πηγή άνθρακα, για την καλλιέργεια διάρκειας 27 ωρών του στελέχους *A. latus* ATCC 29714 σε κωνικές φιάλες, παρατηρήθηκε παραγωγή βιομάζας έως 2,90 g/L με περιεχόμενο ποσοστό PHB 74,1% (2,15 g/L PHB επί ξηρής βιομάζας), σαφώς υψηλότερο από το ποσοστό που προσδιορίστηκε στην παρούσα μελέτη (49,9%). Σε σχέση με την παρούσα μελέτη (8,03 g/L και 3,88 g/L βιομάζας και PHB, αντίστοιχα), η παραγωγή βιομάζας και PHB ήταν μικρότερη σε απόλυτες τιμές. Οι Zafar *et al.* (2012) στη μελέτη τους, με χρήση επίσης εμπορικής σακχαρόζης ως πηγή άνθρακα με αρχική συγκέντρωση περί τα 35,2 g/L, ανέφεραν παραγωγή βιομάζας που ανήλθε στα 10,6 g/L και ενδοκυτταρική συσσώρευση PHB 48% (5,10 g/L PHB επί ξηρής βιομάζας). Σε μεταγενέστερη μελέτη Zafar *et al.* (2014), οι ερευνητές παρατήρησαν πως η χρήση της ίδιας πηγής άνθρακα με συγκέντρωση εκκίνησης περί τα 30 g/L, οδήγησε σε μικρές διαφορές αναφορικά με την παραγωγή βιομάζας, την παραγωγή PHB και την συσσώρευση του πολυμερούς, με τις τιμές να φτάνουν τα 7,92 g/L, 3,50 g/L και 44,2%, αντίστοιχα. Στην παρούσα μελέτη, παρατηρούνται ελαφρώς μεγαλύτερες τιμές παραγωγής βιομάζας και PHB. Ωστόσο, η παραγωγικότητα ήταν αρκετά υψηλότερη (0,081 g/L/h) συγκριτικά με την βιβλιογραφικά αναφερόμενη, ήτοι 0,049 g/L/h.

ii. Υπόστρωμα με πηγή άνθρακα την εμπορική γλυκόζη

Όσον αφορά τη ζύμωση με υπόστρωμα γλυκόζης, η παραγωγή ξηρής βιομάζας έφθασε περί τα 5,89 g/L στο τέλος της ζύμωσης, με ποσοστό περιεχόμενου PHB περί το 44,5% w/w (Γράφημα 5). Η αρχική συγκέντρωση FAN και ανόργανου αζώτου προσδιορίστηκαν στα 131 και 187 mg/L αντίστοιχα και καταναλώθηκαν το μεγαλύτερο ποσοστό στις 70 ώρες ζύμωσης. Όπως φαίνεται στο Γράφημα 6, από τα 5,89 g/L της συνολικής ξηρής βιομάζας, τα 2,62 g/L αφορούν το PHB, που συσσωρεύτηκε στα βακτηριακά κύτταρα έως εκείνη τη χρονική στιγμή, ενώ 3,27 g/L αντιστοιχούν στην υπολειπόμενη βιομάζα. Ο συντελεστής απόδοσης βιομάζας υπολογίστηκε σε 0,16 g/g, ενώ η απόδοση μετατροπής σε PHB ήταν 0,13 g/g. Η παραγωγικότητα της συγκεκριμένης ζύμωσης έφτασε στα 0,037 g/L/h. Τέλος, παρατηρήθηκε ότι η πηγή ανόργανου φωσφόρου παρέμεινε σχεδόν στα αρχικά επίπεδα (περίπου 620 mg/L) καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης.



Γράφημα 5. Κατανάλωση σακχάρων (●), FAN (×), IP (◇), ανόργανου αζώτου (Δ), παραγωγή βιομάζας (□) και ενδοκυτταρική συσσωρευση PHB (▲) κατά τη διάρκεια ασυνεχούς ζύμωσης σε κωνικές φιάλες με τον μικροοργανισμό *A. lata*, σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα την εμπορική γλυκόζη.

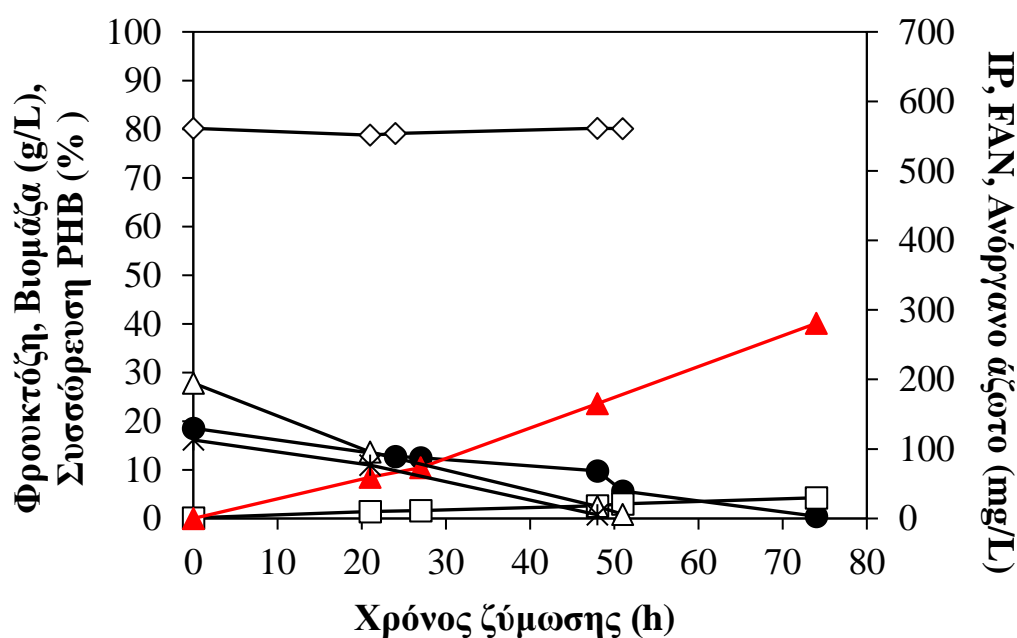


Γράφημα 6. Κινητική παραγωγής βιομάζας (□), υπολειπόμενης βιομάζας (○) και PHB (Δ) του μικροοργανισμού *A. lata*, σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα την εμπορική γλυκόζη.

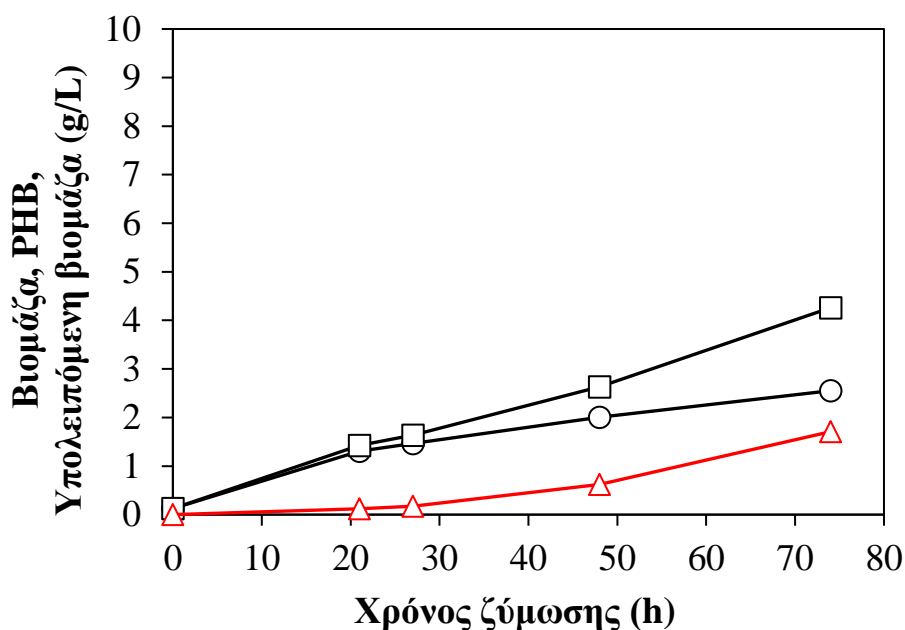
Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι Karbasi *et al.* (2012) στη μελέτη τους, όπου χρησιμοποιήθηκε εμπορική γλυκόζη αρχικής συγκέντρωσης 40 g/L για την καλλιέργεια του στελέχους *A.lata* DSMZ 1123, ανέφεραν παραγωγή βιομάζας που ανήλθε σε 10,5 g/L και συσσώρευση PHB σε ποσοστό 39,1% (4,10 g/L PHB επί ξηρής βιομάζας). Συγκρίνοντας τα παραπάνω δεδομένα με την παρούσα μελέτη, αν και η παραχθείσα βιομάζα δεν ξεπέρασε τα 5,89 g/L, το ποσοστό συσσώρευσης του πολυμερούς ήταν υψηλότερο, φτάνοντας το 44,5% w/w. Συνεχίζοντας με τα αποτελέσματα των Zafar *et al.* (2014), παρατηρήθηκε παραπλήσια έκβαση με την καλλιέργεια της παρούσας μελέτης σε επίπεδο παραγωγής βιομάζας (7,55 g/L) και PHB (3,40 g/L), αλλά και όσον αφορά την παραγωγικότητα του πολυμερούς που άγγιξε τα 0,047 g/L/h έναντι 0,037 g/L/h στην περίπτωση της εν λόγω μελέτης. Επιπλέον, σε ζύμωση με τις ίδιες συνθήκες αλλά αρχική συγκέντρωση εμπορικής γλυκόζης 50 g/L, οι Karbasi *et al.* (2016), κατέγραψαν υποδιπλάσιο ποσοστό συσσώρευσης πολυμερούς (20%) σε σχέση με το προαναφερθέν 44,5% που επετεύχθη στη μελέτη που παρουσιάζεται, ενώ παράλληλα σημειώθηκε σημαντικά υψηλότερη παραγωγικότητα PHB φτάνοντας τα 0,071 g/L/h.

iii. Υπόστρωμα με πηγή άνθρακα την εμπορική φρουκτόζη

Συνεχίζοντας, όπως φαίνεται στο Γράφημα 7, η χρήση εμπορικής φρουκτόζης αρχικής συγκέντρωσης 20 g/L ως πηγή άνθρακα στην επόμενη ζύμωση, οδήγησε σε πλήρη κατανάλωση του σακχάρου στις 74 ώρες, ενώ η πηγή οργανικού αλλά και ανόργανου αζώτου είχε ήδη εκλείψει έως τις 48 ώρες. Η βιομάζα που παρήχθη αντιστοιχούσε σε 4,26 g/L ξηρού βάρους με περιεχόμενο PHB σε ποσοστό 40,1% (Γράφημα 8). Η τιμή της παραγωγικότητας του προϊόντος που επετεύχθη κατά τη ζύμωση έφτασε στα 0,023 g/L/h. Ο συντελεστής μετατροπής του καταναλωθέντος υποστρώματος σε βιομάζα, στο τέλος της ζύμωσης, ήταν 0,03 g/g, ενώ ως προς το προϊόν ήταν 0,09 g/g. Η πηγή ανόργανου φωσφόρου πρακτικά δεν καταναλώθηκε.



Γράφημα 7. Καταναάλωση σακχάρων (●), FAN (x), IP (◇), ανόργανου αζώτου (Δ), παραγωγή βιομάζας (□) και ενδοκυτταρική συσσώρευση PHB (▲) κατά τη διάρκεια ασυνεχούς ζύμωσης σε κωνικές φιάλες με τον μικροοργανισμό *A. lata*, σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα την εμπορική φρουκτόζη.



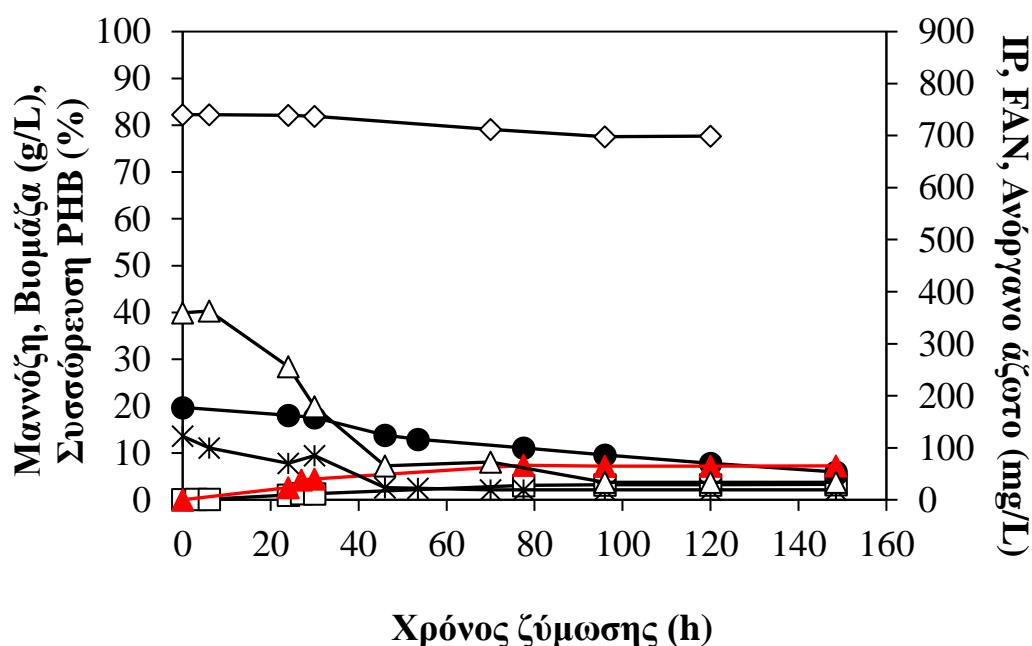
Γράφημα 8. Κινητική παραγωγής βιομάζας (□), υπολειπόμενης βιομάζας (○) και PHB (Δ) του μικροοργανισμού *A. lata*, σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα την εμπορική φρουκτόζη.

Η εμπορική φρουκτόζη σε συγκέντρωση 40 g/L αποτέλεσε ένα εκ των ερευνώμενων υποστρωμάτων για την καλλιέργεια του στελέχους *A. lata* DSMZ 1123, στην εργασία των Karbasi *et al.* (2012), οι οποίοι ανέφεραν ότι παρήχθησαν 14,1 g/L ξηρής βιομάζας με περιεχόμενο ποσοστό PHB μόλις 13,5% w/w. Αντίθετα, στην παρούσα μελέτη αν και η παραχθείσα βιομάζα ήταν χαμηλότερη (4,26 g/L), η περιεκτικότητα σε PHB κυμάνθηκε αρκετά υψηλότερα φτάνοντας το 40,1% w/w. Ο συντελεστής μετατροπής του καταναλωθέντος υποστρώματος σε PHB και η παραγωγικότητα του προϊόντος άγγιζαν τα 0,10 g/g και 0,032 g/L/h, αντίστοιχα, τιμές που είναι συγκρίσιμες με αυτές που σημειώθηκαν στην παρούσα μελέτη (0,09 g/g και 0,023 g/L/h). Επιπρόσθετα, σε ασυνεχή ζύμωση με το στέλεχος *A.lata* MTCC 2311 σε κωνικές φιάλες με αρχική συγκέντρωση σακχάρου 30 g/L με τη χρήση της ίδιας πηγής άνθρακα, οι Zafar *et al.* (2014) ανέφεραν παραγωγή βιομάζας και PHB περί τα 8,35 g/L και 3,60 g/L, αντίστοιχα. Η περιεκτικότητα του πολυμερούς ισοδυναμεί με το 43,1% w/w επί ξηρού, ποσοστό που ομοιάζει με εκείνο που αναφέρθηκε ήδη για την παρούσα εργασία (40,1 % w/w). Η παραγωγικότητα του πολυμερούς έφτασε σε 0,05 g/L/h, ενώ στην παρούσα μελέτη υπολογίστηκε σε 0,023 g/L/h. Είναι φανερό πως οι βιβλιογραφικά αναφερόμενες τιμές, εκτός από την περιεκτικότητα του πολυμερούς, είναι σχεδόν διπλάσιες από τις αντίστοιχες της εργασίας που παρουσιάζεται, κάτι που πιθανώς οφείλεται στον ενεργό

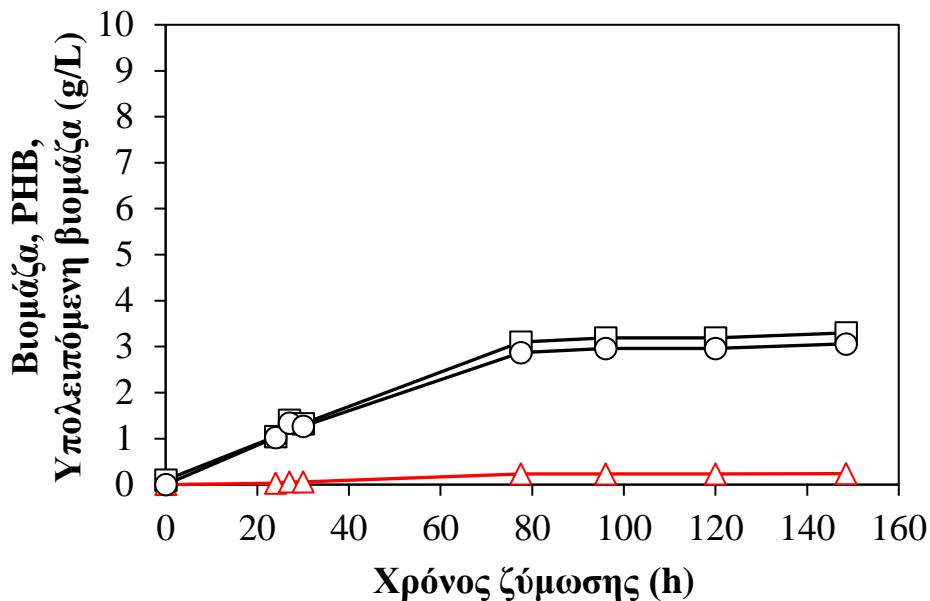
όγκο της εκάστοτε ζύμωσης, καθιστώντας τα αποτελέσματα σύμφωνα με τη βιβλιογραφία.

iv. Υπόστρωμα με πηγή άνθρακα την εμπορική μαννόζη

Η ζύμωση σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα την εμπορική μαννόζη σε αρχική συγκέντρωση 20 g/L, είχε διάρκεια 148,5 ώρες. Όπως παρουσιάζεται στο Γράφημα 9, έως το τέλος της ζύμωσης ο μικροοργανισμός κατάφερε να καταναλώσει την πηγή άνθρακα σε ποσοστό περίπου 63%. Η τιμή της παραχθείσας βιομάζας ανήλθε σε 3,30 g/L επί ξηρού, με την περιεκτικότητα του PHB να φτάνει το 7,2% (Γράφημα 10). Το FAN αλλά και το ανόργανο άζωτο είχαν καταναλωθεί στο μεγαλύτερο ποσοστό τους, απομένοντας διαθέσιμα στο υγρό ζύμωσης 23,1 και 65,0 mg/L, αντίστοιχα. Η πηγή ανόργανου φωσφόρου πρακτικά δεν καταναλώθηκε. Όπως φαίνεται στα παρακάτω γραφήματα, ο μικροοργανισμός παρουσιάζει φτωχή ανάπτυξη σε σύγκριση με την σακχαρόζη, γλυκόζη ή φρουκτόζη ως υποστρώματα, με αποτέλεσμα να μη υπάρχει παραγωγή του PHB.



Γράφημα 9. Κατανάλωση σακχάρων (●), FAN (x), IP (◇), ανόργανου αζώτου (Δ), παραγωγή βιομάζας (□) και ενδοκυτταρική συσσώρευση PHB (▲) κατά τη διάρκεια ασυνεχούς σε κωνικές φιάλες με τον μικροοργανισμό *A. lata*, σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα την εμπορική μαννόζη.

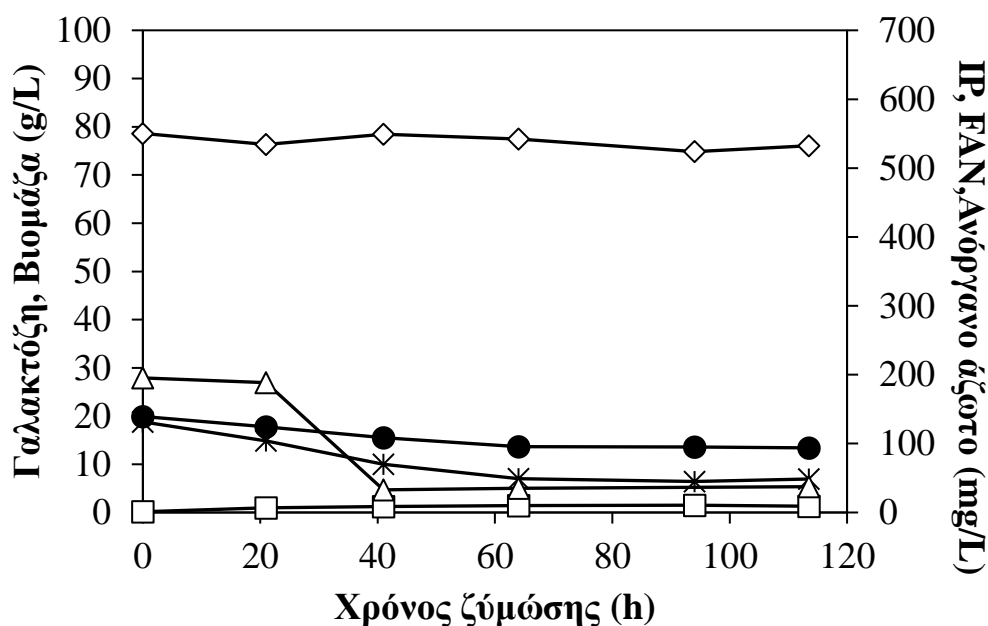


Γράφημα 10. Κινητική παραγωγής βιομάζας (□), υπολειπόμενης βιομάζας (○) και PHB (Δ) του μικροοργανισμού *A. lata*, σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα την εμπορική μαννόζη.

Η διεθνής βιβλιογραφία αναφέρει στοιχεία για αποτυχία ανάπτυξης και παραγωγής PHB από τον μικροοργανισμό *A.lata*, κατά την καλλιέργεια του σε θρεπτικό μέσο με πηγή άνθρακα τη μαννόζη (Palleroni & Palleroni, 1978).

ν. Υπόστρωμα με πηγή άνθρακα την εμπορική γαλακτόζη

Η κινητική της καλλιέργειας, 114 ωρών, σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα την εμπορική γαλακτόζη σε αρχική συγκέντρωση 20 g/L, παρουσιάζεται στο Γράφημα 11. Όπως παρατηρείται, κατά τη διάρκεια της ζύμωσης καταναλώθηκαν μόνο 6,5 g/L γαλακτόζης. Κατά συνέπεια, η βιομάζα που παράχθηκε ήταν 1,31 g/L επί ξηρού. Όπως είναι αναμενόμενο, δεν παρατηρήθηκε παραγωγή πολυμερούς PHB. Όσον αφορά την πηγή αζώτου, έως τις πρώτες 41 ώρες της ζύμωσης είχαν καταναλωθεί περίπου 61,6 mg/L FAN (131,6 mg/L αρχικής συγκέντρωσης) και 162,5 mg/L ανόργανης πηγής αζώτου (195,4 mg/L αρχικής συγκέντρωσης), με την περαιτέρω κατανάλωση να μην μεταβάλλει σημαντικά τη διαθεσιμότητα των συγκεκριμένων θρεπτικών συστατικών. Με βάση τα παραπάνω είναι εμφανής, στη συγκεκριμένη περίπτωση, η προτίμηση του μικροοργανισμού προς την κατανάλωση του ανόργανου αζώτου. Η πηγή φωσφόρου δε φαίνεται να καταναλώθηκε κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας.



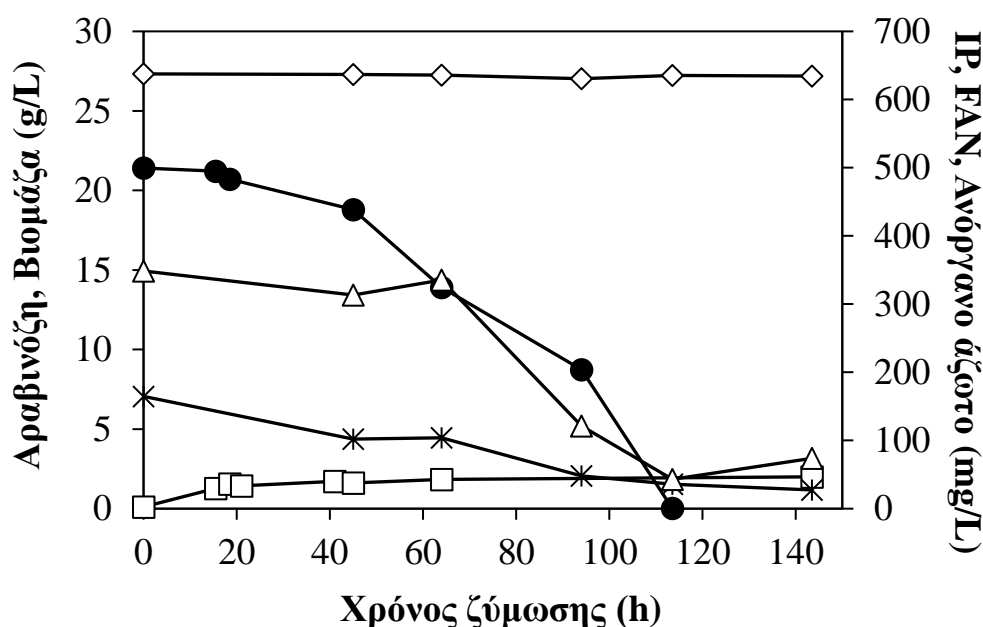
Γράφημα 11. Κατανάλωση σακχάρων (●), FAN (×), IP (◇), ανόργανου αζώτου (Δ), παραγωγή βιομάζας (□) κατά τη διάρκεια ασυνεχούς ζύμωσης σε κωνικές φιάλες με τον μικροοργανισμό *A. lata*, σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα την εμπορική γαλακτόζη.

Οι Βαεί *et al.* (2010), στη μελέτη τους χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα μίγμα γλυκόζης και γαλακτόζης, προερχόμενων από υδρόλυση τυρογάλακτος, προς διάσπαση του δισακχαρίτη της λακτόζης, διερεύνησαν την παραγωγή συμπολυμερούς PHB και P(3HV) σε ασυνεχή ζύμωση που έλαβε χώρα σε κωνικές φιάλες με το στέλεχος *A.lata* DSMZ 1123. Στα αποτελέσματα που εξήχθησαν, αναφέρθηκε παραγωγή ξηρής βιομάζας 9,30 g/L εκ των οποίων 1,21 g/L αντιστοιχούσαν στο κλάσμα του PHB, με το ποσοστό του πολυμερούς να φτάνει στο 13%. Σύμφωνα με τους ερευνητές, τα υδρολυμένα σάκχαρα του τυρογάλακτος αποτέλεσαν πιο ευνοϊκό υπόστρωμα σε σχέση με τα αμιγή σάκχαρα. Πράγματι, σε ό,τι αφορά την παρούσα μελέτη, η χρήση εμπορικής γαλακτόζης οδήγησε σε παραγωγή μόλις 1,31 g/L βιομάζας, ύστερα από ζύμωση 114 ωρών, χωρίς την ανίχνευση περιεχόμενου PHB.

vi. Υπόστρωμα με πηγή άνθρακα την εμπορική αραβινόζη

Τα αποτελέσματα της ζύμωσης σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα την εμπορική αραβινόζη, αρχικής συγκέντρωσης ~20 g/L, παρουσιάζονται στο Γράφημα 12. Όπως φαίνεται, η διάρκεια της διεργασίας ήταν 144 ώρες, εντός των οποίων η πηγή άνθρακα καταναλώθηκε πλήρως. Ωστόσο, η παραγωγή βιομάζας έφτασε μόλις τα 2,00 g/L. Στη

συγκεκριμένη ζύμωση δεν επετεύχθη παραγωγή PHB. Σχετικά με τις πηγές αζώτου, σημειώθηκε κατανάλωση αυτών έως τις πρώτες 94 ώρες ζύμωσης, οπότε και ο μικροοργανισμός είχε χρησιμοποιήσει 116,6 mg/L FAN και 227,6 mg/L ανόργανου αζώτου. Γίνεται αντιληπτή και σε αυτή την περίπτωση υποστρώματος, η τάση του στελέχους *A. lata* προς την κατανάλωση κυρίως της πηγής ανόργανου αζώτου. Η πηγή ανόργανου φωσφόρου πρακτικά δεν καταναλώθηκε.



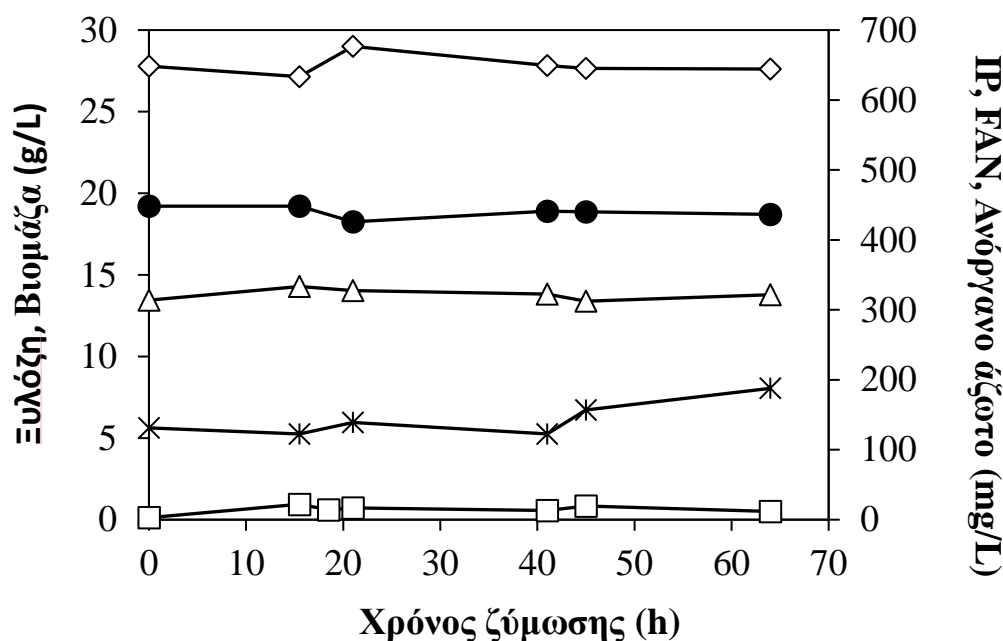
Γράφημα 12. Κατανάλωση σακχάρων (●), FAN (x), IP (◇), ανόργανου αζώτου (Δ), παραγωγή βιομάζας (□) κατά τη διάρκεια ασυνεχούς ζύμωσης σε κωνικές φιάλες με τον μικροοργανισμό *A. lata*, σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα την εμπορική αραβινόζη.

Ερευνώντας τις διαθέσιμες βιβλιογραφικές αναφορές, δεν προέκυψαν αποτελέσματα που να υποδεικνύουν αφομοίωση της αραβινόζης από τον μελετώμενο μικροοργανισμό (Palleroni & Palleroni, 1978; Ashby *et al.*, 2022).

vii. Υπόστρωμα με πηγή άνθρακα την εμπορική ξυλόζη

Εν συνεχεία, στο Γράφημα 13 φαίνεται η κινητική που αφορά σε καλλιέργεια υποστρώματος με πηγή άνθρακα την εμπορική ξυλόζη, σε αρχική συγκέντρωση περίπου 20 g/L. Η μελετώμενη πηγή άνθρακα πρακτικά δεν αφομοιώθηκε κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, η οποία διήρκησε 64 ώρες. Κατά τον ίδιο τρόπο, δεν παρατηρήθηκε αφομοίωση της πηγής οργανικού καθώς και ανόργανου αζώτου. Η

βιομάζα που παρήχθη, δεν ξεπέρασε τα 0,50 g/L ξηρού βάρους έως το τελικό σημείο της ζύμωσης. Όπως είναι αναμενόμενο, δεν παρατηρήθηκε παραγωγή PHB.



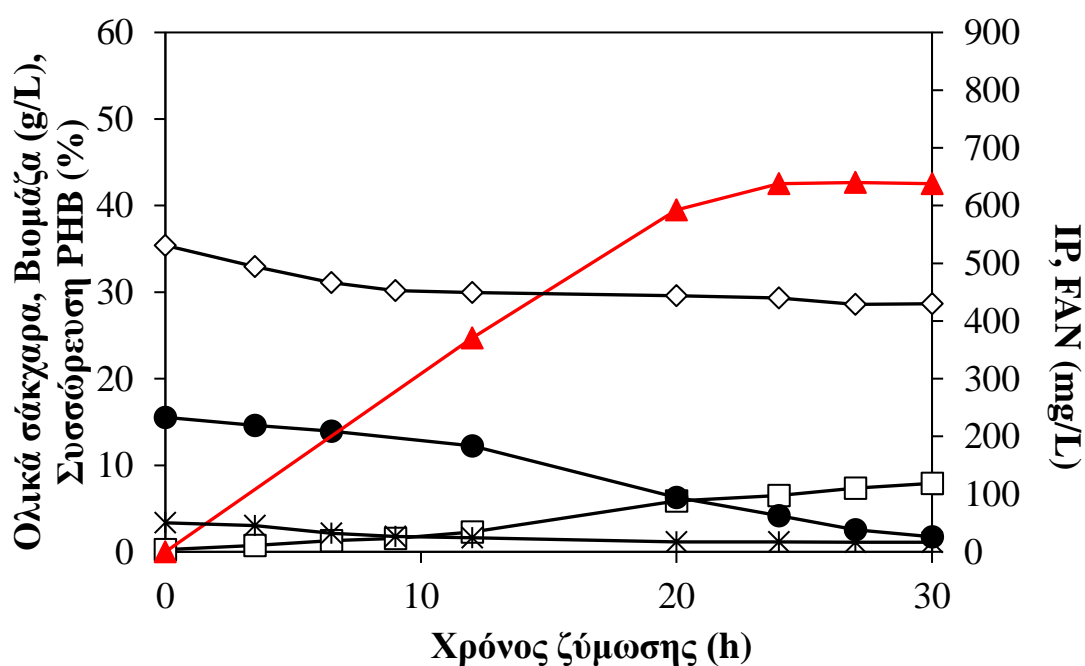
Γράφημα 13. Κατανάλωση σακχάρων (●), FAN (x), IP (◇), ανόργανου αζώτου (Δ), παραγωγή βιομάζας (□) κατά τη διάρκεια ασυνεχούς ζύμωσης σε κωνικές φιάλες με τον μικροοργανισμό *A. lata*, σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα την εμπορική ξυλόζη.

Οι Ashby *et al.* (2018) χρησιμοποιώντας το βακτηριακό στέλεχος *A.lata* DSM 1122 σε μικτή καλλιέργεια με το στέλεχος *B. sacchari* DSM 17165 για τη μελέτη παραγωγής διαφόρων PHAs, ανέφεραν αδυναμία του πρώτου, όσον αφορά στην κατανάλωση της ξυλόζης, υποστηρίζοντας πως δεν διαθέτει τα απαραίτητα μεταβολικά χαρακτηριστικά για την αφομοίωση της. Επιπρόσθετες βιβλιογραφικές αναφορές ενισχύουν την αρνητική απόκριση του βακτηρίου *A. lata*, ως προς την ανάπτυξη του σε υπόστρωμα ξυλόζης (Palleroni & Palleroni, 1978; Ashby *et al.*, 2022). Όπως δείχθηκε και στην μελέτη που παρουσιάζεται, δεν υπήρξε αφομοίωση της ξυλόζης κατά τη ζύμωση που πραγματοποιήθηκε.

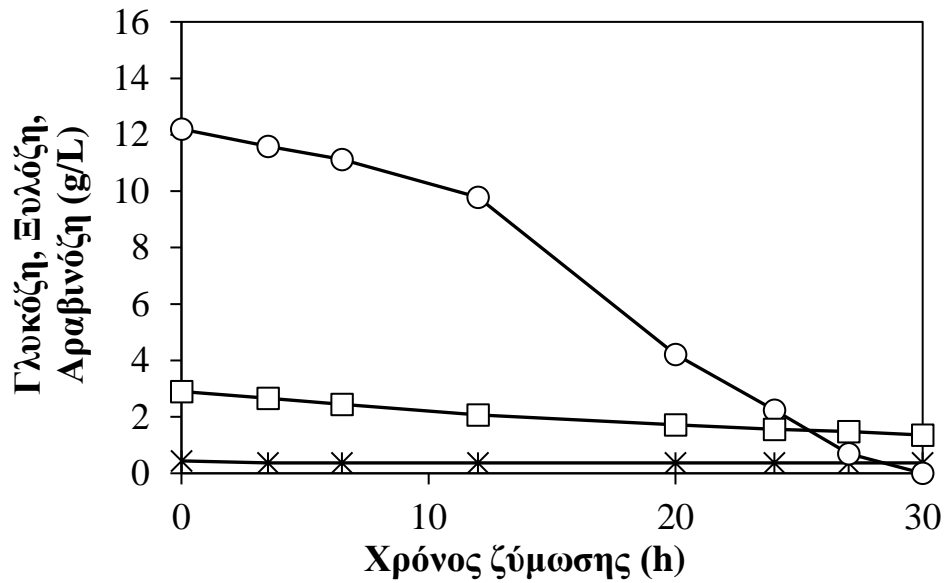
5.1.3. Ασυνεχείς ζυμώσεις με υδρόλυμα πιτύρου ως πηγή άνθρακα

Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις σε κωνικές φιάλες με υδρόλυμα πιτύρου, ως πηγή άνθρακα, με στόχο να εξεταστεί η ικανότητα του μικροοργανισμού να αφομοιώσει την πηγή αυτή. Η καλλιέργεια 32,5 ωρών του *A. lata* σε θρεπτικό υπόστρωμα υδρολύματος πιτύρου σίτου, αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων περίπου 20

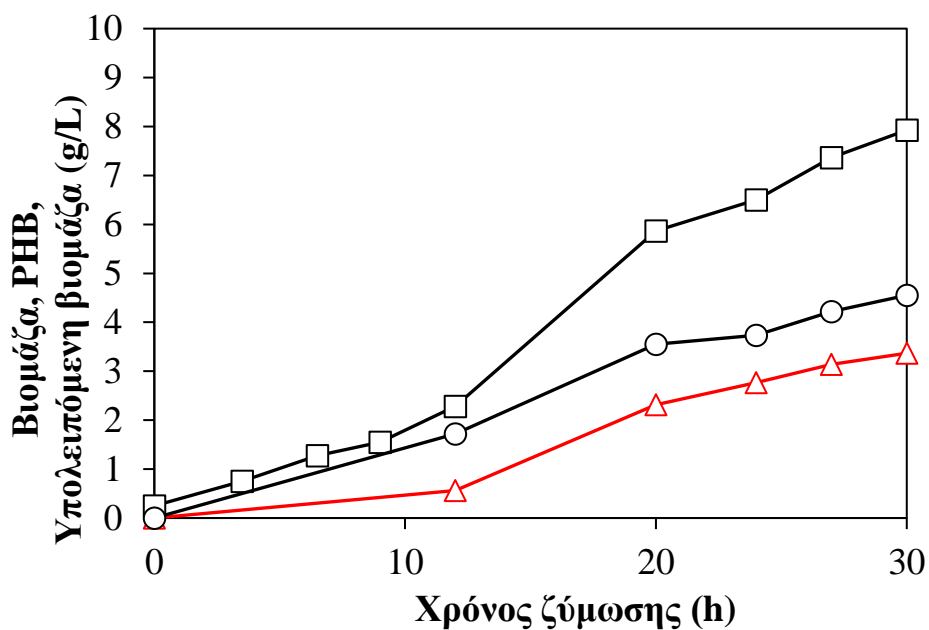
g/L, παρουσιάζεται στα Γράφηματα 14 - 16. Όπως φαίνεται, η πηγή άνθρακα καταναλώθηκε πλήρως έως το τέλος της ζύμωσης, ενώ παράλληλα η οργανική πηγή αζώτου καταναλώθηκε εντός των πρώτων 17 ωρών, παραμένοντας σχεδόν σταθερή έκτοτε (Γράφημα 14). Σύμφωνα με την κινητική κατανάλωσης, μεμονωμένα του κάθε σακχάρου - συστατικού του υποστρώματος (γλυκόζη, ξυλόζη, αραβινόζη) (Γράφημα 15), παρατηρήθηκε πλήρης κατανάλωση της γλυκόζης κοντά στις 30 ώρες της καλλιέργειας. Αναφορικά με την ξυλόζη ο μικροοργανισμός δεν την κατανάλωσε και η καταναλωθείσα αραβινόζη δεν ξεπέρασε τα 0,08 g/L. Στην εν λόγω διεργασία, η παραχθείσα βιομάζα ανήλθε σε 7,92 g/L επί ξηρού βάρους, με την παραγωγικότητα του PHB να φτάνει τα 0,112 g/L/h. Το πολυμερές συσσωρεύθηκε σε ποσοστό 42,5 % w/w (3,37 g/L PHB) (Γράφημα 16). Ο συντελεστής μετατροπής του καταναλωθέντος υποστρώματος σε προϊόν ήταν 0,22 g/g. Από την πηγή ανόργανου φωσφόρου (αρχικής συγκέντρωσης 530,95 mg/L) καταναλώθηκαν περίπου 108 mg/L.



Γράφημα 14. Καταναλώση σακχάρων (●), FAN (x), IP (◇), παραγωγή βιομάζας (□) και ενδοκυτταρική συσσώρευση PHB (▲) κατά τη διάρκεια ασυνεχούς ζύμωσης σε κωνικές φιάλες με τον μικροοργανισμό *A. lata*, σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα το υδρόλυμα πιτύρου σίτου, αρχικής συγκέντρωσης 15,5 g/L



Γράφημα 15. Κατανάλωση γλυκόζης (○), ξυλόζης (□) και αραβινόζης (✱), κατά τη διάρκεια ασυνεχούς ζύμωσης σε κωνικές φιάλες με τον μικροοργανισμό *A. lata*, σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα το υδρόλυμα πιτύρου σίτου.



Γράφημα 16. Κινητική παραγωγής βιομάζας (□), υπολειπόμενης βιομάζας (ο) και PHB (Δ) του μικροοργανισμού *A. lata*, σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα το υδρόλυμα πιτύρου σίτου, αρχικής συγκέντρωσης 15,5 g/L.

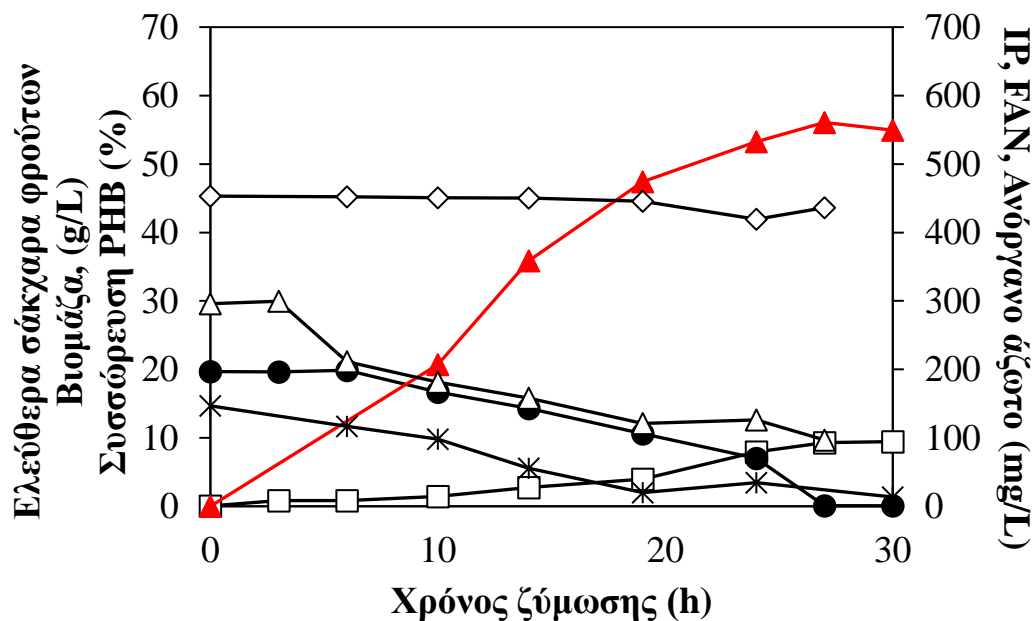
Οι Ashby *et al.* (2022) διεξήγαγαν τη μελέτη τους σε κλίμακα κωνικών φιαλών, χρησιμοποιώντας υδρόλυμα προερχόμενο από υπολείμματα αγροτικών καλλιεργειών αραβοσίτου (corn stover hydrolysate - CSH), καθώς και συνθετικό υπόστρωμα

εμπορικών σακχάρων που προσομοιάζε στη σύσταση του υδρολύματος, με σκοπό την παραγωγή scl-PHAs. Ο μικροοργανισμός, που εξετάστηκε, ήταν το βακτηριακό στέλεχος *A. lata* DSM 1122. Τα σάκχαρα, που περιείχε το συγκεκριμένο υδρόλυμα, ήταν κατά κύριο λόγο γλυκόζη και ξυλόζη και σε μικρότερο ποσοστό αραβινόζη και γαλακτόζη, με την συγκέντρωση εκκίνησης στο συνθετικό υπόστρωμα να κυμαίνεται στα 10,2 g/L. Σύμφωνα με τους ερευνητές δεν επετεύχθη ανάπτυξη του μικροοργανισμού στο υδρόλυμα. Ωστόσο, παρατηρήθηκε θετική απόκριση αυτού κατά την καλλιέργειά 72 ωρών στο συνθετικό υπόστρωμα, με τις μέγιστες τιμές παραγωγής ξηρής βιομάζας και PHAs να φτάνουν τα 5,20 g/L και 2,60 g/L, αντίστοιχα, διαμορφώνοντας τη συσσώρευση PHAs στο 50% w/w επί ξηρού. Σε σύγκριση με τα αποτελέσματα της μελέτης που παρουσιάζεται, παρατηρήθηκε καλή συσχέτιση με αυτά τις βιβλιογραφίας, καθώς καταγράφηκε παραγωγή ξηρής βιομάζας που έφτασε τα 8,08 g/L, ενώ το PHB καταλάμβανε ποσοστό 38,1% w/w αυτής (3,08 g/L PHB). Επιπλέον, κατ' αντιστοιχία με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, ο μικροοργανισμός έτεινε στην πλήρη κατανάλωση της γλυκόζης, αφήνοντας σχεδόν άθικτα τα υπόλοιπα σάκχαρα που προαναφέρθηκαν.

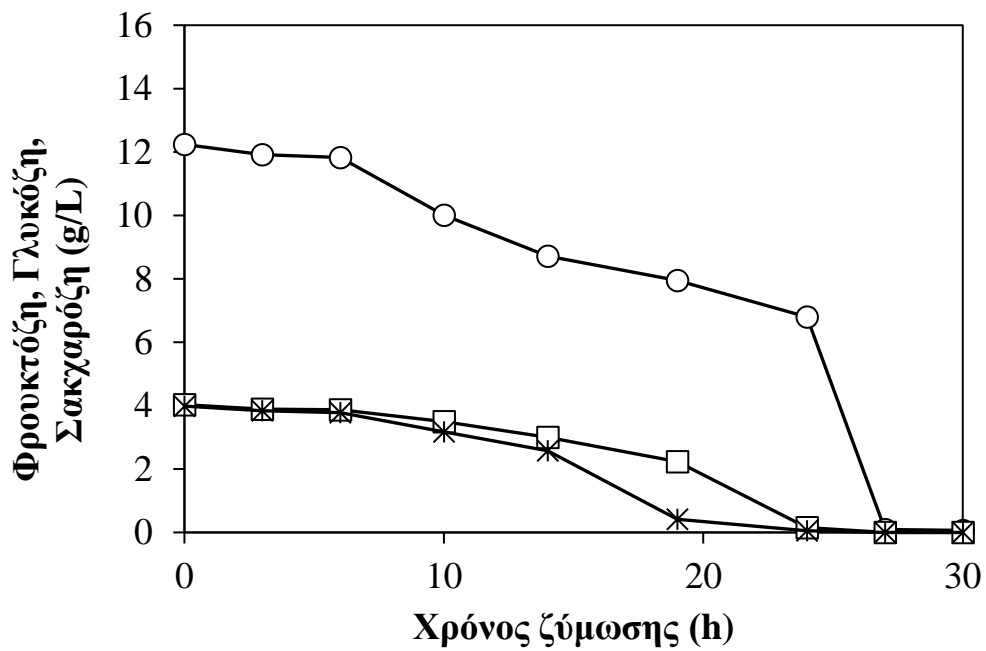
5.1.4. *Ασυνεχείς ζυμώσεις με ελεύθερα σάκχαρα ως πηγή άνθρακα*

Η κινητική της καλλιέργειας 30 ωρών του *A. lata* σε θρεπτικό υπόστρωμα εκχυλίσματος ελεύθερων σακχάρων αποβλήτων φρούτων, αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων περί τα 20 g/L, παρουσιάζεται στα Γραφήματα 17 - 19. Η πηγή άνθρακα καταναλώθηκε πλήρως έως τις 27 ώρες της ζύμωσης. Σύμφωνα με την κινητική κατανάλωσης, μεμονωμένα του κάθε σακχάρου - συστατικού του υποστρώματος (σακχαρόζη, γλυκόζη, φρουκτόζη), παρατηρήθηκε πλήρης κατανάλωση της σακχαρόζης έως τις 19 πρώτες ώρες της ζύμωσης. Εν συνεχεία, στις 24 ώρες, είχε πλέον εξαντληθεί και η γλυκόζη, ενώ τέλος ο μικροοργανισμός αφομοίωσε την υπολειπόμενη φρουκτόζη (Γράφημα 18). Η παραχθείσα βιομάζα έφτασε σε επίπεδα περί τα 9,45 g/L (Γράφημα 19), με την παραγωγικότητα του PHB να ανέρχεται σε 0,172 g/L/h. Η συσσώρευση του πολυμερούς PHB στις 10 ώρες ζύμωσης βρισκόταν ήδη σε ποσοστό 20,7% w/w, ενώ στο τέλος της ζύμωσης η συσσώρευση ανήλθε στο 54,9% w/w (Γράφημα 17). Αναφορικά με το οργανικό και το ανόργανο άζωτο, και οι δύο πηγές καταναλώθηκαν στο μεγαλύτερο μέρος τους τις 19 πρώτες ώρες της ζύμωσης,

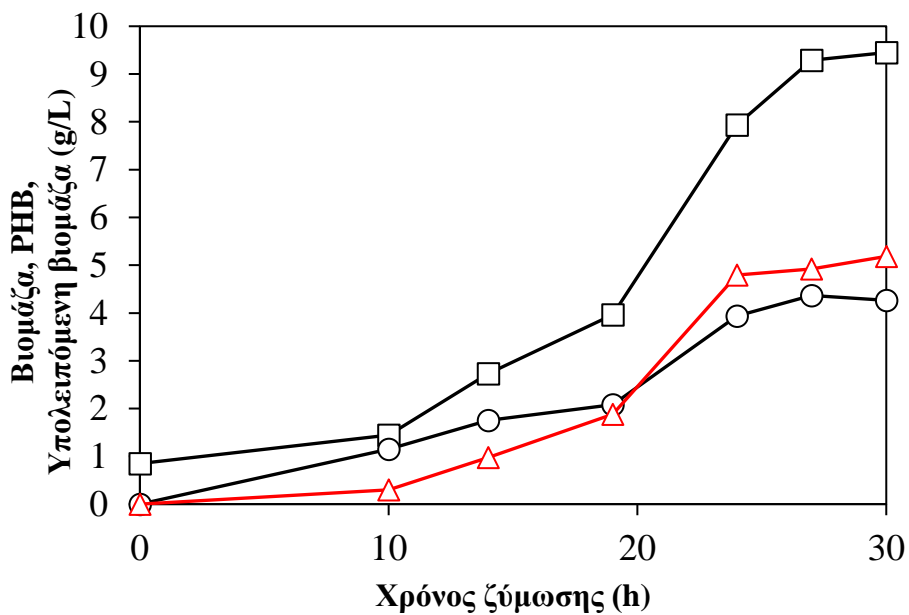
παραμένοντας σε σχεδόν σταθερές τιμές μέχρι το τέλος αυτής. Η πηγή ανόργανου φωσφόρου πρακτικά δεν καταναλώθηκε.



Γράφημα 17. Κατανάλωση σακχάρων (●), FAN (x), IP (◇), ανόργανου αζώτου (Δ), παραγωγή βιομάζας (□) και ενδοκυτταρική συσσωρευση PHB (▲) κατά τη διάρκεια ασυνεχούς ζύμωσης σε κωνικές φιάλες με τον μικροοργανισμό *A. lata*, σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα το εκχύλισμα ελεύθερων σακχάρων αποβλήτων φρούτων, αρχικής συγκέντρωσης 20 g/L.

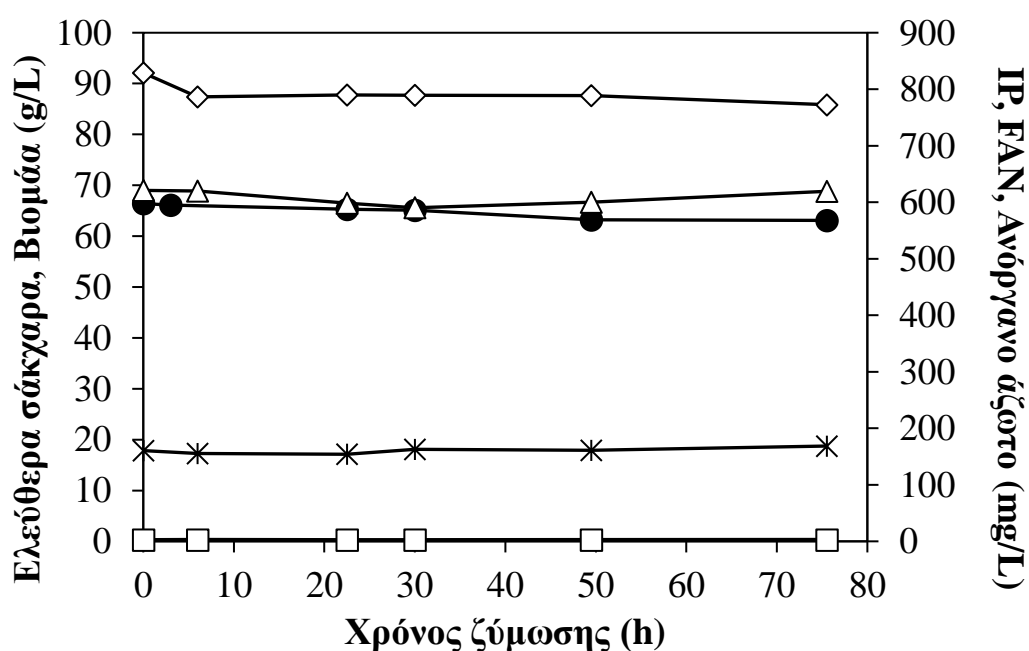


Γράφημα 18. Κατανάλωση φρουκτόζης (ο), γλυκόζης (□) και σακχαρόζης (x), κατά τη διάρκεια ασυνεχούς ζύμωσης σε κωνικές φιάλες με τον μικροοργανισμό *A. lata*, σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα το εκχύλισμα ελεύθερων σακχάρων αποβλήτων φρούτων, αρχικής συγκέντρωσης 20 g/L.

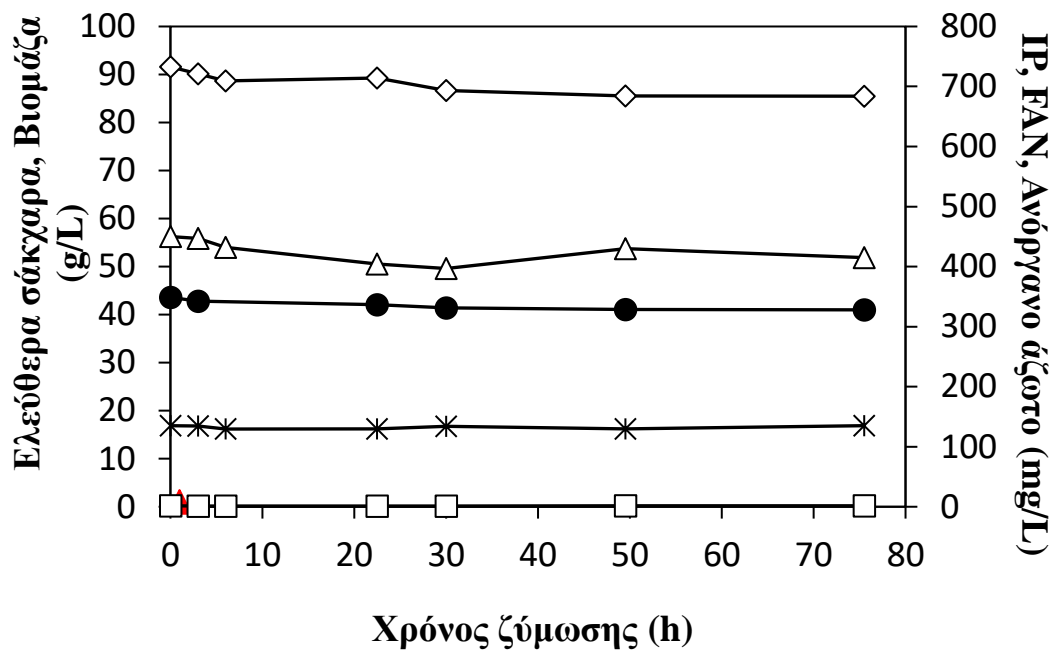


Γράφημα 19. Κινητική παραγωγής βιομάζας (□), υπολειπόμενης βιομάζας (ο) και PHB (Δ) του μικροοργανισμού *A. lata*, σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα το εκχύλισμα ελεύθερων σακχάρων αποβλήτων φρούτων, αρχικής συγκέντρωσης 20 g/L.

Κατά την παράθεση των αποτελεσμάτων των επόμενων ζυμώσεων με το μικροοργανισμό *A. lata*, παρουσιάζεται η κινητική, που αφορά σε καλλιέργεια με υπόστρωμα το εκχύλισμα ελεύθερων σακχάρων αποβλήτων φρούτων, σε αρχική συγκέντρωση 60 ± 4 g/L και 40 ± 4 g/L. Αρχικά δοκιμάστηκε η αρχική συγκέντρωση 60 g/L σακχάρων για να εξεταστεί η ικανότητα του μικροοργανισμού σε μεγαλύτερη συγκέντρωση πηγής άνθρακα. Το υπόστρωμα δεν κατέστη δυνατόν να αφομοιωθεί, με αποτέλεσμα ο μικροοργανισμός να μην παρουσιάσει καμία ανάπτυξη κατά τη διάρκεια ζύμωσης 75,5 ωρών (Γράφημα 20). Κατά τον ίδιο τρόπο, πρακτικά δεν παρατηρήθηκε αφομοίωση της πηγής οργανικού καθώς και ανόργανου αζώτου. Όπως είναι εμφανές, η βιομάζα που παρήχθη, δεν ξεπέρασε τα 0,30 g/L επί ξηρού έως το τελικό σημείο της πρώτης ζύμωσης και τα 0,30 g/L έως το τελικό σημείο της δεύτερης ζύμωσης. Όπως είναι αναμενόμενο, δεν παρατηρήθηκε παραγωγή PHB σε καμία από τις καλλιέργειες. Το ίδιο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε μειώνοντας την αρχική συγκέντρωση σακχάρων κατά 20 g/L (Γράφημα 21), επομένως για την παραγωγή PHB σε βιοαντιδραστήρα επιλέχθηκε η αρχική συγκέντρωση σακχάρων 20 g/L.



Γράφημα 20. Κατανάλωση σακχάρων (●), FAN (x), IP (◇), ανόργανου αζώτου (Δ), παραγωγή βιομάζας (□) κατά τη διάρκεια ασυνεχούς ζύμωσης σε κωνικές φιάλες με τον μικροοργανισμό *A. lata*, σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα το εκχύλισμα ελεύθερων σακχάρων αποβλήτων φρούτων, αρχικής συγκέντρωσης 60 g/L.



Γράφημα 21. Κατανάλωση σακχάρων (●), FAN (x), IP (◇), ανόργανου αζώτου (Δ), παραγωγή βιομάζας (□) κατά τη διάρκεια ασυνεχούς ζύμωσης σε κωνικές φιάλες με τον μικροοργανισμό *A. lata*, σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα το εκχυλίσμα ελεύθερων σακχάρων αποβλήτων φρούτων, αρχικής συγκέντρωσης 40 g/L.

Στην μελέτη των Yezza *et al.* (2007) έγινε χρήση εκχυλίσματος σφενδάμου (maple sap), μια ανανεώσιμη πρώτη ύλη, που απαντάται σε αφθονία και περιέχει, κυρίως, σακχαρόζη σε συγκέντρωση 10 - 30 g/L, ίχνη γλυκόζης και φρουκτόζης, αζωτούχες και φαινολικές ενώσεις, οργανικά οξέα και μέταλλα. Η συγκέντρωση εκκίνησης του υποστρώματος για την ανάπτυξη του στελέχους *A. latus* ATCC 29714 σε ασυνεχή ζύμωση σε κωνικές φιάλες, ήταν 20 g/L. Η παραγωγή ξηρής βιομάζας και PHB κατά τη ζύμωση υπολογίστηκε σε 4,40 g/L και 3,41 g/L, αντίστοιχα, οδηγώντας σε συσσώρευση πολυμερούς που ανήλθε σε 77,6% w/w. Στην παρούσα μελέτη δε, παρατηρήθηκαν αρκετά υψηλότερες απόλυτες τιμές βιομάζας και PHB, περί τα 9,45 g/L και 5,81 g/L, αντίστοιχα. Ωστόσο, η συσσώρευση PHB ήταν πιο χαμηλή (61,5% w/w). Όσον αφορά την παραγωγικότητα του προϊόντος, κυμάνθηκε σε ελαφρώς υψηλότερα επίπεδα στην παρούσα μελέτη, σε σύγκριση με την βιβλιογραφική αναφορά (0,126 g/L/h), αγγίζοντας τα 0,172 g/L/h.

Πίνακας 9. Βιβλιογραφική ανασκόπηση ζυμώσεων με τον μικροοργανισμό *A. lata*, DSM 1123 σε κωνικές φιάλες με διαφορετικές πηγές άνθρακα για την παραγωγή PHB.

Πηγή άνθρακα	Βακτηριακό στέλεχος	DCW (g/L)	Συσσώρευση PHB (%)	Παραγωγικότητα PHB (g/L/h)	Αναφορά
Σακχαρόζη	<i>A. latus</i> ATCC 29714	2,90	74,1	0,08	Yezza <i>et al.</i> , 2007
	<i>A. lata</i> MTCC 2311	10,6	48,0	-	Zafar <i>et al.</i> , 2012
	<i>A. lata</i> MTCC 2311	7,92	44,2	0,049	Zafar <i>et al.</i> , 2014
Γλυκόζη	<i>A. lata</i> DSMZ 1123	10,5	39,1	0,057	Karbasi <i>et al.</i> , 2012
	<i>A. lata</i> MTCC 2311	7,55	45,0	0,047	Zafar <i>et al.</i> , 2014
	<i>A. lata</i> DSMZ 1123	25,5	20,0	0,071	Karbasi <i>et al.</i> , 2016
Φρουκτόζη	<i>A. lata</i> DSMZ 1123	14,1	13,5	0,032	Karbasi <i>et al.</i> , 2012
	<i>A. lata</i> MTCC 2311	8,35	43,1	0,05	Zafar <i>et al.</i> , 2014
Γαλακτόζη	<i>A. lata</i> DSMZ 1123	9,30	13,0	0,017	Baei <i>et al.</i> , 2010
Εκχύλισμα σφενδάμου-Maple sap (Σακχαρόζη-Γλυκόζη-Φρουκτόζη)	<i>A. latus</i> ATCC 29714	4,40	77,6	0,126	Yezza <i>et al.</i> , 2007
Υδρόλυμα υπολειμάτων αραβοσίτου-Corn stover hydrolysate (CSH) (Γλυκόζη-Ξυλόζη-Αραβινόζη-Γαλακτόζη)	<i>A. lata</i> DSM 1122	5,20	50,0*	0,072	Ashby <i>et al.</i> , 2022

*Το αναφερόμενο ποσοστό αφορά σε συσσώρευση PHAs και συγκεκριμένα σε πολυστέρες αποτελούμενες από δομικά μονομερή 3-υδροξυουτυρικού οξέος (3-HB), 3-υδροξυβαλερικού οξέος (3-HV) και 4-υδροξυβαλερικού οξέος (4-HV).

5.2. Ημι-συνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα

Με βάση τα πειράματα, που προηγήθηκαν, σε κλίμακα κωνικών φιαλών και τα ληφθέντα αποτελέσματα, επιλέχθηκε η καταλληλότερη συγκέντρωση πηγής άνθρακα (20 g/L), για την ανάπτυξη ημι-συνεχών καλλιεργειών σε βιοαντιδραστήρα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 10 και αναπτύσσονται αναλυτικότερα ακολούθως, ενώ στον Πίνακα 11 γίνεται βιβλιογραφική ανασκόπηση ζυμώσεων του μικροοργανισμού *A. lata*, σε βιοαντιδραστήρα με διαφορετικές πηγές άνθρακα για την παραγωγή PHB.

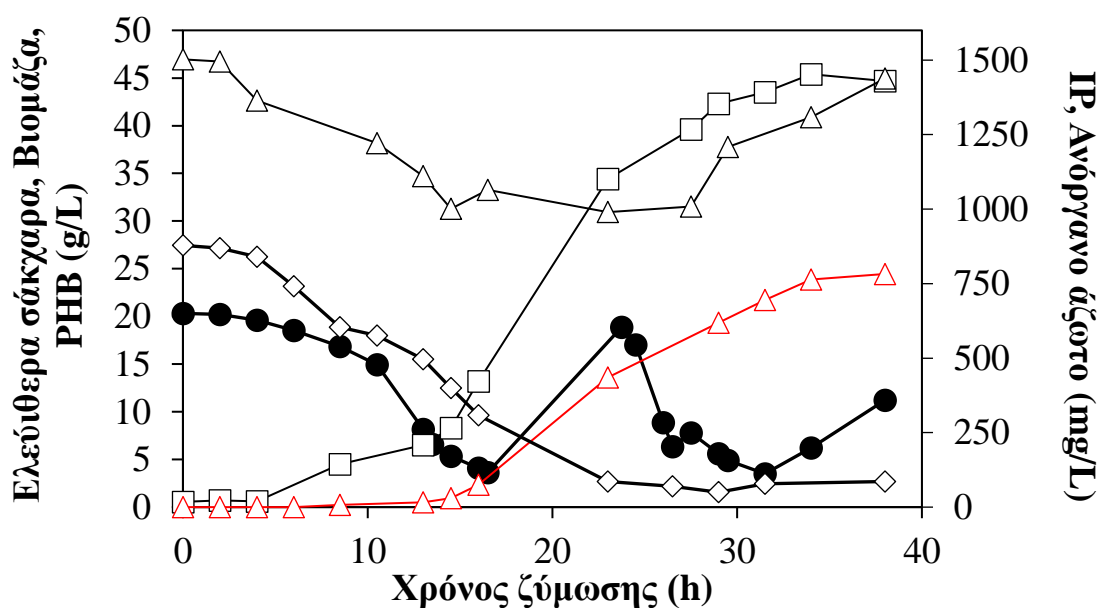
Πίνακας 10. Συνοπτικά αποτελέσματα ημι-συνεχών ζυμώσεων με τον μικροοργανισμό *A. lata* DSM 1123, σε βιοαντιδραστήρα για την παραγωγή PHB.

Πηγή άνθρακα	Συγκέντρωση εκκίνησης (g/L)	DCW (g/L)	PHB (g/L)	Συσσωρευση PHB (%)	Y _{PHB/S} (g/g)	P _{PHB} (g/L/h)
Ελεύθερα σάκχαρα φρούτων (Φρουκτόζη-Γλυκόζη-Σακχαρόζη)	20,0	44,7	24,4	54,7	0,22	0,70
Υδρόλυμα πιτύρου σίτου (Γλυκόζη-Ξυλόζη-Αραβινόζη)	20,0	38,2	18,3	48,8	0,22	0,51

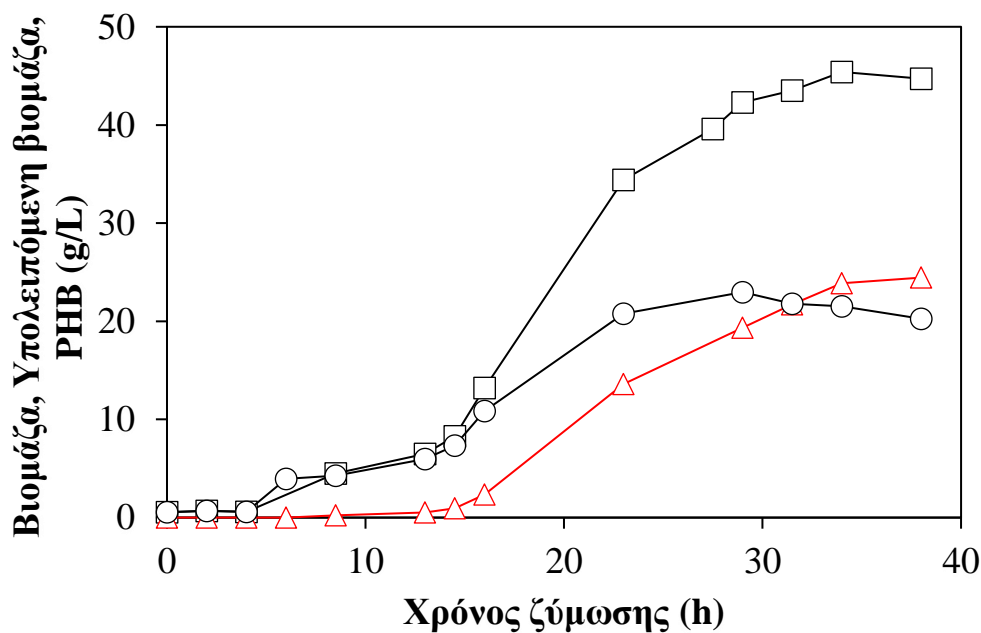
5.2.1. Ημι-συνεχής ζύμωση με εκχύλισμα ελεύθερων σακχάρων αποβλήτων φρούτων ως πηγή άνθρακα

Αρχικά πραγματοποιήθηκε ζύμωση ημι-συνεχούς τροφοδοσίας με ελεύθερα σάκχαρα από φρούτα ως πηγή άνθρακα. Η σύσταση των σακχάρων στα φρούτα αναφέρεται στο Πίνακα 5, ενώ η τροφοδοσία αποτελείτο από πυκνό διάλυμα ελεύθερων σακχάρων από φρούτα, και προστέθηκε σε συνεχή ροή όταν η συνολική συγκέντρωση σακχάρων στον βιοαντιδραστήρα έφτασε περίπου τα 10 g/L. Στα Γραφήματα 22 και 23 απεικονίζονται οι κινητικές κατανάλησης των ολικών σακχάρων, του ανόργανου αζώτου και του ανόργανου φωσφόρου (IP), καθώς επίσης και η κινητική της παραγωγής βιομάζας και

PHB. Όπως παρατηρείται η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων ξεκίνησε με 20 g/L και καταναλώθηκαν 13 g/L τις πρώτες 13 ώρες, όπου άρχισε και η τροφοδοσία. Η ζύμωση ολοκληρώθηκε μετά από 38 ώρες και η τελική συγκέντρωση του PHB ήταν 24,4 g/L ενώ η τελική ξηρή βιομάζα ήταν 44,7 g/L. Η συσσώρευση του PHB ξεκίνησε μετά τις 16 ώρες ζύμωσης και έφτασε 54,7% μέχρι το τέλος της ζύμωσης, χωρίς να υπάρχει κάποιος περιορισμός στο μέσο, γεγονός που δηλώνει ότι ο μικροοργανισμός είναι ικανός να παράγει πολυμερές κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του. Ο συντελεστής απόδοσης προϊόντος έφτασε 0,22 g/g και η παραγωγικότητα προϊόντος 0,70 g/L/h στις 34 ώρες. Συμπερασματικά, τα ελεύθερα σάκχαρα από φρούτα μπορούν να καταναλωθούν ικανοποιητικά από τον μικροοργανισμό και να αποτελέσουν θρεπτικό μέσο για την συσσώρευση του PHB.



Γράφημα 22. Κινητική παραγωγής ξηρής βιομάζας (□) και PHB (Δ) και κατανάλωσης σακχάρων (●), IP (◇), και ανόργανου αζώτου (Δ), σε συνάρτηση με το χρόνο, κατά τη διάρκεια ημι-συνεχούς ζύμωσης σε βιοαντιδραστήρα, με το μικροοργανισμό *A. lata*, με ελεύθερα σάκχαρα από φρούτα ως πηγή άνθρακα.



Γράφημα 23. Κινητική παραγωγής ξηρής βιομάζας (□), υπολειπόμενης βιομάζας (○) και PHB (Δ) με ελεύθερα σάκχαρα από φρούτα ως πηγή άνθρακα σε συνάρτηση με το χρόνο, σε συνάρτηση με το χρόνο, κατά τη διάρκεια ημι-συνεχούς ζύμωσης σε βιοαντιδραστήρα, με το μικροοργανισμό *A. lata*, με ελεύθερα σάκχαρα από φρούτα ως πηγή άνθρακα.

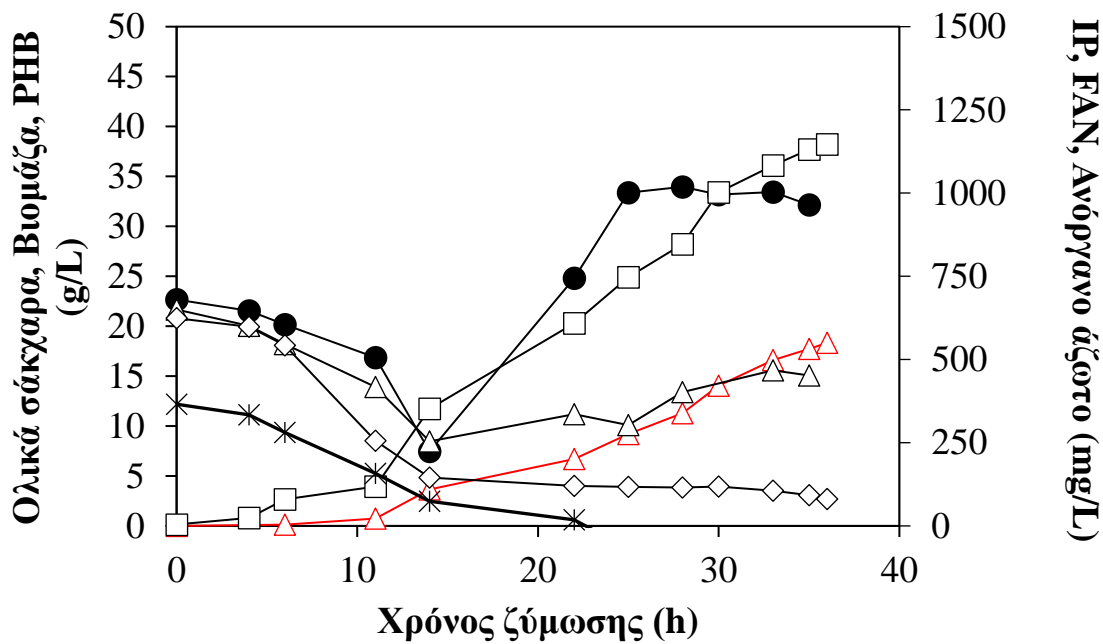
Οι Yezza *et al.* (2007), διεξήγαγαν ασυνεχή ζύμωση 27 ωρών σε βιοαντιδραστήρα 20 L με ενεργό όγκο ζύμωσης 10 L και υπόστρωμα εκχύλισμα σφενδάμου (maple sap) με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 20 g/L, χρησιμοποιώντας το βακτηριακό στέλεχος *A.latus* ATCC 29714. Σύμφωνα με τους ερευνητές, η ζύμωση οδήγησε σε παραγωγή ξηρής βιομάζας 4,20 g/L εκ των οποίων τα 3,26 g/L αντιστοιχούσαν σε PHB, με το ποσοστό συσσώρευσης του πολυμερούς να ανέρχεται σε 77% w/w επί ξηρού, αρκετά υψηλότερο από το αντίστοιχο στην παρούσα μελέτη. Επιπλέον, η παραγωγικότητα που παρατηρήθηκε ως προς το προϊόν ήταν 0,121 g/L/h. Συνεχίζοντας, στην εργασία των Tanamool *et al.* (2009) πραγματοποιήθηκε ασυνεχής ζύμωση με το βακτηριακό στέλεχος *A.latus* ATCC 29714, σε βιοαντιδραστήρα 5 L με ενεργό όγκο 2 L. Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα από γλυκό σόργο (sweet sorghum juice) σε συγκέντρωση εκκίνησης ήταν 20 g/L. Η παραχθείσα ξηρή βιομάζα δεν ξεπέρασε τα 1,73 g/L, ενώ το PHB που ανιχνεύθηκε ήταν μόλις 0,68 g/L (39,3% w/w επί ξηρής βιομάζας). Η παραγωγικότητα της ζύμωσης ως προς το προϊόν ήταν 0,013 g/L/h. Στη μελέτη των Wisuthiphaet & Napathorn (2016), έλαβε χώρα ημι-συνεχής ζύμωση 72 ωρών σε βιοαντιδραστήρα συνολικού όγκου 5 L (2 L ενεργός όγκος), με χρήση του βακτηριακού στελέχους *A.lata* DSM 1123, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα σιρόπι 60-Brix (σακχαρόζη, γλυκόζη, φρουκτόζη), προερχόμενο από υπολειμμάτων σακχαροκαλάμων (sugar cane). Σύμφωνα με τους ερευνητές, σημειώθηκε παραγωγή ξηρής βιομάζας περί τα 20,2 g/L, με την παραγωγή PHB να φτάνει τα 16,1 g/L και το ποσοστό συσσώρευσης του πολυμερούς να ανέρχεται σε 83,9% w/w επί ξηρού, αρκετά υψηλότερο από τη συσσώρευση που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη (54,7%). Η παραγωγικότητα της εν λόγω ζύμωσης υπολογίστηκε σε 0,234 g/L/h, αρκετά χαμηλότερη από την τιμή 0,70 g/L/h, που σημειώθηκε στη μελέτη που παρουσιάζεται.

5.2.2. Ημι-συνεχής ζύμωση με υδρόλυμα πιτύρου σίτου ως πηγή άνθρακα

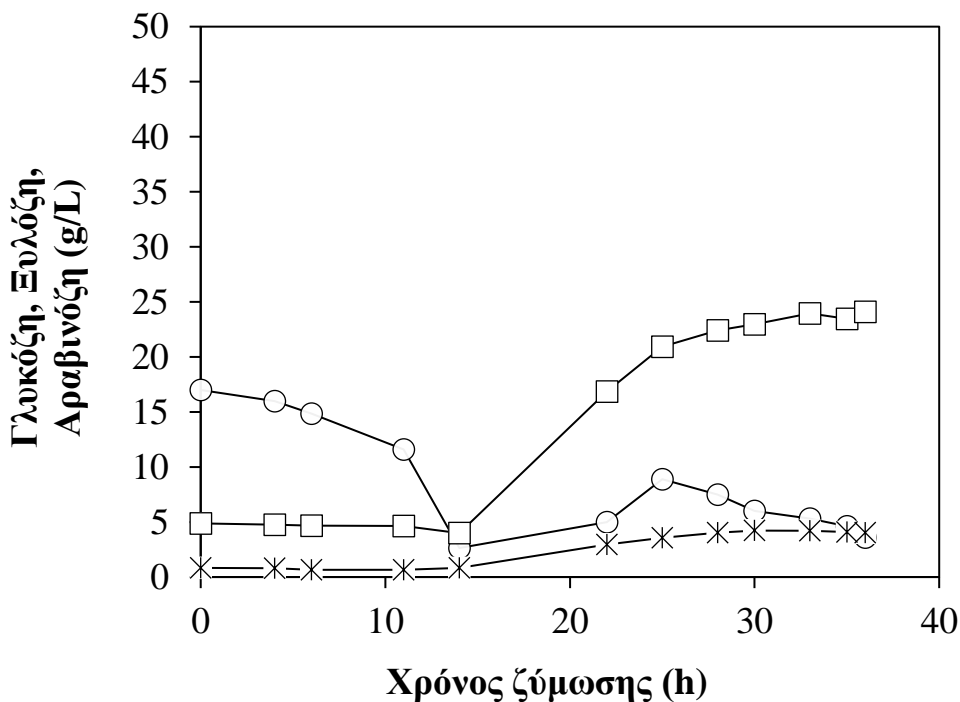
Για την παραγωγή του PHB από υδρόλυμα πιτύρου πραγματοποιήθηκε ημι-συνεχής ζύμωση όπως περιγράφεται στην υποενότητα 3.5. Η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων ήταν 20 g/L ενώ η τροφοδοσία από μίγμα εμπορικών σακχάρων είχε την ίδια σύσταση με του υδρολύματος. Η τιμή εκκίνησης για το οργανικό άζωτο του υδρολύματος ήταν περίπου 300 mg/L και για τον ανόργανο φώσφορο 625 mg/L. Η ανάπτυξη του βακτηρίου, η παραγωγή PHB, η κατανάλωση σακχάρων και ανόργανου

φωσφόρου παρακολουθήθηκαν κατά τη διάρκεια της χρονικής πορείας της ζύμωσης (Γραφήματα 24, 25). Κατά την διάρκεια της ζύμωσης παρατηρήθηκε αύξηση της κυτταρικής βιομάζας ενώ η τελική συγκέντρωση της βιομάζας που παρήχθη στις 36 ώρες ζύμωσης ήταν 38,2 g/L. Η παραγωγή του PHB ήταν 18,34 g/L με συσσώρευση 48,8%. Ο συντελεστής απόδοσης προϊόντος έφτασε 0,22 g/g και η παραγωγικότητα προϊόντος 0,51 g/L/h. Όπως παρατηρείται στο Γράφημα 25, ο μικροοργανισμός αφομοίωσε μόνο την γλυκόζη, ενώ τα υπόλοιπα σάκχαρα δεν ήταν ικανός να τα καταναλώσει με αποτέλεσμα τη συσσώρευσή τους στο μέσο και πιθανόν παρεμπόδιση του μικροοργανισμού μετά από τις υψηλές συγκεντρώσεις τους στο υγρό ζύμωσης. Τα πιο πάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι ο μικροοργανισμός είναι ικανός να αναπτυχθεί και συνεπώς να παράγει PHB με πηγή άνθρακα το υδρόλυμα πιτύρου. Ωστόσο, η ζύμωση χρειάζεται να βελτιστοποιηθεί και να βελτιστοποιηθούν οι παράμετροι που επηρεάζουν την μικροβιακή αύξηση στοχεύοντας την μέγιστη συσσώρευση που μπορεί να αποδώσει ο μικροοργανισμός.

Συγκρίνοντας με άλλες μελέτες, οι Braunegg et al. (1999), μελέτησαν την παραγωγή PHB μέσω του βακτηριακού στελέχους *A.latus* DSM 1123, κατά τη διάρκεια ασυνεχούς ζύμωσης σε βιοαντιδραστήρα συνολικού όγκου 10 L, με υπόστρωμα υδρόλυμα αμύλου (starch hydrolysate) σε αρχική συγκέντρωση 10 g/L. Σύμφωνα με τη συγκεκριμένη εργασία, κατά τη διεργασία παρατηρήθηκε παραγωγή ξηρής βιομάζας 4,90 g/L και περιεκτικότητα σε PHB περί το 30,6% w/w (1,50 g/L επί ξηρού), ενώ η παραγωγικότητα ως προς το προϊόν υπολογίστηκε σε 0,100 g/L/h.



Γράφημα 24. Κινητική παραγωγής ξηρής βιομάζας (□), PHB (Δ) και κατανάλωσης σακχάρων (●), IP (◇), FAN (×) και ανόργανου αζώτου (Δ), σε συνάρτηση με το χρόνο, κατά τη διάρκεια ημι-συνεχούς ζύμωσης με τον μικροοργανισμό *A. lata*, σε βιοαντιδραστήρα, σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα υδρόλυμα πιτύρου σίτου.



Γράφημα 25. Κινητική κατανάλωσης γλυκόζης (○), ξυλόζης (□), αραβινόζης (×) σε συνάρτηση με το χρόνο, κατά τη διάρκεια ημι-συνεχούς ζύμωσης με τον μικροοργανισμό *A. lata*, σε βιοαντιδραστήρα, σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα υδρόλυμα πιτύρου σίτου.

Πίνακας 11. Βιβλιογραφική ανασκόπηση ζυμώσεων με τον μικροοργανισμό *A. lata*, σε βιοαντιδραστήρα, με διαφορετικές πηγές άνθρακα για την παραγωγή PHB.

Πηγή άνθρακα	Βακτηριακό στέλεχος	Διεργασία ζύμωσης	DCW (g/L)	Συσσώρευση PHB (%)	Παραγωγικότητα PHB (g/L/h)	Αναφορά
Εκχύλισμα σφενδάμου-Maple sap (Σακχαρόζη-Γλυκόζη-Φρουκτόζη)	<i>A.latus</i> ATCC 29714	Ασυνεχής	4,20	77,6	0,121	Yezza <i>et al.</i> , 2007
Εκχύλισμα γλυκού σόργου-Sweet sorghum juice (Σακχαρόζη-Γλυκόζη-Φρουκτόζη)	<i>A.latus</i> ATCC 29714	Ασυνεχής	1,73	39,3	0,013	Tanamool <i>et al.</i> , 2009
Σιρόπι 60-Brix υπολειμμάτων σακχαροκαλάμων-Sugar cane (Σακχαρόζη-Γλυκόζη-Φρουκτόζη)	<i>A.lata</i> DSM 1123	Ημι-συνεχής	20,2	83,9	0,234	Wisuthiphaet & Napathorn, 2016
Υδρόλυμα αμύλου-Starch hydrolysate (Μαλτόζη)	<i>A.latus</i> DSM 1123	Ασυνεχής	4,90	30,6	0,100	Braunegg <i>et al.</i> , 1999

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκε το βακτηριακό στέλεχος *A. lata* DSM 1123 ως προς την ικανότητά του να αναπτύσσεται και να συσσωρεύει το πολυμερές PHB σε υποστρώματα με πηγή άνθρακα εμπορικά σάκχαρα χαμηλού κόστους (σακχαρόζη, γλυκόζη, φρουκτόζη, μαννόζη, ξυλόζη, γαλακτόζη, αραβινόζη), τα οποία βρίσκονται σε αφθονία σε απόβλητα προερχόμενα από τη βιομηχανία τροφίμων. Επιπλέον, αξιοποιήθηκαν αγροτοβιομηχανικά απόβλητα, όπως απόβλητα φρούτων και πίτυρο σίτου, με σκοπό την παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων, ώστε να εξεταστεί η ικανότητα αφομοίωσης και ανάπτυξης του μικροοργανισμού, καθώς και η συσσώρευση PHB αξιοποιώντας τα συγκεκριμένα υποστρώματα.

Με βάση τα πειράματα που έλαβαν χώρα, τα σημαντικότερα συμπεράσματα, που εξήχθησαν, ήταν τα ακόλουθα:

- Μεταξύ των εμπορικών σακχάρων, που χρησιμοποιήθηκαν στις ασυνεχείς ζυμώσεις σε κωνικές φιάλες με αρχική συγκέντρωση 20 g/L, ο μικροοργανισμός έδειξε να καταναλώνει πλήρως τη σακχαρόζη, τη γλυκόζη και τη φρουκτόζη, μερικώς τη μαννόζη, την αραβινόζη και τη γαλακτόζη, ενώ δεν κατέστη δυνατή η αφομοίωση της ξυλόζης
- Η μεγαλύτερη παραγωγή ξηρής βιομάζας και PHB που παρατηρήθηκε, όσον αφορά τα εμπορικά σάκχαρα, ήταν 8,03 g/L και 3,88g/L, αντίστοιχα με το ποσοστό συσσώρευσης του πολυμερούς να είναι 48,3% και επιτεύχθηκε στην περίπτωση της σακχαρόζης
- Εν αντιθέσει με τις βιβλιογραφικές αναφορές, στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε μερική αφομοίωση της μαννόζης και παραγωγή ξηρής βιομάζας περί τα 3,30 g/L με συσσώρευση PHB σε ποσοστό 8,79%.
- Στις ασυνεχείς ζυμώσεις σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα ελεύθερα σάκχαρα απόβλητων φρούτων και υδρόλυμα πιτύρου, σημειώθηκαν οι υψηλότερες τιμές παραγωγής ξηρής βιομάζας (9,45 g/L και 7,92 g/L, αντίστοιχα), αλλά και οι υψηλότερες τιμές παραγωγικότητας PHB (0,172 g/L/h και 0,112 g/L/h, αντίστοιχα)
- Στις ασυνεχείς ζυμώσεις με πηγή άνθρακα τα ελεύθερα σάκχαρα αποβλήτων φρούτων, όπου δοκιμάστηκαν συγκεντρώσεις 20 g/L, 40 g/L και 60 g/L, η ανάπτυξη του μικροοργανισμού ήταν επιτυχής μόνο στην πρώτη περίπτωση και αδύνατη στις 2 υψηλότερες συγκεντρώσεις, δεικνύοντας την πιθανή

ανασταλτική επίδραση των υψηλών συγκεντρώσεων πηγής σακχάρου στην ανάπτυξη του συγκεκριμένου στελέχους

- Στην ημι-συνεχή ζύμωση με ελεύθερα σάκχαρα αποβλήτων φρούτων, ως πηγή άνθρακα, η παραγωγή ξηρής βιομάζας έφτασε τα 44,7 g/L με συσσώρευση PHB 54,7%, ενώ σημειώθηκε η υψηλότερη παραγωγικότητα PHB ίση με 0,70 g/L/h
- Στην ημι-συνεχή ζύμωση με υδρόλυμα πιτύρου σίτου, ως πηγή άνθρακα, η παραγωγή ξηρής βιομάζας έφτασε τα 38,2 g/L με συσσώρευση PHB 48,8%, ενώ σημειώθηκε υψηλή παραγωγικότητα PHB 0,51 g/L/h και στην περίπτωση αυτή

Εν κατακλείδι, ο μικροοργανισμός, που εξετάστηκε στην παρούσα μελέτη, έδειξε να αφομοιώνει ικανοποιητικά τα περισσότερα εκ των εμπορικών σακχάρων για τα οποία αξιολογήθηκε και να παράγει βιομάζα, ικανή συσσώρευσης πολυμερούς σε ποσοστά περίπου 50%, χωρίς περιορισμό σε κάποιο θρεπτικό συστατικό και παράλληλα με την κυτταροπλασία. Επιπλέον, αξίζει να τονιστεί ότι σε κλίμακα βιοαντιδραστήρων, παρατηρήθηκαν από τις υψηλότερες παραγωγικότητες πολυμερούς για το συγκεκριμένο βακτηριακό στέλεχος, αξιοποιώντας απόβλητα της βιομηχανίας τροφίμων. Τέλος, κρίνεται απαραίτητη η βελτιστοποίηση της διεργασίας ζύμωσης, τόσο σε επίπεδο θρεπτικών μέσων που να επάγουν περαιτέρω την συσσώρευση του πολυμερούς, στοχεύοντας στη μέγιστη συσσώρευση που μπορεί να επιτευχθεί με τον μικροοργανισμό *A. lata*, αλλά και σε επίπεδο οικονομικής βιωσιμότητας της συνολικής διεργασίας.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Andler, R., Pino, V., Moya, F., Soto, E., Valdés, C., Andreeßen, C., 2021. Synthesis of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) by *Bacillus cereus* using grape residues as sole carbon source. *International Journal of Biobased Plastics*, 3, 98–111.
DOI: <https://doi.org/10.1080/24759651.2021.1882049>
- 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.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.069>
- 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(2), 222–231.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2013.12.003>
- Ashby, R.D., Qureshi, N., Strahan, G.D., Johnston, D.B., Msanne, J., Lin, X., 2022. Corn stover hydrolysate and levulinic acid: Mixed substrates for short-chain polyhydroxyalkanoate production. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 43, 102391.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102391>
- Ashby, R.D., Solaiman, D.K.Y., Strahan, G.D., 2018. The Use of *Azohydromonas lata* DSM 1122 to Produce 4-hydroxyvalerate-Containing Polyhydroxyalkanoate Terpolymers, and Unique Polymer Blends from Mixed-Cultures with *Burkholderia sacchari* DSM 17165. *Journal of Polymers and the Environment*, 27, 198-209.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s10924-018-1332-2>
- Avérous, L., Le Digabel, F., 2006. Properties of biocomposites based on lignocellulosic fillers. *Carbohydrate polymers*, 66, 480-493.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.04.004>
- Baei, M.S., Najafpour G.D., Lasemi, Z., Tabandeh, F., Yunesi, H., Issazadeh, H., Khodabandeh, M., 2010. Optimization PHAs Production from Dairy Industry

- Wastewater (Cheese Whey) by *Azohydromonas lata* DSMZ 1123. *Iranica Journal of Energy and Environment*, 1, 132-136.
DOI: [http://www.idosi.org/jjee/1\(2\)2010/7.pdf](http://www.idosi.org/jjee/1(2)2010/7.pdf)
- Barlaz, M.A., Ham, R.K., Schaefer, D.M., 1989. Mass-balance analysis of anaerobically decomposed refuse. *Journal of Environmental Engineering*, 115, 1088–1102.
DOI: [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)0733-9372\(1989\)115:6\(1088\)](https://doi.org/10.1061/(ASCE)0733-9372(1989)115:6(1088))
- Berwig, K.H., Baldasso, C., Dettmer, A., 2016. Production and characterization of poly (3-hydroxybutyrate) generated by *Alcaligenes latus* using lactose and whey after acid protein precipitation process. *Bioresource technology*, 218, 31–37.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.067>
- Braunegg, G., Lefebvre, G., Genser, K.F., 1998. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. *Journal of Biotechnology*, 65, 127–161.
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(98\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(98)00126-6)
- Bugnicourt, E., Cinelli, P., Lazzeri, A., Alvarez, V.A., 2014. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. *Express Polymer Letters*, 8(11), 791-808.
DOI: <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2014.82>
- Caterbow, A. & Speranskaya, O. 2019. History - Breakthrough in three letters. *Plastic Atlas - Facts and figures about the world of synthetic polymers*.
URL: <https://www.boell.de/en/plasticatlas>
- Chanprateep, S., 2010. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110(6), 621–632.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.07.014>
- Choi, I.S., Lee, Y.G., Khanal, S.K., Park, B.J., Bae, H.-J., 2015. A low-energy, cost-effective approach to fruit and citrus peel waste processing for bioethanol production. *Applied Energy*, 140, 65-74.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2014.11.070>
- Choi, S.Y., Cho, I.J., Lee, Y., Kim, Y.J., Kim, K.J., Lee, S.Y., 2020. Microbial Polyhydroxyalkanoates and Nonnatural Polyesters. *Advanced Materials*, 32, 1907138.

DOI: <https://doi.org/10.1002/adma.201907138>

Dawes, E.A., Senior, P.J., 1973. The Role and Regulation of Energy Reserve Polymers in Micro-organisms, In: Rose, A.H., Tempest, D.W. (Eds.), *Advances in Microbial Physiology*. Academic Press, 135–266.

DOI: [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)60088-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)60088-0)

Demir, H., Tari, C., 2014. Valorization of wheat bran for the production of polygalacturonase in SSF of *Aspergillus sojae*. *Industrial Crops and Products*, 54, 302–309.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.01.025>

Derakhshan, Z., Ferrante, M., Tadi, M., Ansari, F., Heydari, A., Hosseini, M.S., Conti, G. O., & Sadrabad, E.K., 2018. Antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic extract of pomegranate peels, juice and seeds. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 114, 108–111.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.02.023>

De Gisi, S., Gadaleta, G., Gorrasi, G., La Mantia, F.P., Notarnicola, M., Sorrentino, A., 2022. The role of (bio) degradability on the management of petrochemical and bio-based plastic waste. *Journal of Environmental Management*, 310, 114769.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.114769>

Di Lorenzo, M.L., Androsch, R., 2019. Crystallization of Poly[(R)-3-hydroxybutyrate], In: Di Lorenzo, M.L., Androsch, R. (Eds.), *Thermal Properties of Bio-Based Polymers*. Springer International Publishing, Cham, 119–142.

DOI: https://doi.org/10.1007/12_2019_50

Eze, W.U., Umunakwe, R., Obasi, H.C., Ugbaja, M.I., Uche, C.C., Madufor, I.C. 2021. Plastics waste management: A review of pyrolysis technology. *Clean Technologies and Recycling*. 1(1): 50-69.

DOI: [10.3934/ctr.2021003](https://doi.org/10.3934/ctr.2021003)

Galanakis, C.M., 2022. Sustainable Applications for the Valorization of Cereal Processing By-Products. *Foods*, 11, 241.

DOI: <https://doi.org/10.3390/foods11020241>

Geyer, R., Jambeck, J.R., Law, K.L., 2017. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*, 3, e1700782.

DOI: <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700782>

Gilmore, D.F., Fuller, R.C., Lenz, R., 2018. Biodegradation of poly (beta-hydroxyalkanoates), In: *Degradable Materials*. CRC Press, 481–514.

Grage, K., Jahns, A.C., Parlane, N., Palanisamy, R., Rasiah, I.A., Atwood, J.A., Rehm, B.H., 2009. Bacterial polyhydroxyalkanoate granules: biogenesis, structure, and potential use as nano-/micro-beads in biotechnological and biomedical applications. *Biomacromolecules*, 10, 660–669.

DOI: <https://doi.org/10.1021/bm801394s>

Grothe, E., Moo-Young, M., Chisti, Y., 1999. Fermentation optimization for the production of poly (β -hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic. *Enzyme and Microbial Technology*, 25, 132–141.

DOI: [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00023-X](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00023-X)

Howells, E., 1982. Opportunities in biotechnology for the chemical industry. *Chem Ind* 7, 508–511.

Hwang, J.-H., Choi, J.-A., Abou-Shanab, R.A.I., Min, B., Song, H., Kim, Y., Lee, E.S., Jeon, B.-H., 2011. Feasibility of hydrogen production from ripened fruits by a combined two-stage (dark/dark) fermentation system. *Bioresource Technology*, 102(2), 1051–1058.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.08.047>

Jayaprakashvel, M., Akila, S., Venkatramani, M., Vinothini, S., Bhagat, J.S., Hussain, A.J., 2014. Production of bioethanol from papaya and pineapple wastes using marine associated microorganisms. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 11, 193-199.

DOI: <http://dx.doi.org/10.13005/bbra/1410>

Jiménez-Moreno, N., Esparza, I., Bimbela, F., Gandía, L.M., Ancín-Azpilicueta, C., 2019. Valorization of selected fruit and vegetable wastes as bioactive compounds: Opportunities and challenges. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 50, 1–48.

DOI: <https://doi.org/10.1080/10643389.2019.1694819>

Joshi, V., Kumar, A., Kumar, V., 2012. Antimicrobial, antioxidant and phyto-chemicals from fruit and vegetable wastes: A review. *International Journal of Food and Fermentation Technology*. 2, 123-136.

URL:https://www.researchgate.net/publication/306117835_Antimicrobial_anti_oxidant_and_phyto-chemicals_from_fruit_and_vegetable_wastes_A_review

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.

URL: <http://hdl.handle.net/10329/6546>

Karbasi, F., Ardjmand, M., Younesi, H., SafeKordi, A., Yaghmaei, S., 2012. Investigation of optimum fermentation condition for PHA production by four species: *Hydrogenophaga pseudoflava*, *Azohydromonas lata*, *Cupriavidus necator*, *Azotobacter beijinckii*. *World Applied Sciences Journal*, 20, 1713-1724.

DOI: [10.5829/idosi.wasj.2012.20.12.1414](https://doi.org/10.5829/idosi.wasj.2012.20.12.1414)

Karbasi, F., Younesi, H., Ardjmand, M., Safe Kordi, A., Yaghmaei, S., Qaderi, H., 2016. Experimental Investigation of Poly- β -Hydroxybutyrate Production by *Azohydromonas lata*: Kinetics and Artificial Neural Network Modeling. *Chemical Engineering Communications*, 203, 224–235.

DOI: <https://doi.org/10.1080/00986445.2014.990631>

Katiyar, R., Gurjar, B.R., Kumar, A., Bharti, R.K., Biswas, S., Pruthi, V., 2019. A novel approach using low-cost Citrus limetta waste for mixotrophic cultivation of oleaginous microalgae to augment automotive quality biodiesel production. *Environmental science and pollution research international*, 26(16), 16115–16124.

DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04946-0>

Kavitha, S., Yukesh Kannah, R., Kumar, G., Gunasekaran, M., & Rajesh Banu, J. 2020. Introduction: sources and characterization of food waste and food industry wastes. *Food Waste to Valuable Resources*, 1–13.

DOI: [10.1016/b978-0-12-818353-3.00001-8](https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818353-3.00001-8)

Kaza, S., Yao, L., Bhada-Tata, P., Van Woerden, F. 2018. What a Waste 2.0: A Global Snapshot of Solid Waste Management to 2050. *Urban Development Series*. Washington, DC: World Bank.

DOI: [10.1596/978-1-4648-1329-0](https://doi.org/10.1596/978-1-4648-1329-0). License: [Creative Commons Attribution CC BY 3.0 IGO](https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/)

King, P.P., 1982. Biotechnology. An industrial view. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 32, 2–8.

DOI: <https://doi.org/10.1002/jctb.5030320103>

Koutinas, A.A., Xu, Y., Wang, R., Webb, C., 2007. Polyhydroxybutyrate production from a novel feedstock derived from a wheat-based biorefinery. *Enzyme and Microbial technology*, 40, 1035–1044.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.08.002>

Kultys, E., Kurek, M.A., 2022. Green Extraction of Carotenoids from Fruit and Vegetable Byproducts: A Review. *Molecules*, 27, 518.

DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules27020518>

Kumar, A., Gautam, A., Dutt, D., 2016. Biotechnological Transformation of Lignocellulosic Biomass into Industrial Products: An Overview. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 7, 149–168.

DOI: <http://dx.doi.org/10.4236/abb.2016.73014>

Kumar, D., Singh, B., 2020. Sustainable Production of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) Using Biomass-Based Growth Substrates, In: Daramola, M.O., Ayeni, A.O. (Eds.), *Valorization of Biomass to Value-Added Commodities: Current Trends, Challenges, and Future Prospects*. Springer International Publishing, Cham, 245–259.

DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-030-38032-8_12

Lemoigne, M., 1926. Produits de deshydratation et de polymerisation de l'acide β -oxybutyrique. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 8, 770–782.

Leong, Y.K., Chang, J.S., 2022. Valorization of fruit wastes for circular bioeconomy: Current advances, challenges, and opportunities. *Bioresource technology*, 359, 127459.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127459>

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

DOI: <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1973.tb03495.x>

- Lisitsyn, A., Semenova, A., Nasonova, V., Polishchuk, E., Revutskaya, N., Kozyrev, I., & Kotenkova, E. (2021). Approaches in Animal Proteins and Natural Polysaccharides Application for Food Packaging: Edible Film Production and Quality Estimation. *Polymers*, 13(10), 1592.
DOI: [10.3390/polym13101592](https://doi.org/10.3390/polym13101592)
- Liu, H., Kumar, V., Jia, L., Sarsaiya, S., Kumar, D., Juneja, A., Zhang, Z., Sindhu, R., Binod, P., Bhatia, S.K., 2021. Biopolymer poly-hydroxyalkanoates (PHA) production from apple industrial waste residues: A review. *Chemosphere*, 284, 131427.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131427>
- Lizarraga-Valderrama, L., Panchal, B., Thomas, C., Boccaccini, A., Roy, I., 2016. Biomedical applications of polyhydroxyalkanoates, In: *Biomaterials from nature for advanced devices and therapies*. Wiley-Society for Biomaterials, 57, 337–383.
URL: https://www.researchgate.net/profile/Lorena-Lizarraga/publication/309370315_Biomedical_Applications_of_Polyhydroxyalkanoates/URLs/5c24f07e458515a4c7fbf89d/Biomedical-Applications-of-Polyhydroxyalkanoates.pdf
- Maity, S., Das, S., Mohapatra, S., Tripathi, A.D., Akthar, J., Pati, S., Pattnaik, S., Samantaray, D.P., 2020. Growth associated polyhydroxybutyrate production by the novel *Zobellella tiwanensis* strain DD5 from banana peels under submerged fermentation. *International journal of biological macromolecules*, 153, 461–469.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.004>
- Malik, K.A., Jung, C., Claus, D., Schlegel, H.G., 1981. Nitrogen fixation by the hydrogen-oxidizing bacterium *Alcaligenes latus*. *Archives of Microbiology*, 129, 254–256.
DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00425261>
- Manikandan, N.A., Pakshirajan, K., Pugazhenthii, G., 2020. Value addition of waste lignocellulosic biomass through polyhydroxybutyrate production, In: *Waste Biorefinery*. Elsevier, 155–178.
DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818228-4.00006-X>

- Martín, M.A., Siles, J.A., Chica, A.F., Martín, A., 2010. Biomethanization of orange peel waste. *Bioresource technology*, 101(23), 8993–8999.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.133>
- Martínez-Abad, A., Ramos, M., Hamzaoui, M., Kohnen, S., Jiménez, A., Garrigós, M.C., 2020. Optimisation of Sequential Microwave-Assisted Extraction of Essential Oil and Pigment from Lemon Peels Waste. *Foods*, 9(10), 1493.
DOI: <https://doi.org/10.3390/foods9101493>
- Masebinu, S.O., Akinlabi, E.T., Muzenda, E., Aboyade, A.O., Mbohwa, C. 2018. Experimental and feasibility assessment of biogas production by anaerobic digestion of fruit and vegetable waste from Joburg Market. *Waste management (New York, N.Y.)*, 75, 236–250.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.02.011>
- Mathuriya, A.S., Yakhmi, J.V., 2019. Polyhydroxyalkanoates: Biodegradable Plastics and Their Applications, In: Martínez, L.M.T., Kharissova, O.V., Kharisov, B.I. (Eds.), *Handbook of Ecomaterials*. Springer International Publishing, Cham, 2873–2900.
DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-68255-6_84
- Mohan, K., 2011. Microbial deterioration and degradation of polymeric materials. *Journal of Biochemical Technology*, 2, 210–215.
URL: <https://jbiochemtech.com/storage/models/article/dqcR4YRcX44PMI3VJIuJ7R55Dc4ArXQyBupxKjJ5kT8vAZIWU9TnyiGzfJK2/microbial-deterioration-and-degradation-of-polymeric-materials.pdf>
- Moradali, M.F., Rehm, B.H., 2020. Bacterial biopolymers: from pathogenesis to advanced materials. *Nature Reviews Microbiology*, 18, 195–210.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0313-3>
- Narayan, R., Balakrishnan, S., 2009. Drivers for biodegradable/compostable plastics & role of composting in waste management & sustainable agriculture. In: *Biological methods of waste treatment and management in South India*, Chennai, India. February 15, 2007.
URL: https://www.researchgate.net/profile/Parameswari-E/publication/338187531_BIOLOGICAL_METHODS_OF_WASTE_TREATMENT_AND_MANAGEMENT_IN_SOUTH_INDIA_SYMPOSIUM_PROC

[EEDINGS/URLs/5e058e62a6fdcc28374166a8/BIOLOGICAL-METHODS-OF-WASTE-TREATMENT-AND-MANAGEMENT-IN-SOUTH-INDIA-SYMPIOSIUM-PROCEEDINGS.pdf#page=24](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.10.017)

- Nath, A., Dixit, M., Bandiya, A., Chavda, S., Desai, A., 2008. Enhanced PHB production and scale up studies using cheese whey in fed batch culture of *Methylobacterium sp.* ZP24. *Bioresource technology*, 99, 5749–5755.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.10.017>
- Nobes, G.A., Jurasek, L., Marchessault, R.H., Martin, D.P., Putaux, J.L., Chanzy, H., 2000. Growth and kinetics of in vitro poly ([R]-(-)-3-hydroxybutyrate) granules interpreted as particulate polymerization with coalescence. *Macromolecular rapid communications*, 21, 77–84.
URL: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3927\(20000201\)21:2%3C77::AID-MARC77%3E3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3927(20000201)21:2%3C77::AID-MARC77%3E3.0.CO;2-6)
- Ojumu, T., Yu, J., Solomon, aBO, 2004. Production of polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymers. *African journal of Biotechnology*, 3, 18–24.
DOI: <https://doi.org/10.5897/AJB2004.000-2004>
- Olivera, E.R., Carnicero, D., Jodra, R., Miñambres, B., García, B., Abraham, G.A., Gallardo, A., Román, J.S., García, J.L., Naharro, G., 2001. Genetically engineered *Pseudomonas*: a factory of new bioplastics with broad applications. *Environmental Microbiology*, 3, 612–618.
DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2001.00224.x>
- Ong, S.Y., Zainab-L, I., Pyary, S., Sudesh, K., 2018. A novel biological recovery approach for PHA employing selective digestion of bacterial biomass in animals. *Applied microbiology and biotechnology*, 102, 2117–2127.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8788-9>
- 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 & Technology*, 50(12), 2509–2518.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/ijfs.12935>
- Palleroni, N.J., Palleroni, A.V., 1978. *Alcaligenes latus*, a New Species of Hydrogen-Utilizing Bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 28, 416–424.

DOI: <https://doi.org/10.1099/00207713-28-3-416>

Palmeiro-Sánchez, T., O’Flaherty, V., Lens, P.N.L., 2022. Polyhydroxyalkanoate bio-production and its rise as biomaterial of the future. *Journal of Biotechnology*, 348, 10–25.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2022.03.001>

Penkhrue, W., Jendrossek, D., Khanongnuch, C., Pathom-Aree, W., Aizawa, T., Behrens, R. L., Lumyong, S., 2020. Response surface method for polyhydroxybutyrate (PHB) bioplastic accumulation in *Bacillus drentensis* BP17 using pineapple peel. *PloS one*, 15(3), e0230443.

DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230443>

Plastic Atlas. 2019. *Facts and figures about the world of synthetic polymers*. [online]. Διαθέσιμο στο: <https://www.boell.de/en/plasticatlas> [ανάκτηση 10/06/2022].

Polman, E.M.N., Gruter, G.-J.M., Parsons, J.R., Tietema, A., 2021. Comparison of the aerobic biodegradation of biopolymers and the corresponding bioplastics: A review. *Science of The Total Environment*, 753, 141953.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141953>

Rao, M.G., Bharathi, P., Akila, R., 2014. A comprehensive review on biopolymers. *Scientific Reviews & Chemical Communications*, 4, 61–68.

URL: <https://selling.farafire.ir/content/demo/201904/aaa78a1c-dc2e-46c3-9d77-ef6b966c6669.pdf>

Rodríguez-Contreras, A., Marqués-Calvo, M.S., Gil, F.J., Manero, J.M., 2016. Modification of titanium surfaces by adding antibiotic-loaded PHB spheres and PEG for biomedical applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 27, 1–15.

DOI: <https://doi.org/10.1007/s10856-016-5723-4>

Saptoadi, H., Rohmat, T.A., Sutoyo, 2016. Combustion of char from plastic wastes pyrolysis. In: *AIP Conference Proceedings*. AIP Publishing LLC, p. 30006.

DOI: [10.1063/1.4949286](https://doi.org/10.1063/1.4949286)

Scheiner, D., 1976. Determination of ammonia and Kjeldahl nitrogen by indophenol method. *Water research*, 10, 31–36.

DOI: [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(76\)90154-8](https://doi.org/10.1016/0043-1354(76)90154-8)

- Shah, A.A., Hasan, F., Hameed, A., Ahmed, S., 2008. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnology Advances*, 26, 246–265.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.12.005>
- Shahbandeh, M. 2022. Global production of fruit by variety selected 2020. Statista.
URL: <https://www.statista.com/statistics/264001/worldwide-production-of-fruit-by-variety/>
- Singh, A.K., Bhati, R., Mallick, N., 2015. *Pseudomonas aeruginosai* MTCC 7925 as a Biofactory for Production of the Novel SCL-LCL-PHA Thermoplastic from Non-Edible Oils. *Current Biotechnology*, 4, 65–74.
URL: https://www.researchgate.net/profile/Akhilesh-Singh-30/publication/279174972_Pseudomonas_aeruginosai_MTCC_7925_as_a_Biofactory_for_Production_of_the_Novel_SCL-LCL-PHA_Thermoplastic_from_Non-Edible_Oils/URLs/5c3f741892851c22a3799968/Pseudomonas-aeruginosai-MTCC-7925-as-a-Biofactory-for-Production-of-the-Novel-SCL-LCL-PHA-Thermoplastic-from-Non-Edible-Oils.pdf
- Singh, A.K., Sharma, L., Srivastava, J.K., Mallick, N., Ansari, M.I., 2018. Microbially originated polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolymers: an insight into the molecular mechanism and biogenesis of PHA granules, In: *Sustainable Biotechnology-Enzymatic Resources of Renewable Energy*. Springer, 355–398.
DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-95480-6_14
- Singh, B., Sharma, N., 2008. Mechanistic implications of plastic degradation. *Polymer Degradation and Stability*, 93, 561–584.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2007.11.008>
- Singh, G., Kumari, A., Mittal, A., Yadav, A., Aggarwal, N.K., 2013. Poly β -Hydroxybutyrate Production by *Bacillus subtilis* NG220 Using Sugar Industry Waste Water. *BioMed Research International*, 2013, 952641.
DOI: <https://doi.org/10.1155/2013/952641>
- Tanamool, V., Danvirutai, P., Thanonkeo, P., Imai, T., Kaewkannetra, P., 2022. Production of poly- β -hydroxybutyric acid (PHB) from sweet sorghum juice by *Alcaligenes eutrophus* TISTR 1095 and *Alcaligenes latus* ATCC 29714 via

batch fermentation. In: *The 3th International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products (FerVAAP)*, 1-6.

URL:https://www.researchgate.net/publication/267691774_Production_of_Poly-b-hydroxybutyric_acid_PHB_from_sweet_sorghum_juice_by_Alcaligenes_eutrophus_TISTR_1095_and_Alcaligenes_latus_ATCC_29714_via_batch_fermentation

Tiseo, I. 2022. Global plastic production 1950-2020. Statista.

URL:<https://www.statista.com/statistics/282732/global-production-of-plastics-since-1950/>

Vaishnav, A., Upadhyay, K., Tipre, D., Dave, S., 2020. Utilization of mixed fruit waste for exopolysaccharide production by *Bacillus* species SRA4: medium formulation and its optimization. *3 Biotech.* 10, 550.

DOI: <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02545-2>

Valentino, F., Karabegovic, L., Majone, M., Morgan-Sagastume, F., Werker, A., 2015. Polyhydroxyalkanoate (PHA) storage within a mixed-culture biomass with simultaneous growth as a function of accumulation substrate nitrogen and phosphorus levels. *Water Research*, 77, 49–63.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.03.016>

Verma, R., Vinoda, K. S., Papireddy, M., Gowda, A.N.S. 2016. Toxic Pollutants from Plastic Waste- A Review. *Procedia Environmental Sciences*, 35, 701–708.

DOI: [10.1016/j.proenv.2016.07.069](https://doi.org/10.1016/j.proenv.2016.07.069)

Wang, F., Lee, S.Y., 1997. Poly (3-hydroxybutyrate) production with high productivity and high polymer content by a fed-batch culture of *Alcaligenes latus* under nitrogen limitation. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 3703–3706.

DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.63.9.3703-3706.1997>

Weber, C.J., Opp, C., 2020. Spatial patterns of mesoplastics and coarse microplastics in floodplain soils as resulting from land use and fluvial processes. *Environmental Pollution*, 267, 115390.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115390>

- Wisuthiphaet, N., Napathorn, S.C., 2016. Optimisation of the use of products from the cane sugar industry for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Azohydromonas lata* DSM1123 in fed-batch cultivation. *Process Biochemistry*, 51, 352-361.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2015.12.009>
- Xie, C.-H., Yokota, A., 2005. Reclassification of *Alcaligenes latus* strains IAM 12599T and IAM 12664 and *Pseudomonas saccharophila* as *Azohydromonas lata* gen. nov., comb. nov., *Azohydromonas australica* sp. nov. and *Pelomonas saccharophila* gen. nov., comb. nov., respectively. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55, 2419–2425.
DOI: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63733-0>
- Xu, Y., Wang, R.-H., Koutinas, A., Webb, C., 2010. Microbial biodegradable plastic production from a wheat-based biorefining strategy. *Process Biochemistry*, 45, 153–163.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.09.001>
- Yezza, A., Halasz, A., Levadoux, W., Hawari, J., 2007. Production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) by *Alcaligenes latus* from maple sap. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(2), 269-274.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1158-7>
- Zafar, M., Kumar, S., Kumar, S., Dhiman, A.K., 2012. Optimization of polyhydroxybutyrate (PHB) production by *Azohydromonas lata* MTCC 2311 by using genetic algorithm based on artificial neural network and response surface methodology. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 1, 70-79.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2011.08.012>
- Zafar, M., Kumar, S., Kumar, S., Dhiman, A.K., Park., H.-S., 2014. Maintenance-energy-dependent dynamics of growth and poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] production by *Azohydromonas lata* MTCC 2311 using simple and renewable carbon substrates. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 31, 313-323.
DOI: <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20140312s00002434>
- Zahari, M.A.K.M., Zakaria, M.R., Ariffin, H., Mokhtar, M.N., Salihon, J., Shirai, Y., Hassan, M.A., 2012. Renewable sugars from oil palm frond juice as an alternative novel fermentation feedstock for value-added products. *Bioresource technology*, 110, 566–571.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.119>

Πενλόγλου, Ι.Σ, 2011. Μικροβιακή παραγωγή του βιοαποικοδομήσιμου πολυ (3-υδροξύ βουτυρικού) εστέρα (PHB) με στοχευμένες μοριακές ιδιότητες: πειραματική βελτιστοποίηση και μαθηματική προσομοίωση. Διδακτορική Διατριβή. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.

DOI: <https://doi.org/10.26262/heal.auth.ir.125215>

Μελέτη της παραγωγής πολυ(3-υδροξυ-βουτυρικού) εστέρα μέσω μικροβιακών ζυμώσεων με χρήση του *Azohydromonas lata*

ORIGINALITY REPORT



PRIMARY SOURCES



Exclude quotes On

Exclude matches < 2%

Exclude bibliography On