



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Πτυχιακή Εργασία

Παραγωγή και βελτιστοποίηση αποπολυμερασών του πολύ-υδροξυβουτυρικού εστέρα (PHB) με τη χρήση βακτηριακών στελεχών.

Ρίζου Βαΐα Πετρίνα του Δημητρίου

Επιβλέπουσα καθηγήτρια : Πατεράκη Χρυσάνθη

Λάρισα, Σεπτέμβριος 2024

Παραγωγή και βελτιστοποίηση αποπολυμερασών του πολύ-υδροξυβουτυρικού εστέρα (PHB) με τη χρήση βακτηριακών στελεχών.

Production and optimization of poly-(3)-hydroxybutyrate depolymerases using bacterial strains

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Πατεράκη Χρυσάνθη (Επιβλέπουσα καθηγήτρια):
Επίκουρος Καθηγήτρια Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
- Μόσιαλος Δημήτριος:
Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
- Καρπούζας Δημήτριος:
Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας και Πρόεδρος στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Περίληψη

Το πλαστικό αποτελεί βασικό βιομηχανικό προϊόν της σύγχρονης εποχής, με την παραγωγή του να συμβάλλει σημαντικά στην ανάπτυξη ποικίλων τομέων. Ωστόσο, παρά τη θετική του συμβολή στην καθημερινότητα, η μαζική του παραγωγή, σε συνδυασμό με τη λανθασμένη διαχείριση των πλαστικών απορριμμάτων, οδήγησε στη συσσώρευση αποβλήτων και στη ρύπανση των χερσαίων και υδάτινων περιβαλλόντων. Επιπλέον, η παραγωγή πλαστικού αξιοποιεί ως βασικό συστατικό το πετρέλαιο, γεγονός που συμβάλλει στην ταχεία εξάλειψη μη ανανεώσιμων πηγών ενέργειας. Έτσι, η αναζήτηση βιώσιμων εναλλακτικών, φιλικών προς το περιβάλλον που παράγονται από ανανεώσιμες πηγές με χαμηλό κόστος είναι ύψιστης σημασίας. Μία από αυτές τις εναλλακτικές αποτελούν οι πολύ-υδροξυ-αλκανοϊκοί εστέρες (PHAs) και πιο συγκεκριμένα ο πολύ-υδροξυ-βουτυρικός εστέρας (PHB). Τα πολυμερή αυτά παράγονται ενδοκυτταρικά και χρησιμεύουν ως αποθήκες ενέργειας σε διάφορους μικροοργανισμούς, υπό συνθήκες περιορισμού κάποιου θρεπτικού συστατικού, με την προϋπόθεση ότι η πηγή άνθρακα παραμένει σε περίσσεια. Το PHB είναι ένα θερμοπλαστικό πολυμερές, είναι βιοσυμβατό, βιοδιασπώμενο και μη τοξικό. Το PHB λειτουργεί ως αποθήκη ενέργειας και άνθρακα για τους μικροοργανισμούς, συνεπώς οι ίδιοι μικροοργανισμοί που το παράγουν μπορούν να αποβούν και στην αποδόμησή του. Η αποδόμηση του PHB μπορεί να λάβει χώρα ενδοκυτταρικά με τη βοήθεια ενζύμων που ονομάζονται ενδοκυτταρικές αποπολυμεράσες του PHB. Το πολυμερές αυτό αποθηκεύεται ως native PHB (nPHB). Ωστόσο, κάποιοι μικροοργανισμοί κατέχουν τη δυνατότητα να διασπάσουν εξωκυτταρικό ή μετουσιωμένο PHB (dPHB). Για την αποδόμηση του dPHB οι μικροοργανισμοί εκκρίνουν εξωκυτταρικές αποπολυμεράσες. Η εξέταση της ενζυμικής δραστηριότητας των αποπολυμερασών του PHB σε διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειών έχει αποτελέσει αντικείμενο αρκετών μελετών. Για να αποτελέσει το PHB μια ιδανική εναλλακτική έναντι των συμβατών πλαστικών, είναι απαραίτητη η βελτιστοποίηση τόσο της παραγωγής του, όσο και της παραγωγής των εξωκυτταρικών αποπολυμερασών του PHB. Η βελτιστοποίηση της διαδικασίας διάσπασης, συμβάλλει σημαντικά στην ελαχιστοποίηση της περιβαλλοντικής επιβάρυνσης από το συγκεκριμένο βιοπλαστικό. Σε αυτή τη διπλωματική εργασία η προσπάθεια βελτιστοποίησης της παραγωγής των εξωκυτταρικών αποπολυμερασών του PHB έγινε σε συνθήκες ασυνεχούς βακτηριακής ζύμωσης των στελεχών *Alcaligenes faecalis* NRRL-1695 και *Priestia megaterium* NRRL-3254, NRRL-3702 και NRRL-3703. Έγινε χρήση διαφορετικών θρεπτικών μέσων καλλιέργειας και πηγών άνθρακα. Η μεγαλύτερη ενζυμική παραγωγή σημειώθηκε με το μέσο καλλιέργειας minimal secretion (MS). Η καταλληλότερη πηγή άνθρακα για την μέγιστη ενζυμική παραγωγή ήταν το ηλεκτρικό οξύ. Στη συνέχεια, τα ένζυμα που παρήχθησαν από το θρεπτικό MS με πηγή άνθρακα το

ηλεκτρικό οξύ χρησιμοποιήθηκαν για την διάσπαση εμπορικού dPHB. Διερευνήθηκε ικανότητα διάσπασης διαφορετικών αρχικών συγκεντρώσεων PHB (3g/L, 5g/L και 10g/L), με δύο διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα TrisHCl-CaCl₂ και Na₂HPO₄-NaH₂PO₄*2H₂O με pH 8. Ακολούθως, εξετάστηκε η διάσπαση PHB με συγκέντρωση 5g/L με τα ίδια ρυθμιστικά διαλύματα σε pH 6, 7 και 9. Η μέγιστη συγκέντρωση αποδείχθηκε παρεμποδιστική για την ενζυμική διάσπαση του PHB, ενώ αποτελεσματική διάσπαση σημειώθηκε σε αρχική συγκέντρωση PHB 5g/L και TrisHCl-CaCl₂ με pH 7 για το στέλεχος *A.faecalis* NRRL-1695 και TrisHCl-CaCl₂ με pH 6 και pH 8 για το στέλεχος *P. megaterium* NRRL-3254.

Abstract

Plastic is a modern industrial product, with significant contribution on daily life. However, its mass production, along with the fact that plastic waste is improperly managed, has led to its accumulation and therefore pollution of terrestrial and aquatic environments. Additionally, plastic production relies heavily on fossil resources as a primary component, contributing to the rapid depletion of non-renewable energy sources. Thus, sustainable, environmentally friendly alternatives produced from renewable sources at low cost must be made of use. One alternative solution is polyhydroxyalkanoates (PHAs), specifically polyhydroxybutyrate (PHB). PHAs are produced and stored intracellularly by various microorganisms, under nutrient-limiting conditions with excess carbon source. PHB is a thermoplastic polymer, ideal for substituting petroleum-based plastics due to its biocompatibility, biodegradability and non-toxicity. PHB functions as energy and carbon storage for microorganisms, meaning that the same microorganisms that produce it can also degrade it. The degradation of PHB can occur by intracellular PHB depolymerases that degrade native PHB (nPHB). However, some microorganisms can degrade extracellular or denatured PHB (dPHB), by secreting extracellular PHB depolymerases. The examination of the enzymatic activity of PHB depolymerases under different cultivation conditions has been the subject of several studies. To make PHB an ideal alternative to petroleum-based plastics, the optimization of both its production degradation is essential. The last can significantly contribute to minimizing its environmental burden. In this thesis, the production and optimization of the extracellular PHB depolymerase was conducted performing batch-fermentation using bacterial strains *Alcaligenes faecalis* NRRL-1695 and *Priestia megaterium* NRRL-3254, NRRL-3702, and NRRL-3703, with the use of different growth media and carbon sources. The highest production of enzymes was observed in cultures containing the minimal secretion medium (MS). The best carbon source that produced maximum results was succinic acid. Consecutively, the PHB depolymerases produced from the cultures containing the MS medium and succinic acid as a carbon source were utilized for the hydrolysis of commercial dPHB powder. The depolymerases' ability to degrade different concentrations of PHB (3g/L, 5g/L, and 10g/L) in two different buffers TrisHCl-CaCl₂ and Na₂HPO₄-NaH₂PO₄*2H₂O at pH 8 was investigated. Afterwords, hydrolysis of PHB at a concentration of 5g/L was examined using the same buffers at pH 6, 7, and 9 respectively. The maximum concentration proved to be inhibitory for enzymatic degradation of PHB while effective degradation occurred in hydrolysis solutions with a concentration of PHB at 5g/L and TrisHCl-CaCl₂ pH 7 for the strain *A. faecalis* NRRL-1695 and TrisHCl-CaCl₂ pH 6 and pH 8 for the strain *P. megaterium* NRRL-3254.

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία διεκπεραιώθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Μικροβίων – Μοριακής Βακτηριολογίας – Ιολογίας, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας . Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω, την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου κα. Πατεράκη Χρυσάνθη, για την καθοδήγηση που μου παρείχε, την εμπιστοσύνη που μου επέδειξε και την ευκαιρία που μου έδωσε να ενασχοληθώ με ένα σύγχρονο θέμα υψηλού ενδιαφέροντος σε εργαστηριακό επίπεδο. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την ερευνήτρια Ζογμπή Λίνα, για τον χρόνο που αφιέρωσε για να με βοηθήσει και να με καθοδηγήσει σε όλους μου τους προβληματισμούς, αλλά και για την στήριξη που έλαβα από μέρος της. Τέλος, οφείλω να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την στήριξη που μου έδειξαν καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Περιεχόμενα

Εισαγωγή.....	12
Ρύπανση πετρέλαιο-πλαστικών	12
Πολυ-υδροξυ-αλκανοϊκοί εστέρες ή PHAs.....	16
PHB ή πολύ(R)- 3-υδροξυ βουτυρικό οξύ	17
Βιοχημικό μονοπάτι παραγωγής PHB	19
Αποπολυμεράσεις PHB.....	22
Υλικά και μέθοδοι.....	25
Ανάπτυξη και συντήρηση μικροοργανισμών.....	25
Θρεπτικά που χρησιμοποιήθηκαν	26
Πειράματα ασυνεχών ζυμώσεων	27
Πειράματα υδρόλυσης	28
Χημικές μέθοδοι ανάλυσης.....	29
Προσδιορισμός pH.....	29
Προσδιορισμός οπτικής πυκνότητας (OD)	29
Προσδιορισμός ξηρού βάρους βιομάζας (Dry Cell Weight).....	29
Προσδιορισμός ξηρού βάρους PHB και απόδοση υδρόλυσης	29
Προσδιορισμός ενζυμικής δραστηριότητας αποπολυμεράσης του PHB.....	30
Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης με πρωτεϊνική ανάλυση Bradford	
Παρασκευή διαλύματος χρώσης Bradford.....	31
Προσδιορισμός ειδικής ενζυμικής δραστηριότητας.....	31
Προσδιορισμός ανόργανου φωσφόρου (IP).....	31
Αποτελέσματα.....	32
Παραγωγή υδρολυτικών ενζύμων PHB	32
Επιλογή θρεπτικού μέσου για τη μέγιστη παραγωγή αποπολυμερασών του PHB.....	32
Επιλογή πηγής άνθρακα για τη μέγιστη παραγωγή αποπολυμερασών του PHB	37
Υδρόλυση PHB	43

Επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης PHB.....	43
Επίδραση του pH στην ικανότητα υδρόλυσης.....	47
Συζήτηση.....	51
Συμπεράσματα	57
Βιβλιογραφία.....	60

Εικόνες

Εικόνα 1: Κατηγοριοποίηση κύριων ομάδων πολυμερών που προέρχονται από το πετρέλαιο ή από βιομάζα ανάλογα με την ικανότητα βίο-αποικοδόμησης (Προσαρμοσμένη από (Ali et al., 2022)).....	12
Εικόνα 2:Μετάβαση από τη γραμμική παραγωγή πολυμερών από το πετρέλαιο στην κυκλική βιο-οικονομία (Προσαρμοσμένη από Bachmann et al., 2023)	15
Εικόνα 3: Διάγραμμα που απεικονίζει την παγκόσμια παραγωγή των πλαστικών για το 2022 και την κατάληξή τους.	16
Εικόνα 4:Το γλυκολυτικό μονοπάτι οδηγεί στην παραγωγή ακέτυλο-CoA. Ανάλογα τις συνθήκες που αφορούν τη διαθεσιμότητα των θρεπτικών ακολουθεί το μονοπάτι συσσώρευσης του PHB ή ο κύκλος του τρικαρβοξυλικού οξέος(Προσαρμοσμένη από Zhang et al., 2022)	21
Εικόνα 5: Το μονοπάτι συσσώρευσης του PHB σηματοδοτείται από την παρουσία ακέτυλοCoA και ακολουθούν τα τρία βήματα παραγωγής του και τα τρία αποδόμησης(Προσαρμοσμένη από Khanna and Srivastava, 2005).....	21

Πίνακες και Γραφήματα

Πίνακας 1: Μέσο καλλιέργειας MS.....	26
Πίνακας 2: Μέσο καλλιέργειας DSM457	26
Πίνακας 3: Οι συγκεντρώσεις των $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ και Na_2HPO_4 για την παραγωγή $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Η παρασκευή του buffer με pH 9 πραγματοποιήθηκε με την πρόσθεση του διαλύματος $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ συγκέντρωσης 0,83g/L στο διάλυμα Na_2HPO_4 συγκέντρωσης 13,439g/L μέχρι το pH να πάρει την τιμή 9.....	28
Γράφημα 1: Η μέγιστη ενζυμική δραστηριότητα(άξονας x) σε abs/min στα μέσα καλλιέργειας MS και MSY, και DSM457. Για το MS η μέγιστη ενζυμική δραστηριότητα σημειώθηκε στις 25 ώρες, για το MSY στις 24 ώρες ενώ για το μέσο DMS457 στις 48 ώρες.	33
Γράφημα 2: Η ενζυμική δραστηριότητα(άξονας y) σε abs/min των ενδοκυτταρικών ενζύμων των 25 στις καλλιέργειες όπου εμπεριέχονταν MS, των 24 ωρών στις καλλιέργειες με MSY και των 48 ωρών σε αυτές με DSM457.	34
Γράφημα 3: Η ειδική ενζυμική δραστηριότητα εκφράζεται σε Units/mg πρωτεΐνης (άξονας y). Απεικονίζονται τα δείγματα των 25 ωρών στις καλλιέργειες όπου εμπεριέχονταν MS, των 24 ωρών στις καλλιέργειες με MSY και των 48 ωρών σε αυτές με DSM457.	35

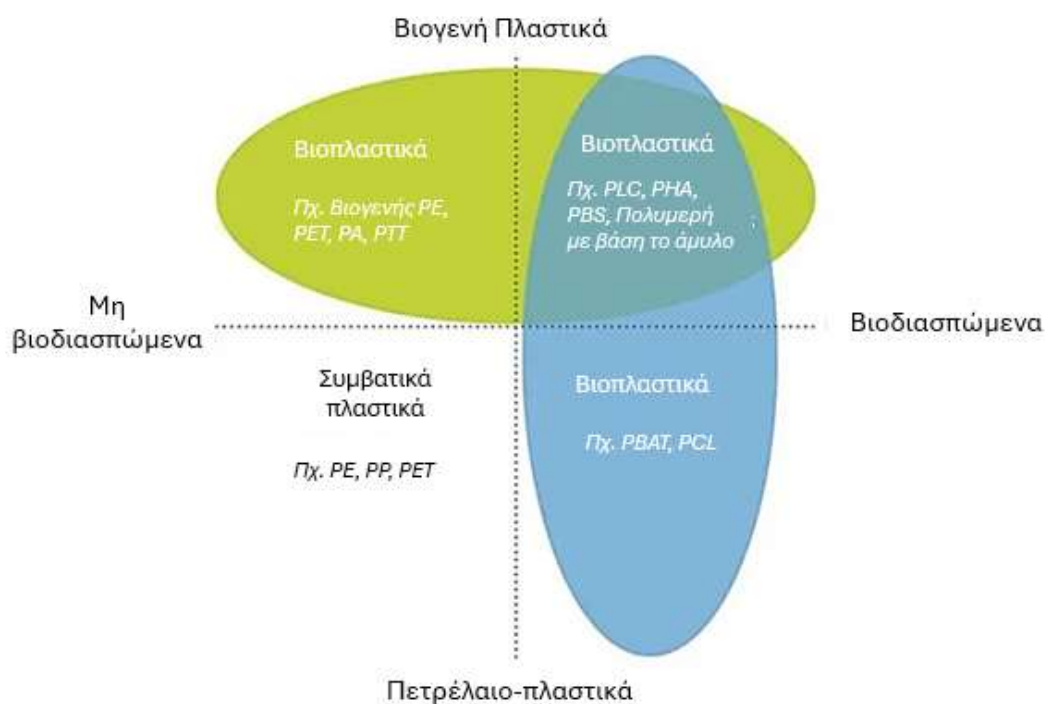
Γράφημα 4: Απεικονίζεται το pH (άξονας y) όλων των δειγμάτων σε συνάρτηση με το χρόνο ζύμωσης (άξονας x). Αριστερά απεικονίζονται τα δείγματα του μέσου MS. Το μεσαίο Πίνακα απεικονίζει τα δείγματα με MSY, ενώ στα δεξιά φαίνονται τα δείγματα με DSM457.....	36
Γράφημα 5: Απεικονίζεται το pH (άξονας y) όλων των δειγμάτων του <i>A. faecalis</i> NRRL-1695 στα αριστερά, και του <i>P. megaterium</i> NRRL-3254 στα δεξιά, σε συνάρτηση με το χρόνο (άξονας x).	37
Γράφημα 6: Η ενζυμική δραστηριότητα εκφράζεται σε Abs/min (άξονας y) σε συνάρτηση με τον χρόνο (άξονας x). Απεικονίζονται τα δείγματα των 24 και 48 ωρών και των δύο μικροοργανισμών.	38
Γράφημα 7: Η ενζυμική δραστηριότητα εκφράζεται σε Abs/min (άξονας y). Απεικονίζονται τα δείγματα των ενδοκυτταρικών ενζύμων των 24 και 48 ωρών και των δύο μικροοργανισμών..	39
Γράφημα 8: Η ειδική ενζυμική δραστηριότητα εκφράζεται σε Units/mg πρωτεΐνης (άξονας y). Απεικονίζονται τα δείγματα των 48 ωρών όλων των καλλιιεργειών του στελέχους NRRL-1695.	40
Γράφημα 9: Απεικονίζεται το ξηρό βάρος βιομάζας και το pH (άξονας y) σε συνάρτηση με το χρόνο ζύμωσης (άξονας x) για τα στελέχη NRRL-1695 και NRRL-3254.	41
Γράφημα 10: Η συγκέντρωση του ανόργανου φωσφόρου σε mg/L (άξονας y) των δειγμάτων του στελέχους NRRL-1695 σε συνάρτηση με το χρόνο ζύμωσης (άξονας x).	42
Γράφημα 11: Η μάζα του αποξηραμένου του PHB σε g/L (άξονας y) των δειγμάτων υδρόλυσης με Tris-HCl CaCl ₂ (pH 8) στα διαλύματα υδρόλυσης των δύο μικροοργανισμών σε συνάρτηση με τον χρόνο (άξονας x).	44
Γράφημα 12: Η μάζα του αποξηραμένου του PHB σε g/L (άξονας y) των δειγμάτων υδρόλυσης με Na ₂ HPO ₄ -NaH ₂ PO ₄ *2H ₂ O στα διαλύματα υδρόλυσης των NRRL-1695 και NRRL-3254 σε συνάρτηση με τον χρόνο (άξονας x).	45
Γράφημα 13: Η απόδοση της υδρόλυσης στα διαλύματα που περιείχαν αρχική συγκέντρωση PHB 3g/L, 5g/L και 10g/L, και TrisHCl-CaCl ₂ pH 8.	46
Γράφημα 14: Η απόδοση της υδρόλυσης στα διαλύματα που περιείχαν αρχική συγκέντρωση PHB 3g/L, 5g/L και 10g/L, και Na ₂ HPO ₄ -NaH ₂ PO ₄ *2H ₂ O pH 8.	47
Γράφημα 15: Το ξηρό βάρος του PHB σε g/L στα διαλύματα υδρόλυσης όπου εμπεριέχεται TrisHCl-CaCl ₂ pH 6, 7 και 9 των NRRL-1695 και NRRL-3254.....	48
Γράφημα 16: Η απόδοση της υδρόλυσης στα διαλύματα όπου εμπεριέχεται TrisHCl-CaCl ₂ pH 6,7και 9 στις 48 ώρες υδρόλυσης. Η τελευταία μπάρα απεικονίζει την απόδοση των προηγούμενων διαλυμάτων υδρόλυσης με pH 8.	49

Γράφημα 17: Το ξηρό βάρος του PHB σε g/L όπου εμπεριέχεται $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ με pH 6, 7, 8 και 9 για τα στελέχη NRRL-1695 και NRRL-3254.	49
Γράφημα 18: Η απόδοση της υδρόλυσης στα διαλύματα όπου εμπεριέχεται $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ pH 6,7 και 9 στις 48 ώρες υδρόλυσης. Η τελευταία μπάρα απεικονίζει την απόδοση των προηγούμενων διαλυμάτων υδρόλυσης με pH 8.	50

Εισαγωγή

Ρύπανση πετρέλαιο-πλαστικών

Ο όρος «πλαστικό» αναφέρεται συνήθως σε έναν μεγάλο αριθμό συνθετικών ή επεξεργασμένων οργανικών υλών που παράγονται κυρίως από πετρέλαιο (Atanasova *et al.*, 2021). Αποτελείται, κατά κύριο λόγο, από θερμοπλαστικά πολυμερή μεγάλου μοριακού βάρους (Atanasova *et al.*, 2021). Τα κύρια πολυμερή που έχουν ως βάση το πετρέλαιο και παράγονται μαζικά είναι το πολυαιθυλένιο (PE), το πολυπροπυλένιο (PP), το πολυβινυλοχλωρίδιο (PVC), το πολυαμίδιο (PA), η πολουρεθάνη (PUR), το τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο (PET), το πολυστυρένιο (PS) και το συνθετικό λάστιχο (SR) (Wei and Zimmermann, 2017; Atanasova *et al.*, 2021). Τα κύρια βιογενή πολυμερή είναι το πολυγαλακτικό οξύ (PLA), οι πολύ-υδροξυαλκανοϊκοί εστέρες (PHAs) και το ηλεκτρικό πολυβουτυλένιο (PBS). Στην Εικόνα 1 φαίνεται η ικανότητα βιοαποικοδόμησης των πλαστικών. Το πλαστικό αποτελεί ένα από τα πιο βασικά βιομηχανικά προϊόντα της σύγχρονης εποχής. Η παραγωγή του έχει συμβάλει σημαντικά σε αρκετούς τομείς, όπως είναι η ιατρική, οι οικοδομικές κατασκευές, η κατασκευή ηλεκτρονικών συσκευών, η παραγωγή προϊόντων καθημερινής χρήσης και η συσκευασία τροφίμων (Liu *et al.*, 2020).



Εικόνα 1: Κατηγοριοποίηση κύριων ομάδων πολυμερών που προέρχονται από το πετρέλαιο ή από βιομάζα ανάλογα με την ικανότητα βιο-αποικοδόμησης (Προσαρμοσμένη από (Ali *et al.*, 2022))

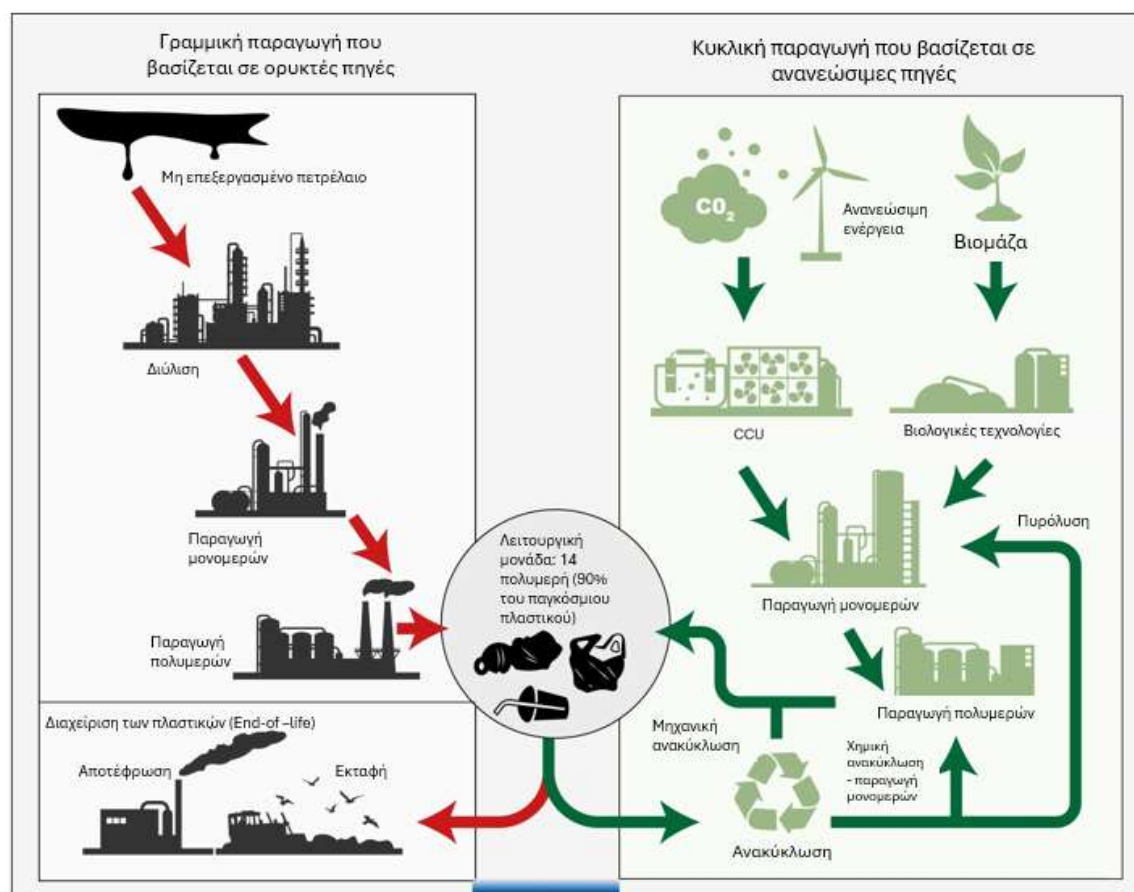
Ωστόσο, παρά τα θετικά που έχουν προσκομιστεί από την μαζική παραγωγή πλαστικών προϊόντων, το κόστος που έχουν στην υγεία, την οικονομία και το περιβάλλον είναι σημαντικό (Hagagy *et al.*, 2022). Η μαζική τους παραγωγή σε συνδυασμό με τα χαμηλά ποσοστά ανακύκλωσης και επανάκτησής τους έχει οδηγήσει σε σημαντική συσσώρευση αστικών και βιομηχανικών αποβλήτων στο περιβάλλον (McAdam *et al.*, 2020). Τα πλαστικά που προέρχονται από το πετρέλαιο χρειάζονται δεκάδες, μέχρι και εκατοντάδες χρόνια για να διασπαστούν (Wei and Zimmermann, 2017; Liu *et al.*, 2020). Συνεπώς, η συσσώρευσή τους οδηγεί σε ρύπανση των χερσαίων και υδάτινων περιβαλλόντων με μακρο- και μικρό- πλαστικά (Chae and An, 2018).

Επιπλέον, η παραγωγή των πλαστικών χρησιμοποιεί ως βασικό συστατικό το πετρέλαιο. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ταχεία εξάλειψη μη ανανεώσιμων πηγών ενέργειας και, κατά συνέπεια, αύξηση των τιμών στα ορυκτά καύσιμα. Η διαδικασία αυτή καταλαμβάνει το 12% της παγκόσμιας κατανάλωσης πετρελαίου (McAdam *et al.*, 2020). Η παραγωγή πλαστικού είναι υπεύθυνη για περίπου το 3,7% των εκπομπών του φαινομένου του θερμοκηπίου, συμβάλλοντας, έτσι, στην επιδείνωσή του (Landrigan *et al.*, 2023). Επομένως, το ενεργειακό αποτύπωμα της μαζικής παραγωγής πλαστικών πολυμερών είναι σημαντικά μεγάλο (Zheng and Suh, 2019).

Η παραγωγή και η κατανάλωση πλαστικών παρουσιάζει αύξηση στις ανεπτυγμένες, αλλά και στις αναπτυσσόμενες χώρες. Ο ανθρώπινος πληθυσμός αναμένεται να ξεπεράσει τα 9 δισεκατομμύρια μέχρι το 2050. Η αύξηση αυτή θα έχει σημαντικό αντίκτυπο στη μαζική κατανάλωση πλαστικών συσκευασιών τροφίμων. Το πλαστικό ξεκίνησε να παράγεται μαζικά το 1950. Έως το 2015, η παραγωγή του έχει φτάσει τους 8.300 εκατομμύρια τόνους. Το 60% αυτών έχει καταλήξει στο περιβάλλον, ενώ το 12 % έχει υποστεί αποτέφρωση και το 9% ανακύκλωση (Geyer, Jambeck and Law, 2017). Το 2022, η Ευρώπη κατείχε το 14% της παγκόσμιας παραγωγής πλαστικού (400,3 εκ. τόνοι), φτάνοντας τους 56,7 εκ. τόνους. Παράλληλα, η παραγωγή βιοπλαστικών αποτέλεσε μικρότερο ποσοστό από 1% σε παγκόσμια κλίμακα, φτάνοντας τους 2,3 εκ. τόνους. Η Ευρώπη σε αυτή την κατηγορία κατέχει το 27% της παραγωγής. Τέλος, την ίδια χρονιά, το 21% των 35,5 εκ. τόνων ανακυκλωμένου πλαστικού, παράχθηκε στην Ευρώπη (*Plastics – the fast Facts 2023 • Plastics Europe*, 2023). Η παραγωγή του πλαστικού παρουσιάζει ετήσιο ρυθμό αύξησης 4%, ενώ αναμένεται να αυξηθεί σχεδόν κατά τέσσερις φορές μέχρι το 2050. Έως τότε, η συσσώρευση των πλαστικών απορριμμάτων στο περιβάλλον προβλέπεται να φτάσει τους 12.000 εκατομμύρια τόνους (Lusher, Hollman and Mendoza-Hill, 2017).

Το εύρος χρήσης των πλαστικών προϊόντων είναι πολύ μεγάλο, εφόσον αυτό αξιοποιείται στις κατασκευές, στην κλωστοϋφαντουργία και την παρασκευή καταναλωτικών αγαθών καθημερινής χρήσης. Ωστόσο, το μεγαλύτερο ποσοστό του παραγόμενου πλαστικού αξιοποιείται στη συσκευασία, δημιουργώντας τη μεγαλύτερη πηγή απορριφθέντων πλαστικών σε παγκόσμια κλίμακα, με τη μικρότερη διάρκεια ζωής, αλλά και το μικρότερο ρυθμό ανακύκλωσης (3,3% ανακύκλωση). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση των πλαστικών αποβλήτων σε χερσαία και θαλάσσια οικοσυστήματα (*Global Plastics Outlook, 2023*). Η ετήσια παραγωγή των πλαστικών αποβλήτων φτάνει τους 350 εκ. τόνους, εκ των οποίων το 0,5% καταλήγει στη θάλασσα. Το 80% αυτών των πλαστικών απορριμμάτων προέρχονται από χερσαία περιβάλλοντα. Παρά τις συντονισμένες ενέργειες που πραγματοποιούνται για την ορθή διαχείριση των πλαστικών, σε πολλές χώρες παγκοσμίως, περίπου για το 23% των πλαστικών απορριμμάτων αυτή δε γίνεται σωστά. Η σωστή διαχείριση των πλαστικών απορριμμάτων αφορά την ανακύκλωση, το θάψιμο και την αποτέφρωσή τους. Η ανθεκτικότητα των πλαστικών σε αυτή την περίπτωση λειτουργεί μειονεκτικά, εφόσον συμβάλλει στη συσσώρευση τους, και κατ' επέκταση στην επιβάρυνση του περιβάλλοντος (Lusher, Hollman and Mendoza-Hill, 2017).

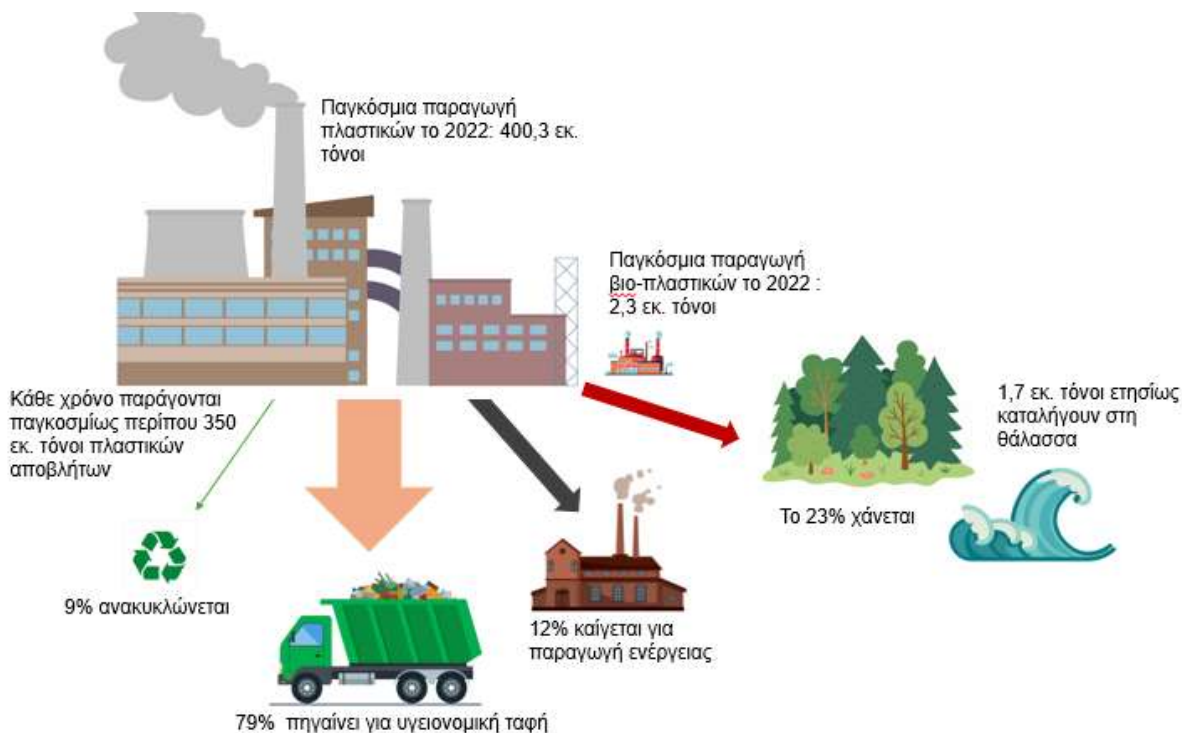
Πλέον, η αντιμετώπιση αυτού του περιβαλλοντικού προβλήματος αποτελεί προτεραιότητα της Ευρωπαϊκής Ένωσης (EU), του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO), του Παγκόσμιου Οικονομικού Φόρουμ (WEF) και των Ηνωμένων Εθνών (UN). Στη βιομηχανία παραγωγής πλαστικών πρωτεύουσα θέση εξακολουθεί να κατέχει το γραμμικό μοντέλο παραγωγής που αξιοποιεί την εξόρυξη πετρελαίου για την παραγωγή προϊόντων, έναντι της κυκλικής, που περιλαμβάνει την ανακύκλωση και την επαναχρησιμοποίηση τους (Bachmann *et al.*, 2023). Από τη χρήση έως την απόρριψή του, η διάρκεια ζωής που έχει ένα πλαστικό προϊόν εξαρτάται από την εφαρμογή του. Συχνά μπορεί να είναι πολύ σύντομη, όπως για παράδειγμα στις συσκευασίες τροφίμων, όπου διαρκεί λίγα μόνο λεπτά. Η κυκλική οικονομία πρέπει να αντικαταστήσει σταδιακά το σημερινό γραμμικό μοντέλο παραγωγής, καθώς είναι απαραίτητη η εφαρμογή βιώσιμων διεργασιών που δεν επιβαρύνουν το περιβάλλον, και δεν επιδρούν αρνητικά στο οικονομικό όφελος της βιομηχανίας πλαστικών. Για την επιτυχή αυτή μετάβαση είναι απαραίτητος ο σχεδιασμός νέων, καινοτόμων διεργασιών και προϊόντων, η αύξηση της παραγωγής, αλλά και η λήψη πολιτικών αποφάσεων υπέρ της κυκλικής οικονομίας. Σε έναν βαθμό, η βίο-οικονομία μπορεί να συμβάλλει στην μερική αντικατάσταση των πλαστικών που παράγονται από ορυκτά καύσιμα, εφόσον αυτή στηρίζεται σε ανανεώσιμες πρώτες ύλες που είναι δυνατόν να επαναχρησιμοποιηθούν και να ανακυκλωθούν (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Μετάβαση από τη γραμμική παραγωγή πολυμερών από το πετρέλαιο στην κυκλική βιο-οικονομία (Προσαρμοσμένη από Bachmann et al., 2023)

Σε παγκόσμια κλίμακα το 2022 παρασκευάστηκαν 2,3 εκ. τόνοι βιοπλαστικών, ενώ η παραγωγή τους αναμένεται να φτάσει στους 7,4 εκ. τόνους μέχρι το 2028. Το 48% των βιοπλαστικών αυτών ήταν βιο-αποικοδομήσιμα (*Plastics – the fast Facts 2023 • Plastics Europe, 2023*). Το 2028 το ποσοστό αυτό προβλέπεται να φτάσει το 62%. Το μεγαλύτερο ποσοστό παραγωγής βιοπλαστικών αποτελεί το πολυγαλακτικό οξύ, ή PLA, (31%), και οι πολύ-υδροξυ αλκανοϊκοί εστέρες, ή PHAs, (4,8%). Έως το 2028 τα ποσοστά παραγωγής τους αναμένονται να φτάσουν το 43,6% και 13,5% αντίστοιχα (*Plastics – the fast Facts 2023 • Plastics Europe, 2023*). Ο ρόλος των βιοπλαστικών είναι πολύ σημαντικός για την επίτευξη των στόχων της βιώσιμης ανάπτυξης εντός του πλαισίου της κυκλικής οικονομίας. Σύμφωνα με τον ορισμό των Ηνωμένων Εθνών, αυτή περιλαμβάνει την αποφυγή των ορυκτών πηγών, την εισαγωγή νέων μεθόδων ανακύκλωσης ή αποδόμησης και την εκτροπή από τοξικούς διαλύτες κατά την διαδικασία παραγωγής. Κατά τη διάρκεια της χρήσης και της απόρριψης των πλαστικών προϊόντων είναι απαραίτητη η εφαρμογή του κανόνα «Μείωση, Επαναχρησιμοποίηση, Ανακύκλωση». Επιπλέον, το τέλος του κύκλου ζωής (End of Life, EOL) χρειάζεται να συμβαδίζει με τους κανόνες που θέτει η κυκλική οικονομία.

Παρά τις προσπάθειες περιορισμού των πλαστικών μιας χρήσης, η ανάγκη λήψης πιο δραστικών μέτρων είναι μεγάλη (Vlaeminck *et al.*, 2022). Η προσπάθεια αντικατάστασης των πλαστικών μίας χρήσης οδήγησε στην αναζήτηση βιώσιμων εναλλακτικών, φιλικών προς το περιβάλλον που παράγονται από ανανεώσιμες πηγές με χαμηλό κόστος (Hagagy *et al.*, 2022). Η αποδοτική παραγωγή μονομερών, όπως είναι το γαλακτικό οξύ, καθώς και το ηλεκτρικό οξύ, πραγματοποιείται μέσω της μικροβιακής βιοτεχνολογίας. Είναι δυνατή η χημική μετατροπή αυτών των μονομερών, προς τον σχηματισμό πολυμερών, όπως το πολυγαλακτικό οξύ (PLA) και το ηλεκτρικό πολυβουτυλένιο (PBS).



Εικόνα 3: Διάγραμμα που απεικονίζει την παγκόσμια παραγωγή των πλαστικών για το 2022 και την κατάληξή τους.

Πολυ-υδροξυ-αλκανοϊκοί εστέρες ή PHAs

Οι πολυ-υδροξυ-αλκανοϊκοί εστέρες, ή αλλιώς PHAs, είναι βιοπολυμερή, και πιο συγκεκριμένα βιοπολυεστέρες (Turco *et al.*, 2020). Παράγονται ενδοκυτταρικά από έναν μεγάλο αριθμό μικροοργανισμών λειτουργώντας ως ενεργειακές αποθήκες (Hisano *et al.*, 2006; García-Hidalgo *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2020). Η σύνθεση και η συσσώρευση των πολυμερών αυτών αποτελεί κυτταρική προσαρμογή σε συνθήκες όπου οι πηγές θρεπτικών συστατικών, όπως είναι τα άλατα, είναι περιορισμένες, και όταν η πηγή άνθρακα βρίσκεται σε περίσσεια (Chen, Pan and Shaw, 2009; Vigneswari *et al.*, 2015; Ray and Kalia, 2017; Turco *et al.*, 2020). Τα PHAs αποτελούν μια οικογένεια που απαρτίζεται από περισσότερα από 150 είδη πολυμερών, τα οποία διαφέρουν ως προς τα άτομα άνθρακα που περιέχουν στην κύρια αλυσίδα τους (Singh

et al., 2015). Η δομή των PHAs καθορίζεται σε επίπεδο μονομερούς από τον αριθμό των ατόμων άνθρακα που απαρτίζουν την κύρια αλυσίδα. Σε επίπεδο πολυμερούς, από την άλλη, καθορίζεται από τη δομή των μονομερών που το απαρτίζουν (Chanprateep, 2010).

Ανάλογα τον αριθμό των ατόμων άνθρακα των μονομερών, οι πολυ-υδροξυ-αλκανοϊκοί εστέρες είναι δυνατό να διαχωριστούν σε τρεις κατηγορίες (Miu, Eremia and Moscovici, 2022). Όταν στο πολυμερές εμπεριέχονται μονομερή με 3-5 άτομα άνθρακα, σχηματίζονται PHAs με αλυσίδες μικρού μήκους, ή scl-PHA(short chain length-PHA). Αντίστοιχα, τα μονομερή με 6-14 άτομα άνθρακα παράγουν τα PHAs με αλυσίδες μεσαίου μήκους, ή mcl-PHAs (medium chain length-PHAs) . Τέλος, αν εμπεριέχονται ταυτόχρονα μικρές και μεσαίες αλυσίδες στο πολυμερές, τότε αυτό ονομάζεται scl-mcl-PHA (Miu, Eremia and Moscovici, 2022).

Αυτό που τα ξεχωρίζει από άλλα βιοπολυμερή είναι οι θερμοπλαστικές τους ιδιότητες (Dawes and Senior, 1973). Τα θερμοπλαστικά είναι γραμμικές αλυσίδες μακρομορίων συνδεδεμένων μέσω δεσμών άνθρακα (Patel *et al.*, 2022). Τα θερμοπλαστικά πολυμερή υφίστανται τήξη σε συγκεκριμένες θερμοκρασίες (Monie *et al.*, 2021). Είναι δυνατή η επαναλαμβανόμενη θέρμανσή τους χωρίς σημαντική μείωση του μοριακού τους βάρους . Το γεγονός αυτό, τα καθιστά οικονομικά και φιλικά προς το περιβάλλον, εφόσον αποτελούν ανακυκλώσιμα προϊόντα (Dawes and Senior, 1973).

Παρόλα αυτά, η σύνθεση των πολυμερών και το μοριακό τους βάρος επηρεάζουν τις θερμικές ιδιότητες τους (Narancic *et al.*, 2020). Ύψιστης σημασίας είναι η θερμική σταθερότητα των πολυμερών, καθώς από αυτή καθορίζεται η δυνατότητα χρήσης τους (Narancic *et al.*, 2020). Τα scl-PHAs είναι ημικρυσταλλικά πολυμερή με υψηλή θερμοκρασία τήξης (Narancic *et al.*, 2020). Τα mcl-PHAs έχουν μικρότερη θερμοκρασία τήξης, εφόσον εμφανίζουν μικρότερη κρυστάλλωση και είναι πιο ελαστικά (Purpi, Pecorini and Federica, 2019).

Τα PHAs είναι βιοσυμβατά, και βιοδιασπώμενα, εφόσον παράγονται και αποθηκεύονται στους μικροοργανισμούς ως πηγές άνθρακα, προοριζόμενες για κατανάλωση υπό αντίξοες συνθήκες (Chanprateep, 2010). Σε φυσικό περιβάλλον πραγματοποιείται διάσπαση με μικροβιακό αποπολυμερισμό, εφόσον ένας μεγάλος αριθμός βακτηρίων κατέχει τη δυνατότητα παραγωγής PHB αποπολυμερασών (Chanprateep, 2010).

PHB ή πολύ(R)- 3-υδροξυ βουτυρικό οξύ

Από την οικογένεια αυτή των πολύ-υδροξυ-αλκανοϊκών εστέρων, αντικείμενο ενός μεγάλου αριθμού μελετών έχει υπάρξει ο πολύ(R)- 3-υδροξυ-βουτυρικός εστέρας, εναλλακτικά

ονομαζόμενος και PHB (Khanna and Srivastava, 2005). Το PHB είναι ένα θερμοπλαστικό πολυμερές που παράγεται από ένα μεγάλο αριθμό μικροοργανισμών χρησιμοποιώντας ανανεώσιμες πηγές ενέργειας (Dobrogojski *et al.*, 2018; McAdam *et al.*, 2020). Αποτελεί μια βασική εναλλακτική εφόσον είναι βιοσυμβατό, βιοδιασπώμενο και μη τοξικό (McAdam *et al.*, 2020).

Μπορεί να έχει εφαρμογή σε αρκετούς εμπορικούς τομείς, όπως συσκευασίες τροφίμων, έναντι των πλαστικών πολυμερών με παρόμοιες ιδιότητες, όπως το πολυαιθυλένιο και το προπυλένιο. Η αποικοδόμηση του PHB είναι ταχύτερη σε σχέση με διαφορετικά βιοπολυμερή όπως το πολυγαλακτικό οξύ (PLA) και το πολυβουτυλένιο (PBS) και μπορεί να πραγματοποιηθεί υπό αναερόβιες συνθήκες (Zhang *et al.*, 2004). Το PHB μπορεί να αποτελέσει σύστημα μεταφοράς για τη χορήγηση φαρμάκων (carrier material) και υλικό επικάλυψης για την προστασία γεωργικών συστημάτων (Boey *et al.*, 2021). Επιπλέον, η βιοσυμβατότητα που παρουσιάζει το καθιστά κατάλληλο για φαρμακευτικά και ιατρικά προϊόντα (Wu and Liao, 2014).

Το PHB απαρτίζεται από υδρόφοβες μεθυλομάδες και υδρόφιλους καρβονυλικούς εστέρες (31). Κατά συνέπεια, οι μεθυλομάδες μπορούν να σχηματίσουν υδρόφοβους δεσμούς και οι καρβονυλεστέρες να αποτελέσουν δέκτες ηλεκτρονίων (31). Επιπλέον, σε αντίθεση με άλλους πολυεστέρες, όπως είναι τα πολυαμίδια και τα πολυπεπίδια, κατέχουν ευλυγισία, καθώς λείπει ο σταθεροποιητικός παράγοντας των εσωτερικών δεσμών υδρογόνου και η δυσκαμψία που προσδίδει ο πεπτιδικός δεσμός αντίστοιχα (Reusch, 2013).

Η κατανομή του μοριακού βάρους του PHB (molecular weight distribution MWD) επηρεάζει άμεσα τις ιδιότητες του PHB. Για την εμφάνιση των μηχανικών ιδιοτήτων του το μέσο μοριακό βάρος πρέπει υπερβαίνει τα 4×10^5 Da, ενώ την εμφάνιση θερμοπλαστικού χαρακτήρα πρέπει να είναι μεγαλύτερο από 4×10^6 Da (McAdam *et al.*, 2020). Ο πολυ-υδροξυβουτυρικός εστέρας εμφανίζει υψηλή κρυσταλλικότητα (έως και 70%) λόγω της μεγάλης ισοτακτικότητας των μονομερών που τον απαρτίζουν (Turco *et al.*, 2020). Συνεπώς είναι ψαθυρός και δύσκαμπτος. Γενικά τα πολυμερή που ανήκουν στα scl-PHAs είναι περισσότερο σκληρά και ψαθυρά, ενώ τα αντίστοιχα της mcl-PHAs είναι πιο ελαστικά και έχουν μικρή κρυσταλλικότητα (McAdam *et al.*, 2020).

Παρόλο που το πολυμερές εμφανίζει υψηλή τάση κρυστάλλωσης, η πυκνότητα των κρυσταλλων που σχηματίζει είναι χαμηλή. Συνεπώς δημιουργούνται μεγάλοι σφαιρικοί κρύσταλλοι (σφαιρουλίτες) που έχουν επίπτωση στις μηχανικές και τις θερμικές ιδιότητες του PHB. Σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, λόγω της χαμηλής θερμοκρασίας υαλώδους μετάπτωσης ($T_g \sim 5-9$ °C), συμβαίνει δευτερογενής κρυστάλλωση (McAdam *et al.*, 2020).

Το PHB κατά την μείωση της θερμοκρασίας κάτω από το φυσιολογικό εύρος καθίσταται πιο δύσκαμπτο (Turco *et al.*, 2020). Το πολυμερές αυτό εμφανίζει μικρό περιθώριο επεξεργασίας, λόγω της πολύ εύκολης θερμικής διάσπασής του (Turco *et al.*, 2020). Η εκτεταμένη διαμοριακή αλληλεπίδραση των μονομερών έχει ως αποτέλεσμα η θερμοκρασία τήξης και η θερμοκρασία αποσύνθεσης να βρίσκονται πολύ κοντά. Η θερμική διάσπαση του PHB σε αυτές τις θερμοκρασίες συμβαίνει πολύ γρήγορα, προκαλώντας σημαντική μείωση του μοριακού βάρους του πολυμερούς.

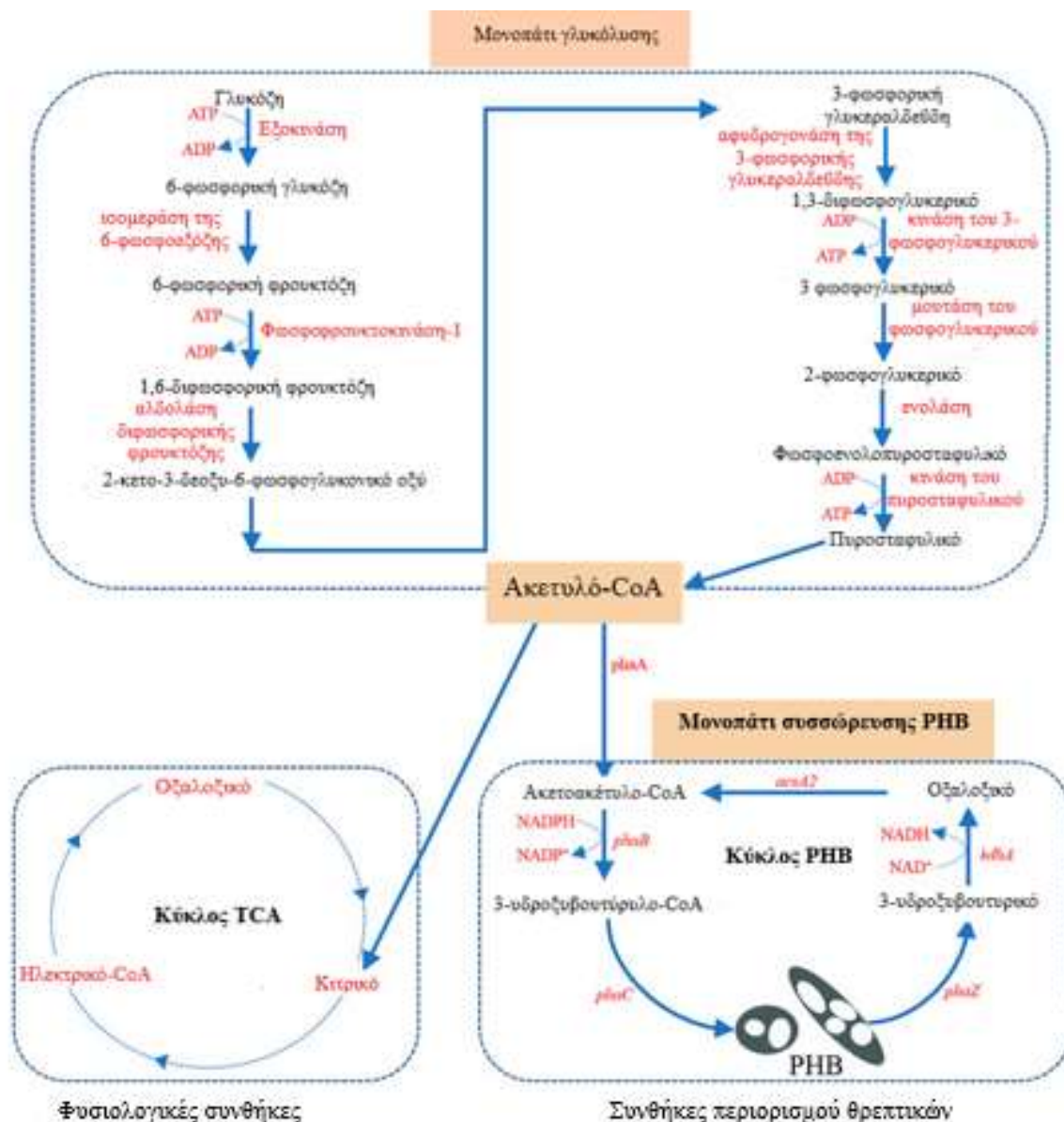
Τα προϊόντα που απαρτίζονται από PHB είναι κατά κανόνα δύσκαμπτα και εύθραυστα (Turco *et al.*, 2020). Εμφανίζουν μικρή θερμική σταθερότητα και μεγάλο βαθμό κρυσταλλικότητας. Η κρυσταλλικότητα ορίζεται ως ο βαθμός της δομικής τάξης των μορίων που απαρτίζουν τα πολυμερή (7). Μεγαλύτερος βαθμός κρυσταλλικότητας συνεπάγεται μεγαλύτερη δυσκαμψία (McAdam *et al.*, 2020). Μπορεί να βρεθεί μόνο ή με προσμίξεις άλλων πολυμερών (Ray and Kalia, 2017). Το συν πολυμερές PHBV (πολύ-(3)-υδροξυ-βουτυρικός-βαλερικός εστέρας) εμφανίζει μικρότερη θερμοκρασία τήξης, διευκολύνοντας έτσι την επεξεργασία του πολυμερούς (Jacquin *et al.*, 2019).

Βιοχημικό μονοπάτι παραγωγής PHB

Η παραγωγή του PHB συμβαίνει σε συνθήκες έλλειψης κάποιου θρεπτικού συστατικού, δεδομένου ότι η πηγή άνθρακα βρίσκεται σε περίσσεια. Σε ασυνεχείς καλλιέργειες, παράγεται συνήθως μετά τη διακοπή της ανάπτυξης της βιομάζας λόγω έλλειψης αζώτου, φωσφόρου ή θείου (Narancic *et al.*, 2020). Συνεπώς η φάση παραγωγής του PHB ακολουθεί τη φάση ανάπτυξης των μικροοργανισμών.

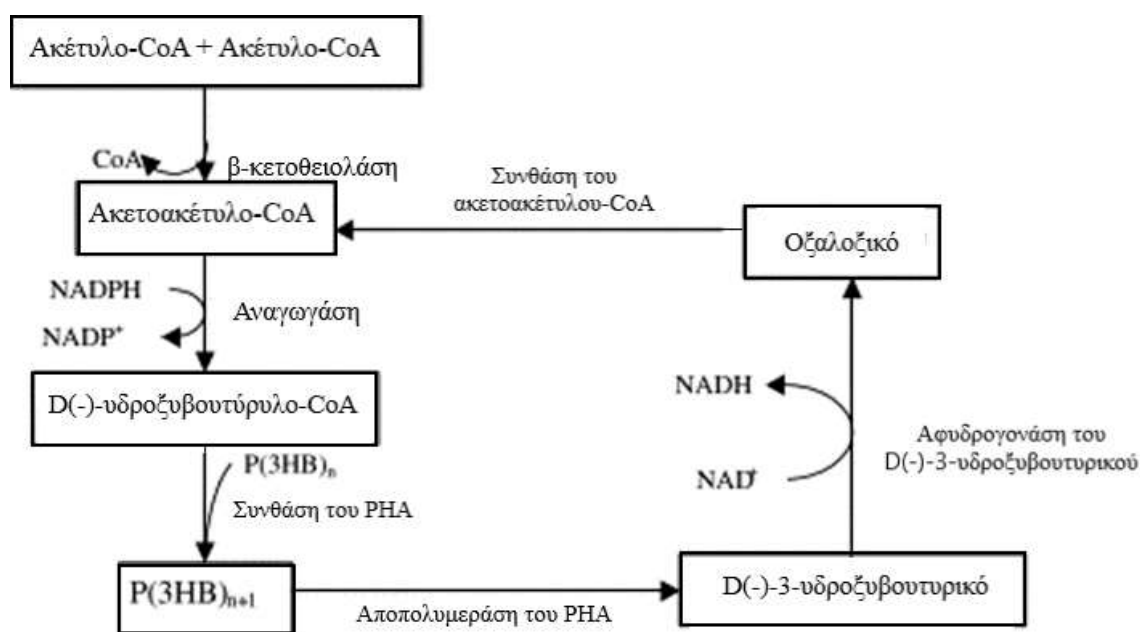
Η μικροβιακή παραγωγή PHAs αξιοποιεί διαφορετικά μεταβολικά μονοπάτια. Η βιοσύνθεση των PHAs εξαρτάται άμεσα από την πηγή άνθρακα που είναι διαθέσιμη στο περιβάλλον των μικροοργανισμών, αλλά και τους ίδιους τους μικροοργανισμούς (Surendran *et al.*, 2020). Το είδος του πολυμερούς που παράγεται είναι διαφορετικό για κάθε βιοχημικό μονοπάτι. Μέσω του πιο συνηθισμένου μονοπατιού, παράγεται 3-υδροξυβουτυρικός εστέρας ως μονομερές από το αντιδρών ακετυλο-CoA (Ray and Kalia, 2017). Στη βακτηριακή παραγωγή PHB παρόλο που έχουν χρησιμοποιηθεί πολλά υποστρώματα, η γλυκόζη αποτελεί την κύρια πηγή άνθρακα (Zhang *et al.*, 2022). Μέσω του γλυκολυτικού μονοπατιού, δηλαδή της μετατροπής της γλυκόζης σε πυροσταφυλικό οξύ (Chandel, 2021), παράγεται ακετυλο-CoA ως το πρόδρομο μόριο για την παραγωγή του πολυμερούς (Shi and Tu, 2015).

Υπό ισορροπημένες συνθήκες, ευνοείται ο κύκλος του τρικαρβοξυλικού οξέος (Ray and Kalia, 2017). Ο κύκλος του τρικαρβοξυλικού οξέος, είναι μια σειρά αντιδράσεων απελευθέρωσης ενέργειας σε μορφή ATP, που λαμβάνει χώρα μέσω της οξείδωσης του ακέτυλο-CoA (Shi and Tu, 2015). Αποτελεί το τελευταίο στάδιο μεταβολισμού υδατανθράκων, λιπαρών οξέων και πρωτεϊνών (Shi and Tu, 2015). Ο κύκλος αυτών των αντιδράσεων συμβάλλει σημαντικά στην αερόβια αναπνοή. Στα βακτήρια, λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα. Η ενέργεια οξείδωσης χρησιμοποιείται για την παραγωγή μορίων υψηλής ενέργειας, όπως είναι το ATP, το NADH και το FADH₂ (Shi and Tu, 2015). Τα δύο τελευταία μόρια λειτουργούν ως μεταφορείς ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας και συμβάλλουν στην πραγματοποίηση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (Shi and Tu, 2015). Τα μονοπάτια αυτά φαίνονται πιο αναλυτικά στην Εικόνα 2.



Εικόνα 4: Το γλυκολυτικό μονοπάτι οδηγεί στην παραγωγή ακετύλο-CoA. Ανάλογα τις συνθήκες που αφορούν τη διαθεσιμότητα των θρεπτικών ακολουθεί το μονοπάτι συσσώρευσης του PHB ή ο κύκλος του τρικαρβοξυλικού οξέος (Προσαρμοσμένη από Zhang et al., 2022).

Υπό συνθήκες έλλειψης θρεπτικών ευνοείται η σύνθεση του PHB, η οποία προκύπτει από το ακετυλο-CoA μέσω τριών ενζυμικών αντιδράσεων. Αρχικά, λαμβάνει χώρα η αντιστρεπτή σύνδεση δύο ακετύλο-coA που συνεπάγεται την παραγωγή ενός ακετυλοακετύλο-coA, με τη βοήθεια της β-κετοθειολάσης (Zhang *et al.*, 2022). Ακολουθεί η αναγωγή του ακετυλοακετύλου-coA σε υδροξύ-βουτυρυλο-coA με κατανάλωση ενός μορίου NADPH, από την αναγωγή του ακετυλοακετύλου-coA (Peoples and Sinskey, 1989). Τέλος, η συνθάση του PHB πραγματοποιεί τον πολυμερισμό του 3 υδροξύ-βουτυρυλο-coA. Άρα, προκύπτει ο πολύ-υδροξυβουτυρικός εστέρας, όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 3. Τα τρία ένζυμα που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση κωδικοποιούνται από τα γονίδια phaA, phaB, phaC αντίστοιχα (40). Τα γονίδια αυτά οργανώνονται σε ένα οπερόνιο, με σειρά phaC phaB και phaA (Eggers and Steinbüchel, 2013).



Εικόνα 5: Το μονοπάτι συσσώρευσης του PHB σηματοδοτείται από την παρουσία ακετύλοCoA και ακολουθούν τα τρία βήματα παραγωγής του και τα τρία αποδόμησης (Προσαρμοσμένη από Khanna and Srivastava, 2005).

Κατά την έναρξη του κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος, πραγματοποιείται η απελευθέρωση του CoA, που λειτουργεί ως αναστολέας της έκφρασης του phaA σε μεγάλες συγκεντρώσεις (Ray and Kalia, 2017). Περιορίζοντας μέταλλα του θρεπτικού, όπως το άζωτο

και το φώσφορο ενισχύεται η συγκέντρωση του PHB, καθώς η έλλειψη αυτών οδηγεί στην αναγέννηση NADPH, ευνοώντας έτσι το μονοπάτι του PHB (Ray and Kalia, 2017). Το NADPH είναι απαραίτητο για το ένζυμο που κωδικοποιείται από το γονίδιο *phaB*, που συμβάλλει στον σχηματισμό του 3HB-CoA (Ray and Kalia, 2017). Υπό μη ισορροπημένες συνθήκες, αναστέλλεται η παραγωγή του CoA και ευνοείται έτσι το μεταβολικό μονοπάτι της παραγωγής PHB (Zhang *et al.*, 2022). Συνεπώς, η πιο συχνή μέθοδος παραγωγής PHB σε βακτηριακά στελέχη είναι ο περιορισμός του αζώτου με περίσσεια πηγής άνθρακα (Zhang *et al.*, 2022).

Τα κυτταροπλασματικά PHB αποθηκεύονται σε υποκυτταρικά διαμερίσματα που ονομάζονται καρβονοσώματα (Reusch, 2013). Αυτά απαρτίζονται από άμορφα PHB που επικαλύπτονται από μονοστοιβάδα φωσφολιπιδίων και διάφορες πρώτεϊνες εμπλεκόμενες στην παραγωγή των πολυμερών, την σταθεροποίησή τους, ή τον μεταβολισμό τους (Chen, Pan and Shaw, 2009; Reusch, 2013). Τα καρβονοσώματα ονομάζονται εναλλακτικά και native PHB (nPHB) σφαιρίδια (García-Hidalgo *et al.*, 2013). Όταν μετά την κυτταρική λύση έρθουν σε επαφή με το εξωκυτταρικό περιβάλλον, η εξωτερική στοιβάδα καταστρέφεται ή χάνεται, οπότε δημιουργείται το εξωκυτταρικό ή μετουσιωμένο (denatured) PHB (dPHB) (Gebauer and Jendrossek, 2006).

Αποπολυμεράσεις PHB

Είναι δυνατή η ενδοκυτταρική αποδόμηση του PHB εάν αυτό δεν ανακτηθεί εγκαίρως. Τη διαδικασία αυτή πραγματοποιούν ένζυμα που ονομάζονται αποπολυμεράσες του PHB. Οι αποπολυμεράσες PHB συμβάλλουν στη διάσπαση των δεσμών ανάμεσα στο 3-υδροξυβουτυρικό οξύ που δομεί το πολυμερές. Η NADH-εξαρτώμενη αφυδρογονάση, συμβάλλει στην οξείδωση του 3 υδροξυβουτυρικού εστέρα, προς το σχηματισμό ακετοξικού εστέρα (Delafield *et al.*, 1965). Τέλος, η συνθετάση του ακετύλο-CoA, επιτρέπει την αναγέννηση του ακετοακετύλο-CoA, το οποίο με τη σειρά του μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη βιοσύνθεση του PHB (Cai, Driscoll and Charles, 2000).

Υπάρχουν δύο είδη αποπολυμερασών PHB, οι ενδοκυτταρικές και οι εξωκυτταρικές (Thomas *et al.*, 2022). Οι εξωκυτταρικές αποπολυμεράσες εκκρίνονται στο περιβάλλον με σκοπό την υδρόλυση του PHB, και κατ' επέκταση την αξιοποίησή του ως πηγή άνθρακα και ενέργειας για την ανάπτυξη των βακτηρίων (Handrick *et al.*, 2004). Το PHB που βρίσκεται ελεύθερο στο περιβάλλον έχει προέλθει από τη λύση των βακτηρίων που το παράγουν και το αποθηκεύουν (Chen, Pan and Shaw, 2009). Οι ενδοκυτταρικές αποπολυμεράσες, από την άλλη, διασπούν το PHB, το οποίο βρίσκεται σε μορφή καρβονοσωμάτων, μέσα στα βακτήρια, σε μη

ιδανικές συνθήκες βακτηριακής επιβίωσης, με σκοπό την κατανάλωσή του (Vigneswari *et al.*, 2015).

Σε μοριακό επίπεδο, το εξωκυτταρικό ένζυμο απαρτίζεται από μια αμινοτελική καταλυτική περιοχή (catalytic domain), μια καρβοξυτελική περιοχή σύνδεσης του υποστρώματος (substrate-binding domain) και μια περιοχή σύνδεσης του αμινοτελικού και του καρβοξυτελικού άκρου (linker domain) (Hisano *et al.*, 2006). Επιπλέον, υπάρχει και ένα πεπτίδιο σηματοδότης (signal peptide) (Hisano *et al.*, 2006; García-Hidalgo *et al.*, 2013). Η καταλυτική περιοχή εμπεριέχει τρεις καταλυτικές περιοχές α/β υδρολασών, σερίνης ιστιδίνης και ασπαραγινικού οξέος, και μια συντηρημένη αλληλουχία λιπάσης (lipase box) (García-Hidalgo *et al.*, 2013). Υπάρχουν διάφορα είδη περιοχής σύνδεσης των άκρων (linker domains), όπως η φιμπρονεκτίνη τύπου III (Fn3), η τύπου καδερίνη (cadherin like) (Cad) και η πλούσια σε θρεονίνη (threonine rich) (Thr) (Hachisuka *et al.*, 2023). Οι αποπολυμεράσες των θαλάσσιων βακτηρίων περιέχουν μια Fn3 ή Cad, ενώ τα χερσαία μια Fn3 ή Thr (Hachisuka *et al.*, 2023). Τα θαλάσσια βακτήρια, επιπρόσθετα κατέχουν μια περιοχή σύνδεσης υποστρώματος που αποτελείται από δύο περιοχές, ενώ η ίδια περιοχή στα χερσαία βακτήρια απαρτίζεται από μία περιοχή (Suzuki, Tachibana and Kasuya, 2020). Από την άλλη, οι ενδοκυτταρικές PHB αποπολυμεράσες εμφανίζουν παρόμοια δομή, χωρίς όμως να κατέχουν περιοχή σύνδεσης (linker domain) και περιοχή σύνδεσης του υποστρώματος, καθώς αυτή εξαρτάται από το αμινοτελικό άκρο του ενζύμου (Knoll *et al.*, 2009).

Η ενζυμική διάσπαση του PHB είναι μια αντίδραση που απαιτεί δύο βήματα για την πραγματοποίησή της. Αρχικά, λαμβάνει χώρα η σύνδεση του υδρόφοβου καρβοξυ-τελικού άκρου του ενζύμου με το μη υδατοδιαλυτό PHB και, στη συνέχεια, η υδρόλυση του πολυμερούς από το ενεργό κέντρο του ενζύμου (Thomas *et al.*, 2022). Αυτές υδrolύουν τους εστερικούς δεσμούς των πολυμερών σε υδατοδιαλυτά μονομερή και ολιγομερή (Abe and Doi, 1999). Οι μικροοργανισμοί, τέλος μεταβολίζουν περαιτέρω τα προϊόντα αυτά, αερόβια, παράγοντας διοξείδιο του άνθρακα, νερό και μεθάνιο, ή αερόβια, παράγοντας διοξείδιο του άνθρακα και νερό (Vlaeminck *et al.*, 2022) .

Η διαφοροποίηση των PHB αποπολυμερασών πραγματοποιείται σύμφωνα με την ικανότητα τους να υδrolύουν dPHB ή nPHB. Αξίζει να σημειωθεί, πως παρόλο που κάποιες εξωκυτταρικές πολυμεράσες έχουν τη δυνατότητα να υδrolύσουν nPHB, οι ενδοκυτταρικές αποπολυμεράσες συνήθως δεν υδrolύουν μετουσιωμένο PHB (Gebauer and Jendrosseck, 2006). Εξαιρέσεις σε αυτό τον κανόνα αποτελούν οι PHB αποπολυμεράσες μικροοργανισμών όπως ο *Priestia megaterium* και ο *Alcaligenes faecalis*, όπου εμφανίζονται λειτουργίες εξωκυτταρικών και ενδοκυτταρικών ενζύμων (Nojiri and Saito, 1997; García-Hidalgo *et al.*, 2013).

Η αποτελεσματικότητα διάσπασης των βιοδιασπώμενων πολυμερών, και κατ' επέκταση του PHB στο εκάστοτε περιβάλλον εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα των μικροοργανισμών που κατέχουν την ικανότητα έκκρισης εξωκυτταρικών αποπολυμερασών (Vigneswari *et al.*, 2015). Η ικανότητα της καταλυτικής δράσης των εξωκυτταρικών PHB αποπολυμερασών εξαρτάται από παράγοντες όπως είναι οι φυσικές ιδιότητες των πολυμερών, οι περιβαλλοντικές συνθήκες στις οποίες συμβαίνει η διάσπαση (θερμοκρασία, pH), ο μικροβιακός πληθυσμός του εκάστοτε περιβάλλοντος (Vigneswari *et al.*, 2015), καθώς και από τη διαθεσιμότητα των πηγών άνθρακα και αζώτου, ιχνοστοιχείων και μετάλλων (Bano *et al.*, 2018).

Η αποτελεσματικότητα της διάσπασης εξαρτάται από τη σύσταση του πολυμερούς. Οι ιδιότητες της αποπολυμεράσης PHB στον *Alcaligenes faecalis* έχουν μελετηθεί εκτενώς (Kita *et al.*, 1995). Η ενζυμική υδρόλυση του πολυμερούς έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή διμερών ως κύριο προϊόν και μικρή ποσότητα μονομερούς, 3-υδροξυβουτυρικού οξέος (Delafield *et al.*, 1965). Συν-πολυμερή που περιέχουν 4HB μονομερή διασπώνται ταχύτερα από το PHB ή το PHBV [P(3HB-co-3HV)] (Wu, Wang and Chen, 2009; Kovalcik *et al.*, 2020). Ο βαθμός κρυστάλλωσης του PHB επηρεάζει αρνητικά το ρυθμό διάσπασης του πολυμερούς. Συνεπώς, όσο το μέγεθος του κρυστάλλου PHB μεγαλώνει, τόσο πιο αργά πραγματοποιείται η αποσύνθεσή του (Altaee *et al.*, 2016).

Η εξέταση της ενζυμικής δραστηριότητας των εξωκυτταρικών PHB αποπολυμερασών σε διαφορετικά μέσα καλλιέργειας, έχει αποτελέσει αντικείμενο αρκετών μελετών (Vigneswari *et al.*, 2015; Wani *et al.*, 2016). Η πηγή αζώτου αποτελεί ένα σημαντικό κυτταρικό συστατικό και αξιοποιείται σε πολλά βιοσυνθετικά μονοπάτια (Bano *et al.*, 2018; Engelhart-Straub *et al.*, 2023). Η διάσπαση του PHB έχει μελετηθεί με χρήση διαφορετικών πηγών αζώτου, όπως για παράδειγμα η πεπτόνη, ή το εκχύλισμα ζύμης, στο μέσο καλλιέργειας μικροοργανισμών που εκκρίνουν τα εξωκυτταρικά ένζυμα, καθώς αυτά μεταβάλλουν την ενζυμική απόδοση (Kita *et al.*, 1995; Vigneswari *et al.*, 2015; Sayyed *et al.*, 2019).

Επιπρόσθετα, έχει μελετηθεί και η ενζυμική δραστηριότητα των αποπολυμερασών με διαφορετικές πηγές άνθρακα. Σημαντικά αποτελέσματα έχουν σημειωθεί με προσθήκη πηγών άνθρακα το άμυλο και τη γλυκόζη (Bano *et al.*, 2018). Η χρήση του PHB σε καλλιέργειες παραγωγής των αποπολυμερασών είναι αρκετά διαδεδομένη και αποτελεσματική. Επιπλέον, σε καλλιέργειες όπου γίνεται χρήση του PHB ως μοναδική πηγή άνθρακα, η ενζυμική δραστηριότητα φαίνεται να εξαρτάται άμεσα από τη συγκέντρωση του πολυμερούς (Vigneswari *et al.*, 2015; Wani *et al.*, 2016; Sayyed *et al.*, 2019). Τέλος, το ηλεκτρικό οξύ ως πηγή άνθρακα αξιοποιείται στην καλλιέργεια και απομόνωση των εξωκυτταρικών ενζύμων του βακτηρίου *P. lemoignei*. Σε αυτή την περίπτωση, σημειώνεται η μέγιστη ενζυμική παραγωγή, η οποία όμως

είναι άμεσα εξαρτώμενη από το pH της καλλιέργειας (>7) (Terpe *et al.*, 1999). Επιπλέον, έχουν διεξαχθεί μελέτες που αναλύουν τη δραστικότητα των αποπολυμερασών υπό διαφορετικές θερμοκρασίες, αλλά και διαφορετικό pH (Shivakumar *et al.*, 2011).

Για να θεωρηθεί το PHB και άλλα παρεμφερή βιοπλαστικά μια καλή εναλλακτική επιλογή έναντι των πετρελαιο-πλαστικών, είναι αναγκαία η βελτιστοποίηση της διαδικασίας διάσπασης του (Amir *et al.*, 2023). Αυτό είναι απαραίτητο, καθώς αυτό αποσυντίθεται με σχετικά αργό ρυθμό. Η βελτιστοποίηση της διαδικασίας διάσπασης, λοιπόν, συμβάλλει σημαντικά στην ελαχιστοποίηση της περιβαλλοντικής επιβάρυνσης από το συγκεκριμένο βιοπλαστικό.

Σκοπός της διπλωματικής αυτής εργασίας, είναι η παραγωγή και η βελτιστοποίηση της παραγωγής των αποπολυμερασών PHB, συγκρίνοντας την ενζυμική δραστικότητα τους σε διαφορετικές συνθήκες ασυνεχών ζυμώσεων αλλά και συνθηκών υδρόλυσης. Οι παράμετροι που εξετάστηκαν αφορούσαν τα διαφορετικά βακτηριακά στελέχη, το μέσο καλλιέργειας, καθώς και την πηγή άνθρακα στη διαδικασία της ζύμωσης. Μέσω της διαδικασίας υδρόλυσης εξετάστηκε εκτενώς η αποτελεσματικότητα διάσπασης τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων PHB από εξωκυτταρικά ένζυμα δυο βακτηριακών στελεχών. Επιπρόσθετα εξετάστηκε η ικανότητα υδρόλυσης του PHB με τη χρήση δύο διαφορετικών ρυθμιστικών διαλυμάτων, TrisHCl-CaCl₂ και Na₂HPO₄-NaH₂PO₄*2H₂O σε διαφορετικά pH 6,7,8 και 9 αντίστοιχα.

Υλικά και μέθοδοι

Ανάπτυξη και συντήρηση μικροοργανισμών

Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι *Priestia megaterium* NRRL-3254, , NRRL-3702, NRRL-3703 και *Alcaligenes faecalis* NRRL -1695.

Η αποθήκευση των μικροοργανισμών έγινε στους -80 °C, σε cryovial που περιείχαν 1mL ανεπτυγμένης καλλιέργειας του μικροοργανισμού και 1mL γλυκερόλης.

Η ανανέωσή τους πραγματοποιήθηκε μέσω της ανάπτυξης 500μL της συντηρημένης στο cryovial καλλιέργειας σε 50mL θρεπτικού μέσου «medium 1», στο οποίο εμπεριέχεται πεπτόνη (peptone) 5g/L και εκχύλισμα κρέατος 3g/L διαλυμένα σε απιονισμένο νερό (ddH₂O).

Μετά τον εμβολιασμό των 500 μL της αποθηκευμένης καλλιέργειας, ακολούθησε επώαση σε θάλαμο επώασης με ανάδευση για 16 - 20 ώρες στους 30 °C και στις 220rpm. Μετά το παραπάνω χρονικό όριο, οι καλλιέργειες παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο για τυχόν

επιμολύνσεις. Οι καλλιέργειες που δεν εμφάνισαν κάποια μόλυνση αποθηκεύτηκαν ανά 1 mL σε cryovials με τον ίδιο τρόπο που περιεγράφηκε προηγουμένως.

Θρεπτικά που χρησιμοποιήθηκαν

Παρασκευάστηκαν θρεπτικά που είχαν ως μέσα καλλιέργειας growth/secretion medium (MS) (Stinson and Merrick, 1974). Επιπλέον, παρασκευάστηκε MS στο οποίο προστέθηκε εκχύλισμα ζύμης σε συγκέντρωση 1g/L και ονομάστηκε MSY. Τέλος, παρασκευάστηκε ένα ακόμη μέσο καλλιέργειας, το DSM457, όπως προτείνεται από την εταιρία DSMZ για την ανάπτυξη μικροοργανισμών που παράγουν αποπολυμεράσεις PHB. Τα συστατικά των μέσων καλλιέργειας παρατίθενται στους Πίνακες 1 και 2. Σε αυτές τις καλλιέργειες, ως πηγή άνθρακα αξιοποιήθηκε το ηλεκτρικό οξύ, το PHB και η γλυκόζη. Κάθε πηγή άνθρακα προστέθηκε σε συγκέντρωση 2g/L.

Πίνακας 1: Μέσο καλλιέργειας MS.

Προκαλλιέργεια (growth MS) pH 6,8	
KH ₂ PO ₄ -NaHPO ₄ (PH= 6,8)	4,5-4,68 g/L
NH ₄ Cl	0,96 g/L
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,49 g/L
FeCl ₃ 6H ₂ O	0,01 g/L
CaCl ₂	0,005 g/L
Κύρια καλλιέργεια (secretion MS) pH 7,4	
KH ₂ PO ₄ (PH=7,4)	4,5-4,68 g/L
NH ₄ Cl	0,96 g/L
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,25 g/L

Πίνακας 2: Μέσο καλλιέργειας DSM457

DSM457 MINERAL MEDIUM	
Na ₂ HPO ₄	2.44 g
KH ₂ PO ₄	1.52 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.50 g
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0.20 g
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	0.05 g
Trace element solution SL-4	10.00 mL
Distilled water	1000.00 mL
Trace element solution SL-4	
EDTA	0.50 g/L
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0.20 g/L
Trace element solution SL-6	100.00 mL
Distilled water	900.00 mL
Trace element solution SL-6	
ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	0.10 g/L
MnCl ₂ * 4 H ₂ O	0.03 g/L
H ₃ BO ₃	0.30 g/L
CoCl ₂ * 6 H ₂ O	0.20 g/L

CuCl ₂ * 2 H ₂ O	0.01 g/L
NiCl ₂ * 6 H ₂ O	0.02 g/L
Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O	0.03 g/L
Distilled water	1000 mL

Στο μέσο καλλιέργειας του Πίνακα 2 χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρικό οξύ ως πηγή άνθρακα. Το διάλυμα του ηλεκτρικού οξέος και το μέσο DSM457 παρασκευάστηκαν και αποστειρώθηκαν ξεχωριστά, για την αποφυγή αντιδράσεων Maillard. Αφού απέκτησαν θερμοκρασία δωματίου, τότε αναμείχθηκαν σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής. Μετά την ανάμειξη τους, ακολούθησε ρύθμιση του pH με πρόσθεση διαλυμάτων NaOH ή HCl στις τιμές 6,8 και 7,4 αντίστοιχα.

Πειράματα ασυνεχών ζυμώσεων

Για κάθε καλλιέργεια παρασκευάστηκαν 50mL θρεπτικού σε κωνικές φιάλες των 250mL. Αφού αποστειρώθηκαν και απέκτησαν θερμοκρασία δωματίου, πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός των καλλιέργειών που είχαν pH 6,8 με τους μικροοργανισμούς που είχαν αποθηκευτεί στα cryovials. Ο εμβολιασμός έγινε σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής για την εξασφάλιση αποστειρωμένων συνθηκών. Τέλος, οι κωνικές φιάλες τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης με ανάδευση, στους 30 °C βαθμούς κελσίου, υπό ανάδευση στις 220 rpm. Η επώασή τους διήρκεσε 16 με 20 ώρες. Ύστερα, ακολούθησε η μεταφορά των μικροοργανισμών στις κωνικές φιάλες με την κύρια καλλιέργεια. Η μεταφορά πραγματοποιήθηκε επίσης σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής. Συγκεντρώθηκαν 40mL κάθε προκαλλιέργειας σε falcon των 50 mL, τα οποία στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στους 4 βαθμούς κελσίου. Στο ίζημα της φυγοκέντρωσης, που περιέχονταν η βιομάζα προστέθηκαν 10 mL ρυθμιστικού διαλύματος KH₂PO₄-NaHPO₄ με PH 7,4. Ακολούθησε ανάδευση με vortex και ξανά φυγοκέντρωση στις ίδιες συνθήκες. Ο σκοπός της διαδικασίας αυτής ήταν η απομάκρυνση υπολειμμάτων του θρεπτικού μέσου της προκαλλιέργειας από τη βιομάζα. Στο ίζημα που προέκυψε από τη δεύτερη φυγοκέντρωση έγινε πρόσθεση του θρεπτικού μέσου της κύριας καλλιέργειας και ανάδευση με vortex με σκοπό την ομογενοποίηση του διαλύματος. Τέλος, το ομογενές διάλυμα της κύριας πλέον καλλιέργειας μεταφέρθηκε σε κωνική φιάλη χωρητικότητας 250mL, έτσι ώστε να τοποθετηθεί ξανά στον επωαστήρα, αφού πρώτα πραγματοποιήθηκε λήψη δειγμάτων σε Eppendorf αμέσως μετά τη μεταφορά. Οι συνθήκες επώασης παρέμειναν οι ίδιες. Κατά την επώαση της κύριας καλλιέργειας, ακολούθησε ανά χρονικά διαστήματα η λήψη δειγμάτων υπό αποστειρωμένες συνθήκες.

Πειράματα υδρόλυσης

Στο πέρας των ασυνεχών ζυμώσεων στις 24 ώρες, η καλλιέργειες μεταφέρθηκαν σε falcon των 50mL και φυγοκεντρήθηκαν στους 4 °C για 10 λεπτά. Τα υπερκείμενα κάθε καλλιέργειας μεταφέρθηκαν σε διαφορετικά falcon των 50 mL και ύστερα χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας των εξωκυτταρικών αποπολυμερασών μέσω της διάσπασης PHB σε συγκεντρώσεις 10g/L, 5g/L και 3g/L. Επιπλέον, διερευνήθηκε η ικανότητα διάσπασης του PHB με διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα, Tris-HCl CaCl₂ και Na₂HPO₄-NaH₂PO₄*2H₂O, με pH 6, 7, 8 και 9 αντίστοιχα.

Παρασκευή ρυθμιστικών διαλυμάτων (buffers)

Tris-HCl CaCl₂

Οι συγκεντρώσεις Tris και CaCl₂ ήταν ίδιες για όλα τα διαλύματα που παρασκευάστηκαν, καθώς αξιοποιήθηκε Tris Ultrapure συγκέντρωσης 12,1g/L και 0,38g/L CaCl₂. Προστέθηκε HCl μέχρι το κάθε διάλυμα να αποκτήσει το επιθυμητό pH, δηλαδή 6, 7, 8 και 9 αντίστοιχα.

Na₂HPO₄-NaH₂PO₄*2H₂O

Χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις Na₂HPO₄ και NaH₂PO₄*2H₂O για να αποκτήσει το κάθε διάλυμα το επιθυμητό pH, όπως φαίνεται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3: Οι συγκεντρώσεις των NaH₂PO₄*2H₂O και Na₂HPO₄ για την παραγωγή Na₂HPO₄-NaH₂PO₄*2H₂O. Η παρασκευή του buffer με pH 9 πραγματοποιήθηκε με την πρόσθεση του διαλύματος NaH₂PO₄ 2H₂O συγκέντρωσης 0,83g/L στο διάλυμα Na₂HPO₄ συγκέντρωσης 13,439g/L μέχρι το pH να πάρει την τιμή 9.

Ph	NaH ₂ PO ₄ *2H ₂ O	Na ₂ HPO ₄ :
6	13,616g/L	1,806g/L
7	5,812g/L	8,906g/L
8	0,83g/L	13,439g/L
9	0,83g/L	13,439g/L

Σε Duran χωρητικότητας 25mL αναμείχθηκαν τα ρυθμιστικά διαλύματα με το PHB και τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο υπερήχων για 10 λεπτά. Σε κάθε Duran προστέθηκαν 4mL από τα υπερκείμενα που προέκυψαν από κάθε καλλιέργεια. Ακολούθησε επώαση στους 37 °C σε ηλεκτρικό μάτι υπό ανάδευση με τη βοήθεια μαγνητών.

Χημικές μέθοδοι ανάλυσης

Οι χημικές μέθοδοι ανάλυσης διεκπεραιώθηκαν με τη λήψη δειγμάτων από κάθε καλλιέργεια σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές της ζύμωσης. Αντίστοιχη δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε και στα διαλύματα υδρόλυσης.

Προσδιορισμός pH

Το pH των υπερκειμένων των δειγμάτων που περιείχαν τα εξωκυτταρικά και τα ενδοκυτταρικά ένζυμα μετρήθηκε με τη βοήθεια ηλεκτρονικού πεχαμέτρου.

Προσδιορισμός οπτικής πυκνότητας (OD)

Μετά τη λήψη κάθε δείγματος χρησιμοποιήθηκαν 0,05mL από κάθε δείγμα για τον προσδιορισμό της οπτικής πυκνότητας. Η φωτομέτρηση πραγματοποιήθηκε στα 660nm μετά από αραιώση 0,05mL κάθε δείγματος σε 0,95 mL H₂O, δηλαδή αραιώση ένα προς είκοσι (1:20). Με βάση την απορρόφηση υπολογίστηκε η οπτική πυκνότητα των μη αραιωμένων δειγμάτων.

Προσδιορισμός ξηρού βάρους βιομάζας (Dry Cell Weight)

Η λήψη των δειγμάτων έγινε σε προ-ζυγισμένα Eppendorf, τα οποία, μετά από φυγοκέντριση και μεταφορά του υπερκειμένου σε διαφορετικά Eppendorf, επώαστηκαν στους 65 °C, αφού πρώτα προστέθηκαν 0,5mL καθαρής αιθανόλης.

Ύστερα από 24 ώρες τα Eppendorf που περιείχαν το πλέον αποξηραμένο δείγμα ζυγίστηκαν με τη βοήθεια ζυγού ακριβείας. Ο προσδιορισμός της μάζας έγινε από την αφαίρεση της μάζας του Eppendorf από την συνολική μάζα του δοχείου και της αποξηραμένης βιομάζας που μετρήθηκε στο ζυγό. Στη συνέχεια, γίνεται προσδιορισμός του Ξηρού Βάρους σε g/L.

Προσδιορισμός ξηρού βάρους PHB και απόδοση υδρόλυσης

Στα πειράματα υδρόλυσης πραγματοποιήθηκαν λήψεις δειγμάτων 1 mL αμέσως μετά την προσθήκη του υπερκειμένου, στις 24 και στις 48 ώρες επώασης. Κάθε δείγμα φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά με επακόλουθη την ξήρανση του ιζήματος στους 65 °C με προσθήκη 0,5mL καθαρής ακετόνης. Στη συνέχεια έγινε προσδιορισμός του ξηρού βάρους του αποξηραμένου PHB με τη βοήθεια ζυγού ακριβείας.

Ο υπολογισμός της απόδοσης υδρόλυσης (yield) πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του παρακάτω τύπου :

$$Y = \frac{M_0 - M_X}{M_0} \times 100\%$$

Εξίσωση 1: Ο τύπος υπολογισμού της απόδοσης υδρόλυσης (yield). M_X ορίζεται το τελικό ξηρό βάρος του PHB, ενώ M_0 η αρχική μάζα που προστέθηκε στο διάλυμα.

Προσδιορισμός ενζυμικής δραστηριότητας αποπολυμεράσης του PHB

Αρχικά, έγινε λήψη δειγμάτων 2mL από τις καλλιέργειες και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντριση των δειγμάτων για 5min. Ακολούθησε ο διαχωρισμός του υπερκείμενου από το ίζημα με τοποθέτηση του υπερκείμενου σε διαφορετικό Eppendorf. Στο υπερκείμενο εμπεριέχονταν τα εξωκυτταρικά ένζυμα των μικροοργανισμών. Αφού διαχωρίστηκε το υπερκείμενο των εξωκυτταρικών ενζύμων, στα Eppendorf που εμπεριείχαν τη βιομάζα προστέθηκε 1,5mL ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl CaCl₂ (pH 8). Πραγματοποιήθηκε ανάδευση με Vortex και τα Eppendorf τοποθετήθηκαν σε λουτρό υπερήχων για 5 λεπτά, έτσι ώστε να ακολουθήσει η λύση των βακτηρίων και η απελευθέρωση των ενδοκυτταρικών ενζύμων. Πραγματοποιήθηκε, λοιπόν, δεύτερη φυγοκέντριση και αποθήκευση του υπερκείμενου που περιείχε τα ενδοκυτταρικά ένζυμα σε διαφορετικό Eppendorf.

Τα υπερκείμενα που συλλέχθηκαν διατηρήθηκαν στον πάγο, και ακολούθησε η παρασκευή των διαλυμάτων υδρόλυσης σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Σε αυτά, εμπεριέχονταν 0,3mL υδατικού διαλύματος εμπορικού PHB 0,3% w/v, 0,45mL απιονισμένου H₂O και 1,25mL ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl CaCl₂ (pH 8). Σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκαν 0,5mL από τα εξωκυτταρικά ή τα ενδοκυτταρικά ένζυμα. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας αυτής οι δοκιμαστικοί σωλήνες βρίσκονταν σε πάγο για την αποφυγή έναρξης της ενζυμικής αντίδρασης.

Η υδρόλυση πραγματοποιήθηκε στα 30 λεπτά στους 37 °C. Στο πέρας της επώασής τους, τα διαλύματα, μετά από ανάδευση σε vortex, φωτομετρήθηκαν στα 660nm. Η ενζυμική δραστηριότητα προσδιορίστηκε με βάση το ρυθμό μείωσης της απορρόφησης στα 660nm ανά λεπτό και η μονάδα μέτρησης ορίστηκε σε Units (Absorbance/min). Το δείγμα που λήφθηκε τη χρονική στιγμή μηδέν χρησιμοποιήθηκε ως το σημείο μηδέν της ενζυμικής αντίδρασης, δηλαδή το σημείο με την ελάχιστη ενζυμική δραστηριότητα. Για την ελαχιστοποίηση των σφαλμάτων, κάθε συνθήκη έγινε εις διπλούν.

Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης με πρωτεϊνική ανάλυση Bradford

Παρασκευή διαλύματος χρώσης Bradford

Για την παρασκευή του διαλύματος Bradford χρησιμοποιήθηκε η χρωστική Coomassie brilliant blue G-250 σε stock μεθανόλης. Η αναλογία στερεού Coomassie brilliant blue G-250 σε stock μεθανόλης είναι 100mg/100mL.

Για την παρασκευή 100 mL διαλύματος Bradford χρησιμοποιήθηκαν 5 mL Coomassie brilliant blue G-250, 10mL H_3PO_4 και 85 mL απιονισμένου νερού (dH_2O). Αρχικά προστέθηκαν σε ποτήρι ζέσεως τα δύο πρώτα διαλύματα και στη συνέχεια 50mL dH_2O . Αφού πραγματοποιήθηκε διήθηση με τη χρήση φίλτρου Whatman #1, στο διάλυμα που προέκυψε προστέθηκαν και τα υπόλοιπα 35mL dH_2O . Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε σε απαγωγό, καθώς γίνεται διαχείριση πτητικών ουσιών (μεθανόλη). Η δοκιμασία Bradford διεξήχθη σε μικροπλάκα 96 φρεατίων με 3 οριζόντιες επαναλήψεις ανά δείγμα.

Αρχικά κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη με την βοήθεια πυκνού διαλύματος BSA 1,5g/L, που υπέστη αραιώσεις με τελικές συγκεντρώσεις 0,3 g/L, 0,1 g/L, 0,075 g/L, 0,03 g/L και 0,015 g/L. Προστέθηκαν 50 μ l των διαλυμάτων που παρασκευάστηκαν στα φρεάτια. Τέλος, προστέθηκαν 0,2mL διαλύματος Bradford.

Με τον ίδιο τρόπο, στα υπόλοιπα φρεάτια ακολούθησε η ανάμειξη 0,05mL από κάθε υπερκείμενο δείγματος των καλλιιεργειών και 0,2mL διαλύματος Bradford.

Πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση σε microplate reader στα 595nm. Μέσω των φωτομετρικών αποτελεσμάτων και με τη βοήθεια της πρότυπης καμπύλης προσδιορίστηκε η πρωτεϊνική συγκέντρωση κάθε δείγματος σε mg/L και στη συνέχεια η πρωτεϊνική μάζα των δειγμάτων σε mg.

Προσδιορισμός ειδικής ενζυμικής δραστηριότητας

Η ενζυμική δραστηριότητα υπολογίστηκε από τη διαίρεση του ρυθμού απορρόφησης του κάθε δείγματος προς την πρωτεϊνική του μάζα. Εκφράστηκε λοιπόν σε Units / mg πρωτεΐνης.

Προσδιορισμός ανόργανου φωσφόρου (IP)

Αντιδραστήρια

Χρησιμοποιήθηκαν τρία (3) αντιδραστήρια για την διεκπεραίωση αυτής της διαδικασίας:

1. Υπερχλωρικό οξύ 60% v/v

2. L-ασκορβικό οξύ 10g/L
3. Μολυβδανικό αμμώνιο 50g/L

Κατασκευή πρότυπης καμπύλης

Αρχικά κατασκευάστηκε πυκνό K_2HPO_4 με συγκέντρωση ανόργανου φωσφόρου (IP) 10mg/L. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις, έτσι ώστε να προκύψουν διαλύματα με συγκεντρώσεις ανόργανου φωσφόρου (IP) 5 mg/L, 2,5mg/L, 1mg/L και 0,1mg/L .

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του ανόργανου φωσφόρου πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την Εξίσωση 3:

$$y = 9,5346x - 0,1719$$

Εξίσωση 2: Η εξίσωση της πρότυπης καμπύλης του ανόργανου φωσφόρου, όπου y είναι η συγκέντρωση του ανόργανου φωσφόρου σε mg/mL και x ο μέσος όρος της απορρόφησης των επαναλήψεων των προτύπων διαλύματος ανόργανου φωσφόρου γνωστής συγκέντρωσης.

Μέτρηση ανόργανου φωσφόρου στα δείγματα

Χρησιμοποιήθηκαν τα υπερκείμενα των δειγμάτων της ζύμωσης για την παραγωγή PHB αποπολυμερασών, στα οποία έγινε αραιώση 1:500 σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Ο τελικός όγκος κάθε δείγματος ήταν 5mL. Για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν δύο (2) επαναλήψεις. Παρασκευάστηκαν επίσης 2 τυφλά δείγματα με 5 mL H_2O .

Σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκαν 0,4mL υπερχλωρικού οξέος, 0,3 mL L-ασκορβικού οξέος και 0,4 mL μολυβδανικού αμμωνίου. Ανάμεσα από κάθε προσθήκη πραγματοποιήθηκε ανάδευση με vortex για 10 δευτερόλεπτα. Έπειτα τα διαλύματα διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά και ακολούθησε φωτομέτρηση στα 730 nm. Η διαδικασία αυτή απαιτεί τη χρήση απαγωγού, λόγω της διαβρωτικής και πτητικής φύσης του υπερχλωρικού οξέος. Μέσω της απορρόφησης έγινε ο υπολογισμός του ανόργανου φωσφόρου (IP) σε mg/L.

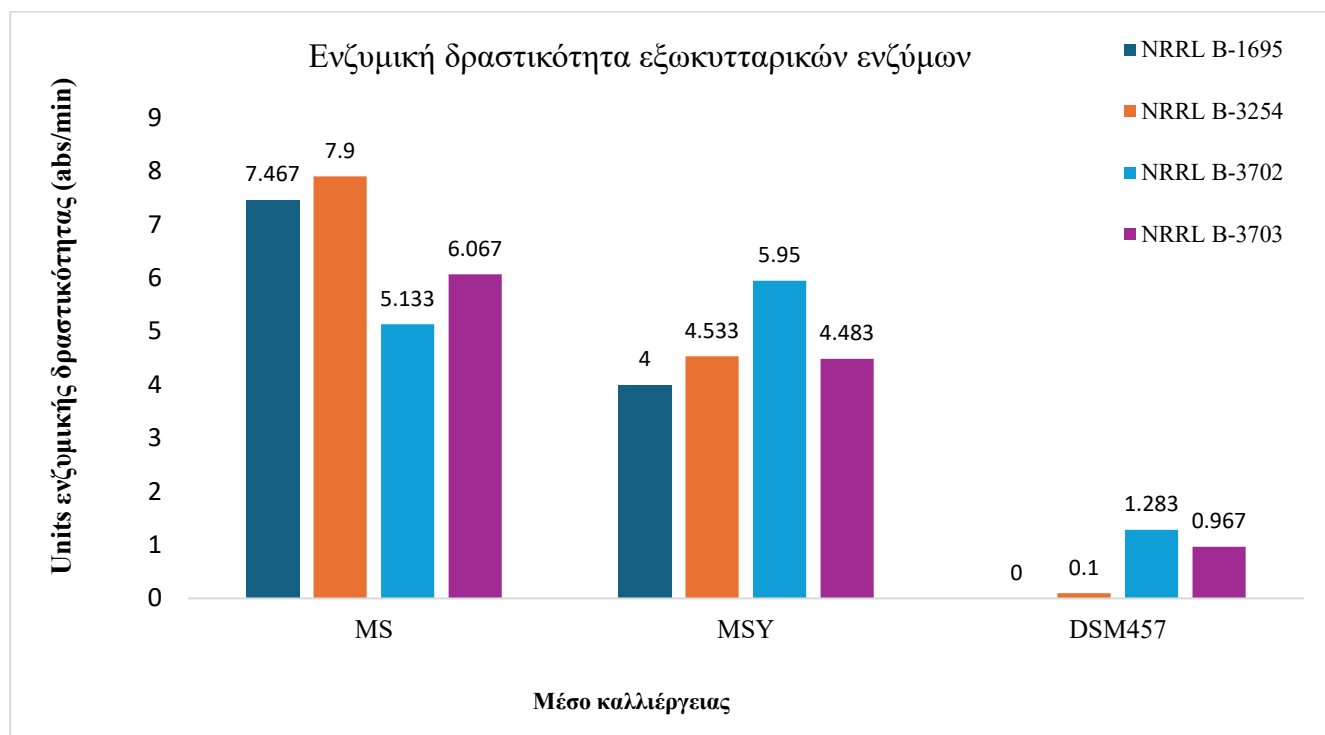
Αποτελέσματα

Παραγωγή υδρολυτικών ενζύμων PHB

Επιλογή θρεπτικού μέσου για τη μέγιστη παραγωγή αποπολυμερασών του PHB

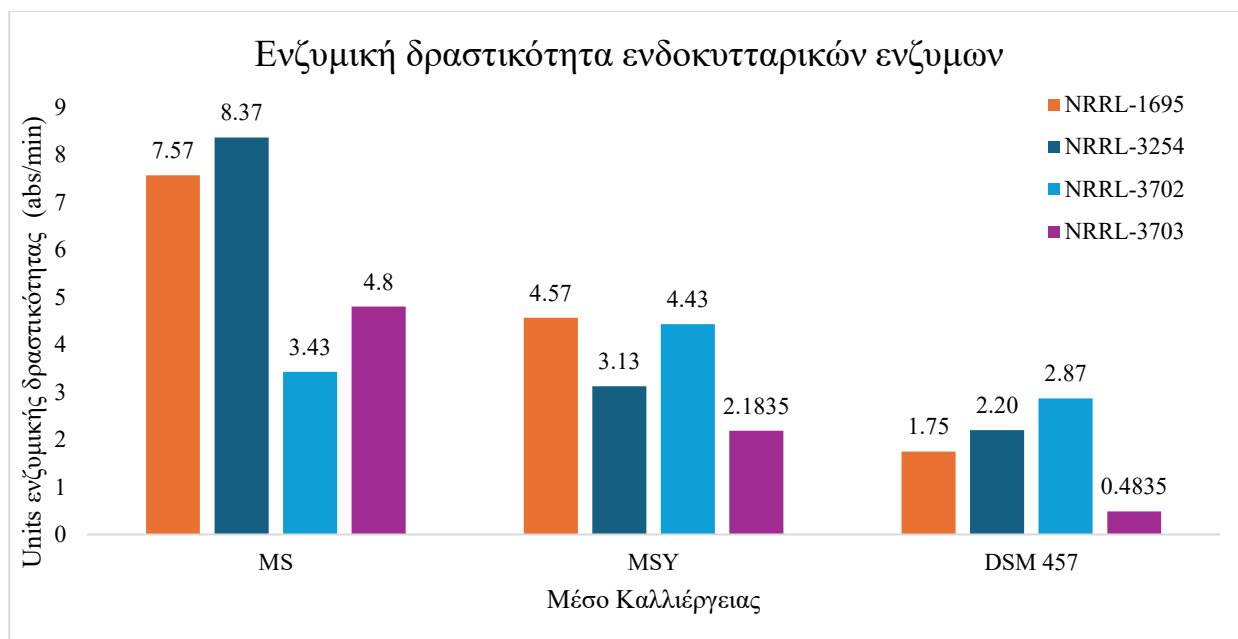
Για την παραγωγή των ενζύμων χρησιμοποιήθηκαν τα βακτήρια *P.megaterium* NRRL-3702, NRRL-3703, NRRL-3254 και *A. faecalis* NRRL-1695. Αρχικά μελετήθηκε η σύσταση του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας με στόχο την μέγιστη παραγωγή εξωκυτταρικών ενζύμων.

Στο Γράφημα 1 φαίνεται η μέγιστη ενζυμική δραστηριότητα των εξωκυτταρικών ενζύμων που παρήχθησαν από τους μικροοργανισμούς που μελετήθηκαν.



Γράφημα 1: Η μέγιστη ενζυμική δραστηριότητα (άξονας x) σε abs/min στα μέσα καλλιέργειας MS και MSY, και DSM457. Για το MS η μέγιστη ενζυμική δραστηριότητα σημειώθηκε στις 25 ώρες, για το MSY στις 24 ώρες ενώ για το μέσο DMS457 στις 48 ώρες.

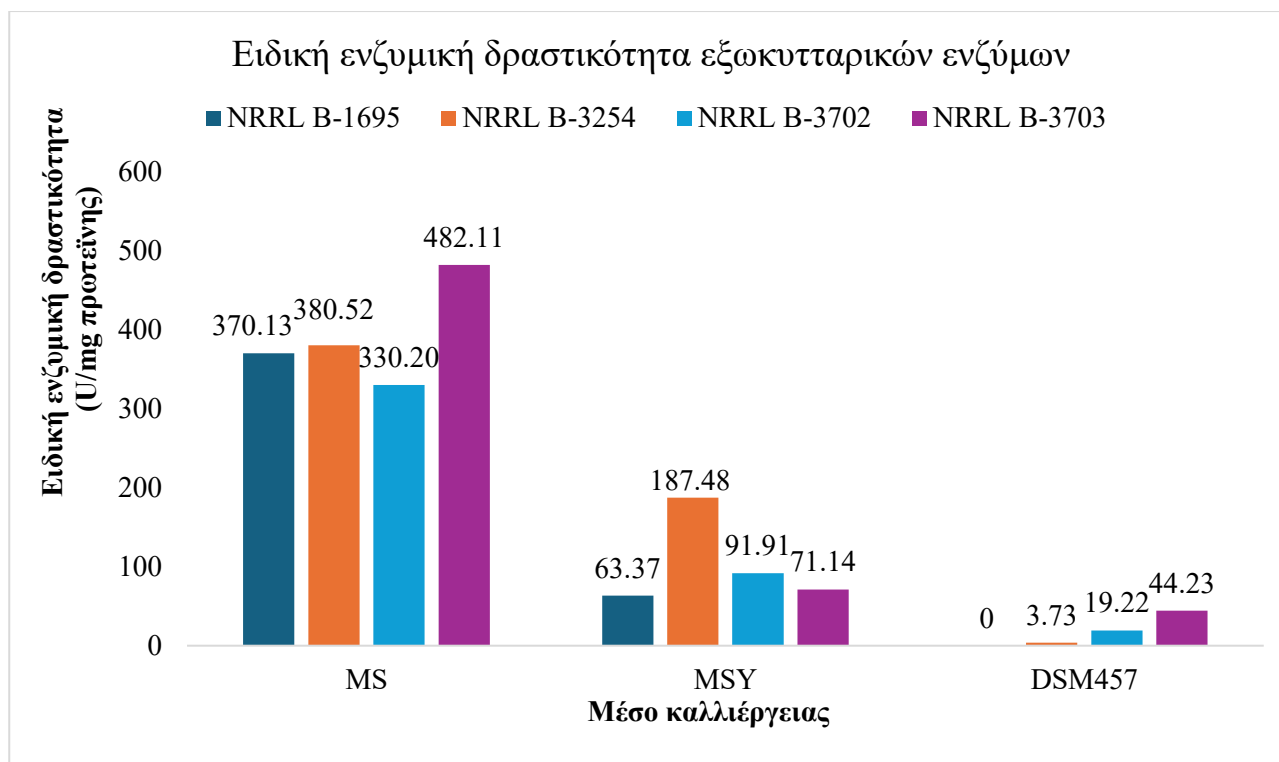
Η μέγιστη ενζυμική δραστηριότητα στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας MS παρατηρήθηκε στις 25 ώρες ζύμωσης για όλα τα των βακτήρια που μελετήθηκαν. Οι καλύτεροι παραγωγοί αποπολυμερασών ήταν τα στελέχη *P. megaterium* NRRL-3254 και *A. faecalis* NRRL-1695 με μέγιστη ενζυμική δραστηριότητα 7,9 Units και 7,467 Units, αντίστοιχα. Στο θρεπτικό μέσο MSY με το εκχύλισμα ζύμης η μέγιστη ενζυμική δραστηριότητα παρατηρήθηκε στις 24 ώρες ζύμωσης, με πιο αποδοτικό τον μικροοργανισμό *P. megaterium* NRRL-3702 (5,95 Units). Από την άλλη, το θρεπτικό μέσο DSM457 δεν ευνόησε την παραγωγή ενζύμων σε κανένα μικροοργανισμό, εφόσον, ακόμα και στις 48 ώρες, όπου παρατηρήθηκε η μέγιστη ενζυμική δραστηριότητα. Οι μέγιστες ενζυμικές δραστηριότητες που εμφανίστηκαν ήταν 1,283 Units για το στέλεχος *P. megaterium* NRRL-3702 και 0,967 Units για το στέλεχος *P. megaterium* NRRL-3703.



Γράφημα 2: Η ενζυμική δραστικότητα(άξονας y) σε abs/min των ενδοκυτταρικών ενζύμων των 25 στις καλλιέργειες όπου εμπεριέχονταν MS, των 24 ωρών στις καλλιέργειες με MSY και των 48 ωρών σε αυτές με DSM457.

Στο Γράφημα 2απεικονίζεται η ενζυμική δραστικότητα των ενδοκυτταρικών ενζύμων. Από αριστερά προς τα δεξιά οι μέγιστες τιμές της ενζυμικής δραστικότητας του MS (25 ώρες), του MSY(24 ώρες) και του DSM457 (48ώρες). Το θρεπτικό μέσο MS ευνόησε ιδιαίτερα τα στελέχη *P. megaterium* NRRL-3254 (8,37 Units) και *A. faecalis* NRRL-1695 (8,37 Units). Το MSY εμφάνισε την υψηλότερη ενζυμική δραστικότητα στους μικροοργανισμούς *P. megaterium* NRRL-3702 (4,43 Units). Στο μέσο DSM457 τα στελέχη *P. megaterium* NRRL-3254 και *A. faecalis* NRRL-1695 παρουσίασαν ενζυμική δραστικότητα 2,2 Units και 1,75 Units αντίστοιχα. Η υψηλότερη τιμή στο DSM457 σημειώθηκε στα 2,87 Units στο στέλεχος *P. megaterium* NRRL-3702.

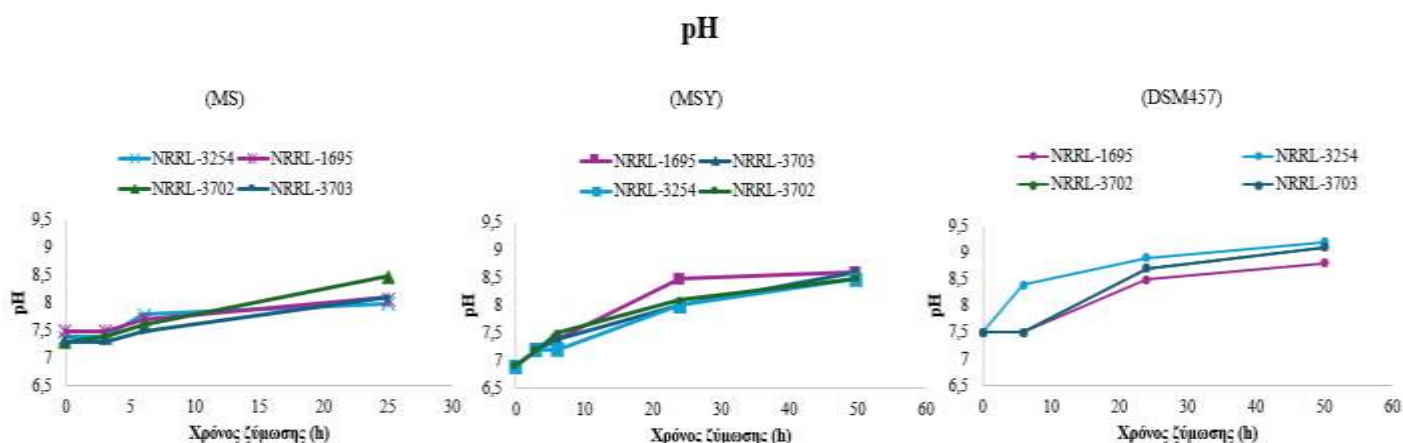
Στη συνέχεια, ακολούθησε ο προσδιορισμός της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης μέσω της δοκιμασίας Bradford και ο υπολογισμός της ειδικής ενζυμικής δραστικότητας. Οι πρωτεϊνικές συγκεντρώσεις υπολογίστηκαν για τα διαλύματα των εξωκυτταρικών ενζύμων. Συνεπώς προσδιορίστηκε μόνο η ειδική ενζυμική δραστικότητα εξωκυτταρικών ενζύμων.



Γράφημα 3: Η ειδική ενζυμική δραστηριότητα εκφράζεται σε Units/mg πρωτεΐνης (άξονας y). Απεικονίζονται τα δείγματα των 25 ωρών στις καλλιέργειες όπου εμπεριέχονταν MS, των 24 ωρών στις καλλιέργειες με MSY και των 48 ωρών σε αυτές με DSM457.

Στα δείγματα που περιείχαν το MS ως μέσο καλλιέργειας, όπως παρουσιάζεται αριστερά στο Γράφημα 3, ο NRRL-3702 είχε ειδική ενζυμική δραστηριότητα 330,198 Units/mg πρωτεΐνης και ο NRRL-3703 482,112 Units/mg. Η ειδική ενζυμική δραστηριότητα των μικροοργανισμών NRRL-1695 και NRRL-3254 πήρε τιμές 370,13 Units/mg πρωτεΐνης και 380,52 Units/mg πρωτεΐνης αντίστοιχα. Τη μεγαλύτερη ειδική ενζυμική δραστηριότητα στο μέσο MSY, που παρατίθεται στη μέση του διαγράμματος, παρουσιάζουν οι NRRL- 3254 και NRRL- 3702 με τιμές 187,481 Units/mg πρωτεΐνης και 91,91 Units/mg πρωτεΐνης αντίστοιχα. Το μέσο DSM457 εμφάνισε πολύ χαμηλές τιμές πρωτεϊνικής συγκέντρωσης, άρα και ειδικής ενζυμικής δραστηριότητας. Τη μεγαλύτερη τιμή εμφάνισε ο NRRL-3703, καθώς η ειδική ενζυμική δραστηριότητα υπολογίστηκε στα 44,23 Units/mg πρωτεΐνης.

Έπειτα, καταγράφηκαν οι τιμές του pH κάθε υπερκειμένου από τα δείγματα των καλλιεργειών.



Γράφημα 4: Απεικονίζεται το pH (άξονας y) όλων των δειγμάτων σε συνάρτηση με το χρόνο ζύμωσης (άξονας x). Αριστερά απεικονίζονται τα δείγματα του μέσου MS. Το μεσαίο Πίνακα απεικονίζει τα δείγματα με MSY, ενώ στα δεξιά φαίνονται τα δείγματα με DSM457.

Με βάση τα αποτελέσματα του Γραφήματος 4, στην πειραματική διαδικασία όπου ως θρεπτικό χρησιμοποιήθηκε το MS με πηγή άνθρακα το ηλεκτρικό οξύ, με το πέρας του χρόνου σημειώθηκε αύξηση του pH στις καλλιέργειες των μικροοργανισμών *P. megaterium* NRRL-3702 και NRRL-3703. Αντίστοιχα, τις ίδιες ώρες, το pH της καλλιέργειας του στελέχους NRRL-3702 ήταν 7,3 , 7,4 , 7,6 και 8,5. Στις 24 ώρες ζύμωσης παρατηρήθηκε επίσης αύξηση στο pH της καλλιέργειας του *A. faecalis* NRRL-1695, εφόσον οι τιμή του pH παρέμεινε σταθερή στο 7,5 στις πρώτες δύο μετρήσεις και αυξήθηκε στο 7,7 στις 6 ώρες και στο 8,1 στις 25 ώρες. Από την άλλη, η καλλιέργεια του *P. megaterium* NRRL-3254 εμφάνισε τιμή 7,4 στις δύο αρχικές μετρήσεις και στη συνέχεια πήρε τις τιμές 7,6 στις 6 ώρες και 7,9 στις 24 ώρες.

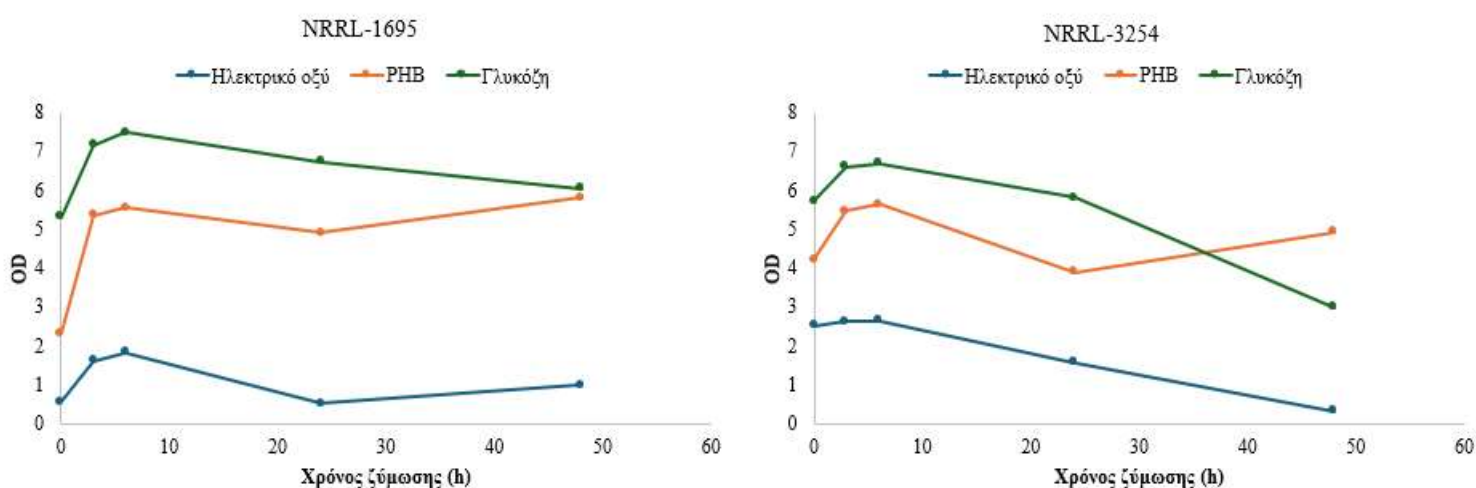
Στις καλλιέργειες που χρησιμοποιήθηκε το μέσο MSY, εμφανίστηκε αύξηση στο pH όλων των καλλιεργειών ζύμωσης. Στα δείγματα του στελέχους NRRL-1695 σημειώθηκε σημαντική αύξηση στο δείγμα των 24 ωρών εμφανίζοντας τιμή 8,5. Το δείγμα των 48 ωρών είχε τιμή pH 8,6. Τα στελέχη NRRL-3254, NRRL-3702 και NRRL-3703 εμφάνισαν πολύ παρόμοιες τιμές στα δείγματα τους, άρα και παρόμοιες διακυμάνσεις. Το pH των 48ωρων δειγμάτων που καταγράφηκε ήταν 8,5.

Σε όλες τις καλλιέργειες των μικροοργανισμών όπου αξιοποιήθηκε ως μέσο καλλιέργειας το DMS457, εμφανίστηκε αύξηση του pH. Το στέλεχος NRRL-3254 εμφάνισε τη μεγαλύτερη αύξηση, με τελική τιμή pH 9,2 στο δείγμα των 50 ωρών. Όλα τα αρχικά δείγματα είχαν pH 7,5. Οι τιμές pH των στελεχών NRRL-3702 και NRRL-3703 ήταν ίδιες στα δείγματα όλων των ωρών, με την τιμή του pH των 50ωρων μετρήσεων να είναι 9,1. Τέλος, στα τελευταία δείγματα του στελέχους NRRL-1695 η τιμή του pH έφτασε το 8,8.

Επιλογή πηγής άνθρακα για τη μέγιστη παραγωγή αποπολυμερασών του PHB

Για την παραγωγή των ενζύμων χρησιμοποιήθηκαν τα βακτήρια *P. megaterium* NRRL-3254 και *A. faecalis* NRRL-1695. Το μέσο καλλιέργειας που επιλέχθηκε ήταν το MS και οι πηγές άνθρακα που εξετάστηκαν για τη μέγιστη παραγωγή αποπολυμερασών του PHB ήταν η γλυκόζη, το PHB και το ηλεκτρικό οξύ. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η καταγραφή της ανάπτυξης των μικροοργανισμών μέσω του προσδιορισμού της οπτικής πυκνότητας.

Οπτική Πυκνότητα (OD)

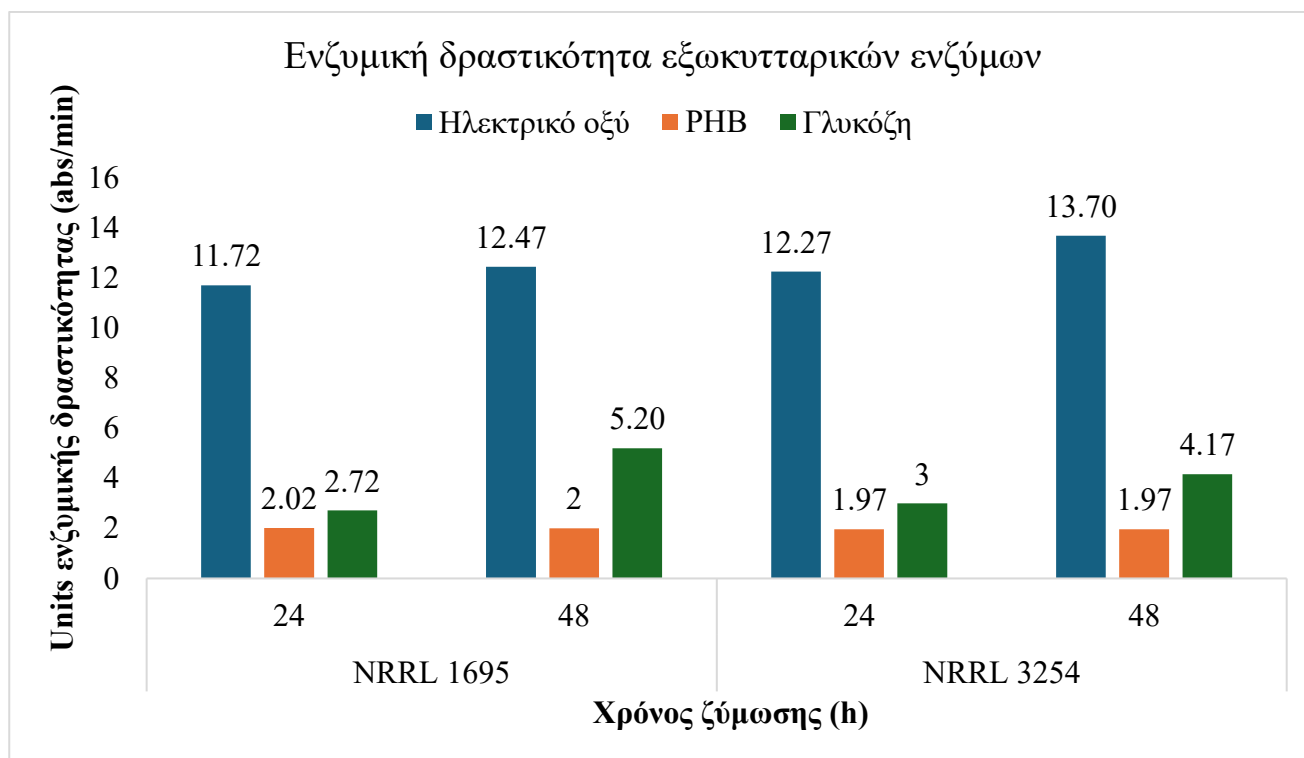


Γράφημα 5: Απεικονίζεται το pH (άξονας y) όλων των δειγμάτων του *A. faecalis* NRRL-1695 στα αριστερά, και του *P. megaterium* NRRL-3254 στα δεξιά, σε συνάρτηση με το χρόνο (άξονας x).

Η οπτική πυκνότητα των καλλιεργειών του στελέχους *A. faecalis* NRRL-1695 φαίνεται αριστερά στο Γράφημα 5. Στην καλλιέργεια του *A. faecalis* NRRL-1695 με ηλεκτρικό οξύ, η μέγιστη οπτική πυκνότητα έφτασε στο 1,82 στις 6 ώρες ζύμωσης. Η μέγιστη οπτική πυκνότητα που παρατηρήθηκε στο PHB σαν πηγή άνθρακα ήταν 5,56 στις 3 ώρες και στην γλυκόζη 7,49 στις 24 ώρες.

Στα δεξιά του Γραφήματος 5 απεικονίζεται η οπτική πυκνότητα των καλλιεργειών του *P. megaterium* NRRL-3254. Στην καλλιέργεια όπου πηγή άνθρακα αποτέλεσε το ηλεκτρικό οξύ, η μέγιστη οπτική πυκνότητα ήταν 2,65 στις 6 ώρες. Στην καλλιέργεια που προστέθηκε το PHB ως πηγή άνθρακα η οπτική πυκνότητα πήρε τιμή 5,64 στις 6 ώρες ζύμωσης. Τέλος, στην καλλιέργεια που αξιοποιήθηκε η γλυκόζη η οπτική πυκνότητα πήρε τη μέγιστη τιμή στις 6 ώρες, που ήταν 6,7.

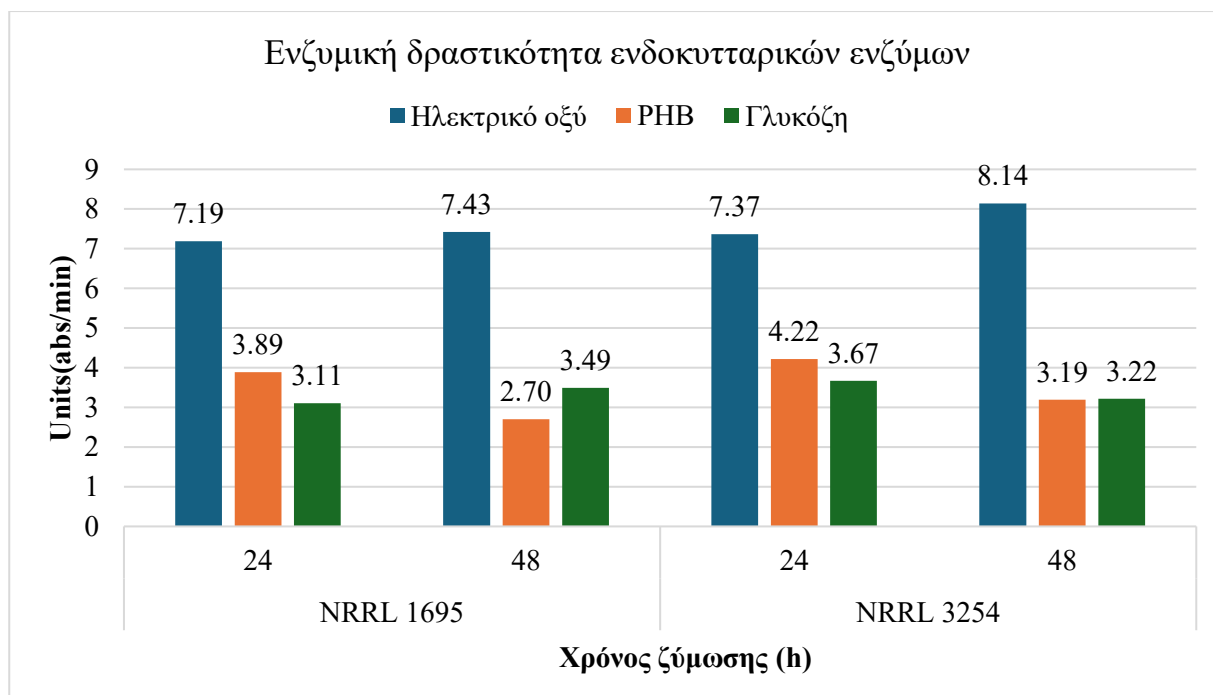
Στη συνέχεια υπολογίστηκε η ενζυμική δραστικότητα των καλλιεργειών των δυο στελεχών, NRRL-1695 και NRRL-3254. Οι μέγιστες τιμές εμφανίστηκαν στις 24 και στις 48 ώρες για κάθε μικροοργανισμό.



Γράφημα 6: Η ενζυμική δραστικότητα εκφράζεται σε Abs/min (άξονας y) σε συνάρτηση με τον χρόνο (άξονας x). Απεικονίζονται τα δείγματα των 24 και 48 ωρών και των δύο μικροοργανισμών.

Στο Γράφημα 6 παρουσιάζονται οι τιμές της μέγιστης ενζυμικής δραστικότητας των εξωκυτταρικών ενζύμων στις 48 ώρες ζύμωσης. Στο στέλεχος *A. faecalis* NRRL-1695, όπως φαίνεται αριστερά, στα δείγματα των 24 και 48 ωρών, όπου χρησιμοποιήθηκε ως πηγή άνθρακα το ηλεκτρικό οξύ, η ενζυμική δραστικότητα ήταν 11,72 Units και 12,47 Units. Τα δείγματα του PHB εμφάνισαν ενζυμική δραστικότητα 2,02 Units και 2 Units, ενώ τα δείγματα της γλυκόζης 2,72 Units και 5,20 Units.

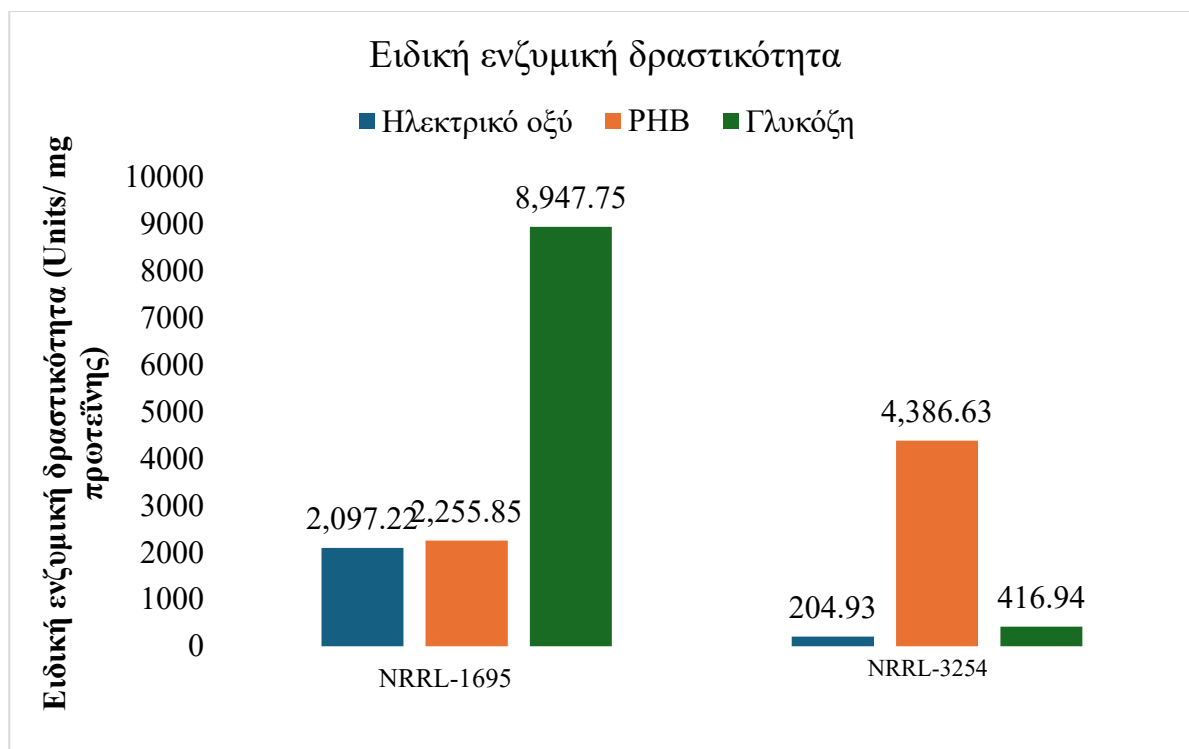
Στα δεξιά του Γραφήματος 6, φαίνεται η ενζυμική δραστικότητα των εξωκυτταρικών ενζύμων του στελέχους *P. megaterium* NRRL-3254. Τα δείγματα του ηλεκτρικού οξέος εμφάνισαν ενζυμική δραστικότητα 12,27 Units και 13,70 Units στις 24 και 48 ώρες, ενώ το δείγμα του PHB 1,97 Units και στα δύο δείγματα. Τέλος, η ενζυμική δραστικότητα στα δείγματα της γλυκόζης υπολογίστηκε στα 3 Units και 4,17 Units στις 24 και 48 ώρες ζύμωσης.



Γράφημα 7: Η ενζυμική δραστικότητα εκφράζεται σε Abs/min (άξονας y). Απεικονίζονται τα δείγματα των ενδοκυτταρικών ενζύμων των 24 και 48 ωρών και των δύο μικροοργανισμών.

Στο Γράφημα 7 παρουσιάζονται οι τιμές της μέγιστης ενζυμικής δραστικότητας των ενδοκυτταρικών ενζύμων στις 48 ώρες ζύμωσης. Στο στέλεχος *A. faecalis* NRRL-1695, όπως φαίνεται αριστερά, στα δείγματα του ηλεκτρικού οξέος η ενζυμική δραστικότητα ήταν 7,19 Units και 7,43 Units στις 24 και 48 ώρες αντίστοιχα. Τα δείγματα του PHB εμφάνισαν ενζυμική δραστικότητα 3,98 Units και 2,70 Units, ενώ τα δείγματα της γλυκόζης 3,11 Units και 3,49 Units.

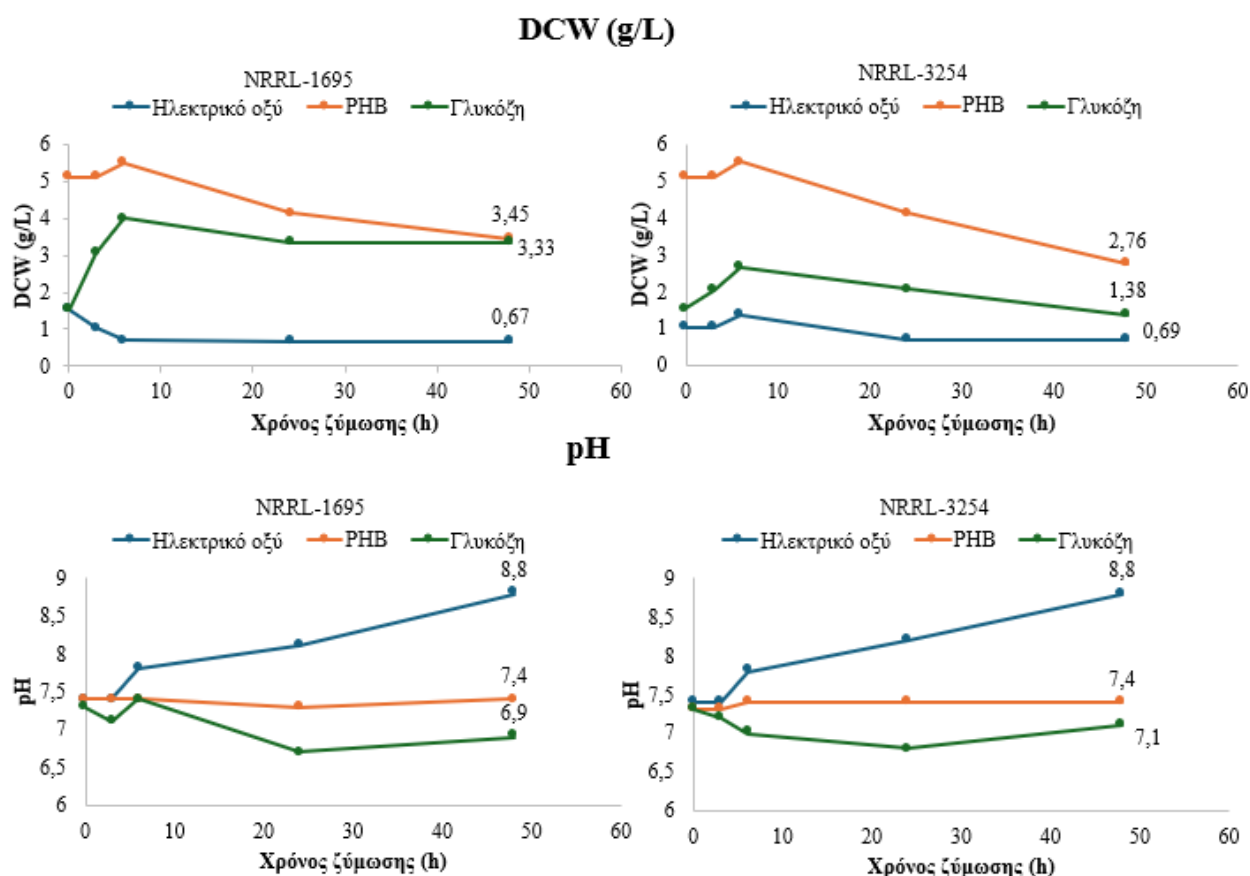
Στα δεξιά του Γραφήματος 7, φαίνεται η ενζυμική δραστικότητα των ενδοκυτταρικών ενζύμων του στελέχους *P. megaterium* NRRL-3254. Τα δείγματα του ηλεκτρικού οξέος εμφάνισαν ενζυμική δραστικότητα 7,37 Units και 8,14 Units στις 24 και 48 ώρες, ενώ το δείγμα του PHB 4,22 Units και 3,19 Units. Τέλος, η ενζυμική δραστικότητα στα δείγματα της γλυκόζης υπολογίστηκε στα 3,67 Units και 3,22 Units στις 24 και 48 ώρες ζύμωσης.



Γράφημα 8: Η ειδική ενζυμική δραστηριότητα εκφράζεται σε Units/mg πρωτεΐνης (άξονας y). Απεικονίζονται τα δείγματα των 48 ωρών όλων των καλλιιεργειών του στελέχους NRRL-1695.

Στο Γράφημα 8 φαίνεται η ειδική ενζυμική δραστηριότητα των στελεχών *A. faecalis* NRRL-1695 και *P. megaterium* NRRL-3254 στις 48 ώρες ζύμωσης, όπου πήρε μέγιστες τιμές σε όλες τις καλλιέργειες. Στο στέλεχος *A. faecalis* NRRL-1695, όπως φαίνεται αριστερά, το δείγμα του ηλεκτρικού οξέος είχε ειδική ενζυμική δραστηριότητα 2.097 Units/mg πρωτεΐνης. Το δείγμα του PHB εμφάνισε ειδική ενζυμική δραστηριότητα 2.255,85 Units/mg πρωτεΐνης, ενώ το δείγμα της γλυκόζης 8.947,75 Units/mg πρωτεΐνης.

Στα δεξιά του Γραφήματος 8, φαίνεται η ειδική ενζυμική δραστηριότητα των στελεχών *P. megaterium* NRRL-3254. Το δείγμα του ηλεκτρικού οξέος εμφάνισε ειδική ενζυμική δραστηριότητα 204,93 Units/mg πρωτεΐνης, ενώ το δείγμα του PHB 4.386,63 Units/mg πρωτεΐνης. Τέλος, η ειδική ενζυμική δραστηριότητα στο δείγμα της γλυκόζης υπολογίστηκε στα 416,94 Units/mg πρωτεΐνης.



Γράφημα 9: Απεικονίζεται το ξηρό βάρος βιομάζας και το pH (άξονας y) σε συνάρτηση με το χρόνο ζύμωσης (άξονας x) για τα στελέχη NRRL-1695 και NRRL-3254.

Το ξηρό βάρος της βιομάζας στις καλλιέργειες του στελέχους *A. faecalis* NRRL-1695 φαίνεται επάνω αριστερά στο Γράφημα 9. Στα δείγματα του ηλεκτρικού οξέος, το ξηρό βάρος βιομάζας ήταν 1,54 g/L αρχικά, 1,03 g/L στις 3 ώρες, 0,69 g/L στις 6 ώρες και 0,67 g/L στις 24 και 48 ώρες. Τα αποτελέσματα που καταγράφηκαν στα δείγματα με πηγή άνθρακα το PHB ήταν 5,13 g/L στις 0 και 3 ώρες, 5,52 g/L στις 6 ώρες, 5,33 g/L στις 24 ώρες και 3,52 g/L στις 48 ώρες. Στα δείγματα όπου αξιοποιήθηκε γλυκόζη ως πηγή άνθρακα το ξηρό βάρος βιομάζας ήταν 1,54 g/L αρχικά, 3,08 g/L στις 3 ώρες, 4 g/L στις 6 ώρες, 3,33 g/L στις 24 ώρες και 1,38 g/L στις 48 ώρες ζύμωσης.

Οι μετρήσεις του ξηρού βάρους της βιομάζας στις καλλιέργειες του στελέχους *P. megaterium* NRRL-3254 απεικονίζονται επάνω αριστερά στο Γράφημα 9. Αρχικά στην καλλιέργεια του ηλεκτρικού οξέος καταγράφηκαν 1,03 g/L στις 0 και 3 ώρες, 1,38 g/L στις 6 ώρες και 0,69 g/L στις 24 και 48 ώρες. Στα δείγματα του PHB η βιομάζα μετρήθηκε στα 5,13g/L στις 0 και 3 ώρες, στα 3,52 g/L στις 6 ώρες, στα 4,14 g/L στις 24 ώρες και στα 2,76

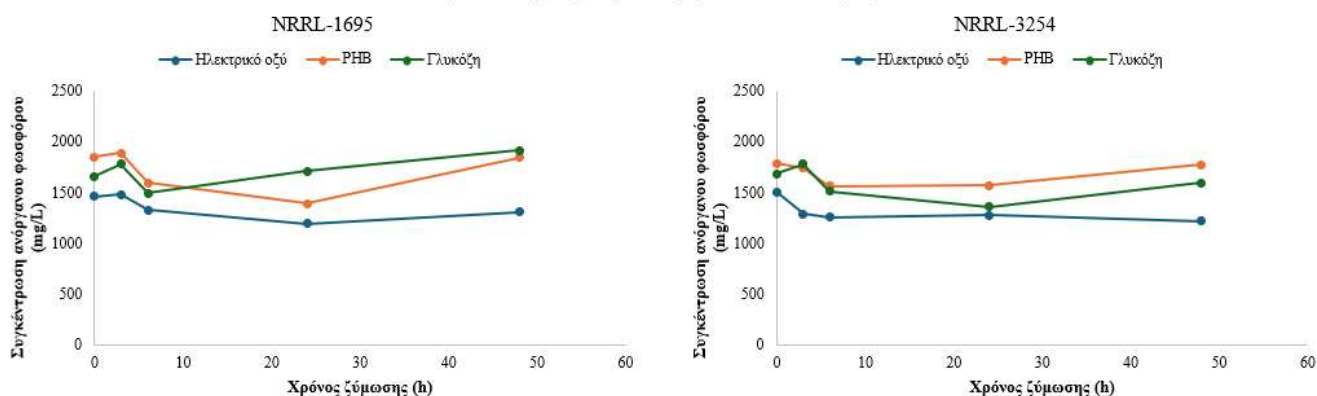
g/L στις 48 ώρες. Τέλος, στα δείγματα όπου εμπεριέχονταν γλυκόζη η βιομάζα ήταν 1,54 g/L αρχικά, 2,05 g/L στις 3 ώρες, 2,07 g/L στις 6 και 24 ώρες και 1,38 g/L στις 48 ώρες ζύμωσης.

Οι μεταβολές του pH στις καλλιέργειες του στελέχους *A. faecalis* NRRL-1695 απεικονίζονται κάτω αριστερά στο Γράφημα 9. Στα δείγματα του ηλεκτρικού οξέος, από την άλλη, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση του pH. Τα πρώτα δύο δείγματα είχαν pH 7,4, στις 6 ώρες 7,8 στις 24 ώρες 8,1, ενώ το τελευταίο πήρε τιμή 8,5. Τα δείγματα PHB δεν εμφάνισαν σημαντικές αλλαγές, εφόσον το pH παρέμεινε 7,4 για όλα τα δείγματα, εκτός από αυτό των 24 ωρών όπου ήταν 7,3. Τα δείγματα της γλυκόζης εμφάνισαν μείωση του pH από 7,3 ,αρχικά, σε 7,1 στις 3 ώρες ζύμωσης. Στη συνέχεια αυξήθηκε στο 7,4 στις 6 ώρες και , ύστερα, μείωση στο 6,7 στις 24 ώρες και στο 6,9 στις 48 ώρες.

Παρομοίως, στο στέλεχος *P. megaterium* NRRL -3254, που φαίνεται κάτω δεξιά στο Γράφημα 9, παρατηρούνται παρόμοιες διακυμάνσεις. Αρχικά, στα δείγματα που εμπεριέχονταν ηλεκτρικό οξύ το αρχικό δείγμα, όπως και αυτό των 3 ωρών είχε pH 7,4, στις 6 ώρες αυξήθηκε στο 7,8. Στις 24 ώρες το pH ήταν 8,2 και στο τελικό δείγμα 8,6 . Στα δείγματα PHB δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική αλλαγή καθώς η τιμή του pH παρέμεινε 7,3 στα δύο πρώτα δείγματα, ενώ από τις 6 ώρες και μετά αυξήθηκε στο 7,4. Το αρχικό δείγμα γλυκόζης είχε pH 7,3, των 3 ωρών 7,2, των 6 ωρών 7, των 24 ωρών 6,8, ενώ το τελικό είχε pH 7,1.

Ακολούθησε προσδιορισμός της συγκέντρωσης του ανόργανου φωσφόρου σε mg/mL.

Προσδιορισμός Ανόργανου Φωσφόρου



Γράφημα 10: Η συγκέντρωση του ανόργανου φωσφόρου σε mg/L (άξονας y) των δειγμάτων του στελέχους NRRL-1695 σε συνάρτηση με το χρόνο ζύμωσης (άξονας x).

Η συγκέντρωση του ανόργανου φωσφόρου στα δείγματα του στελέχους *A. faecalis* NRRL-1695 παρουσιάζεται αριστερά του Γραφήματος 10. Στα δείγματα του ηλεκτρικού οξέος οι συγκεντρώσεις του ανόργανου φωσφόρου που καταγράφηκαν ήταν 1471 mg/L αρχικά, 1488 mg/L στις 3 ώρες, 1332 mg/L στις 6 ώρες, 1199 mg/L στις 24 ώρες, και 1316 mg/L στις 48

ώρες ζύμωσης. Στα δείγματα PHB οι συγκεντρώσεις του ανόργανου φωσφόρου τις αντίστοιχες χρονικές στιγμές υπολογίστηκαν στα 1857 mg/L, 1897 mg/L, 1604 mg/L, 1397 mg/L και 1854 mg/L. Τέλος, στα δείγματα της γλυκόζης οι συγκεντρώσεις πήραν τις τιμές 1666 mg/L, 1788 mg/L, 1504 mg/L, 1718 mg/L και 1921 mg/L.

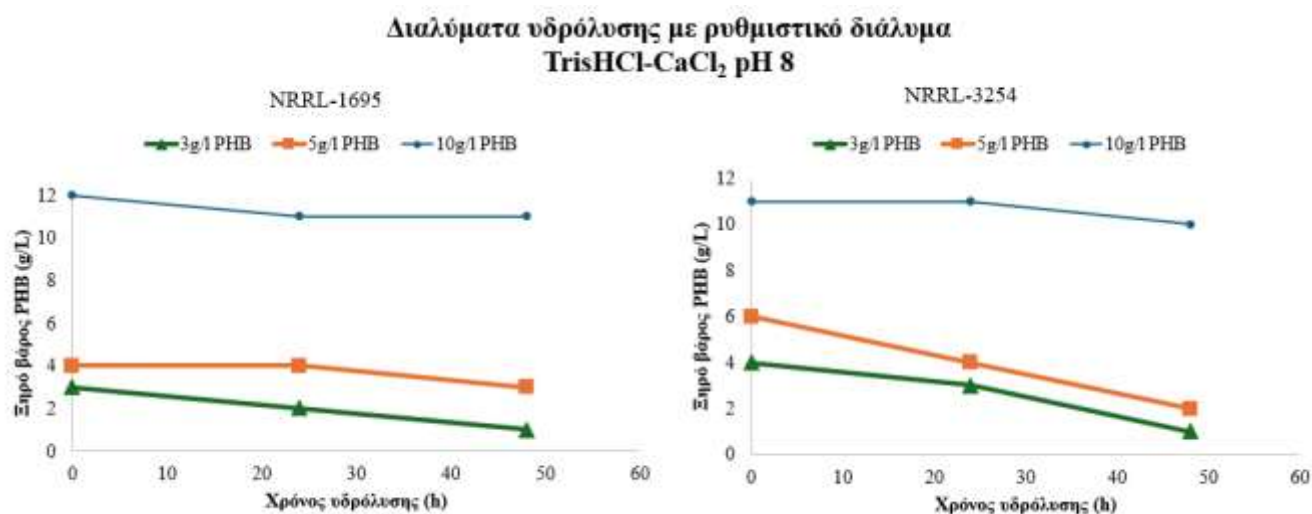
Τα δείγματα του στελέχους *P. megaterium* NRRL-3254 φαίνονται δεξιά του Γραφήματος 10. Στα δείγματα του ηλεκτρικού οξέος η συγκέντρωση του ανόργανου φωσφόρου ήταν 1511 mg/L αρχικά, 1297 mg/L στις 3 ώρες, 1265 mg/L στις 6 ώρες, 1287 mg/L στις 24 ώρες και 1225 mg/L στις 48 ώρες ζύμωσης. Στα δείγματα PHB στις αντίστοιχες χρονικές στιγμές η συγκέντρωση του ανόργανου φωσφόρου υπολογίστηκε 1794 mg/L, 1751 mg/L, 1573 mg/L, 1575 mg/L και 1782 mg/L. Στα δείγματα της γλυκόζης η συγκεντρώσεις πήραν τις τιμές 1692 mg/L, 1790 mg/L, 1520 mg/L, 1366 mg/L και 1602 mg/L αντίστοιχα.

Υδρόλυση PHB

Επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης PHB

Αρχικά εξετάστηκε η ικανότητα υδρόλυσης σε διαλύματα με 10g/L, 5g/L και 3g/L PHB σε μορφή σκόνης. Τα ένζυμα που παρήχθησαν από το θρεπτικό MS και πηγή άνθρακα το ηλεκτρικό οξύ χρησιμοποιήθηκαν για την διάσπαση εμπορικού PHB. Παρασκευάστηκε μια καλλιέργεια για κάθε μικροοργανισμό, των οποίων τα εξωκυτταρικά ένζυμα χρησιμοποιήθηκαν για τη διάσπαση του εμπορικού PHB με αρχική συγκέντρωση PHB 3g/L 5g/L και 10 g/L. Η οπτική πυκνότητα στον *Alcaligenes faecalis* NRRL-1695 ήταν 1,16 στο δείγμα κ και στον *Priestia megaterium* NRRL-3254 ήταν 1,68 στις 24 ώρες ζύμωσης, που παραλήφθηκαν τα ένζυμα. Από τα πειράματα της ζύμωσης η ενζυμική δραστηριότητα στα δείγματα των 24 ωρών προέκυψε 2,633 Abs/min, ενώ στον NRRL-3254 ήταν 2,250 Abs/min. Οι τιμές pH στα δείγματα και των δυο μικροοργανισμών ήταν 7 8,5 στις 24 ώρες. Στον *Alcaligenes faecalis* NRRL-1695 η πρωτεϊνική μάζα προέκυψε 0,005mg και η ειδική ενζυμική δραστηριότητα 500,331 Units/mg πρωτεΐνης. Στον *Priestia megaterium* NRRL-3254 η πρωτεϊνική μάζα υπολογίστηκε επίσης στα 0,005mg και η ειδική ενζυμική δραστηριότητα στα 427,498 Units/mg πρωτεΐνης.

Αρχικά εξετάστηκαν τα διαλύματα υδρόλυσης που περιείχαν Tris-HCl CaCl₂ (pH 8) και για τους δυο μικροοργανισμούς.



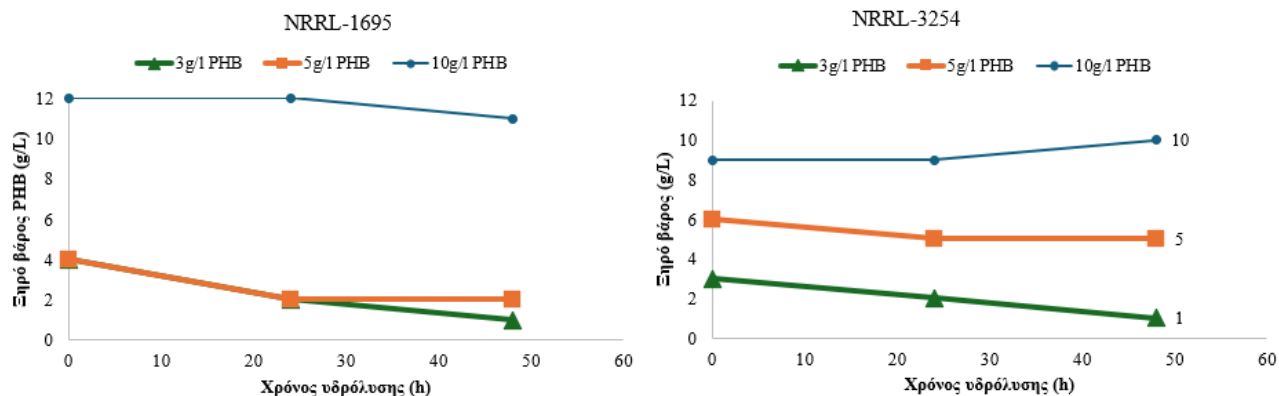
Γράφημα 11: Η μάζα του αποξηραμένου του PHB σε g/L (άξονας y) των δειγμάτων υδρόλυσης με Tris-HCl CaCl₂ (pH 8) στα διαλύματα υδρόλυσης των δύο μικροοργανισμών σε συνάρτηση με τον χρόνο (άξονας x).

Στο Γράφημα 11 απεικονίζεται η μάζα του αποξηραμένου PHB που προέκυψε από τα διαλύματα που περιείχαν ως ρυθμιστικό διάλυμα TrisHCl -CaCl₂ με pH 8. Η αρχική συγκέντρωση του PHB, που ήταν 12g/L μειώθηκε στα 11g/L στα δείγματα των 24 και 48 ωρών. Σε αρχική συγκέντρωση PHB g/L μειώθηκε στα 2g/L PHB στις 48 ώρες. Τέλος, στα 3g/L PHB προέκυψε 1 g/L στις 48 ώρες.

Για το στέλεχος *P. megaterium* NRRL-3254 η μεταβολές που παρατηρήθηκαν ήταν: από 11 g/L αρχική συγκέντρωση PHB έμειναν 10 g/L, σε αρχική συγκέντρωση PHB 6g/L, έμειναν 2 g/L και σε αρχική συγκέντρωση 3g/L PHB έμεινε 1 g/L .

Στη συνέχεια, εξετάστηκαν τα διαλύματα υδρόλυσης με ρυθμιστικό διάλυμα Na₂HPO₄-NaH₂PO₄*2H₂O (pH 8) και για τους δυο μικροοργανισμούς.

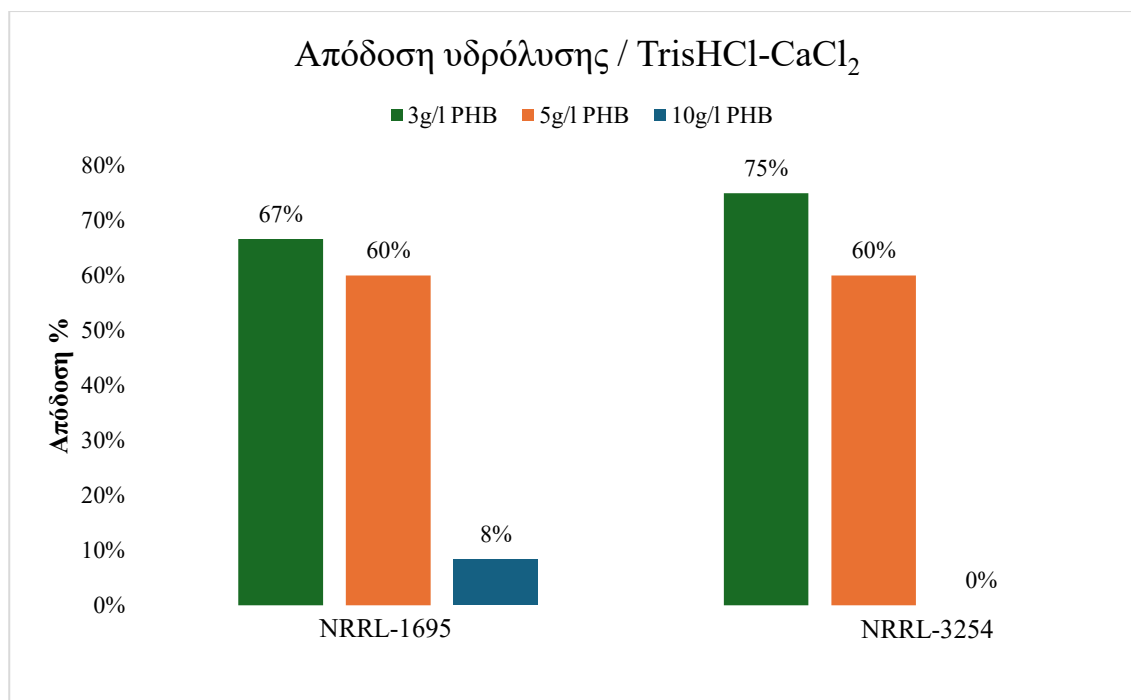
Διαλύματα υδρόλυσης με ρυθμιστικό διάλυμα $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ pH 8



Γράφημα 12: Η μάζα του αποξηραμένου του PHB σε g/L (άξονας y) των δειγμάτων υδρόλυσης με $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ στα διαλύματα υδρόλυσης των NRRL-1695 και NRRL-3254 σε συνάρτηση με τον χρόνο (άξονας x).

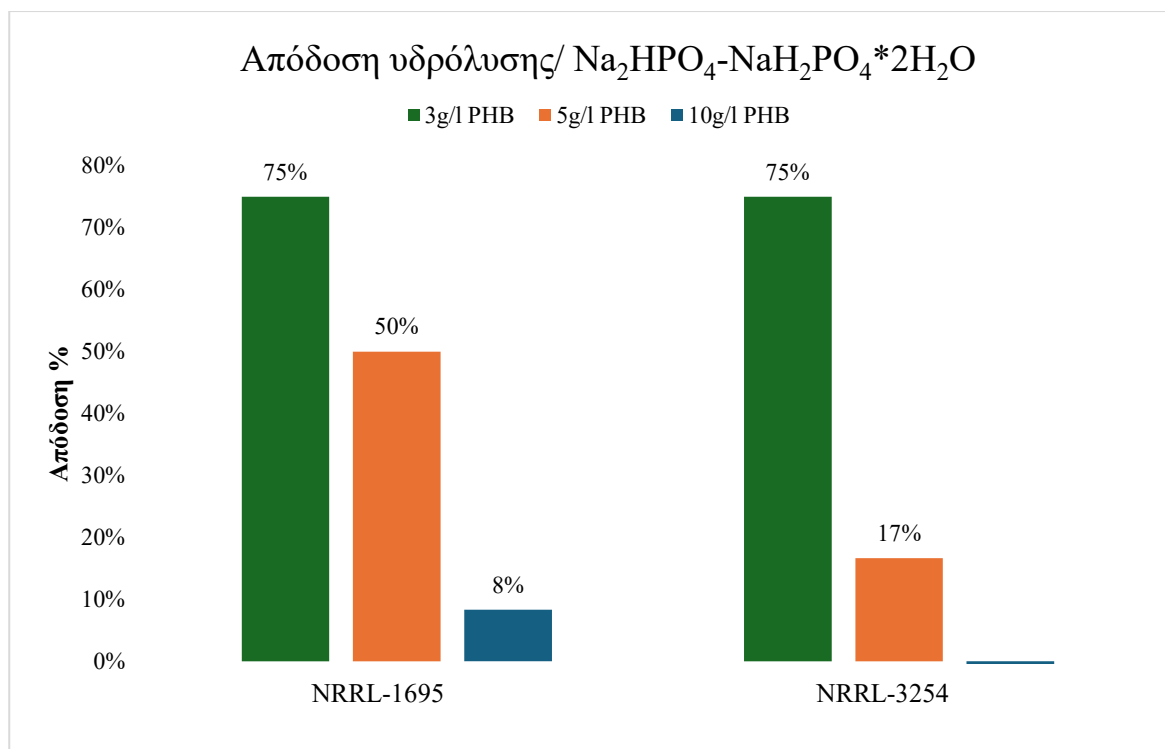
Στο Γράφημα 12 απεικονίζεται η μάζα του αποξηραμένου PHB που προέκυψε από τα διαλύματα που περιείχαν ως buffer $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ με pH 8. Αριστερά φαίνονται οι μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν στα διαλύματα των ενζύμων του στελέχους *A. faecalis* NRRL-1695. Στο διάλυμα με αρχική συγκέντρωση σκόνης PHB 10g/L έμειναν 11g/L. Στο διάλυμα όπου προστέθηκε σκόνη PHB σε συγκέντρωση 5g/L, προέκυψαν τελικά 2g/L. Τέλος, στο διάλυμα, όπου προστέθηκαν 3g/L PHB μετρήθηκε τελικά 1g/L PHB..

Στα δεξιά του Γραφήματος 12, απεικονίζονται τα ξηρά βάρη του αποξηραμένου PHB των διαλυμάτων των αποπολυμερασών του στελέχους *P. megaterium* NRRL-3254. Στο διάλυμα όπου προστέθηκε σκόνη PHB σε συγκέντρωση 10g/L το τελικό ξηρό βάρος ήταν 10 g/L. Στη συνέχεια, στο διάλυμα με αρχική συγκέντρωση 5g/L ήταν 5g/L στις 48 ώρες. Στο τελευταίο διάλυμα με αρχική συγκέντρωση PHB 3g/L, υπολογίστηκε τελικά 1g/L.



Γράφημα 13: Η απόδοση της υδρόλυσης στα διαλύματα που περιείχαν αρχική συγκέντρωση PHB 3g/L, 5g/L και 10g/L, και TrisHCl-CaCl₂ pH 8.

Στο Γράφημα 13 παρουσιάζεται η απόδοση στις 48 ώρες υδρόλυσης με ένζυμα από τους μικροοργανισμούς *A.faecalis* NRRL-1695 (αριστερά) και *P. megaterium* NRRL-3254 (δεξιά) στα οποία εμπεριέχεται TrisHCl-CaCl₂ (pH 8). Ο *A. faecalis* NRRL-1695 έδωσε αποδόσεις 8%, 60% και 67%, σε 10 g/L, 5 g/L και 3 g/L, αντίστοιχα. Ο *P. megaterium* NRRL-3254 έδωσε αποδόσεις 0%, 60% και 75%, σε 10 g/L, 5 g/L και 3 g/L, αντίστοιχα.



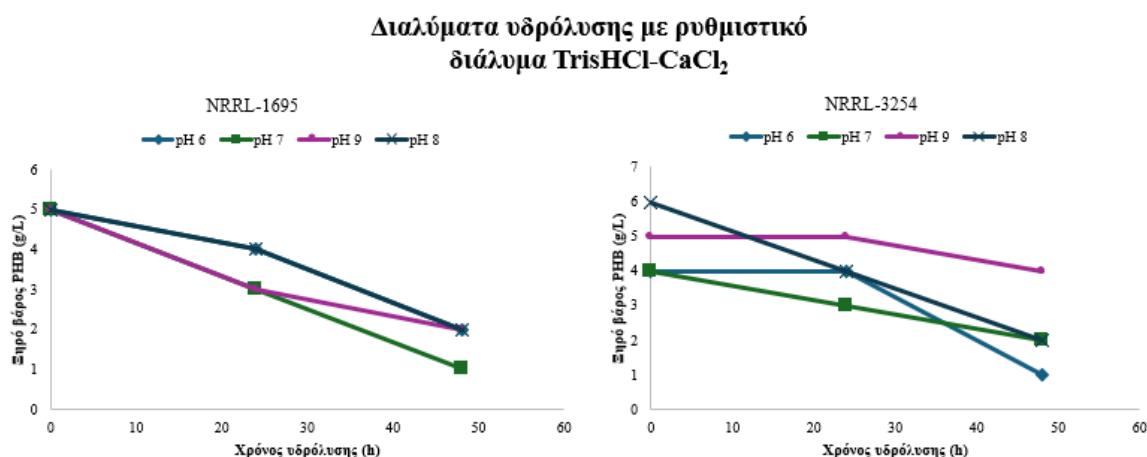
Γράφημα 14: Η απόδοση της υδρόλυσης στα διαλύματα που περιείχαν αρχική συγκέντρωση PHB 3g/L, 5g/L και 10g/L, και $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ pH 8.

Στο Γράφημα 14 φαίνονται οι τιμές της απόδοσης των 48 ωρών στα διαλύματα των μικροοργανισμών *A. faecalis* NRRL-1695 (αριστερά) και *P. megaterium* NRRL-3254 (δεξιά) στα οποία εμπεριέχεται $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ pH 8.. Στα διαλύματα των αποπολυμερασών του NRRL-1695 όπου η αρχική συγκέντρωση του PHB ήταν 5g/L, απόδοση υδρόλυσης ήταν 50%. Στο ίδιο διάλυμα του NRRL-3254 ήταν 17%. Και στα δύο διαλύματα όπου προστέθηκαν 3g/L η απόδοση έφτασε το 75%

Επίδραση του pH στην ικανότητα υδρόλυσης

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η ικανότητα υδρόλυσης των ενζύμων σε 5g/L εμπορικού PHB. Χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια ένζυμα, που παρήχθησαν από το θρεπτικό MS με ηλεκτρικό οξύ. Τα buffers που αξιοποιήθηκαν ήταν το TrisHCl-CaCl_2 και το $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ σε pH 6, 7 και 9 αντίστοιχα. Η οπτική πυκνότητα των καλλιιεργειών του *Alcaligenes faecalis* NRRL-1695 υπολογίστηκε 1,48 και 1,98 στα δείγματα των 0 και των 24 ωρών. Στον *Priestia megaterium* NRRL-3254 στο πρώτο δείγμα ήταν 0,92 και στη συνέχεια καταγράφηκε 0,6 στο δεύτερο δείγμα. Από τα πειράματα της ζύμωσης η ενζυμική δραστηκότητα στα διαλύματα υδρόλυσης των 24 ωρών προέκυψε 2,833 Abs/min. Στο στέλεχος NRRL-3254, αντίστοιχα, ήταν 2,250 Abs/min. Τα δείγματα και των δύο μικροοργανισμών εμφάνισαν ξηρό βάρος βιομάζας

0,513mg/L και 0,667 mg/L στις 0 και 24 ώρες. Οι τιμές pH που καταγράφηκαν στα δείγματα και των δυο μικροοργανισμών ήταν 7,4 στα πρώτα δείγματα και 8,5 στα δείγματα των 24 ωρών. Στον *Alcaligenes faecalis* NRRL-1695 η πρωτεϊνική μάζα υπολογίστηκε στα 0,004mg και η ειδική ενζυμική δραστηριότητα 641,809 Units/mg πρωτεΐνης. Στον *Priestia megaterium* NRRL-3254 η πρωτεϊνική μάζα υπολογίστηκε επίσης στα 0,002mg και η ειδική ενζυμική δραστηριότητα 1462,101 Units/mg πρωτεΐνης.

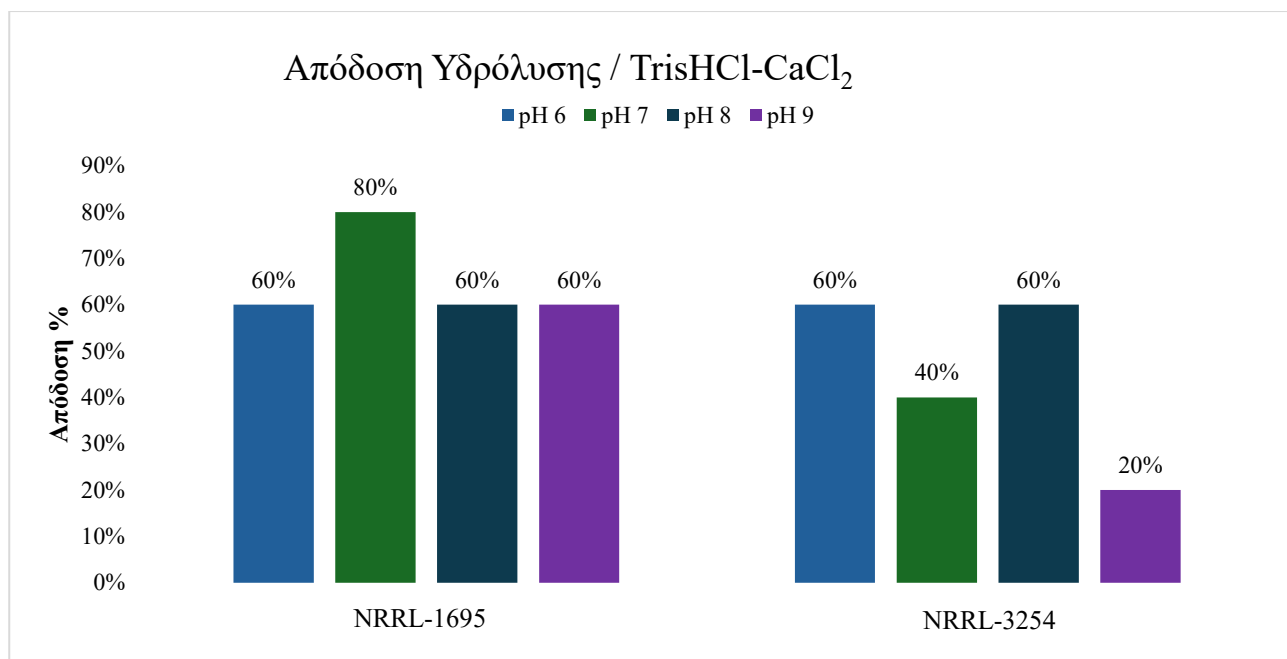


Γράφημα 15: Το ξηρό βάρος του PHB σε g/L στα διαλύματα υδρόλυσης όπου εμπεριέχεται TrisHCl-CaCl₂ pH 6, 7 και 9 των NRRL-1695 και NRRL-3254.

Όπως φαίνεται στο Γράφημα 15, το ξηρό βάρος του PHB στο διάλυμα υδρόλυσης του *A. faecalis* NRRL-1695 με Tris-HCl CaCl₂ pH 9, υπολογίστηκε στα 2g/L στις 48 ώρες. Στο διάλυμα με Tris-HCl CaCl₂ pH 7, το ξηρό βάρος του αποξηραμένου πολυμερούς ήταν 1g/L στις 48 ώρες. Στο διάλυμα όπου εμπεριέχονταν Tris-HCl CaCl₂ pH 6, η μάζα του αποξηραμένου PHB ήταν 2g/L στις 48 ώρες.

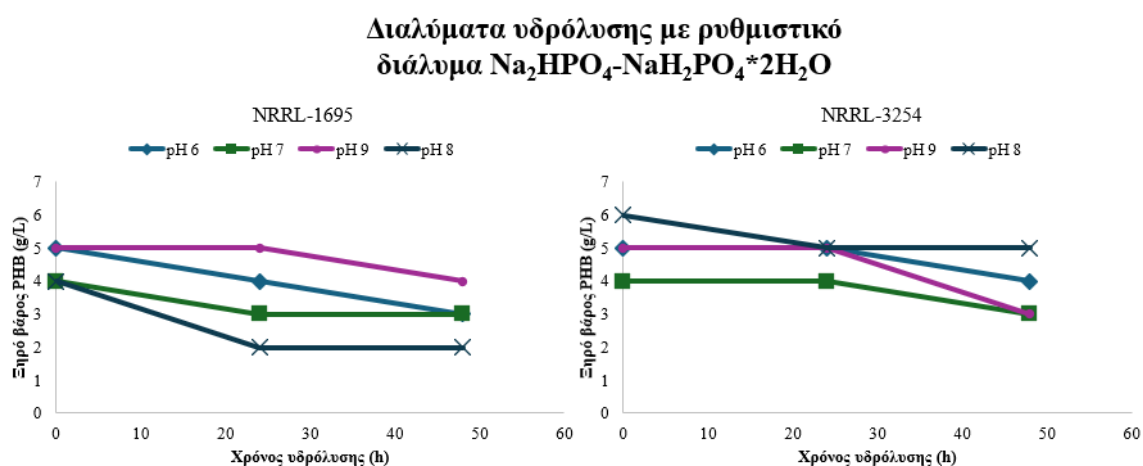
Στο διάλυμα υδρόλυσης αποπολυμερασών του *P. megaterium* NRRL-3254 με Tris-HCl CaCl₂ pH 9 το αποξηραμένο PHB καταγράφηκε στα 5g/L στο αρχικό δείγμα 4g/L στο δείγμα των 48 ωρών. Στο διάλυμα υδρόλυσης με Tris-HCl CaCl₂ pH 7 το ξηρό βάρος του PHB ήταν 2g/L. Τέλος, στο τελευταίο διάλυμα του *P. megaterium* NRRL-3254 με Tris-HCl CaCl₂ pH 6, σημειώθηκε 1g/L αποξηραμένου PHB.

Έπειτα, υπολογίστηκε το ποσοστό απόδοσης της υδρόλυσης στα διαλύματα που είχαν ως buffer Tris-HCl CaCl₂ με pH 6, 7 και 9 αντίστοιχα. Πιο συγκεκριμένα, η απόδοση υπολογίστηκε για τα δείγματα των 24 και 48 ωρών.



Γράφημα 16: Η απόδοση της υδρόλυσης στα διαλύματα όπου εμπεριέχεται TrisHCl-CaCl₂ pH 6,7 και 9 στις 48 ώρες υδρόλυσης. Η τελευταία μπάρα απεικονίζει την απόδοση των προηγούμενων διαλυμάτων υδρόλυσης με pH 8.

Στο Γράφημα 16 παρουσιάζονται οι τιμές της απόδοσης των 48 ωρών στα διαλύματα των μικροοργανισμών *A. faecalis* NRRL-1695 (αριστερά) και *P. megaterium* NRRL-3254 (δεξιά) στα οποία εμπεριέχεται TrisHCl-CaCl₂ pH 6,7, 8 και 9. Στα διαλύματα των αποπολυμερασών του NRRL-1695 η απόδοση υδρόλυσης προέκυψε 60% σε pH 6 και 9 και 80% σε pH 7. Στον *P. megaterium* NRRL-3254 η απόδοση υδρόλυσης ήταν 60% στο διάλυμα με pH 6, 40% στο διάλυμα με pH 7 και 20% στο διάλυμα με pH 9.



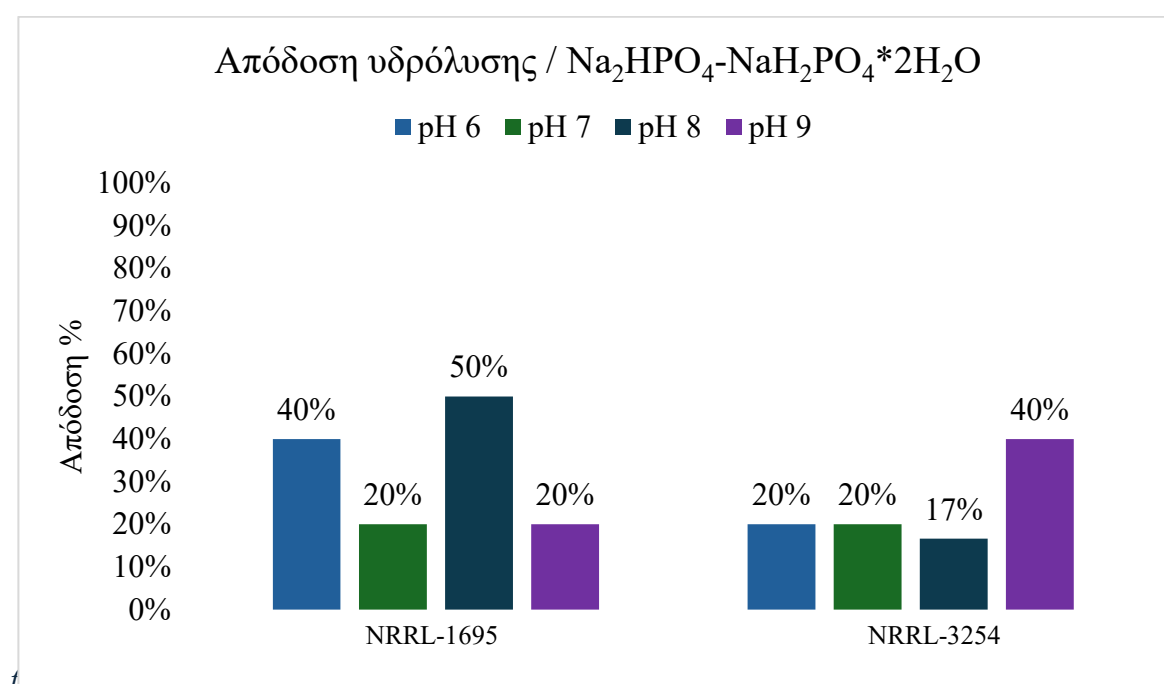
Γράφημα 17: Το ξηρό βάρος του PHB σε g/L όπου εμπεριέχεται Na₂HPO₄-NaH₂PO₄*2H₂O με pH 6, 7, 8 και 9 για τα στελέχη NRRL-1695 και NRRL-3254.

Στο διάλυμα με το υπερκείμενο της καλλιέργειας του *A. faecalis* NRRL-1695 με Na₂HPO₄-NaH₂PO₄*2H₂O pH 9, το PHB στα 4g/L στις 48 ώρες. Στο αντίστοιχο διάλυμα με

$\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ pH 7 υπολογίστηκαν 3g/L στις 48 ώρες. Στο διάλυμα με $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ pH 6 το ξηρό βάρος του ήταν 3g/L στις 48 ώρες.

Στο διάλυμα υδρόλυσης του *P. megaterium* NRRL-3254 με $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ pH 9, το αποξηραμένο PHB υπολογίστηκε στα 3g/L. Στο δεύτερο διάλυμα υδρόλυσης με $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ pH 7 καταγράφηκαν 3g/L PHB. Τέλος, στο διάλυμα υδρόλυσης με $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ pH 6, ήταν 4g/L στο δείγμα των 48 ωρών.

Ύστερα, υπολογίστηκε το ποσοστό απόδοσης της υδρόλυσης στα διαλύματα που είχαν ως buffer $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ pH 6,7 και 9 αντίστοιχα. Όπως προηγουμένως, η απόδοση υπολογίστηκε για τα δείγματα των 24 και 48 ωρών.



Γράφημα 18: Η απόδοση της υδρόλυσης στα διαλύματα όπου εμπεριέχεται $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ pH 6,7 και 9 στις 48 ώρες υδρόλυσης. Η τελευταία μπάρα απεικονίζει την απόδοση των προηγούμενων διαλυμάτων υδρόλυσης με pH 8.

Στο Γράφημα 18 απεικονίζονται οι αποδόσεις που καταγράφηκαν στα διαλύματα υδρόλυσης των δύο μικροοργανισμών. Αριστερά φαίνονται οι αποδόσεις στις 48 ώρες επώασης των διαλυμάτων που περιέχουν τις αποπολυμεράσεις του στελέχους NRRL-1695. Η απόδοση στο διάλυμα με pH 6 είναι 40 %, ενώ στα διαλύματα με pH 7 και pH 9 είναι 20%. Στα δεξιά έχουν καταγραφεί οι τιμές απόδοσης των διαλυμάτων υδρόλυσης του NRRL-3254 , όπου οι αποδόσεις για το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα είναι 20% σε pH 6 και pH 7 και 40% σε pH 9

Συζήτηση

Σε αυτή τη διπλωματική εργασία διερευνήθηκε η ενζυμική δραστικότητα των PHB αποπολυμερασών του *Alcaligenes faecalis* NRRL-1695 και *Priestia megaterium* NRRL 3254, NRRL3702 και NRRL-3703. Στα πειράματα ζύμωσης, οι παράμετροι που εξετάστηκαν αφορούσαν το μέσο της καλλιέργειας και τις διαφορετικές πηγές άνθρακα.

Συγκεκριμένα, τα μέσα που επιλέχθηκαν ήταν το MS (MS secretion) , το οποίο χρησιμοποιείται σε αρκετές έρευνες που αφορούν τη μελέτη των εξωκυτταρικών αποπολυμερασών του PHB (Delafield *et al.*, 1965; Stinson and Merrick, 1974) . Δεδομένου ότι η προσθήκη οργανικής πηγής αζώτου (εκχυλισμα ζύμης, πεπτόνη κ.α) συμβάλλει στην ενίσχυση της βακτηριακής ανάπτυξης και την ενζυμική παραγωγή, προστέθηκε 1 g/L εκχύλισμα ζύμης στο MS. Το θρεπτικό αυτό ονομάστηκε MSY. Το εκχύλισμα ζύμης αυξάνει σημαντικά την παραγωγή PHB αλλά και την ενζυμική δραστικότητα των αποπολυμερασών του PHB σε διάφορους μικροοργανισμούς (Wei *et al.*, 2011; Bano *et al.*, 2018). Αξίζει να σημειωθεί, πως σε παρόμοια έρευνα, που πραγματοποιήθηκε από τους Bano *et al.*, όπου μελετήθηκε η ενζυμική παραγωγή του βακτηρίου *P. Alvei* PHB28, πραγματοποιήθηκε αντικατάσταση της αρχικής πηγής αζώτου, δηλαδή του εκχυλίσματος ζύμης, η ενζυμική δραστικότητα των αποπολυμερασών μειώθηκε (Bano *et al.*, 2018). Επίσης χρησιμοποιήθηκε το DSM457 που προτείνεται από την εταιρεία DSMZ για την ανάπτυξη και παραγωγή αποπολυμερασών για τον *P. megaterium*.

Στην πειραματική διαδικασία όπου μελετήθηκε η ενζυμική δραστικότητα των αποπολυμερασών PHB των βακτηρίων *P.megaterium*, NRRL-3702, NRRL-3703 και NRRL - 3254 και *A. faecalis* NRRL-1695 με διαφορετικά μέσα καλλιέργειας, σημαντικά αποτελέσματα εμφάνισε το MS στις 25 ώρες επώασης (5,133 Units, 6,067 Units, 7,9 Units και 7,467 Units αντίστοιχα). Επιπλέον, παρουσιάστηκε η υψηλότερη ειδική ενζυμική δραστικότητα για όλους τους μικροοργανισμούς (370,130 Units/mg πρωτεΐνης, 380,520 Units/mg πρωτεΐνης, 330,198 Units/mg πρωτεΐνης και 482,112 Units/mg πρωτεΐνης).

Το μέσο MSY δεν φάνηκε να είναι τόσο ευνοϊκό όσο το MS για την ενζυμική παραγωγή. Η ενζυμική δραστικότητα υπολογίστηκε 4 Units στον *A.faecalis* NRRL-1695, 4,533 Units στον *P.megaterium* NRRL-3254 και 4,483 Units στον *P.megaterium* NRRL-3703. Αντίστοιχα οι ειδικές ενζυμικές δραστικότητες για αυτούς τους μικροοργανισμούς ήταν 63,374 Units/mg πρωτεΐνης , 187,481 Units/mg πρωτεΐνης και 71,139 Units/mg πρωτεΐνης. Εξάιρεση αποτέλεσε ο *P.megaterium* NRRL-3702, ο οποίος παρόλο που εμφάνισε μεγαλύτερη ενζυμική δραστικότητα, δηλαδή 5,96 Units, η ειδική ενζυμική δραστικότητα παρουσιάστηκε μικρότερη

από ότι στο MS (91,912 Units/mg πρωτεΐνης). Συνεπώς, παρατηρήθηκε μια μικρή βελτίωση σε ένα από τα βακτηριακά στελέχη, άρα ενδέχεται η ενισχυτική του ικανότητα να αφορά συγκεκριμένους μικροοργανισμούς. Τέλος, οι λιγότερο ευνοϊκές συνθήκες για την ενζυμική παραγωγή των PHB αποπολυμερασών βρέθηκαν στις καλλιέργειες με μέσο DSM457. Η ενζυμική δραστηριότητα ήταν μηδενική για το στέλεχος *A.faecalis* NRRL-1695, ενώ για το *P.megaterium* NRRL-3254 0,1 Units. Επιπλέον, για το *P.megaterium* NRRL-3702 προσδιορίστηκε 1,283 Units και για το *P.megaterium* NRRL-3703 0,967 Units. Η αντίστοιχη ενζυμική δραστηριότητα ήταν 3,73 Units/mg πρωτεΐνης για τον μικροοργανισμό *P.megaterium* NRRL-3254, 19,216 Units/mg πρωτεΐνης για τον *P.megaterium* NRRL-3702 και 44,23 Units/mg πρωτεΐνης για τον *P.megaterium* NRRL-3703.

Με σκοπό την εξέταση της σχέσης μεταξύ των ενδοκυτταρικών ενζύμων των μικροοργανισμών και της υδρόλυσης του PHB στη δοκιμασία προσδιορισμού της ενζυμικής δραστηριότητας, μελετήθηκε η έκφρασή τους από τις 6 ώρες και μετά. Παρατηρήθηκε ενζυμική δραστηριότητα σε όλα τα δείγματα που παραλήφθηκαν κατά τη διάρκεια των ζυμώσεων. Σε όλα τα διαφορετικά θρεπτικά, η ενζυμική δραστηριότητα των ενδοκυτταρικών ενζύμων είχε παρόμοιες τιμές με αυτή των εξωκυτταρικών ενζύμων. Παρόμοια αποτελέσματα σημειώθηκαν στην έρευνα των M. W. Stinson AND J. M. Merrick, όπου το συμπέρασμα που προέκυψε ήταν πως η σύνθεση των ενδοκυτταρικών ενζύμων γίνεται ανεξάρτητα από αυτή των εξωκυτταρικών στον *P. lemoignei*, σε καλλιέργειες με μέσο MS και πηγή άνθρακα το ηλεκτρικό οξύ (Stinson and Merrick, 1974).

Συσχετίζοντας τις τιμές του pH που καταγράφηκαν με την ενζυμική δραστηριότητα, προκύπτει το συμπέρασμα πως οι διακυμάνσεις του pH είναι άμεσα συνυφασμένες με την ενζυμική έκκριση. Κατά την κατανάλωση του ηλεκτρικού οξέος σημειώνεται αύξηση στο pH των καλλιεργειών στις 25 ώρες ζύμωσης για τις καλλιέργειες με MS και στις 24 ώρες για τις καλλιέργειες με MSY και DSM457. Τις ίδιες χρονικές στιγμές, η ενζυμική δραστηριότητα εμφάνισε σημαντικά αποτελέσματα σε όλους τους μικροοργανισμούς που αξιοποίησαν το MS και το MSY. Στο MSY σημειώθηκε αύξηση του pH σε όλους τους μικροοργανισμούς στις 24 και 48 ώρες. Συγκριτικά με τα υπόλοιπα μέσα καλλιέργειας το μέσο DMS457, που εμφάνισε τις μικρότερες ενζυμικές δραστηριότητες, είχε τις μεγαλύτερες τιμές pH, αφού στις 48 ώρες τα δείγματα των *A.faecalis* NRRL-1695 και *P.megaterium* NRRL-3254 είχαν pH 8,8 και 9,2 αντίστοιχα, ενώ το pH των δειγμάτων των *P.megaterium* NRRL-3702 και *P.megaterium* NRRL3703 έφτασε στο 9,1. Στην έρευνα των M. W. Stinson και J. M. Merrick, όπου μελετήθηκε η ενζυμική δραστηριότητα των εξωκυτταρικών ενζύμων του *P. lemoignei* προέκυψε εξάρτηση της ενζυμικής έκκρισης από τη συγκέντρωση της πηγής άνθρακα, δηλαδή το

ηλεκτρικό οξύ, και κατ' επέκταση του pH. Με τη μείωση της συγκέντρωσης του ηλεκτρικού οξέος σηματοδοτείται η έκκριση των ενζύμων (Stinson and Merrick, 1974).

Ωστόσο, όσον αφορά το μέσο DSM457, παρατηρείται κατανάλωση του ηλεκτρικού οξέος κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Άρα, η χαμηλή ενζυμική δραστικότητα που σημειώθηκε πιθανόν να οφείλεται σε κάποιον ανασταλτικό παράγοντα που εμπεριέχεται σε αυτό το μέσο. Η ανασταλτική ικανότητα του EDTA έναντι των PHB αποπολυμερασών του *Penicillium expansum* και του *Aeromonas caviae* Kukl-(34) έχει επιβεβαιωθεί στις έρευνες που πραγματοποιήθηκαν για τον καθαρισμό και τον χαρακτηρισμό αυτών των ενζύμων (S. and Shivakumar, 2015; Amir *et al.*, 2023). Συνεπώς, το DMS457, το οποίο περιέχει EDTA ενδέχεται να εμφανίζει ανασταλτική δράση έναντι των αποπολυμερασών του PHB.

Ακολούθησε η διαδικασία ενζυμικής παραγωγής αποπολυμερασών του PHB σε καλλιέργειες με διαφορετικές πηγές άνθρακα. Για την παραγωγή των ενζύμων χρησιμοποιήθηκαν τα βακτήρια *P.megaterium* NRRL-3254 και *A. faecalis* NRRL-1695. Το μέσο καλλιέργειας που επιλέχθηκε ήταν το MS, εφόσον αυτό παρουσίασε τις πιο ευνοϊκές συνθήκες για την μέγιστη ενζυμική παραγωγή.

Οι πηγές άνθρακα που προστέθηκαν στις καλλιέργειες ήταν η γλυκόζη το PHB και ηλεκτρικό οξύ. Η γλυκόζη αποτελεί σημαντικό υπόστρωμα που αξιοποιείται συχνά για τη βακτηριακή παραγωγή PHB λόγω της διαθεσιμότητάς της και της ευκολίας χρήσης της (Zhang *et al.*, 2022). Το PHB χρησιμοποιείται ως πηγή άνθρακα για την παραγωγή των αποπολυμερασών, εφόσον αυτές το διασπούν. Όπως διαπιστώθηκε και προηγουμένως, η κατανάλωση του ηλεκτρικού οξέος είναι περιορισμένη σε υψηλότερα επίπεδα pH. Ο περιορισμός αυτός ενεργοποιεί την έκκριση αποπολυμερασών PHB ενισχύοντας την δραστικότητα των ενζύμων (Terpe *et al.*, 1999).

Η οπτική πυκνότητα χρησιμοποιήθηκε ως μέθοδος για τον προσδιορισμό της βακτηριακής ανάπτυξης στις χρονικές στιγμές όπου πραγματοποιήθηκε η δειγματοληψία. Στα δείγματα γλυκόζης παρουσιάστηκαν οι υψηλότερες τιμές, ακολούθησε το PHB και τελευταίες κατατάχθηκαν οι τιμές του ηλεκτρικού οξέος. Οι τιμές της οπτικής πυκνότητας εμφάνισαν αύξηση στις 3 και 6 ώρες ζύμωσης, όπου οι τιμές ήταν και οι μέγιστες.

Τα εξωκυτταρικά ένζυμα εμφάνισαν τις μέγιστες ενζυμικές δραστικότητες, αλλά και ειδικές ενζυμικές δραστικότητες στα δείγματα των 48 ωρών. Τα ενδοκυτταρικά ένζυμα των καλλιεργειών με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη και το PHB εμφάνισαν χαμηλότερες ενζυμικές δραστικότητες στις 48 ώρες σε σχέση με τις μετρήσεις των 24 ωρών, με εξαίρεση αυτών της καλλιέργειας της γλυκόζης του στελέχους *A.faecalis* NRRL-1695. Στις καλλιέργειες του ηλεκτρικού οξέος η ενζυμική δραστικότητα των ενδοκυτταρικών ενζύμων παρουσίασε αύξηση.

Το μεγαλύτερο ξηρό βάρος εμφανίζουν τα δείγματα με PHB. Σε αυτά τα δείγματα το ίζημα περιέχει και την πηγή άνθρακα, καθώς το PHB δεν είναι υδατοδιαλυτό πολυμερές, συνεπώς μετά από έκπλυση δεν απομακρύνεται από το ίζημα. Ακολουθούν οι τιμές της γλυκόζης και στη συνέχεια του ηλεκτρικού οξέος. Παρόμοιο μοτίβο παρατηρείται και σε αυτή τη μέτρηση, καθώς σε όλα τα δείγματα παρουσιάστηκε αυξημένη βιομάζα στις 3 ώρες και στις 6 ώρες. Εξαίρεση αποτελεί η καλλιέργεια του *A.faecalis* NRRL-1695 που χρησιμοποίησε ως πηγή άνθρακα το ηλεκτρικό οξύ, εφόσον το ξηρό βάρος βιομάζας εμφανίζει μείωση.

Ενζυμική δραστηριότητα σε πολύ χαμηλές τιμές παρατηρήθηκε από τις 6 ώρες της ζύμωσης σε όλες τις καλλιέργειες. Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους S. Vigneswari et al., που αφορά την απομόνωση και την ταυτοποίηση του στελέχους *Acidovorax* DP5, αυτό εμφάνισε μέγιστη ενζυμική δραστηριότητα λίγο πριν τη στατική φάση ανάπτυξής του, δηλαδή στις 72 ώρες ζύμωσης (Vigneswari et al., 2015). Οι παρατηρήσεις αυτές οδηγούν στο συμπέρασμα πως σε όλες τις καλλιέργειες με γλυκόζη και PHB υπήρξε μία φάση ανάπτυξης των βακτηρίων, μέχρι τις 3 ώρες, όπου σημειώθηκαν και οι αυξήσεις της οπτικής πυκνότητας, αλλά και της βιομάζας. Όταν τα βακτήρια βρίσκονται υπό συνθήκες έλλειψης θρεπτικών, περνούν από την εκθετική φάση στην στατική (Paulová and Brányik, 2013). Η μετάβαση αυτή, σύμφωνα με τα διαγράμματα φαίνεται να συμβαίνει στις 6 ώρες ζύμωσης, όπου πραγματοποιείται και η ενζυμική έκκριση. Ωστόσο, δεν ήταν η μέγιστη, εφόσον σε αυτή την πειραματική διαδικασία οι μέγιστες ενζυμικές δραστηριότητες εμφανίστηκαν στις 48 ώρες.

Οι μεταβολές του pH που παρατηρήθηκαν και στους δύο μικροοργανισμούς είχαν τις ίδιες διακυμάνσεις. Στα δείγματα της γλυκόζης παρουσιάστηκε μείωση του pH κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, με εξαίρεση την καλλιέργεια του *A.faecalis* NRRL-1695 στις 6 ώρες ζύμωσης (pH 7,4). Το αποτέλεσμα αυτό είναι πιθανό να οφείλεται στην παραγωγή οργανικών οξέων από διαφορετικά μεταβολικά μονοπάτια, όπως για παράδειγμα οξικό οξύ (Sun et al., 2020), πριν την στατική φάση, όπου δεν αποτελεί κύριο μεταβολικό μονοπάτι ο κύκλος του PHB. Στις καλλιέργειες όπου χρησιμοποιήθηκε PHB το pH παρέμεινε σταθερό. Η κατανάλωση του PHB δεν αποτελεί διαδικασία που θα επηρεάσει το pH, εφόσον δεν προκύπτουν προϊόντα του μεταβολισμού που θα προκαλέσουν σημαντικές μεταβολές. Το ηλεκτρικό οξύ κατά την κατανάλωσή του οδηγεί σε αύξηση του pH, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως (Stinson and Merrick, 1974).

Τέλος, ακολούθησε προσδιορισμός του ανόργανου φωσφόρου. Πηγή ανόργανου φωσφόρου στις καλλιέργειες αυτές αποτελεί το ρυθμιστικό διάλυμα $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaHPO}_4$. Στα δείγματα της γλυκόζης και για τους δύο μικροοργανισμούς παρατηρήθηκε μείωση στις 6 ώρες, ενώ ακολούθησε αύξηση στις 24 και 48 ώρες. Επιπλέον, η κατανάλωση μεγάλης συγκέντρωσης

ανόργανου φωσφόρου ενδεχομένως να συσχετίζεται με τις απορρυθμίσεις στο pH, αφού αυτό παρουσιάζει αύξηση (7,4). Στα δείγματα του PHB σημαντική μείωση στη συγκέντρωση του ανόργανου φωσφόρου που παρατηρήθηκε ήταν στις 6 ώρες στο στέλεχος NRRL-1695. Στις 24 ώρες σημειώθηκε περαιτέρω κατανάλωση του ανόργανου φωσφόρου. Στο ίδιο δείγμα των 24 ωρών παρατηρείται μια μηδαμινή μείωση στο pH. Το pH στις καλλιέργειες με πηγή άνθρακα το ηλεκτρικό οξύ παρουσίασε αύξηση στις 6 ώρες και για τους δύο μικροοργανισμούς. Αντίστοιχα, η συγκέντρωση του ανόργανου φωσφόρου την ίδια χρονική στιγμή μειώθηκε. Ωστόσο η μείωση της συγκέντρωσης του ανόργανου φωσφόρου στις 6 ώρες ζύμωσης του *P.megaterium* NRRL-3254 δεν ήταν τόσο σημαντική. Η αύξηση του ανόργανου φωσφόρου στις 48 ώρες στις καλλιέργειες γλυκόζης και PHB του *A.faecalis* NRRL-1695 και στην καλλιέργεια γλυκόζης του *P.megaterium* NRRL-3254 είναι αποτέλεσμα βακτηριακής λύσης, και συνεπώς απελευθέρωσης ανόργανου φωσφόρου. Συμπερασματικά, η κατανάλωση του ανόργανου φωσφόρου ξεκινά στις 6 ώρες ζύμωσης, όπως και η στατική φάση των καλλιεργειών. Συνεπώς είναι αμεσα συνυφασμένος με την ενζυμική έκκριση των PHB αποπολυμερασών.

Συγκρίνοντας τις καλλιέργειες με πηγή άνθρακα το ηλεκτρικό οξύ και μέσο MS στα δύο πειράματα, παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στις τιμές ενζυμικής δραστηριότητας των στελεχών NRRL-1695 και NRRL-3254. Δεδομένου ότι οι μέγιστες ενζυμικές δραστηριότητες στο αρχικό πείραμα επιλογής μέσου καλλιέργειας προέκυψαν 7,467 Units και 7,9 Units, ενώ στο δεύτερο πείραμα 12,47 Units και 13,70 Units αντίστοιχα, ενδέχεται η διαφορά αυτή να μπορεί να ερμηνευτεί από τις διαφορετικές διακυμάνσεις στα pH. Οι διακυμάνσεις των τιμών του στο πρώτο πείραμα είναι μικρότερες. Συνεπώς, υπήρξε μικρότερη κατανάλωση του ηλεκτρικού οξέος, άρα και μικρότερος βαθμός ανάπτυξης των μικροοργανισμών.

Τέλος, εξετάστηκε η απόδοση της υδρόλυσης τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων (10g/L, 5g/L και 3g/L) του PHB σε μορφή σκόνης, σε δύο διαφορετικά buffers με pH 8. Σε όλα τα διαλύματα με αρχική συγκέντρωση PHB 3 g/L και στους δύο μικροοργανισμούς, σημειώθηκε η μέγιστη απόδοση, που ήταν 67%. Στα διαλύματα υδρόλυσης όπου η αρχική συγκέντρωση του PHB ήταν 10 g/L, η απόδοση ήταν 8% για το στέλεχος *A.faecalis* NRRL-1695 και μηδενική για το στέλεχος *P.megaterium* NRRL-3254. Τα αποτελέσματα αυτού του πειράματος δεν ήταν ικανοποιητικά για τα διαλύματα με αρχική συγκέντρωση PHB 10g/L. Δεν καταγράφηκε διάσπαση του πολυμερούς από τα ένζυμα των καλλιεργειών, παρόλο που αυτά εμφάνισαν δραστηριότητα στις 24 ώρες, με βάση τις χημικές μεθόδους που εφαρμόστηκαν κατά τη διάρκεια του πειράματος ζύμωσης. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται σε σφάλματα κατά το ζύγισμα των Eppendorf στην αρχή της δοκιμασίας, ή κατά το ζύγισμα του PHB στο πέρας αυτής, λόγω ελαττωματικού ζυγού. Επιπλέον, κατά την επώαση και ανάδευση των διαλυμάτων

υδρόλυσης, ενδέχεται κάποιοι από τους μαγνήτες ανάδευσης να ακινητοποιήθηκαν εάν οι Duran βρίσκονταν πολύ κοντά μεταξύ τους. Τέλος, ίσως κατά τη δειγματοληψία να μην πραγματοποιήθηκε σωστή ανάδευση, με αποτέλεσμα τη λήψη μεγάλης ποσότητας PHB ανά δείγμα. Ωστόσο, η έντονη απόκλιση που εμφάνισαν τα αποτελέσματα, η προσπάθεια ελέγχου των παραπάνω παραμέτρων, καθώς και η εξέταση διαφορετικών διαλυμάτων υδρόλυσης με μικρότερες συγκεντρώσεις PHB, οδήγησαν στο συμπέρασμα πως η συγκεκριμένη συγκέντρωση που προστέθηκε στα διαλύματα υδρόλυσης ήταν παρεμποδιστική για τη δράση των ενζύμων.

Το γεγονός ότι οι αυξημένες συγκεντρώσεις του PHB παρεμποδίζουν τη διάσπασή του πολυμερούς από τις αποπολυμεράσες του PHB έχει διαπιστωθεί από αρκετές έρευνες, στις οποίες το PHB χρησιμοποιείται ως πηγή άνθρακα. Για παράδειγμα, στην έρευνα των S. Vigneswari et al. , όπου πραγματοποιήθηκε η απομόνωση του *Acidovorax sp* DP5 και ο προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας των εξωκυτταρικών του αποπολυμερασών , σε θρεπτικό με Mineral salt Medium (MSM), προστέθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις PHB (1g/L - 7,5g/L). Η υψηλότερη δραστηριότητα παρατηρήθηκε με συγκέντρωση PHB 1,5g/L, ενώ υψηλότερες ή χαμηλότερες συγκεντρώσεις οδήγησαν σε καταστολή ή μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας των αποπολυμερασών του PHB (Vigneswari et al., 2015).

Εφόσον, λοιπόν, τα 10g/L αποτελούν περιοριστική συγκέντρωση ως προς την δράση των αποπολυμερασών του PHB, και οι μέγιστες αποδόσεις παρατηρήθηκαν στα με 3g/L σκόνης PHB, για την βελτιστοποίηση της υδρόλυσης του PHB σε ρυθμιστικά διαλύματα με διαφορετικά pH, επιλέχθηκε η συγκέντρωση των 5g/L PHB. Τα διαλύματα με αυτή την αρχική ποσότητα εμφάνισαν αποτελέσματα με σημαντικά περιθώρια βελτιστοποίησης, καθώς δεν ήταν ούτε εξαιρετικά αλλά ούτε και απογοητευτικά.

Η διαδικασία βελτιστοποίησης επικεντρώθηκε στην μελέτη της ικανότητας υδρόλυσης των ενζύμων σε διαλύματα με ρυθμιστικό διάλυμα TrisHCl-CaCl₂ και Na₂HPO₄-NaH₂PO₄*2H₂O, με pH 6,7 και 9 αντίστοιχα. Το διάλυμα του *A.faecalis* NRRL-1695 με TrisHCl-CaCl₂ με pH 7 εμφάνισε απόδοση 80% στις 48 ώρες. Από την άλλη, τα ρυθμιστικά διαλύματα TrisHCl-CaCl₂ με pH 7 και 8 φάνηκαν πιο ευνοϊκά για τις αποπολυμεράσες του *P.megaterium* NRRL-3254, καθώς εκεί σημειώθηκε η μέγιστη απόδοσή τους, που ήταν επίσης 60%. Στα διαλύματα με ρυθμιστικό διάλυμα Na₂HPO₄-NaH₂PO₄*2H₂O απόδοση ήταν εμφανώς χαμηλότερη.

Το ρυθμιστικό διάλυμα TrisHCl-CaCl₂ αξιοποιείται σε δοκιμασίες ενζυμικής δραστηριότητας των PHB αποπολυμερασών, λόγω της ικανότητας διατήρησης του pH σε ιδανικές συνθήκες για την ενζυμική δράση, εφόσον παρεμποδίζει τις ακραίες διακυμάνσεις που μπορεί να οδηγήσουν σε μετουσίωση ή απώλεια δραστηριότητας. Τα ιόντα Ca²⁺ λειτουργούν ως

συμπαράγοντες των αποπολυμερασών, συμβάλλοντας στην διατήρηση της σταθερότητας και της δραστικότητάς τους. Το $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ είναι ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο ρυθμιστικό διάλυμα σε διάφορες βιολογικές εφαρμογές ,ωστόσο δεν χρησιμοποιείται σε δοκιμασίες υδρόλυσης για τον προσδιορισμό της ενζυμικής δραστικότητας. Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, προκύπτει το συμπέρασμα πως το συγκεκριμένο ρυθμιστικό διάλυμα παρεμπόδιζε σε ένα βαθμό την δραστικότητα των αποπολυμερασών.

Τα αποτελέσματα ήταν ιδιαίτερος ενθαρρυντικά, καθώς ήταν δυνατός ο εντοπισμός μη παρεμποδιστικής συγκέντρωσης PHB, ενώ παρατηρήθηκε ικανοποιητική διάσπαση στα διαλύματα υδρόλυσης με ρυθμιστικό διάλυμα TrisHCl-CaCl_2 . Επιπλέον, υπάρχουν πολλές άλλες παράμετροι που μπορούν να εξεταστούν, γεγονός που ανοίγει πολλές προοπτικές για μελλοντική έρευνα και περεταίρω βελτιστοποίηση. Είναι δυνατή η εξέταση πολλών ακόμα παραμέτρων, όπως είναι η χρήση διαφορετικών ρυθμιστικών διαλυμάτων, οι διαφορετικές θερμοκρασίες και pH υδρόλυσης, καθώς και οι διαφορετικές συγκεντρώσεις PHB.

Συμπεράσματα

Το πλαστικό αποτελεί βασικό βιομηχανικό προϊόν της σύγχρονης εποχής, αποτελώντας ένα αγαθό με τεράστια συμβολή σε πολλούς τομείς. Παρόλα αυτά η μαζική του παραγωγή και η μη ορθή διαχείριση των πλαστικών αποβλήτων, το καθιστούν έναν από τους πιο επιβλαβείς ρύπους των χερσαίων και υδάτινων περιβαλλόντων. Επιπλέον, η παραγωγή των πετρελαιο-πλαστικών συμβάλλει στην ταχεία εξάλειψη μη ανανεώσιμων πηγών ενέργειας. Συνεπώς, έχει δημιουργηθεί μεγάλη ανάγκη αξιοποίησης φθηνών, βιώσιμων, ανανεώσιμων και φιλικών προς το περιβάλλον εναλλακτικών. Μία από αυτές τις εναλλακτικές είναι οι πολύ-υδροξυ-αλκανοϊκοί εστέρες (PHAs) και πιο συγκεκριμένα ο πολύ-υδροξυ-βουτυρικός εστέρας (PHB). Το PHB είναι ένα θερμοπλαστικό πολυμερές που μπορεί να αντικαταστήσει τα πετρέλαιο-πλαστικά , εφόσον είναι βιοσυμβατό, βιοδιασπώμενο και μη τοξικό. Το PHB λειτουργεί ως αποθήκη ενέργειας και άνθρακα για τους μικροοργανισμούς, συνεπώς οι ίδιοι μικροοργανισμοί που το παράγουν μπορούν να το διασπάσουν. Η διάσπαση του πολυμερούς αυτού πραγματοποιείται από τις ενδοκυτταρικές και τις εξωκυτταρικές αποπολυμεράσες του PHB. Η εξέταση της ενζυμικής δραστικότητας των αποπολυμερασών του PHB σε διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειών έχει αποτελέσει αντικείμενο αρκετών μελετών.

Σε αυτή τη διπλωματική εργασία διερευνήθηκε η ενζυμική δραστικότητα των PHB αποπολυμερασών του *Alcaligenes faecalis* NRRL-1695 και *Priestia Megaterium* NRRL-3254,

NRRL-3702 και NRRL-3703. Στα πειράματα ζύμωσης, οι παράμετροι που εξετάστηκαν αφορούσαν το μέσο της καλλιέργειας και τις διαφορετικές πηγές άνθρακα.

Το κατάλληλο μέσο καλλιέργειας στο οποίο παρουσιάστηκε η μεγαλύτερη ενζυμική δραστηριότητα των PHB αποπολυμερασών αποτέλεσε το μέσο MS. Το MSY δεν φάνηκε να είναι τόσο ευνοϊκό. Τέλος, οι λιγότερο ευνοϊκές συνθήκες για την ενζυμική παραγωγή των PHB αποπολυμερασών βρέθηκαν στις καλλιέργειες με μέσο DSM457 λόγω της παρουσίας EDTA, που δρα ανασταλτικά έναντι των αποπολυμερασών του PHB.

Ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα πηγή άνθρακα αποτέλεσε το ηλεκτρικό οξύ, εφόσον κατέχει την ικανότητα να προκαλέσει ενζυμική έκκριση σε μεγάλο βαθμό σε σύγκριση με τις υπόλοιπες πηγές άνθρακα που εξετάστηκαν. Επιπλέον, η παραγωγή των PHB αποπολυμερασών σε καλλιέργειες με ηλεκτρικό οξύ, συσχετίζεται άμεσα με το pH. Επιπρόσθετα, το ηλεκτρικό οξύ, αποτελώντας ένα βασικό συστατικό στην παραγωγή βιοδιασπώμενων πολυμερών, κατέχει σημαντικές δυνατότητες αξιοποίησης τόσο για την παραγωγή PHB όσο και για τη διάσπασή του. Επομένως, το ηλεκτρικό οξύ είναι μια πηγή άνθρακα που όχι μόνο συμβάλλει αποτελεσματικά στην παραγωγή των αποπολυμερασών του PHB, αλλά η αποικοδόμηση της μπορεί να φανεί συμφέρουσα περιβαλλοντικά και οικονομικά.

Επιπλέον εξετάστηκε και η υδρόλυση του PHB σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, σε δύο διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα με pH 6, 7, 8 και 9 αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα ήταν ιδιαίτερος ενθαρρυντικά, καθώς ήταν δυνατή η εύρεση μη παρεμποδιστικής συγκέντρωσης PHB, αλλά και η βελτιστοποίηση της διαδικασίας υδρόλυσης. Η μεγαλύτερη διάσπαση πραγματοποιήθηκε σε διαλύματα υδρόλυσης που περιείχαν ρυθμιστικό διάλυμα TrisHCl-CaCl₂. Για τον *A.faecalis* NRRL-1695 η μεγαλύτερη απόδοση σημειώθηκε σε pH 7, ενώ για τον *P.megaterium* NRRL-3254 το καταλληλότερο ρυθμιστικό διάλυμα ήταν αυτό με pH 8 και pH 6. Υπάρχουν πολλές ακόμη παράμετροι που μπορούν να εξεταστούν, με σκοπό τη βελτιστοποίηση της ενζυμικής διάσπασης του PHB. Αρχικά, είναι δυνατή η κατηγοριοποίηση των προς μελέτη αποπολυμερασών, με βάση τα προϊόντα διάσπασης, μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης. Στη συνέχεια, τα διαλύματα υδρόλυσης που δημιουργούνται, με τα γνωστά πλέον προϊόντα διάσπασης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως θρεπτικά συστατικά για νέες ζυμώσεις που αποσκοπούν στη βελτιστοποίηση της παραγωγής αλλά και της διάσπασης του PHB.

Συνεπώς, με την κατανόηση των μηχανισμών διάσπασης και τη βελτιστοποίηση της παραγωγής των αποπολυμερασών του PHB, είναι δυνατή η δημιουργία ενός κύκλου παραγωγής, βιο-διάσπασης αλλά και ανακύκλωσης του. Το γεγονός αυτό καθιστά το PHB σημαντική εναλλακτική έναντι των πετρελαιο-πλαστικών, εφόσον συμβαδίζει με τις αρχές της

κυκλικής οικονομίας και είναι φιλικό προς το περιβάλλον. Σε έναν πλανήτη που πλήττεται από πλαστικά σκουπίδια, οι πολύ-υδροξυβουτυρικοί εστέρες και γενικότερα τα βιοπλαστικά μπορούν να θέσουν τα θεμέλια για ένα καθαρότερο και πιο βιώσιμο μέλλον.

Βιβλιογραφία

- Abe, H. and Doi, Y. (1999) 'Structural effects on enzymatic degradabilities for poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] and its copolymers', *International Journal of Biological Macromolecules*, 25(1), pp. 185–192. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(99\)00033-1](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(99)00033-1).
- Ali, S.S. *et al.* (2022) 'Biowastes for biodegradable bioplastics production and end-of-life scenarios in circular bioeconomy and biorefinery concept', *Bioresource Technology*, 363, p. 127869. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127869>.
- Altaee, N. *et al.* (2016) 'Biodegradation of different formulations of polyhydroxybutyrate films in soil', *SpringerPlus*, 5(1), p. 762. Available at: <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2480-2>.
- Amir, M. *et al.* (2023) 'Purification and characterization of extracellular PHB depolymerase enzyme from *Aeromonas caviae* Kuk1-(34) and their biodegradation studies with polymer films', *Biodegradation*, 35. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10532-023-10051-4>.
- Atanasova, N. *et al.* (2021) 'Plastic Degradation by Extremophilic Bacteria', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), p. 5610. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms22115610>.
- Bachmann, M. *et al.* (2023) 'Towards circular plastics within planetary boundaries', *Nature Sustainability*, 6, pp. 1–12. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41893-022-01054-9>.
- Bano, K. *et al.* (2018) 'A novel, thermotolerant, extracellular PHB depolymerase producer *Paenibacillus alvei* PHB28 for bioremediation of biodegradable plastics', *Turkish Journal of Biochemistry*, 44, pp. 344–353. Available at: <https://doi.org/10.1515/tjb-2018-0207>.
- Boey, J.Y. *et al.* (2021) 'A Review of the Applications and Biodegradation of Polyhydroxyalkanoates and Poly(lactic acid) and Its Composites', *Polymers*, 13(10), p. 1544. Available at: <https://doi.org/10.3390/polym13101544>.
- Cai, G., Driscoll, B.T. and Charles, T.C. (2000) 'Requirement for the Enzymes Acetoacetyl Coenzyme A Synthetase and Poly-3-Hydroxybutyrate (PHB) Synthase for Growth of *Sinorhizobium meliloti* on PHB Cycle Intermediates', *Journal of Bacteriology*, 182(8), pp. 2113–2118. Available at: <https://doi.org/10.1128/jb.182.8.2113-2118.2000>.
- Chae, Y. and An, Y.-J. (2018) 'Current research trends on plastic pollution and ecological impacts on the soil ecosystem: A review', *Environmental Pollution*, 240, pp. 387–395. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.05.008>.
- Chandel, N.S. (2021) 'Glycolysis', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 13(5), p. a040535. Available at: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a040535>.
- Chanprateep, S. (2010) 'Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates', *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110(6), pp. 621–632. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.07.014>.

- Chen, H.-J., Pan, S.-C. and Shaw, G.-C. (2009) 'Identification and Characterization of a Novel Intracellular Poly(3-Hydroxybutyrate) Depolymerase from *Bacillus megaterium*', *Applied and Environmental Microbiology*, 75(16), pp. 5290–5299. Available at: <https://doi.org/10.1128/AEM.00621-09>.
- Dawes, E.A. and Senior, P.J. (1973) 'The Role and Regulation of Energy Reserve Polymers in Micro-organisms', in A.H. Rose and D.W. Tempest (eds) *Advances in Microbial Physiology*. Academic Press, pp. 135–266. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)60088-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)60088-0).
- Delafield, F.P. *et al.* (1965) 'Decomposition of Poly- β -Hydroxybutyrate by Pseudomonads', *Journal of Bacteriology*, 90(5), pp. 1455–1466. Available at: <https://doi.org/10.1128/jb.90.5.1455-1466.1965>.
- Dobrogojski, J. *et al.* (2018) 'Transgenic plants as a source of polyhydroxyalkanoates', *Acta Physiologiae Plantarum*, 40(9), p. 162. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11738-018-2742-4>.
- Eggers, J. and Steinbüchel, A. (2013) 'Poly(3-Hydroxybutyrate) Degradation in *Ralstonia eutropha* H16 Is Mediated Stereoselectively to (S)-3-Hydroxybutyryl Coenzyme A (CoA) via Crotonyl-CoA', *Journal of Bacteriology*, 195(14), pp. 3213–3223. Available at: <https://doi.org/10.1128/jb.00358-13>.
- Engelhart-Straub, S. *et al.* (2023) 'Optimization of *Rhodococcus erythropolis* JCM3201T Nutrient Media to Improve Biomass, Lipid, and Carotenoid Yield Using Response Surface Methodology', *Microorganisms*, 11(9), p. 2147. Available at: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11092147>.
- García-Hidalgo, J. *et al.* (2013) 'Novel Extracellular PHB Depolymerase from *Streptomyces ascomycinicus*: PHB Copolymers Degradation in Acidic Conditions', *PLOS ONE*, 8(8), p. e71699. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071699>.
- Gebauer, B. and Jendrossek, D. (2006) 'Assay of Poly(3-Hydroxybutyrate) Depolymerase Activity and Product Determination', *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9), pp. 6094–6100. Available at: <https://doi.org/10.1128/AEM.01184-06>.
- Geyer, R., Jambeck, J.R. and Law, K.L. (2017) 'Production, use, and fate of all plastics ever made', *Science Advances*, 3(7), p. e1700782. Available at: <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700782>.
- Global Plastics Outlook* (no date). Available at: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/data/global-plastic-outlook_c0821f81-en (Accessed: 22 September 2024).
- Hachisuka, S.-I. *et al.* (2023) 'Isolation and characterization of polyhydroxyalkanoate-degrading bacteria in seawater at two different depths from Suruga Bay', *Applied and Environmental Microbiology*, 89(11), p. e0148823. Available at: <https://doi.org/10.1128/aem.01488-23>.
- Hagagy, N. *et al.* (2022) 'Characterization of Polyhydroxybutyrate, PHB, Synthesized by Newly Isolated Haloarchaea *Halolamina* spp.', *Molecules*, 27(21), p. 7366. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules27217366>.

- Handrick, R. *et al.* (2004) ‘The “Intracellular” Poly(3-Hydroxybutyrate) (PHB) Depolymerase of *Rhodospirillum rubrum* Is a Periplasm-Located Protein with Specificity for Native PHB and with Structural Similarity to Extracellular PHB Depolymerases’, *Journal of Bacteriology*, 186(21), pp. 7243–7253. Available at: <https://doi.org/10.1128/jb.186.21.7243-7253.2004>.
- Hisano, T. *et al.* (2006) ‘The Crystal Structure of Polyhydroxybutyrate Depolymerase from *Penicillium funiculosum* Provides Insights into the Recognition and Degradation of Biopolyesters’, *Journal of Molecular Biology*, 356(4), pp. 993–1004. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.12.028>.
- Jacquín, J. *et al.* (2019) ‘Microbial Ecotoxicology of Marine Plastic Debris: A Review on Colonization and Biodegradation by the “Plastisphere”’, *Frontiers in Microbiology*, 10. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00865>.
- Khanna, S. and Srivastava, A.K. (2005) ‘Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates’, *Process Biochemistry*, 40(2), pp. 607–619. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.01.053>.
- Kita, K. *et al.* (1995) ‘Properties of poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from a marine bacterium, *Alcaligenes faecalis* AE122.’, *Applied and Environmental Microbiology*, 61(5), pp. 1727–1730.
- Knoll, M. *et al.* (2009) ‘The PHA Depolymerase Engineering Database: A systematic analysis tool for the diverse family of polyhydroxyalkanoate (PHA) depolymerases’, *BMC Bioinformatics*, 10(1), p. 89. Available at: <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-89>.
- Kovalcik, A. *et al.* (2020) ‘Enzymatic Hydrolysis of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) Scaffolds’, *Materials*, 13(13), p. 2992. Available at: <https://doi.org/10.3390/ma13132992>.
- Landrigan, P.J. *et al.* (2023) ‘The Minderoo-Monaco Commission on Plastics and Human Health’, *Annals of Global Health*, 89(1). Available at: <https://doi.org/10.5334/aogh.4056>.
- Liu, L.-Y. *et al.* (2020) ‘Biological conversion of methane to polyhydroxyalkanoates: Current advances, challenges, and perspectives’, *Environmental Science and Ecotechnology*, 2, p. 100029. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.es.2020.100029>.
- Lusher, A., Hollman, P.C.H. and Mendoza-Hill, J. (2017) *Microplastics in fisheries and aquaculture: status of knowledge on their occurrence and implications for aquatic organisms and food safety*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO fisheries and aquaculture technical paper, 615).
- McAdam, B. *et al.* (2020) ‘Production of Polyhydroxybutyrate (PHB) and Factors Impacting Its Chemical and Mechanical Characteristics’, *Polymers*, 12(12), p. 2908. Available at: <https://doi.org/10.3390/polym12122908>.
- Miu, D.-M., Eremia, M.C. and Moscovici, M. (2022) ‘Polyhydroxyalkanoates (PHAs) as Biomaterials in Tissue Engineering: Production, Isolation, Characterization’, *Materials (Basel, Switzerland)*, 15(4), p. 1410. Available at: <https://doi.org/10.3390/ma15041410>.

- Monie, F. *et al.* (2021) ‘Self-foaming polymers: Opportunities for the next generation of personal protective equipment’, *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 145, p. 100628. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mser.2021.100628>.
- Narancic, T. *et al.* (2020) ‘Recent Advances in Bioplastics: Application and Biodegradation’, *Polymers*, 12(4), p. 920. Available at: <https://doi.org/10.3390/polym12040920>.
- Nojiri, M. and Saito, T. (1997) ‘Structure and function of poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Alcaligenes faecalis* T1.’, *Journal of Bacteriology*, 179(22), pp. 6965–6970.
- Patel, D. *et al.* (2022) ‘Rogue one: A plastic story’, *Marine Pollution Bulletin*, 177, p. 113509. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2022.113509>.
- Paulová, L. and Brányik, T. (2013) ‘Advanced Fermentation Processes’, in, pp. 89–105. Available at: <https://doi.org/10.1201/b15426-6>.
- Peoples, O.P. and Sinskey, A.J. (1989) ‘Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16’, *Journal of Biological Chemistry*, 264(26), pp. 15298–15303. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)84825-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)84825-1).
- Plastics – the fast Facts 2023 • Plastics Europe* (no date) *Plastics Europe*. Available at: <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-fast-facts-2023/> (Accessed: 22 September 2024).
- Puppi, D., Pecorini, G. and Federica, C. (2019) ‘Biomedical Processing of Polyhydroxyalkanoates’, *Bioengineering*, 6. Available at: <https://doi.org/10.3390/bioengineering6040108>.
- Ray, S. and Kalia, V.C. (2017) ‘Microbial Cometabolism and Polyhydroxyalkanoate Copolymers’, *Indian Journal of Microbiology*, 57(1), pp. 39–47. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12088-016-0622-4>.
- Reusch, R.N. (2013) ‘The Role of Short-Chain Conjugated Poly-(R)-3-Hydroxybutyrate (cPHB) in Protein Folding’, *International Journal of Molecular Sciences*, 14(6), pp. 10727–10748. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms140610727>.
- S., V. and Shivakumar, S. (2015) ‘Poly(- β -hydroxybutyrate) (PHB) depolymerase PHAZ Pen from *Penicillium expansum*: purification, characterization and kinetic studies’, *3 Biotech*, 5. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13205-015-0287-4>.
- Sayyed, R.Z. *et al.* (2019) ‘Purification and kinetics of the PHB depolymerase of *Microbacterium paraoxydans* RZS6 isolated from a dumping yard’, *PLOS ONE*. Edited by P. Kumar, 14(6), p. e0212324. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212324>.
- Shi, L. and Tu, B.P. (2015) ‘Acetyl-CoA and the Regulation of Metabolism: Mechanisms and Consequences’, *Current opinion in cell biology*, 33, pp. 125–131. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.02.003>.
- Shivakumar, S. *et al.* (2011) ‘Purification, Characterization and Kinetic Studies of a Novel Poly(β) Hydroxybutyrate (PHB) Depolymerase PhaZ Pen from *Penicillium citrinum* S2’,

Applied Biochemistry and Biotechnology, 164(8), pp. 1225–1236. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9208-0>.

Singh, M. *et al.* (2015) ‘Challenges and Opportunities for Customizing Polyhydroxyalkanoates’, *Indian Journal of Microbiology*, 55(3), pp. 235–249. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12088-015-0528-6>.

Stinson, M.W. and Merrick, J.M. (1974) ‘Extracellular Enzyme Secretion by *Pseudomonas lemoignei*’, *Journal of Bacteriology*, 119(1), pp. 152–161.

Sun, S. *et al.* (2020) ‘Comparison of Glucose, Acetate and Ethanol as Carbon Resource for Production of Poly(3-Hydroxybutyrate) and Other Acetyl-CoA Derivatives’, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, p. 833. Available at: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00833>.

Surendran, A. *et al.* (2020) ‘Can Polyhydroxyalkanoates Be Produced Efficiently From Waste Plant and Animal Oils?’, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. Available at: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00169>.

Suzuki, M., Tachibana, Y. and Kasuya, K.-I. (2020) ‘Biodegradability of poly(3-hydroxyalkanoate) and poly(ϵ - caprolactone) via biological carbon cycles in marine environments’, *Polymer Journal*, 53. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41428-020-00396-5>.

Terpe, K. *et al.* (1999) ‘Relationship between Succinate Transport and Production of Extracellular Poly(3-Hydroxybutyrate) Depolymerase in *Pseudomonas lemoignei*’, *Applied and Environmental Microbiology*, 65(4), pp. 1703–1709.

Thomas, G.M. *et al.* (2022) ‘Bioplastic degradation by a polyhydroxybutyrate depolymerase from a thermophilic soil bacterium’, *Protein Science*, 31(11), p. e4470. Available at: <https://doi.org/10.1002/pro.4470>.

Turco, R. *et al.* (2020) ‘In vivo and Post-synthesis Strategies to Enhance the Properties of PHB-Based Materials: A Review’, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, p. 619266. Available at: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.619266>.

Vigneswari, S. *et al.* (2015) ‘Extracellular Polyhydroxyalkanoate Depolymerase by *Acidovorax* sp. DP5’, *Enzyme Research*, 2015, p. 212159. Available at: <https://doi.org/10.1155/2015/212159>.

Vlaeminck, E. *et al.* (2022) ‘Industrial side streams as sustainable substrates for microbial production of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB)’, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 38(12), p. 238. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03416-z>.

Wani, S.J. *et al.* (2016) ‘*Stenotrophomonas* sp. RZS 7, a novel PHB degrader isolated from plastic contaminated soil in Shahada, Maharashtra, Western India’, *3 Biotech*, 6(2), p. 179. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0477-8>.

Wei, R. and Zimmermann, W. (2017) ‘Microbial enzymes for the recycling of recalcitrant petroleum-based plastics: how far are we?’, *Microbial Biotechnology*, 10(6), pp. 1308–1322. Available at: <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12710>.

Wei, Y.-H. *et al.* (2011) ‘Biodegradable and Biocompatible Biomaterial, Polyhydroxybutyrate, Produced by an Indigenous *Vibrio* sp. BM-1 Isolated from Marine Environment’, *Marine Drugs*, 9(4), pp. 615–624. Available at: <https://doi.org/10.3390/md9040615>.

Wu, C.-S. and Liao, H.-T. (2014) ‘The mechanical properties, biocompatibility and biodegradability of chestnut shell fibre and polyhydroxyalkanoate composites’, *Polymer Degradation and Stability*, 99, pp. 274–282. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2013.10.019>.

Wu, Q., Wang, Y. and Chen, G.-Q. (2009) ‘Medical Application of Microbial Biopolyesters Polyhydroxyalkanoates’, *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 37(1), pp. 1–12. Available at: <https://doi.org/10.1080/10731190802664429>.

Zhang, L. *et al.* (2022) ‘A Review on Enhancing *Cupriavidus necator* Fermentation for Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) Production From Low-Cost Carbon Sources’, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10. Available at: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.946085>.

Zhang, S. *et al.* (2004) ‘Poly(3-Hydroxybutyrate) Biosynthesis in the Biofilm of *Alcaligenes eutrophus*, Using Glucose Enzymatically Released from Pulp Fiber Sludge’, *Applied and Environmental Microbiology*, 70(11), pp. 6776–6782. Available at: <https://doi.org/10.1128/AEM.70.11.6776-6782.2004>.

Zheng, J. and Suh, S. (2019) ‘Strategies to reduce the global carbon footprint of plastics’, *Nature Climate Change* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41558-019-0459-z>.