



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Πτυχιακή Εργασία

**Ενζυμική και θερμική αποικοδόμηση του πολύ-υδροξυβουτυρικού
εστέρα (PHB).**

Μπαντέτσιου Αθανασία Χρυσούλα του Εμμανουήλ

Επιβλέπουσα καθηγήτρια : Πατεράκη Χρυσάνθη

Λάρισα, Σεπτέμβριος 2025

Ενζυμική και θερμική αποικοδόμηση του πολύ-υδροξυβουτυρικού εστέρα (PHB).

Enzymatic and Thermal Degradation of poly-(3)-hydroxybutyrate depolymerases (PHB).

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Πατεράκη Χρυσάνθη (Επιβλέπουσα καθηγήτρια):
Επίκουρος Καθηγήτρια Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
- Μόσιαλος Δημήτριος:
Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
- Βασιλειάδης Σωτήριος:
Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Μικροβιακής Οικολογίας και Γονιδιωματικής του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα πλαστικά υλικά έχουν καταστεί αναπόσπαστο κομμάτι της βιομηχανίας και της τεχνολογίας. Ο συνδυασμός ευελιξίας, ανθεκτικότητας και χαμηλού κόστους παραγωγής τα καθιστά απαραίτητα για την ανάπτυξη πληθώρας τομέων. Ωστόσο, η εκτεταμένη χρήση τους και η ανεπαρκής διαχείριση των αποβλήτων τους, οδήγησαν στη συσσώρευση ρύπων, με αποτέλεσμα την ρύπανση των χερσαίων και υδάτινων οικοσυστημάτων. Παράλληλα, η εξάρτηση από το πετρέλαιο συμβάλλει στην ταχεία εξάντληση των μη ανανεώσιμων πηγών ενέργειας. Κατά συνέπεια, αναπτύσσεται η ανάγκη για βιώσιμες, οικολογικά αποδεκτές εναλλακτικές λύσεις, που προέρχονται από ανανεώσιμες πηγές και έχουν χαμηλό περιβαλλοντικό αποτύπωμα. Μια τέτοια εναλλακτική είναι οι πολύ-υδροξυ-αλκανοϊκοί εστέρες (PHA) και, ειδικότερα, ο πολύ-υδροξυ-βουτυρικός εστέρας (PHB). Αυτά τα ενδοκυτταρικά πολυμερή αποθήκευσης συντίθενται από πολλούς μικροοργανισμούς όταν τα αποθέματα θρεπτικών ουσιών είναι περιορισμένα, αλλά υπάρχει περίσσεια άνθρακα. Το PHB είναι ένα θερμοπλαστικό πολυμερές, το οποίο είναι βιοσυμβατό και βιοδιασπώμενο, καθώς και μη τοξικό. Ο διπλός ρόλος του ως πηγή άνθρακα και ενέργειας του επιτρέπει να αποικοδομείται από τους ίδιους μικροοργανισμούς που το συνθέτουν. Ωστόσο, για να καθιερωθεί ο πολύ-υδροξυ-βουτυρικός εστέρας (PHB) ως βιώσιμη εναλλακτική λύση, είναι κρίσιμη η αποτελεσματική αποικοδόμησή του μετά τη χρήση. Η αποτελεσματική διάσπαση του πολυμερούς, είτε ενζυμικά είτε θερμικά, είναι καθοριστική για τη βιοδιασπασιμότητά του και, κατά συνέπεια, για τον περιορισμό των περιβαλλοντικών επιπτώσεων.

Οι ενζυμικοί μηχανισμοί αποικοδόμησης, που περιλαμβάνουν τόσο ενδοκυτταρική (nPHB) όσο και εξωκυτταρική (dPHB) αποδόμηση μέσω αποπολυμερασών, έχουν μελετηθεί εκτενώς. Αντίθετα, για τη θερμική αποικοδόμηση του PHB, υπάρχουν λιγότερες πληροφορίες για τις συνθήκες που την ευνοούν. Η μελέτη φυσικοχημικών παραμέτρων, όπως η θερμοκρασία, το pH και η συγκέντρωση του πολυμερούς, είναι σημαντικό να μελετηθούν για την κατανόηση της συμπεριφοράς του PHB σε τέτοιες συνθήκες και τη βελτιστοποίηση της διαδικασίας αποδόμησης του. Στη παρούσα διπλωματική εργασία, μελετούνται οι συνθήκες θερμικής αποικοδόμησης του PHB, με έμφαση στην επίδραση του pH, της θερμοκρασίας και της συγκέντρωσης του πολυμερούς κατά τη διάσπασή του υπό αλκαλικές συνθήκες. Για αυτό το σκοπό, πραγματοποιήθηκαν δύο πειραματικές προσεγγίσεις. Στο πρώτο πείραμα, εξετάστηκε

η υδρόλυση του PHB σε συγκέντρωση 0.5 g/L, σε pH 9, 10 και 11, καθώς και σε δείγματα ελέγχου pH 7.6, υπό διαφορετικές θερμοκρασίες (80–90°C, 100°C, 120–130°C). Στο δεύτερο πείραμα, μελετήθηκε η αποικοδόμηση του PHB σε pH 11 με αρχικές συγκεντρώσεις 0.5 g/L, 1 g/L και 5 g/L, σε θερμοκρασίες 80°C, 100°C και 120–130°C. Σε όλες τις περιπτώσεις, πραγματοποιήθηκε συλλογή δειγμάτων σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα, τα οποία αναλύθηκαν ως προς το υπολειπόμενο PHB μέσω μέτρησης του ξηρού βάρους μετά από φυγοκέντριση, έκπλυση με ακετόνη και ξήρανση. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αποδόμηση του PHB βελτιώνεται σημαντικά σε έντονα αλκαλικό περιβάλλον (pH 11), ενώ η αύξηση της θερμοκρασίας επιταχύνει περαιτέρω τη διαδικασία. Οι υψηλότερες θερμοκρασίες (120–130°C) οδήγησαν στη μέγιστη αποικοδόμηση, γεγονός που τονίζει τη σημασία του συνδυασμού αλκαλικών συνθηκών και θερμικής επεξεργασίας για την αποδοτική διάσπαση του πολυμερούς.

Η βελτιστοποίηση της διαδικασίας διάσπασης, συμβάλλει σημαντικά στην ελαχιστοποίηση της περιβαλλοντικής επιβάρυνσης από το συγκεκριμένο βιοπλαστικό. Σε αυτή τη διπλωματική εργασία η προσπάθεια ταυτοποίησης της βέλτιστης δράσης των εξωκυτταρικών αποπολυμερασών του PHB των στελεχών *Alcaligenes faecalis* NRRL-1695. Τα ένζυμα χρησιμοποιήθηκαν για την διάσπαση εμπορικού dPHB. Διερευνήθηκε ικανότητα διάσπασης διαφορετικών αρχικών συγκεντρώσεων PHB (3g/L, 5g/L και 10g/L), σε ρυθμιστικό διάλυμα $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ με pH 8. Ακολούθως, εξετάστηκε η διάσπαση PHB με συγκέντρωση 5g/L με τα ίδια ρυθμιστικά διαλύματα σε pH 6, 7 και 9. Η αποτελεσματική διάσπαση σημειώθηκε σε αρχική συγκέντρωση PHB 5g/L και $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ με pH 8 για το στέλεχος *A.faecalis* NRRL-1695.

Abstract

Plastic materials are currently an integral part of industry and technology. Their flexibility, strength, and affordability make them central to many industries. However, they are used widely. They are also not managed properly. This leads to pollutants concentrating. This causes damage to terrestrial and aquatic ecosystems. Meanwhile, oil consumption likewise results in the rapid depletion of non-renewable resources. Therefore, there is an increasing demand for renewable, sustainable materials produced using renewable resources and with a minimal environmental footprint. One such source is polyhydroxyalkanoates (PHAs) and, more importantly, polyhydroxybutyrate (PHB). These intracellular carbon storage polymers are synthesized by most microorganisms when nutrients are scarce, but carbon is abundant. PHB is a non-toxic, biodegradable, and bioCompatible thermoplastic polymer. Due to its dual function as an energy and carbon source, it can be hydrolyzed by the same microorganisms that synthesized it. However, for PHB to be considered a sustainable product, it must degrade following use. Effective degradation of the polymer, either enzymatically or thermally, is central to biodegradability and thus to preventing environmental impact. The enzymatic degradation of PHB by depolymerases, both intracellular (nPHB) and extracellular (dPHB), has been extensively studied. Conversely, the mechanisms underlying the thermal degradation of PHB have received less attention. The objective of this dissertation is to examine the heat-induced degradation of PHB under basic conditions, with particular emphasis on the impact of pH, temperature, and polymer concentration on the degradation process. Two experimental procedures were carried out. The first examined PHB hydrolysis at a concentration of 0.5 g/L under pH levels of 9, 10, and 11, as well as in control samples at pH 7.6, at various temperatures (80–90°C, 100°C, and 120–130°C). The second experiment involved assessing the degradation of PHB at a pH of 11 with initial concentrations of 0.5 g/L, 1 g/L, and 5 g/L, at temperatures of 80°C, 100°C, and 120–130°C. Samples were taken at various time intervals and analyzed for residual PHB. This involved determining the dry weight after centrifugation, acetone washing, and drying. The results showed that degradation of PHB was significantly enhanced in a highly alkaline environment (pH 11), and further increasing the temperature improved the process. Maximum degradation was achieved at the highest temperatures (120–130 °C), demonstrating the importance of combining alkalinity with heat treatment to ensure effective polymer degradation.

Making PHB an ideal alternative to petroleum-based plastics means optimizing its production and degradation, the latter of which significantly contributes to minimizing its environmental impact. PHB depolymerases were used to hydrolyze commercial dPHB powder. The depolymerases' ability to degrade different concentrations of PHB (3g/L, 5g/L, and 10g/L) in Na₂HPO₄-NaH₂PO₄*2H₂O, pH 8 buffer was investigated, and then at pH 6, 7, and 9, respectively. The 5g/L concentration proved to be inhibitory for enzymatic degradation of PHB, while effective degradation occurred at 5g/L and Na₂HPO₄-NaH₂PO₄*2H₂O, pH 8 for the *A. faecalis* NRRL-1695 strain.

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Μικροβίων – Μοριακής Βακτηριολογίας – Ιολογίας, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας . Αρχικά θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στην επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, κα. Πατεράκη Χρυσάνθη, για την πολύτιμη καθοδήγηση, την εμπιστοσύνη και την συνεχή στήριξή της σε κάθε στάδιο της παρούσας εργασίας. Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στην ερευνήτρια κα. Ζογμπή Λίνα, για την πολύτιμη συμβολή της στη πορεία της εργασίας, την πρόθυμη καθοδήγησή της και την ουσιαστική υποστήριξή της τόσο σε επιστημονικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη διδακτορική ερευνήτρια του εργαστηρίου, κα. Δουλοπούλου Ευστρατία, για τη βοήθειά της, την επιστημονική της κατάρτιση και την προθυμία με την οποία με στήριξε καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας. Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου προς την οικογένεια μου για την αδιάκοπη στήριξη και εμπύχωση που μου έδειξαν καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	11
1.1. Ρύπανση Πετρελαίου-Πλαστικών.....	11
1.2. Βιοπολυμερή.....	13
1.3. Πολυ-υδροξυ-αλκανοϊκοί εστέρες (PHA).....	14
1.4. Πολυ(3-υδροξυβουτυρικός εστέρας) (PHB)	16
1.5. Μονοπάτια βιοσύνθεσης PHB.....	20
1.6. Ενζυμική αποικοδόμηση του PHB	23
1.7. Αλκαλική αποικοδόμηση PHB.....	25
2. Υλικά και Μέθοδοι.....	26
2.1. Δημιουργία διαλυμάτων.....	26
2.2. Πειραματικός σχεδιασμός.....	26
2.3. Πειραματική Διαδικασία	26
2.3.1. Επίδραση pH και θερμοκρασίας.....	26
2.3.2. Επίδραση συγκέντρωσης PHB και θερμοκρασίας.....	27
2.4. Διαδικασία επεξεργασίας δειγμάτων	28
2.5. Προσδιορισμός ξηρού βάρους PHB και ποσοστού αποικοδόμησης.....	28
2.6. Ανάπτυξη και συντήρηση μικροοργανισμών	29
2.7. Θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν	29
2.8. Πειράματα ασυνεχών ζυμώσεων	31
2.9. Πειράματα υδρόλυσης	32
3. Αποτελέσματα	33
3.1. Επίδραση pH και θερμοκρασίας.....	33
3.2. Επίδραση συγκέντρωσης PHB και θερμοκρασίας	34
3.3. Μελέτη ενζυμικής υδρόλυσης.....	35
4. Συζήτηση.....	37

5. Συμπεράσματα.....	39
6. Βιβλιογραφία.....	40

Εικόνες

Εικόνα 1: Οι τύποι συνθετικών πλαστικών και τα ποσοστά τους στην αγορά. (Από: (Ali et al., 2021)	11
Εικόνα 2: Μετάβαση από τη γραμμική παραγωγή πολυμερών από το πετρέλαιο στην κυκλική βιο-οικονομία (Προσαρμοσμένη από Bachmann et al., 2023).....	12
Εικόνα 3: Κατηγορίες βιοπολυμερών με βάση την μέθοδο παρασκευής και την προέλευσή τους. (Προσαρμοσμένο από Kabir et al., 2020).....	13
Εικόνα 4: Δομή του μονομερούς μορίου του PHB, του [R]-3-υδροξυβουτυρικού οξέος. (Από: Lenz & Marchessault, 2005)	16
Εικόνα 5: Εικόνες από μικροσκόπιο TEM των ενδοκυτταρικών κοκκίων PHB στο <i>Marichromatium. Bheemlicum</i> . (Από: Higuchi-Takeuchi et al., 2016)	17
Εικόνα 6: Απεικόνιση της κρυσταλλικής δομής του PHB. (Από: dos Santos et al., 2017).....	18
Εικόνα 7: Φωτογραφίες μικροσκοπίας που απεικονίζουν την μορφολογία των κοκκίων του PHB σε διαφορετικές θερμοκρασίες κρυστάλλωσης (T_C). (α) $T_C=30^\circ\text{C}$, (b) $T_C=50^\circ\text{C}$, (c) $T_C=65^\circ\text{C}$, (d) $T_C=90^\circ\text{C}$, (e) $T_C=100^\circ\text{C}$, (f) $T_C=130^\circ\text{C}$ (Από: Barham et al., 1984)	19
Εικόνα 8: Απεικόνιση του μονοπατιού δημιουργίας του PHB. (Προσαρμογή από: Taroncher-Oldenburg et al., 2000).....	20
Εικόνα 9: Μοντέλο σύνθεσης και αποικοδόμησης PHB. Ο PHB συντίθεται με τη συμπίκνωση δύο μορίων ακετυλο-CoA σε ακετοακετυλο-CoA από μια β -κετοθειολάση (PhaA) (1) και με αναγωγή από την αναγωγή του ακετοακετυλο-CoA (PhaB) (2) σε μια αντίδραση που εξαρτάται από το NADPH από ακετοακετυλο-CoA σε (R)-3-υδροξυβουτυρυλο-CoA. Η PHA συνθάση (PhaC) (3) ενσωματώνει τα μονομερή σε πολυ(R)-3-υδροξυβουτυρικό οξύ. Ο PHB αποικοδομείται σε κροτονυλο-CoA μέσω (R)-3-υδροξυβουτυρυλο-CoA σε μια θειολυτική αντίδραση από ενδοκυτταρικές PHB αποπολυμεράσες (PhaZ) (4). Το κροτονυλο-CoA συνδυάζει την αποικοδόμηση του PHB με β -οξείδωση, όπου προστίθεται ένας διπλός δεσμός σε ένα ακυλο-CoA από μια ακυλο-CoA αφυδρογονάση (FadE) (5) και σχηματίζεται ένα	

ενοϋλο-CoA. Το ενοϋλο-CoA μετατρέπεται στερεοειδικά σε (S)-3-υδροξυακυλο-CoA από μια ενοϋλο-CoA υδρατάση (6) και σχηματίζεται 3-κετοακυλο-CoA σε μια NAD-εξαρτώμενη αντίδραση από μια 3-υδροξυακυλο-CoA αφυδρογονάση (FadB) (7). Μια 3-κετοακυλο-CoA θειολάση (FadA) (8) διασπά το κετοακυλο-CoA και σχηματίζεται ένα μόριο ακετυλο-CoA, παράγοντας ένα κομμένο ακυλο-CoA. Ο κύκλος β-οξειδωσης ξεκινά ξανά με την προσθήκη ενός διπλού δεσμού στο κομμένο ακυλο-CoA. (Από: Eggers & Steinbüchel, 2014).....	21
<i>Εικόνα 10: Το γλυκολυτικό μονοπάτι οδηγεί στην παραγωγή ακετυλο-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)</i>	22
<i>Εικόνα 11: Τρισδιάστατη απεικόνιση του εξωκυτταρικού ενζύμου PHB αποπολυμεράση. Από: (Panagiotidou et al., 2014)</i>	23
<i>Εικόνα 12: Ενζυμική αποικοδόμηση κρυστάλλου PHB από τις PHB αποπολυμεράσες. Αυτό το σχήμα απεικονίζει τη δομή των εξωκυτταρικών αποπολυμερασών PHB, όπου υπάρχουν τρεις περιοχές: η περιοχή πρόσδεσης (binding domain), η οποία είναι υπεύθυνη για την απορρόφηση και την εξάπλωση σε όλο το πολυμερές, η περιοχή σύνδεσης (linker domain), η οποία είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση της περιοχής σύνδεσης με την καταλυτική περιοχή, και η καταλυτική περιοχή (catalytic domain), η οποία διασπά το PHB και τυχόν διαθέσιμα διμερή και τριμερή. (Από: Meereboer et al., 2020)</i>	24
<i>Εικόνα 13: Αλκαλική υδρόλυση του PHB και παράλληλη παραγωγή του 3-υδροξυβουτυρικού οξέος (3HB) και του κροτονικού οξέος (CA). Από: (Yu et al., 2005).....</i>	25

Πίνακες και Γραφήματα

<i>Πίνακας 1: Σύγκριση των ιδιοτήτων του πολυπροπυλενίου (PP) και του πολυυδροξυβουτυρικού εστέρα (PHB). (Προσαρμογή από: Verlinden et al., 2007)..</i>	20
<i>Πίνακας 2: Επίδραση pH και θερμοκρασίας</i>	27
<i>Πίνακας 3: Επίδραση συγκέντρωσης και θερμοκρασίας</i>	28
<i>Πίνακας 4: Μέσο καλλιέργειας MS.</i>	30
<i>Πίνακας 5: Μέσο καλλιέργειας DSM457</i>	30

Πίνακας 6: 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 προσθήκη 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. 32

Γράφημα 1: Συγκριτικό διάγραμμα του ποσοστού μεταβολής της συγκέντρωσης PHB (άξονας y) σε διαφορετικές θερμοκρασίες (άξονας x) και σε διαφορετικές τιμές pH (κάθετες στήλες διαφορετικού χρώματος). Η μέγιστη μεταβολή παρατηρείται σε θερμοκρασίες 120-130 °C και σε pH=11. 33

Γράφημα 2: Συγκριτικό διάγραμμα του ποσοστού μεταβολής της συγκέντρωσης PHB (άξονας y) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (άξονας x) και σε διαφορετικές θερμοκρασίες (κάθετες στήλες διαφορετικού χρώματος). Η μέγιστη μεταβολή παρατηρείται σε θερμοκρασίες 120-130 °C και συγκέντρωση 0,5g/L. 34

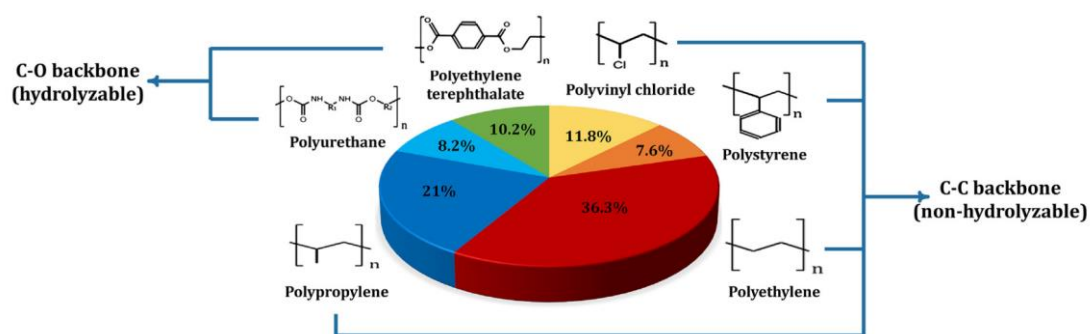
Γράφημα 3: Η απόδοση της υδρόλυσης στα διαλύματα όπου εμπεριέχεται $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ pH 6,7,8 και 9 στις 48 ώρες υδρόλυσης. 36

1. Εισαγωγή

1.1. Ρύπανση Πετρελαίου-Πλαστικών

Τα συνθετικά πολυμερή παράγονται με την σύνδεση εκατοντάδων ή χιλιάδων οργανικών μονομερών με ισχυρούς ομοιοπολικούς δεσμούς. Το πρώτο πολυμερές το οποίο έχει συντεθεί πλήρως χημικά είναι ο βακελίτης. Ο βακελίτης δημιουργήθηκε το 1907 μέσω μιας αντίδρασης συμπύκνωσης μεταξύ φαινόλης και φορμαλδεΐδης. (Chamas et al., 2020). Η μαζική παραγωγή πολυμερών ξεκίνησε την δεκαετία του 1950. Το 1960 τα πλαστικά αντιπροσώπευαν λιγότερο από το 0,5% των αστικών στερεών αποβλήτων που παράγονταν στις ΗΠΑ ενώ το 2009, αντιπροσώπευαν το 12%. Έχει αυξηθεί από 1,5 εκατομμύρια τόνους το 1950 σε 335 εκατομμύρια τόνους το 2016. Εκτιμάται ότι το 79% των πλαστικών προϊόντων δεν υποβάλλονται σε κατάλληλη επεξεργασία και τελικά καταλήγουν σε χώρους υγειονομικής ταφής ή στο φυσικό περιβάλλον. (Li et al., 2021) Δημιουργούνται διάφορες περιβαλλοντικές προκλήσεις από την αύξηση των πωλήσεων και του μεριδίου αγοράς.

Τα συνθετικά πλαστικά πολυμερή χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: C-C και C-O. Τα πολυμερή με σκελετό C-C, συμπεριλαμβανομένων του πολυπροπυλενίου (PP), του πολυαιθυλενίου (PE), του πολυβινυλοχλωριδίου (PVC) και του πολυστυρενίου (PS), κυριαρχούν στην παγκόσμια αγορά με μερίδιο 77%. Τα πολυμερή C-O, όπως το τereφθαλικό πολυαιθυλένιο (PET) και το πολ्यουρεθάνιο (PU), καλύπτουν το υπόλοιπο 18% της αγοράς. (Kendall, 2012)

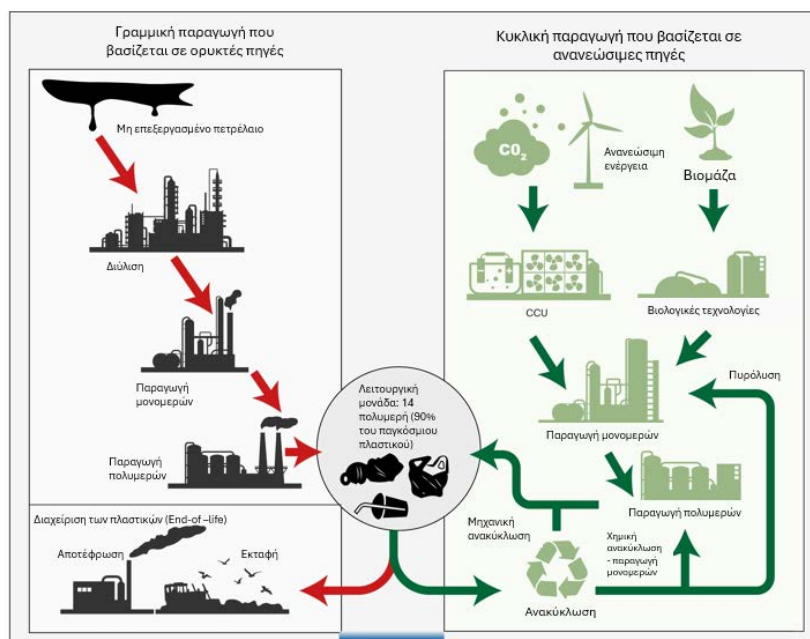


Εικόνα 1: Οι τύποι συνθετικών πλαστικών και τα ποσοστά τους στην αγορά. (Από: (Ali et al., 2021)

Η συντριπτική πλειοψηφία των πλαστικών που παράγονται σήμερα, συμπεριλαμβανομένων όλων των προαναφερθέντων εμπορικών πολυμερών, κατασκευάζονται από μη ανανεώσιμα πετροχημικά. Αυτά τα πετροχημικά προέρχονται από ορυκτά καύσιμα όπως το πετρέλαιο, το φυσικό αέριο και ο άνθρακας. (Chamas et

al., 2020). Τα περισσότερα συνθετικά πλαστικά δεν είναι βιοαποικοδομήσιμα. Έτσι παραμένουν στο θαλάσσιο περιβάλλον και σε άλλα φυσικά οικοσυστήματα, βλάπτοντας την άγρια ζωή και διαταράσσοντας τα οικοσυστήματα. (Kendall, 2012)

Παρόλο που η παραγωγή των συνθετικών πλαστικών αυξάνεται, η διαχείρισή τους μετά την χρήση τους δεν είναι αποτελεσματική στις περισσότερες των περιπτώσεων. (Li et al., 2021) Μόνο το 18% των συνολικά παραγόμενων πλαστικών ανακυκλώνεται σε παγκόσμια κλίμακα και το 24% αυτών καίγεται. Το υπόλοιπο 58% απορρίπτεται σε χωματερές ή συσσωρεύονται στο περιβάλλον. Μπορεί οι τελευταίες δύο μέθοδοι να είναι οι πιο «βολικές» και χαμηλότερου κόστους λύσεις, όμως δημιουργούν τεράστια περιβαλλοντικά προβλήματα και εκπέμπουν μεγάλες ποσότητες αερίων που συμβάλλουν στο φαινόμενο του θερμοκηπίου. (Chamas et al., 2020; Li et al., 2021) Όταν τα πλαστικά καίγονται, εκλύουν τοξικές εκπομπές όπως μονοξείδιο του άνθρακα, χλώριο, υδροχλωρικό οξύ, διοξίνη, φουράνια, αμίνες, νιτρίδια, στυρόλιο, βενζόλιο, 1,3-βουταδιένιο και ακεταλδεΐδη, τα οποία αποτελούν απειλή τόσο για το περιβάλλον όσο και για τη δημόσια υγεία. (Mangaraj et al., 2019) Η αυξημένη παραγωγή των συνθετικών πλαστικών και η περιορισμένη ικανότητα διαχείρισης τους δημιουργεί παγκόσμια ανησυχία. Επομένως, η ερευνητική κοινότητα έχει στραφεί προς την ανακάλυψη νέων και ανακυκλώσιμων υλικών για να μειωθεί ο περιβαλλοντικός αντίκτυπος.

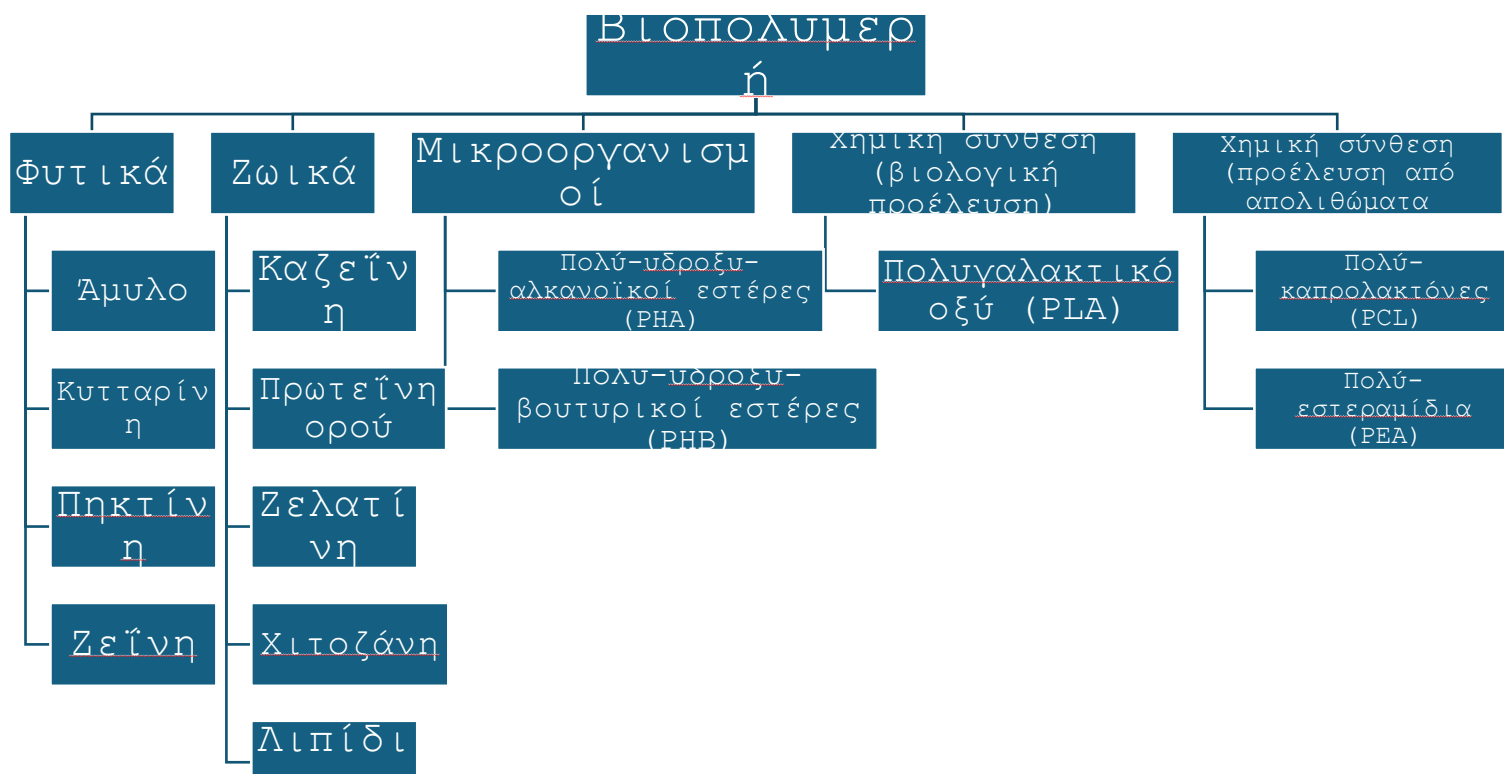


Εικόνα 2: Μετάβαση από τη γραμμική παραγωγή πολυμερών από το πετρέλαιο στην κυκλική βιο-οικονομία (Προσαρμοσμένη από: (Bachmann et al., 2023))

1.2. Βιοπολυμερή

Τα τελευταία χρόνια, τα βιοπλαστικά έχουν αναδειχθεί ως εναλλακτική λύση για την αντιμετώπιση των προβλημάτων που προκαλούν τα πλαστικά. Τα βιοπλαστικά είναι βιοαποικοδομήσιμα υλικά, τα οποία μπορούν να αφομοιωθούν πιο εύκολα από τα μικρόβια. Τα περισσότερα συνθετικά πλαστικά δεν αποικοδομούνται γρήγορα και η ταχύτητα αποικοδόμησης επηρεάζεται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες και από την ίδια την χημική σύνθεση του πολυμερούς. (dos Santos et al., 2017; Mangaraj et al., 2019) Σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Βιοπλαστικών, ένα πλαστικό υλικό ορίζεται ως βιοπλαστικό εάν είναι βιολογικής προέλευσης και/ή βιοδιασπώμενο. Τα βιοδιασπώμενα πολυμερή παράγονται από ανανεώσιμες πηγές, είναι πλήρως βιοδιασπώμενα και μιμούνται τις ιδιότητες των συμβατικών πολυμερών, όπως το πολυαιθυλένιο (PE), το πολυπροπυλένιο (PP) και το τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο (PET). (Becker et al., 2022)

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των πολυμερών (π.χ. ακαμψία, ανθεκτικότητα, θερμική και ηλεκτρική αγωγιμότητα, αντοχή στη διάβρωση, διαφάνεια, χρώμα κ.λπ.) εξαρτώνται από τους τύπους των μονομερών που χρησιμοποιούνται, τον βαθμό πολυμερισμού και το μοτίβο ή τη σειρά σύνδεσης. Τα βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή



Εικόνα 3: Κατηγορίες βιοπολυμερών με βάση την μέθοδο παρασκευής και την προέλευσή τους. (Προσαρμοσμένο από Kabir et al., 2020)

κατατάσσονται σε μία από τις πέντε κατηγορίες ανάλογα με τη μέθοδο κατασκευής και την πηγή τους: (α) φυτικής προέλευσης (π.χ. άμυλο, κυτταρίνη, ζεΐνη, πηκτίνη και λιπίδια) (β) ζωικής προέλευσης (π.χ. καζεΐνη, πρωτεΐνη ορού γάλακτος, ζελατίνη και χιτοζάνη) (γ) προϊόντα ζύμωσης ή υποπροϊόντα (π.χ. πολυυδροξυβουτυρικό (PHB) και πολυυδροξυαλκανοϊκά (PHA)) (δ) χημική σύνθεση ουσιών φυσικής προέλευσης (π.χ. πολυγαλακτικό οξύ (PLA)) και (ε) χημική σύνθεση ορυκτών πόρων (π.χ. πολυκαπρολακτόνες (PCL) και πολυεστεραμίδια (PEA)).(Kabir et al., 2020)

Η σύνθεση όλων των βιοπολυμερών γίνεται κυρίως ενζυματικά σε διαφορετικά σημεία των κυττάρων. Το σημείο σύνθεσης εξαρτάται από το βιοπολυμερές. Έτσι υπάρχουν ορισμένα που συντίθενται στο κυτταρόπλασμα, κάποια άλλα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, στην επιφάνεια των κυττάρων ή ακόμα και εκτός του ίδιου του κυττάρου. (Rao et al., 2014)

1.3. Πολυ-υδροξυ-αλκανοϊκοί εστέρες (PHA)

Οι πολυ-υδροξυ-αλκανοϊκοί εστέρες (PHA) ανήκουν στην κατηγορία των βιοπολυεστέρων και αποτελούν μια από τις πιο υποσχόμενες ομάδες βιοπολυμερών που μπορούν να υποκαταστήσουν τα συνθετικά πλαστικά προερχόμενα από πετρέλαιο. Πρόκειται για πολυμερή που συντίθενται ενδοκυτταρικά από έναν μεγάλο αριθμό μικροοργανισμών και λειτουργούν ως αποθήκες άνθρακα και ενέργειας, τις οποίες τα κύτταρα επιστρατεύουν σε περιόδους περιορισμού θρεπτικών συστατικών αλλά περίσσειας πηγών άνθρακα (Chen et al., 2009; Hisano et al., 2006). Ο μεταβολικός αυτός μηχανισμός προσδίδει στα PHA ιδιαίτερη οικολογική αξία, καθώς αφενός παράγονται από ανανεώσιμες πρώτες ύλες και αφετέρου διαθέτουν υψηλή βιοαποικοδομησιμότητα, σε αντίθεση με τα παραδοσιακά πλαστικά που συσσωρεύονται στο περιβάλλον για δεκαετίες ή και αιώνες.

Η οικογένεια των PHA είναι εξαιρετικά εκτεταμένη και περιλαμβάνει περισσότερους από 150 διαφορετικούς τύπους μονομερών, τα οποία μπορούν να συνδυαστούν ώστε να σχηματίσουν πολυμερή με διαφορετικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά. Η χημική τους δομή καθορίζεται τόσο από τη φύση των μονομερών όσο και από το μήκος της ανθρακικής τους αλυσίδας. Με βάση αυτό το κριτήριο, οι PHA ταξινομούνται σε πολυμερή μικρού μήκους αλυσίδας (scl-PHA), που αποτελούνται από μονομερή με τρία έως πέντε άτομα άνθρακα, και σε πολυμερή

μεσαίου μήκους αλυσίδας (mcl-PHA), τα οποία περιλαμβάνουν μονομερή έξι έως δεκατεσσάρων ατόμων άνθρακα (Miu et al., 2022). Υπάρχουν επίσης πολυμερή που ενσωματώνουν ταυτόχρονα μονομερή μικρού και μεσαίου μήκους, γνωστά ως scl-mcl-PHA, τα οποία συνδυάζουν ενδιάμεσες ιδιότητες.

Ένα από τα κύρια γνωρίσματα που διαφοροποιεί τα PHA από άλλα βιοπολυμερή είναι οι θερμοπλαστικές τους ιδιότητες. Τα PHA σχηματίζουν γραμμικές αλυσίδες μακρομορίων, οι οποίες συνδέονται μέσω εστερικών δεσμών και μπορούν να υποστούν τήξη σε συγκεκριμένη θερμοκρασία. Σε αντίθεση με τα περισσότερα βιοπολυμερή, η θέρμανση των PHA μπορεί να επαναληφθεί χωρίς ουσιαστική μείωση του μοριακού τους βάρους, καθιστώντας τα ανακυκλώσιμα και φιλικά προς το περιβάλλον (Dawes & Senior, n.d.; Patel et al., 2022). Ωστόσο, οι θερμικές ιδιότητες των PHA επηρεάζονται έντονα από το μοριακό τους βάρος, τον βαθμό κρυσταλλικότητας και τη σύσταση των μονομερών τους. Τα scl-PHA χαρακτηρίζονται από ημικρυσταλλική δομή και υψηλή θερμοκρασία τήξης, στοιχεία που τους προσδίδουν μηχανική αντοχή αλλά μειωμένη ελαστικότητα. Αντίθετα, τα mcl-PHA εμφανίζουν χαμηλότερη θερμοκρασία τήξης, χαμηλή κρυσταλλικότητα και μεγαλύτερη ευκαμψία, γεγονός που τα καθιστά ιδιαίτερα ελκυστικά για εφαρμογές που απαιτούν ελαστικότητα και αντοχή σε καταπόνηση (Narancic et al., 2020; Puppi et al., 2019).

Εξίσου σημαντικό χαρακτηριστικό των PHA είναι η βιοσυμβατότητά τους, καθώς δεν προκαλούν τοξικές αντιδράσεις στον ανθρώπινο οργανισμό και μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε εφαρμογές βιοϊατρικής, όπως είναι τα ράμματα, τα εμφυτεύματα και τα συστήματα ελεγχόμενης αποδέσμευσης φαρμάκων (Chen et al., 2009). Επιπλέον, τα PHA είναι βιοδιασπώμενα σε φυσικά περιβάλλοντα χάρη στη δράση μικροβιακών αποπολυμερασών, οι οποίες υδρολύουν τους εστερικούς δεσμούς του πολυμερούς και απελευθερώνουν μονομερή όπως το 3-υδροξυβουτυρικό (Chanprateep, 2010). Η βιοαποικοδόμηση αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί σε ποικιλία περιβαλλοντικών συνθηκών, όπως έδαφος, γλυκά και θαλάσσια ύδατα, αλλά και σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες.

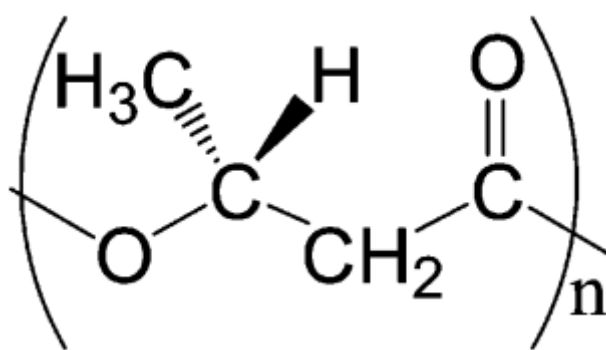
Η συνύπαρξη των παραπάνω χαρακτηριστικών—ανανεώσιμη βιολογική προέλευση, θερμοπλαστική φύση, μη τοξικότητα και βιοδιασπασιμότητα— καθιστά τα PHA μια από τις πλέον υποσχόμενες ομάδες βιοπολυμερών για την ανάπτυξη βιώσιμων υλικών. Ωστόσο, παρά τα πλεονεκτήματά τους, η ευρεία εμπορική τους αξιοποίηση παραμένει περιορισμένη, κυρίως λόγω του υψηλού κόστους παραγωγής και των

διαφορών στις φυσικοχημικές τους ιδιότητες ανάλογα με την πηγή και τις συνθήκες βιοσύνθεσης.

1.4. Πολυ(3-υδροξυβουτυρικός εστέρας) (PHB)

Ανάμεσα στην ευρεία οικογένεια των πολυ-υδροξυ-αλκανοϊκών εστέρων (PHA), ο πολυ(3-υδροξυβουτυρικός εστέρας), γνωστός και ως PHB, έχει αποτελέσει αντικείμενο εκτεταμένης μελέτης τις τελευταίες δεκαετίες (Khanna and Srivastava, 2005). Πριν από το 1960, οι χημικοί δεν γνώριζαν ότι τα βακτήρια μπορούσαν να παράγουν πολυεστέρες. Στην πραγματικότητα, ακόμη και οι περισσότεροι βιοχημικοί και μικροβιολόγοι δεν γνώριζαν αυτό το γεγονός πριν από το 1958, παρά το γεγονός ότι η παρουσία αυτών των πολυμερών στα βακτηριακά κύτταρα και η χημική τους σύνθεση είχαν αναφερθεί στη βιβλιογραφία ήδη από το 1926. Αυτοί οι φυσικοί πολυεστέρες παρέμειναν άγνωστοι στην ευρύτερη επιστημονική κοινότητα για τόσο καιρό επειδή ο ερευνητής που τους ανακάλυψε, ο Maurice Lemoigne, δημοσίευσε τα αποτελέσματά του σε άγνωστα γαλλικά περιοδικά.

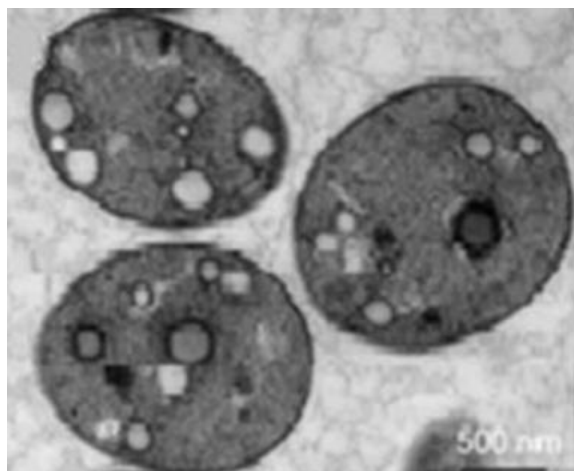
Ο πολυ-3-υδροξυβουτυρικός εστέρας (PHB) απομονώθηκε από το βακτήριο *Bacillus megaterium*, στο οποίο εμφανίζεται σε ενδοκυτταρικά κοκκία. Το PHB είναι ένα αποθηκευτικό πολυμερές που βρίσκεται σε πολλούς τύπους βακτηρίων που μπορούν να αναπτυχθούν σε διάφορα φυσικά περιβάλλοντα. Αυτά τα βακτήρια μπορούν να παράγουν και να πολυμερίσουν το μονομερές [R]-3-υδροξυβουτυρικό οξύ. (Lenz & Marchessault, 2005).



Εικόνα 4: Δομή του μονομερούς μορίου του PHB, του [R]-3-υδροξυβουτυρικού οξέος. (Από: Lenz & Marchessault, 2005)

Ο PHB χρησιμεύει ως ενδοκυτταρική αποθήκη τροφής και ενέργειας στο μεταβολισμό των μικροοργανισμών. Παράγεται από βακτήρια ως αντίδραση σε περιβαλλοντικούς περιορισμούς θρεπτικών ουσιών, όπως έλλειψη φωσφόρου, αζώτου ή οξυγόνου. Ο PHB λειτουργεί ως πολυμερές αποθήκευσης άνθρακα που είναι

αδιάλυτο στο νερό, χημικά σταθερό και οσμωτικά αδρανές. Όταν χρειάζεται, το PHB μπορεί να διασπαστεί ενζυματικά σε οξικό οξύ, το οποίο παρέχει στο κύτταρο ενέργεια και άνθρακα.



Εικόνα 5: Εικόνες από μικροσκόπιο TEM των ενδοκυτταρικών κοκκίων PHB στο *Marichromatium. Bheemlicum*.
(Από: Higuchi-Takeuchi et al., 2016)

Ο PHB είναι ένας αλειφατικός πολυεστέρας με γραμμική πολυμερή αλυσίδα, ο οποίος παρουσιάζει θερμοπλαστικές ιδιότητες. Το υλικό αυτό είναι μη τοξικό, οπτικά ενεργό και, όταν δεν υπάρχουν προσμίξεις, έχει κιτρινωπό χρώμα, παρουσιάζει μικρή διαπερατότητα σε νερό, οξυγόνο και διοξείδιο του άνθρακα και σταθερότητα στην υπεριώδη ακτινοβολία, ενώ μπορεί να υποβληθεί σε επεξεργασία με εξώθηση, έγχυση, εμφύσηση και θερμοδιαμόρφωση. (dos Santos et al., 2017) Επιπλέον, έχει υψηλό σημείο τήξης και μεγάλο βαθμό κρυσταλοποίησης. (Rajan et al., 2019)

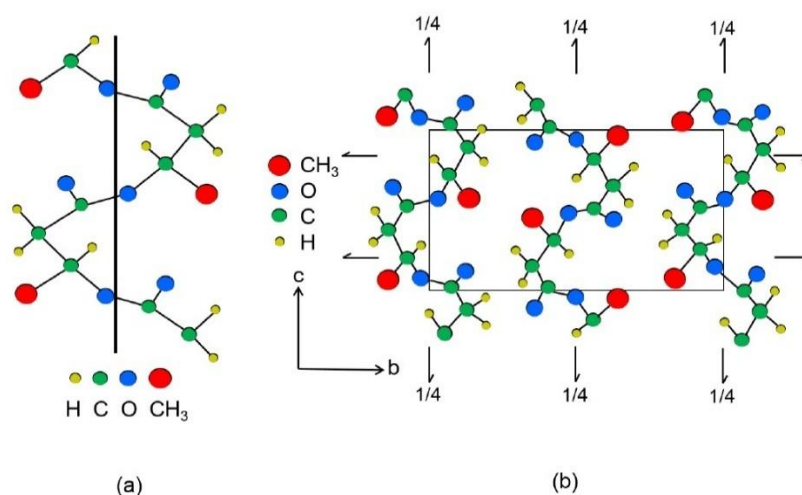
Ο PHB ως μέλος των PHA, χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη ενός μεθυλίου ως υποκαταστάτη, το οποίο επεξηγεί την υδρόφοβη συμπεριφορά του μορίου. Το πολυμερές αυτό δημιουργείται από ένα μονομερές με 4 άτομα άνθρακα, οπότε θεωρείται ένα πολυμερές μικρής αλυσίδας. (dos Santos et al., 2017; Rao et al., 2014)

Ανάλογα με τον τρόπο με τον οποίο παράγεται το μοριακό βάρος του PHB κυμαίνεται από 2 έως 4×10^3 KDa. Το μοριακό βάρος εξαρτάται από την ικανότητα των μικροβίων να συσσωρεύουν και να αποθηκεύουν το πολυμερές, τις συνθήκες ανάπτυξής τους, την πηγή άνθρακα και την συγκέντρωσή της, την μέθοδο με την οποία απομονώνεται από αυτούς. (dos Santos et al., 2017; Rajan et al., 2019)

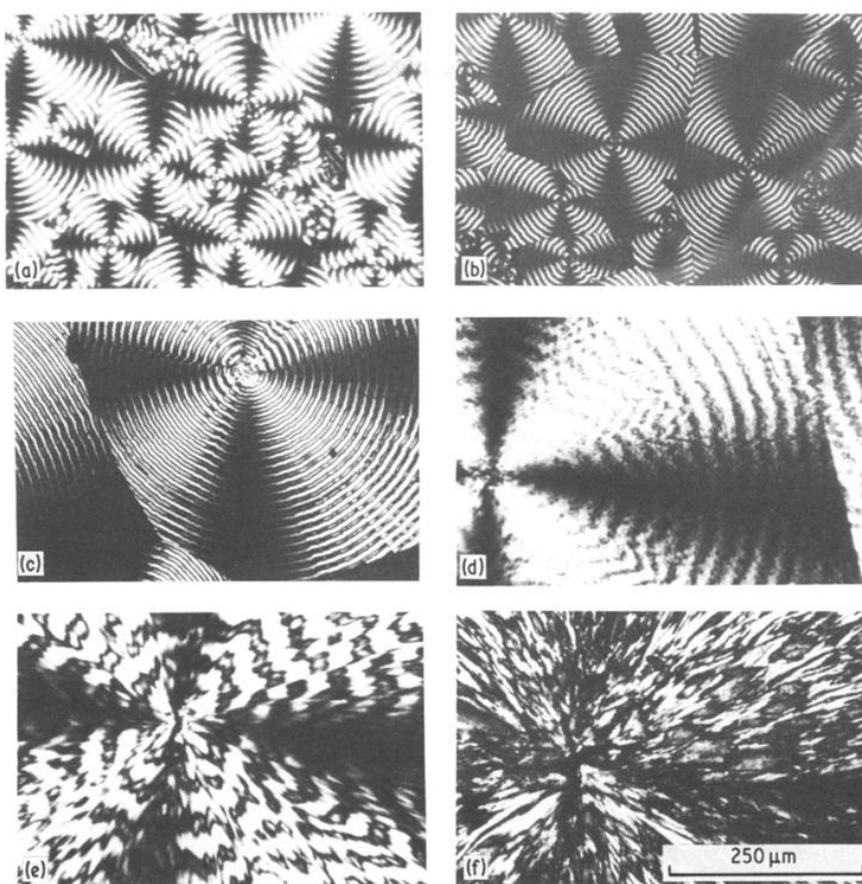
Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό του PHB είναι η κρυσταλλικότητά του. Αυτή καθορίζει τις φυσικές και μηχανικές ιδιότητες του πολυμερούς. Ο PHB είναι ημικρυσταλλικός επειδή οι μακριές πολυμερείς αλυσίδες του δεν κρυσταλλώνουν ποτέ

πλήρως. Έτσι παρουσιάζουν ταυτόχρονα και κρυσταλλικές και άμορφες φάσεις. Η κρυσταλλικότητα του επηρεάζεται από την κανονικότητα της δομής του, η οποία με την σειρά της εξαρτάται από τον τρόπο σύνθεσής του. (Barham et al., 1984; Organ et al., 1991) Στην κρυσταλλική του φάση του PHB, τα μόρια είναι καταναμεμημένα σε έναν οργανωμένο και επαναλαμβανόμενο τρόπο. Η μονάδα αυτού του κρυστάλλου αποτελείται από 4 μονομερή σε ορθορομβικό σύστημα. Μεταξύ των καρβονυλικών και των μεθυλικών ομάδων αναπτύσσονται δυνάμεις van der Waals. (Sudesh et al., 2000)

Ο PHB έχει μηχανικές ιδιότητες παρόμοιες με αυτές του εμπορικού πολυπροπυλενίου (PP). (Verlinden et al., 2007) Παρόλα αυτά η επεξεργασία του PHB σε εμπορικά προϊόντα εμφανίζει μεγάλες προκλήσεις. Αυτός είναι ένας από τους κύριους παράγοντες που περιορίζουν την ευρεία χρήση του σε εφαρμογές εμπορικών προϊόντων. (Dalton et al., 2022). Η θερμοκρασία τήξης (T_m) του PHB είναι περίπου 180°C , η οποία είναι κοντά στη θερμοκρασία αποσύνθεσής του. (Sharma & Ray, 1995)



Εικόνα 6: Απεικόνιση της κρυσταλλικής δομής του PHB. (Από: dos Santos et al., 2017)



Εικόνα 7: Φωτογραφίες μικροσκοπίας που απεικονίζουν την μορφολογία των κοκκίων του PHB σε διαφορετικές θερμοκρασίες κρυστάλλωσης (T_c). (a) $T_c=30^\circ\text{C}$, (b) $T_c=50^\circ\text{C}$, (c) $T_c=65^\circ\text{C}$, (d) $T_c=90^\circ\text{C}$, (e) $T_c=100^\circ\text{C}$, (f) $T_c=130^\circ\text{C}$ (Από: Barham et al., 1984)

Κρίσιμο ρόλο στον προσδιορισμό των θερμικών και μηχανικών ιδιοτήτων του πολυμερούς παίζει η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης (T_g), η οποία συνδέεται με την κινητικότητα των τμημάτων των πολυμερών αλυσίδων. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι ο αριθμός των ατόμων άνθρακα επηρεάζει άμεσα τη θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης (T_g), τη θερμοκρασία τήξης (T_m) και τη θερμοκρασία κρυστάλλωσης (T_c) των PHA. (Pradhan et al., 2018a; Sharma & Ray, 1995) Ο PHB είναι ένας καλά μελετημένος scl-PHA λόγω των ιδιοτήτων του. Πολλές αναφορές υποδηλώνουν ότι το εύρος της T_g είναι από -15°C έως 9°C , ανάλογα με τη δομή του PHB και του συμπολυμερούς. Ομοίως, το σημείο τήξης (T_m) του PHB αναφέρεται ότι είναι μεταξύ 160°C και 180°C , ανάλογα με τον τύπο της κρυσταλλικής φάσης που υπάρχει. (Verlinden et al., 2007)

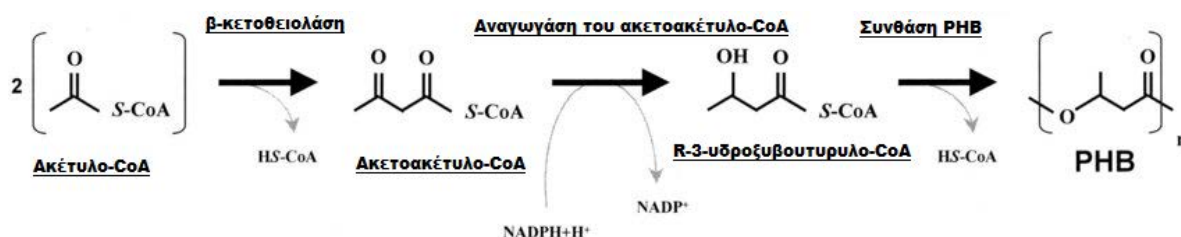
Πίνακας 1: Σύγκριση των ιδιοτήτων του πολυπροπυλενίου (PP) και του πολυυδροξυβουτυρικού εστέρα (PHB). (Προσαρμογή από: Verlinden et al., 2007)

Παράμετροι	PP	PHB
Ποσοστό Κρυσταλλικότητας (%)	50-70	60
Θερμοκρασία τήξης (T_m , °C)	176	177
Θερμοκρασία ναλώδους μετάπτωσης (T_g , °C)	-10	2
Πυκνότητα (g/cm^3)	0,905	1,25
Αντίσταση σε UV	Ελάχιστη	Καλή

1.5. Μονοπάτια βιοσύνθεσης PHB

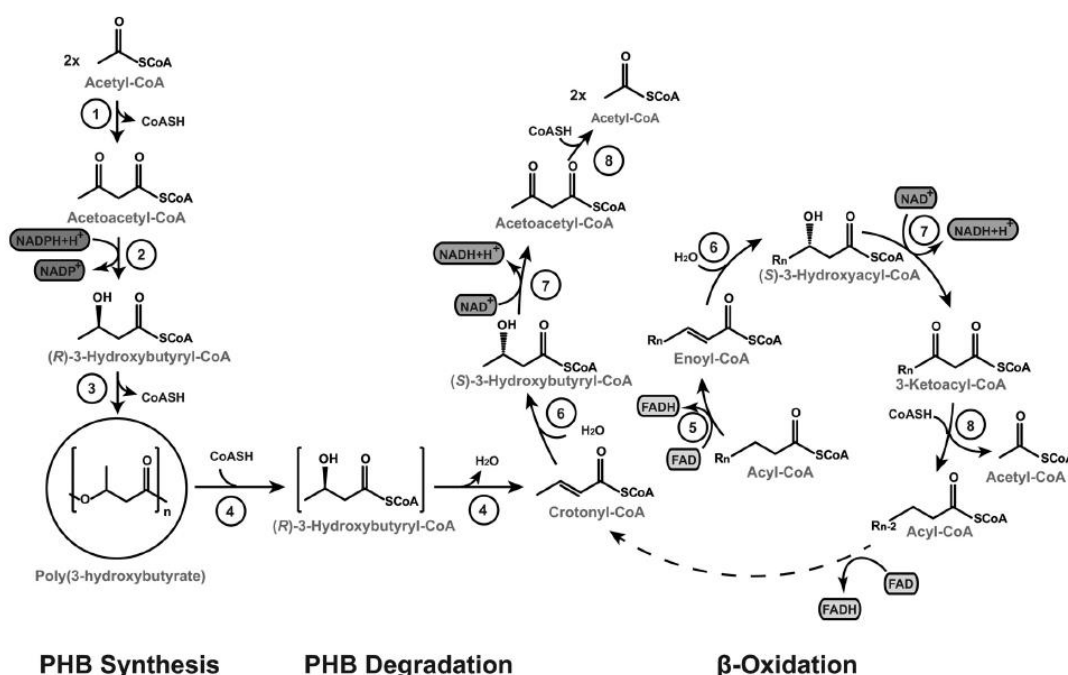
Στις μελέτες τους το 1959 σχετικά με τον σχηματισμό PHB στο *R. rubrum*, ο Stanier και οι συνεργάτες του εντόπισαν για πρώτη φορά τις αντιδράσεις που εμπλέκονται στη μεταβολική οδό που είναι υπεύθυνη για τη βιοσύνθεση του πολυυδροξυβουτυρικού (PHB) από το οξικό οξύ. (Stanier et al., 1959)

Οι Schlegel και ο Dawes δημοσίευσαν την ανακάλυψή τους σχετικά με την ταυτοποίηση των ενζύμων που εμπλέκονται στη μετατροπή του οξικού οξέος σε 3-υδροξυβουτυρικό οξύ σε δύο διαφορετικά βακτήρια. Τα ένζυμα ήταν μια β-κετοθειολάση, η οποία καταλύει τη διμεροποίηση του παραγώγου του συνενζύμου A του οξικού οξέος, και μια αναγωγάση, την PhbB, η οποία καταλύει την υδρογόνωση του τελευταίου σε (R)-3-υδροξυβουτυρυλο-CoA. Αυτό το μονομερές στη συνέχεια πολυμερίζεται από την PhbC συνθάση για να σχηματίσει PHB. (Lu et al., 2020) Αυτή η συνθάση αποτελείται από δύο διαφορετικά διμερή, PhaE και PhaC, στα κυανοβακτήρια, καθιστώντας την μέλος της κατηγορίας III των συνθασών PHA. (Koch & Forchhammer, 2021)



Εικόνα 8: Απεικόνιση του μονοπατιού δημιουργίας του PHB. (Προσαρμογή από: Taroncher-Oldenburg et al., 2000)

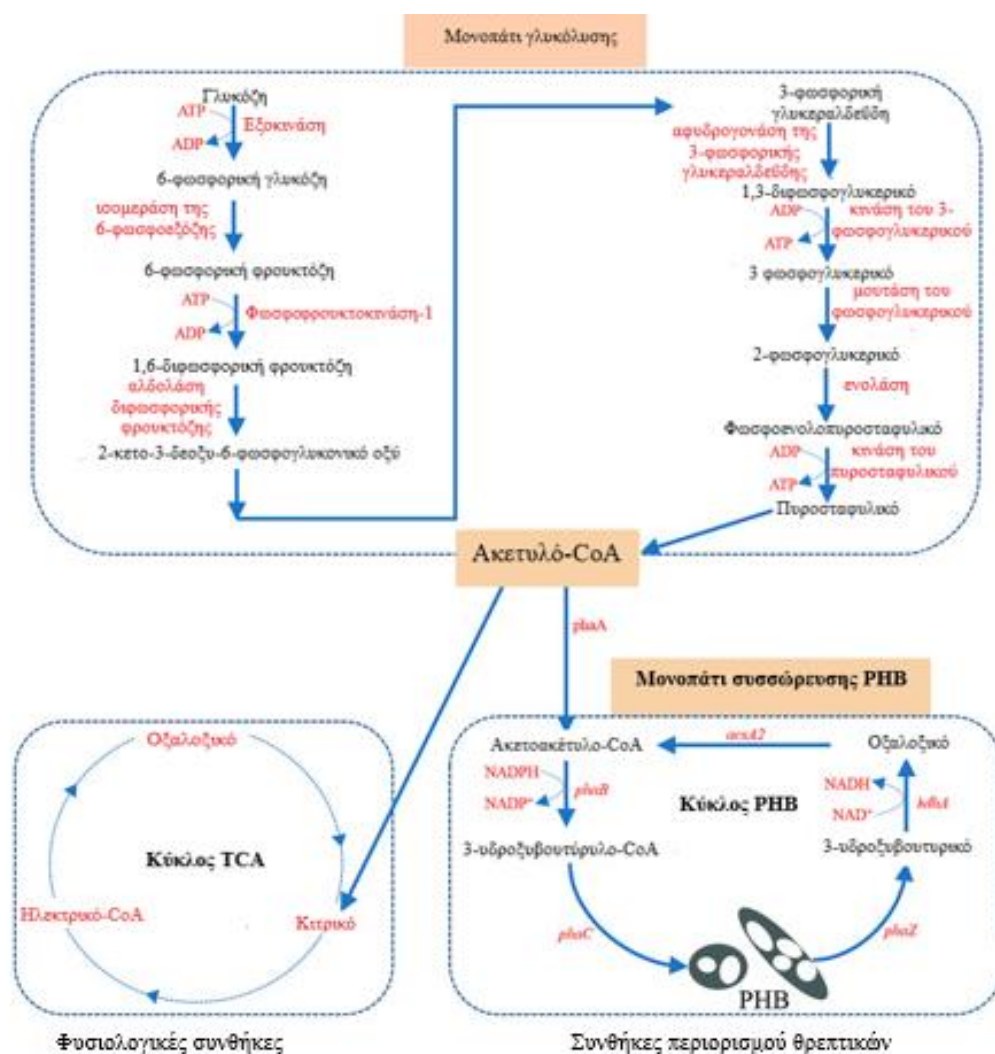
Το πολυμερές PHB μπορεί να καταβολιστεί από αποπολυμεράσες PHA (PhaZ). Η αποπολυμεροποίηση μπορεί να συμβεί ενδοκυτταρικά ή εξωκυτταρικά, ανάλογα με τον σκοπό του ενζύμου. Έχουν ταυτοποιηθεί επτά διαφορετικές αποπολυμεράσες στο *C. necator*, γεγονός που υποδηλώνει τη σημασία της ρύθμισης κινητοποίησης του PHB. Το PhaZ αποικοδομεί το PHB σε μονομερή κροτονυλο-CoA, τα οποία στη συνέχεια μεταβολίζονται στην οδό β-οξείδωσης. Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει ότι οι φασίνες PhaP επηρεάζουν σημαντικά την αποικοδόμηση του PHB. (Eggers & Steinbüchel, 2013, 2014)



Εικόνα 9: Μοντέλο σύνθεσης και αποικοδόμησης PHB. Ο PHB συντίθεται με τη συμπύκνωση δύο μορίων ακετυλο-CoA σε ακετοακετυλο-CoA από μια β-κετοθειολάση (PhaA) (1) και με αναγωγή από την αναγωγάση του ακετοακετυλο-CoA (PhaB) (2) σε μια αντίδραση που εξαρτάται από το NADPH από ακετοακετυλο-CoA σε (R)-3-υδροξυβουτυρυλο-CoA. Η PHA συνθάση (PhaC) (3) ενσωματώνει τα μονομερή σε πολυ(R)-3-υδροξυβουτυρικό οξύ. Ο PHB αποικοδομείται σε κροτονυλο-CoA μέσω (R)-3-υδροξυβουτυρυλο-CoA σε μια θειολυτική αντίδραση από ενδοκυτταρικές PHB αποπολυμεράσες (PhaZ) (4). Το κροτονυλο-CoA συνδυάζει την αποικοδόμηση του PHB με β-οξείδωση, όπου προστίθεται ένας διπλός δεσμός σε ένα ακυλο-CoA από μια ακυλο-CoA αφυδρογονάση (FadE) (5) και σχηματίζεται ένα ενούλο-CoA. Το ενούλο-CoA μετατρέπεται στερεοειδικά σε (S)-3-υδροξυακυλο-CoA από μια ενούλο-CoA υδρατάση (6) και σχηματίζεται 3-κετοακυλο-CoA σε μια NAD-εξαρτώμενη αντίδραση από μια 3-υδροξυακυλο-CoA αφυδρογονάση (FadB) (7). Μια 3-κετοακυλο-CoA θειολάση (FadA) (8) διασπά το κετοακυλο-CoA και σχηματίζεται ένα μόριο ακετυλο-CoA, παράγοντας ένα κομμένο ακυλο-CoA. Ο κύκλος β-οξείδωσης ξεκινά ξανά με την προσθήκη ενός διπλού δεσμού στο κομμένο ακυλο-CoA. (Από: Eggers & Steinbüchel, 2014)

Εκτός από τα προαναφερθέντα ένζυμα, ορισμένα είδη όπως το *P. putida*, διαθέτουν επιπλέον ένζυμα που τους επιτρέπουν να μετατρέπουν περισσότερα υποστρώματα σε PHA. Ένα από αυτά τα ένζυμα είναι το PhaJ, το οποίο μετατρέπει το

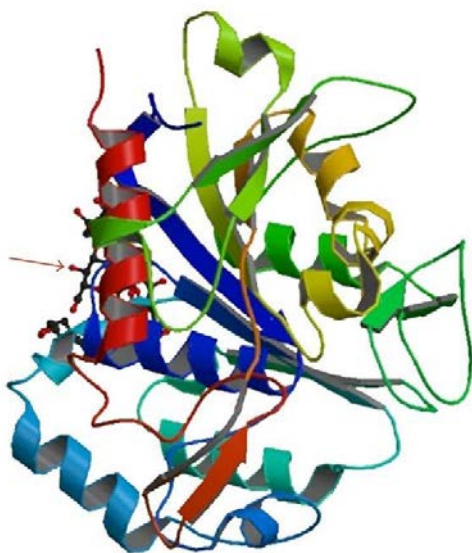
ενοϋλο-CoA σε R-3-υδροξυακυλο-CoA. Αυτό συνδέει τη β-οξείδωση των λιπαρών οξέων με τη σύνθεση PHA (Liu et al., 2016). Ένα άλλο ένζυμο που βρίσκεται στο *P. putida* είναι το PhaG, το οποίο μετατρέπει το ακυλο-ACP σε (R)-3-ακυλο-CoA. Αυτό συνδέει τη σύνθεση των λιπαρών οξέων de novo με το μεταβολισμό του PHA. Οι οδοί των λιπαρών οξέων και του PHA συνδέονται περαιτέρω μεταξύ τους από ένζυμα που καταλύουν αντιδράσεις και στις δύο οδούς. Για παράδειγμα, το FabG, το οποίο εμπλέκεται στη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων, μπορεί να καταλύσει την ίδια αντίδραση με το PhaB, αν και με χαμηλότερη απόδοση. (Koch & Forchhammer, 2021)



Εικόνα 10: Το γλυκολυτικό μονοπάτι οδηγεί στην παραγωγή ακετυλο-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).

1.6. Ενζυμική αποικοδόμηση του PHB

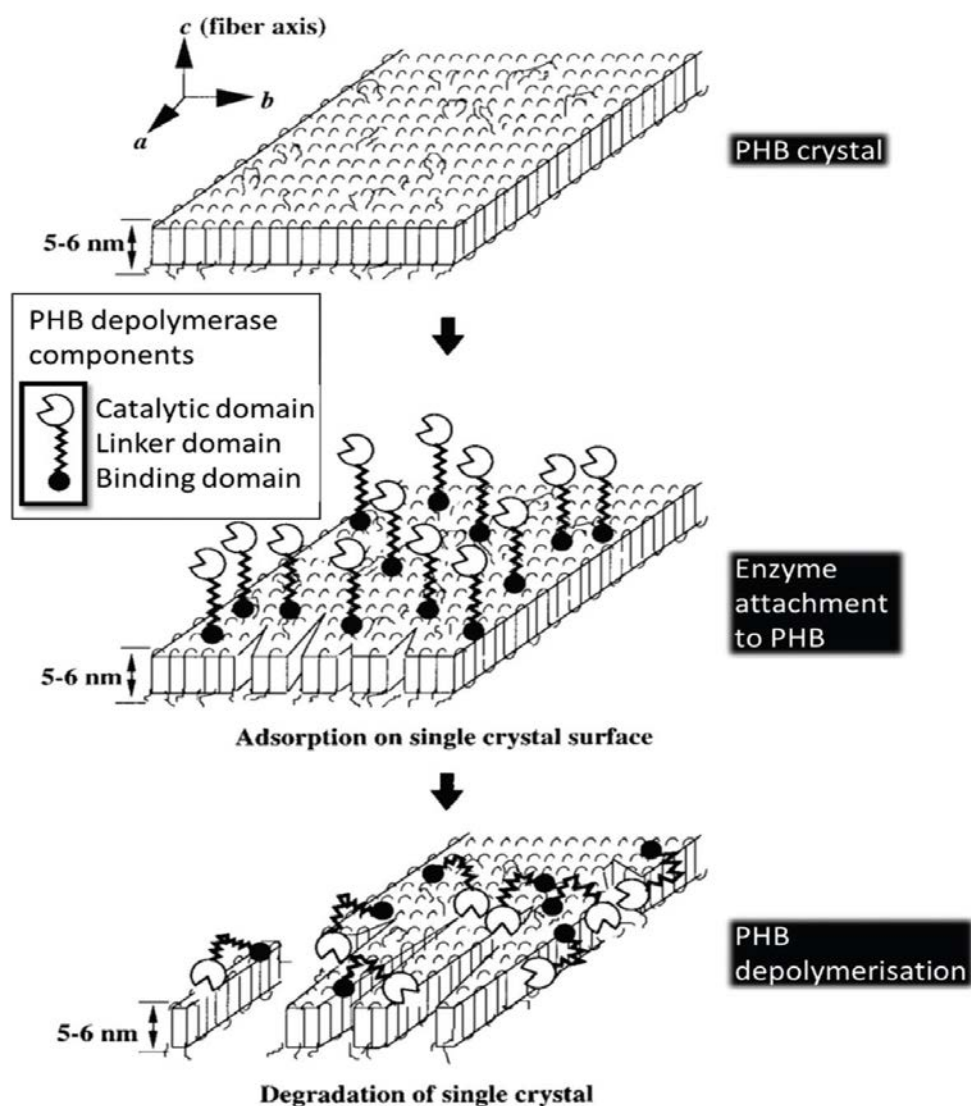
Ο PHB είναι εύκολα βιοαποικοδομήσιμος στα περισσότερα αναερόβια και αερόβια περιβάλλοντα. Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός μικροοργανισμών που μπορούν να αποικοδομήσουν τον PHB. Σε αυτούς ανήκουν βακτήρια των γενών: *Acidovorax*, *Actinomyces*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Aspergillus*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Caldimonas*, *Clostridium*, *Comamonas*, *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Gracilibacillus*, *Klebsiella*, *Leptothrix*, *Lihua Xuella*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Pimelobacter*, *Planococcus*, *Pseudomonas*, *Pseudoalteromonas*, *Staphylococcus*, *Streptomyces*, *Variovorax*. Οι μύκητες μπορούν επίσης να αποικοδομήσουν τον PHB. Οι μύκητες θεωρούνται ως πιο αποτελεσματικοί αποικοδομητές σε σύγκριση με τα βακτήρια. Οι γνωστοί μύκητες που αποικοδομούν τον PHB ανήκουν στις κατηγορίες *Ascomycota*, *Basidiomycetes*, *Deuteromycetes* και *Zygomycotina* σε αερόβια και αναερόβια περιβάλλοντα. (Meereboer et al., 2020; Paloyan et al., 2025; Roohi et al., 2018) Διάφοροι μικροοργανισμοί εκκρίνουν εξωκυτταρικές PHB αποπολυμεράσες που υδρολύουν τον στερεό PHB σε υδατοδιαλυτό μονομερές και олиγομερή. Τέτοιοι μικροοργανισμοί έχουν απομονωθεί από διάφορα περιβάλλοντα, όπως το έδαφος, το θαλασσινό νερό, το νερό των λιμνών, ο αέρας, οι θερμές πηγές, το κομπόστ και η λάσπη. (Sudesh et al., 2000.)



Εικόνα 11: Τρισδιάστατη απεικόνιση του εξωκυτταρικού ενζύμου PHB αποπολυμεράση. Από: (Panagiotidou et al., 2014)

Οι PHB αποπολυμεράσες αποτελούνται από μία πολυπεπτιδική αλυσίδα και το μοριακό τους βάρος κυμαίνεται μεταξύ 37.000 και 60.000 Da. Η ανάλυση έδειξε ότι όλα τα

ένζυμα αποτελούνται από έναν καταλυτικό τομέα που βρίσκεται στο N-άκρο, έναν τομέα που συνδέεται με το υπόστρωμα στο C-άκρο και μια περιοχή σύνδεσης που ενώνει τους δύο τομείς. Το ένζυμο παρουσιάζει αλκαλικά ισοηλεκτρικά σημεία και μέγιστη δραστηριότητα μεταξύ pH 7,5 και 9,5. Ο καταλυτικός τομέας περιέχει ένα μοναδικό πενταπεπτίδιο: την αλληλουχία [Gly-X1-Ser-X2-Gly], που ονομάζεται «lipase box» και είναι κοινή σε διάφορες υδρολάσες σερίνης. Αυτή η σερίνη σχηματίζει μια καταλυτική τριάδα με δύο ακόμη αμινοξέα, το ασπαρτικό και την ιστιδίνη (His-Ser-Asp), τα οποία σχηματίζουν το πραγματικό καταλυτικό κέντρο. (Roohi et al., 2018; Sudesh et al., 2000.)

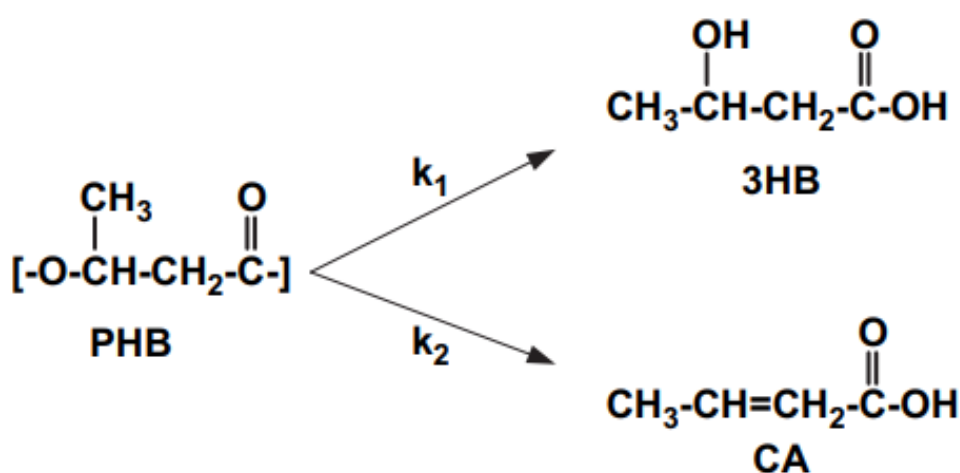


Εικόνα 12: Ενζυμική αποικοδόμηση κρυστάλλων PHB από τις PHB αποπολυμεράσες. Αυτό το σχήμα απεικονίζει τη δομή των εξωκυτταρικών αποπολυμερασών PHB, όπου υπάρχουν τρεις περιοχές: η περιοχή πρόσδεσης (binding domain), η οποία είναι υπεύθυνη για την απορρόφηση και την εξάπλωση σε όλο το πολυμερές, η περιοχή σύνδεσης (linker domain), η οποία είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση της περιοχής πρόσδεσης με την καταλυτική περιοχή, και η καταλυτική περιοχή (catalytic domain), η οποία διασπά το PHB και τυχόν διαθέσιμα διμερή και τριμερή. (Από: Meereboer et al., 2020)

Η ενζυμική αποικοδόμηση του PHB χαρακτηρίζεται ως ετερογενής αντίδραση δύο σταδίων: την προσρόφηση και την υδρόλυση. Αρχικά, το ένζυμο συνδέεται με την επιφάνεια του PHB μέσω της περιοχής πρόσδεσης του ενζύμου. Το δεύτερο στάδιο περιλαμβάνει τον καταλυτικό τομέα του ενζύμου. Ο τομέας αυτός υδρολύει τις αλυσίδες του πολυεστέρα. Το ένζυμο συνδέεται με ολόκληρη την επιφάνεια των μονοκρυσταλλων PHB. (Magalhães Júnior et al., 2021) Το αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι ο σχηματισμός αταξικών αλυσίδων PHB που μοιάζουν με αλυσίδες πολυμερούς στην άμορφη φάση. Ο ρυθμός της ενζυμικής αποικοδόμησης εξαρτάται από τη συγκέντρωση του ενζύμου. (Panagiotidou et al., 2014; Roohi et al., 2018; Sudesh et al., n.)

1.7. Αλκαλική αποικοδόμηση PHB

Η αβιοτική υδρόλυση είναι μια σχετικά αργή διαδικασία αν συμβεί σε ουδέτερο pH. Η υδρόλυση αυτή επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως το pH, η θερμοκρασία και ο βαθμός κρυσταλλοποίησης του πολυμερούς. Σε μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί έχειδειχθεί ότι σπάζουν οι εστερικοί δεσμοί του πολυμερούς. Έτσι δημιουργούνται διαλυτά και αδιάλυτα μονομερή. (Chae & Lee, 2025; Tapadiya & Vasanthan, 2017; Yu et al., 2005) Στην έρευνα των Yu et al. (2005) προτάθηκε ένας πιθανός μηχανισμός της αντίδρασης υδρόλυσης. Με βάση την έρευνα αυτή, η αντίδραση μπορεί να παράγει 3-υδροξυβουτυρικό οξύ (3HB) και κροτονικό οξύ (CA) ως τελικά προϊόντα.



Εικόνα 13: Αλκαλική υδρόλυση του PHB και παράλληλη παραγωγή του 3-υδροξυβουτυρικού οξέος (3HB) και του κροτονικού οξέος (CA). Από: (Yu et al., 2005)

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1. Δημιουργία διαλυμάτων

Το πολύ-3-υδροξυβουτυρικό (PHB) χρησιμοποιήθηκε σε μορφή έτοιμης σκόνης υψηλής καθαρότητας. Για τις ανάγκες των πειραμάτων παρασκευάστηκαν υδατικά διαλύματα αποθέματος (stock solutions), διαλύοντας κατάλληλες ποσότητες PHB (0,5 g/L, 1g/L και 5 g/L) σε απιονισμένο νερό (dH₂O). Για την ρύθμιση του pH χρησιμοποιήθηκε διάλυμα NaOH 5 M, το οποίο παρασκευάστηκε στο εργαστήριο. Ως ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιήθηκε φωσφορικό buffer Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ συγκέντρωσης 200mM, με αρχικό pH 8.0, το οποίο εξασφάλιζε σταθερές συνθήκες κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης.

2.2. Πειραματικός σχεδιασμός

Για την πραγματοποίηση των δύο πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν οκτώ γυάλινες φιάλες Duran χωρητικότητας 25mL και δύο φιάλες Duran των 1000mL. Σε κάθε μικρή φιάλη τοποθετούνταν, εκτός από το δείγμα, και ένα μικρό μαγνητικό αναδευτήριο. Στη συνέχεια, τέσσερις μικρές φιάλες τοποθετούνταν ανά ομάδα σε μία μεγάλη φιάλη αντίστοιχα, οι οποίες λειτουργούσαν ως λουτρά θερμοκρασίας. Οι μεγάλες φιάλες περιείχαν 150mL νερό ή, σε περιπτώσεις υψηλότερων θερμοκρασιών (>100°C), σιλικονέλαιο (silicon oil), προς αποφυγή εξάτμισης. Με τον τρόπο αυτό εξασφαλιζόταν η ομοιόμορφη μεταφορά θερμότητας από το εξωτερικό υγρό προς τις μικρές φιάλες. Στη συνέχεια, οι δύο μεγάλες φιάλες τοποθετούνταν ταυτόχρονα σε θερμαινόμενη πλάκα με δυνατότητα ανάδευσης, ώστε να διατηρείται σταθερή θερμοκρασία σε όλη τη διάρκεια του πειράματος και συνεχή ανάδευση των δειγμάτων. Τέλος, η συλλογή των δειγμάτων για την μέτρηση του υδρόλυμένου PHB γίνεται σε διαφορετικά χρονικά σημεία.

2.3. Πειραματική Διαδικασία

2.3.1. Επίδραση pH και θερμοκρασίας

Για να μελετηθεί η επίδραση του pH και της θερμοκρασίας στην υδρόλυση του PHB, χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 15 δείγματα των 10ml. Σε κάθε δείγμα προστέθηκε

1ml PHB συγκέντρωσης 0,5g/L, 4ml απεσταγμένου νερού και 5ml ρυθμιστικού διαλύματος για την απόκτηση επιθυμητού pH, δηλαδή 9, 10 και 11. Για κάθε δείγμα το πείραμα πραγματοποιείται σε διαφορετικές θερμοκρασίες (75-85 °C, 80-90 °C, 90-100 °C, 100 °C, 120-130 °C). Για την ελαχιστοποίηση των σφαλμάτων, κάθε συνθήκη επαναλαμβάνεται εις διπλούν.

Πίνακας 2: Επίδραση pH και θερμοκρασίας

	Ποσότητα PHB	Θερμοκρασία	pH
Πείραμα i	1ml PHB [0,5g/L]	80-90 °C	9
Πείραμα ii	1ml PHB [0,5g/L]	80-90 °C	10
Πείραμα iii	1ml PHB [0,5g/L]	80-90 °C	11
Πείραμα iv	1ml PHB [0,5g/L]	90-100 °C	9
Πείραμα v	1ml PHB [0,5g/L]	90-100 °C	10
Πείραμα vi	1ml PHB [0,5g/L]	90-100 °C	11
Πείραμα vii	1ml PHB [0,5g/L]	100 °C	9
Πείραμα viii	1ml PHB [0,5g/L]	100 °C	10
Πείραμα ix	1ml PHB [0,5g/L]	100 °C	11
Πείραμα x	1ml PHB [0,5g/L]	120-130 °C (silicon oil)	9
Πείραμα xi	1ml PHB [0,5g/L]	120-130 °C (silicon oil)	10
Πείραμα xii	1ml PHB [0,5g/L]	120-130 °C (silicon oil)	11
Blank	1ml PHB [0,5g/L]		7,6

2.3.2. Επίδραση συγκέντρωσης PHB και θερμοκρασίας

Για να μελετηθεί η επίδραση της συγκέντρωσης του PHB και της θερμοκρασίας στην υδρόλυση του PHB, χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 12 δείγματα των 10ml. Σε κάθε δείγμα προστέθηκε 1ml PHB συγκέντρωσης 0,5g/L, 1g/L ή 5g/L, 4ml απεσταγμένου νερού και 5ml ρυθμιστικού διαλύματος για την απόκτηση επιθυμητού pH, δηλαδή 10 και 11. Για κάθε δείγμα το πείραμα πραγματοποιείται σε διαφορετικές θερμοκρασίες (80-90 °C, 100 °C, 120-130 °C). Για την ελαχιστοποίηση των σφαλμάτων, κάθε συνθήκη επαναλαμβάνεται εις διπλούν.

Πίνακας 3: Επίδραση συγκέντρωσης και θερμοκρασίας

	Ποσότητα PHB	Θερμοκρασία	pH
Πείραμα i	1ml PHB [0,5g/L]	80-90 °C	11
Πείραμα ii	1ml PHB [1g/L]	80-90 °C	11
Πείραμα iii	1ml PHB [5g/L]	80-90 °C	11
Πείραμα iv	1ml PHB [0,5g/L]	100 °C	11
Πείραμα v	1ml PHB [1g/L]	100 °C	11
Πείραμα vi	1ml PHB [5g/L]	100 °C	11
Πείραμα vii	1ml PHB [0,5g/L]	100 °C	10
Πείραμα viii	1ml PHB [1g/L]	100 °C	10
Πείραμα ix	1ml PHB [5g/L]	100 °C	10
Πείραμα x	1ml PHB [0,5g/L]	120-130 °C (silicon oil)	11
Πείραμα xi	1ml PHB [1g/L]	120-130 °C (silicon oil)	11
Πείραμα xii	1ml PHB [5g/L]	120-130 °C (silicon oil)	11
Blank	1ml PHB [0,5g/L]		7,6

2.4. Διαδικασία επεξεργασίας δειγμάτων

Η επεξεργασία των δειγμάτων πραγματοποιούνταν σε φυγόκεντρο υψηλής ταχύτητας για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε 12.000 rpm. Για την κατακράτηση και ποσοτικοποίηση του PHB χρησιμοποιήθηκαν προ-ζυγισμένοι σωληνίσκοι μικροφυγοκέντρησης (Eppendorf), των 1,5 mL και 2mL.

2.5. Προσδιορισμός ξηρού βάρους PHB και ποσοστού αποικοδόμησης

Για την ποσοτικοποίηση της υδρόλυσης του PHB σε κάθε δείγμα λαμβάνεται ποσότητα 1ml σε διαφορετικούς χρόνους. Οι συνηθέστεροι ήταν 0h, 24h, 48h, 96h. Κάθε δείγμα φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά με επακόλουθη την ξήρανση του ιζήματος στους 65 °C με προσθήκη 50 μl καθαρής ακετόνης. Στη συνέχεια έγινε προσδιορισμός του ξηρού βάρους του αποξηραμένου PHB με τη βοήθεια ζυγού ακριβείας. Ο προσδιορισμός της μάζας έγινε από την αφαίρεση της μάζας του Eppendorf από την συνολική μάζα του Eppendorf μετά την αποξήρανση.

Η μεταβολή της συγκέντρωσης του PHB σε κάθε ένα από τα δείγματα γίνεται με την χρήση του τύπου: $Μεταβολή(\%) = \frac{[PHB]_{αρχική} - [PHB]_{τελική}}{[PHB]_{αρχική}} \times 100\%$.

2.6. Ανάπτυξη και συντήρηση μικροοργανισμών

Ο μικροοργανισμός που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο *Alcaligenes faecalis* NRRL - 1695. Η αποθήκευση του μικροοργανισμού γίνεται στην κατάψυξη στους -80 °C, σε cryovial. Τα cryovial περιείχαν 1mL καλλιέργειας του μικροοργανισμού και 1mL γλυκερόλης. Η αναγέννηση της κατεψυγμένης καλλιέργειας πραγματοποιήθηκε μέσω της ανάπτυξης 500μL της καλλιέργειας σε 50mL θρεπτικού μέσου «medium 1», στο οποίο εμπεριέχεται πεπτόνη (peptone) συγκέντρωσης 5g/L και εκχύλισμα κρέατος συγκέντρωσης 3g/L διαλυμένα σε απιονισμένο νερό (ddH₂O). Μετά τον εμβολιασμό, ακολουθεί επώαση σε θάλαμο επώασης με ανάδευση για 16 - 20 ώρες στους 30 °C και στις 220 στροφές. Μετά το πέρας του χρόνου, οι καλλιέργειες παρατηρούνται στο μικροσκόπιο για τυχόν επιμολύνσεις. Οι καλλιέργειες που δεν εμφάνισαν κάποια επιμόλυνση αποθηκεύτηκαν ανά 1 mL σε cryovials με τον ίδιο τρόπο που περιεγράφηκε προηγουμένως.

2.7. Θρεπτικά υλικά 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 4 και 5. 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 4: Μέσο καλλιέργειας MS.

Προκαλλιέργεια (growth MS) pH 6,8	
KH₂PO₄-NaHPO₄ (PH= 6,8)	4,5-4,68 g/L
NH₄Cl	0,96 g/L
MgSO₄ 7H₂O	0,49 g/L
FeCl₃ 6H₂O	0,01 g/L
CaCl₂	0,005 g/L
Κύρια καλλιέργεια (secretion MS) pH 7,4	
KH₂PO₄ (PH=7,4)	4,5-4,68 g/L
NH₄Cl	0,96 g/L
MgSO₄ 7H₂O	0,25 g/L

Πίνακας 5: Μέσο καλλιέργειας DSM457

DSM457 MINERAL MEDIUM	
Na₂HPO₄	2.44 g
KH₂PO₄	1.52 g
(NH₄)₂SO₄	0.50 g
MgSO₄ * 7 H₂O	0.20 g
CaCl₂ * 2 H₂O	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
FeSO₄ x 7 H₂O	0.20 g/L
Trace element solution SL-6	100.00 mL
Distilled water	900.00 mL
Trace element solution SL-6	
ZnSO₄ * 7 H₂O	0.10 g/L
MnCl₂ * 4 H₂O	0.03 g/L
H₃BO₃	0.30 g/L
CoCl₂ * 6 H₂O	0.20 g/L

CuCl₂ * 2 H₂O	0.01 g/L
NiCl₂ * 6 H₂O	0.02 g/L
Na₂MoO₄ * 2 H₂O	0.03 g/L
Distilled water	1000 mL

Στο μέσο καλλιέργειας του Πίνακα 5 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.

2.8. Πειράματα ασυνεχών ζυμώσεων

Για την καλλιέργεια παρασκευάστηκαν 50mL θρεπτικού σε κωνικές φιάλες των 250mL. Ακολούθησε αποστείρωση και μετά την επιστροφή τους σε θερμοκρασία δωματίου, πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός των καλλιεργειών με pH 6,8 με τους μικροοργανισμούς που είχαν αποθηκευτεί στα cryovials. Ο εμβολιασμός γίνεται σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής για να εξασφαλιστούν αποστειρωμένες συνθήκες. Τέλος, οι κωνικές φιάλες τοποθετούνται σε θάλαμο επώασης με συνεχή ανάδευση, στους 30°C στις 220 στροφές. Η επώασή τους διαρκεί 16-20 ώρες.

Έπειτα, ακολουθεί η μεταφορά των μικροοργανισμών στις κωνικές φιάλες με την κύρια καλλιέργεια. Η μεταφορά πραγματοποιείται επίσης σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής. Συγκεντρώνονται 40mL κάθε προκαλλιέργειας σε falcon των 50 mL, τα οποία στη συνέχεια φυγοκεντρούνται για 10 λεπτά στους 4 °C. Στο ίζημα της φυγοκέντρωσης, υπάρχει η βιομάζα. Στο ίζημα προστίθενται 10 mL ρυθμιστικού διαλύματος KH₂PO₄-NaHPO₄ με PH 7,4. Ακολουθεί 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 προκύπτει από τη δεύτερη φυγοκέντρωση γίνεται προσθήκη του θρεπτικού μέσου της κύριας καλλιέργειας και ανάδευση με vortex με σκοπό την ομογενοποίηση του διαλύματος. Τέλος, το ομογενές διάλυμα της κύριας πλέον καλλιέργειας μεταφέρεται σε κωνική φιάλη χωρητικότητας 250mL, έτσι ώστε να τοποθετηθεί ξανά στον επωαστήρα, αφού πρώτα πραγματοποιείται λήψη δειγμάτων σε Eppendorf αμέσως μετά τη μεταφορά. Οι συνθήκες επώασης παραμένουν οι ίδιες.

Κατά την επώαση της κύριας καλλιέργειας, ακολουθεί ανά χρονικά διαστήματα η λήψη δειγμάτων υπό αποστειρωμένες συνθήκες.

2.9. Πειράματα υδρόλυσης

Στο πέρας των ασυνεχών ζυμώσεων στις 24 ώρες, η καλλιέργειες μεταφέρονται σε falcon των 50mL και φυγοκεντρώνονται στους 4 °C για 10 λεπτά. Τα υπερκείμενα κάθε καλλιέργειας μεταφέρονται σε διαφορετικά falcon των 50 mL και ύστερα χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας των εξωκυτταρικών αποπολυμερασών μέσω της διάσπασης PHB σε συγκεντρώσεις 10g/L, 5g/L και 3g/L. Επιπλέον, εξετάζεται η ικανότητα διάσπασης του PHB με σε ρυθμιστικό διάλυμα $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, με pH 6, 7, 8 και 9 αντίστοιχα.

Παρασκευή ρυθμιστικών διαλυμάτων (buffers)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Χρησιμοποιούνται διαφορετικές συγκεντρώσεις Na_2HPO_4 και $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ για να αποκτήσει το κάθε διάλυμα το επιθυμητό pH, όπως φαίνεται στον πίνακα 6.

Πίνακας 6: 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 προσθήκη 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.

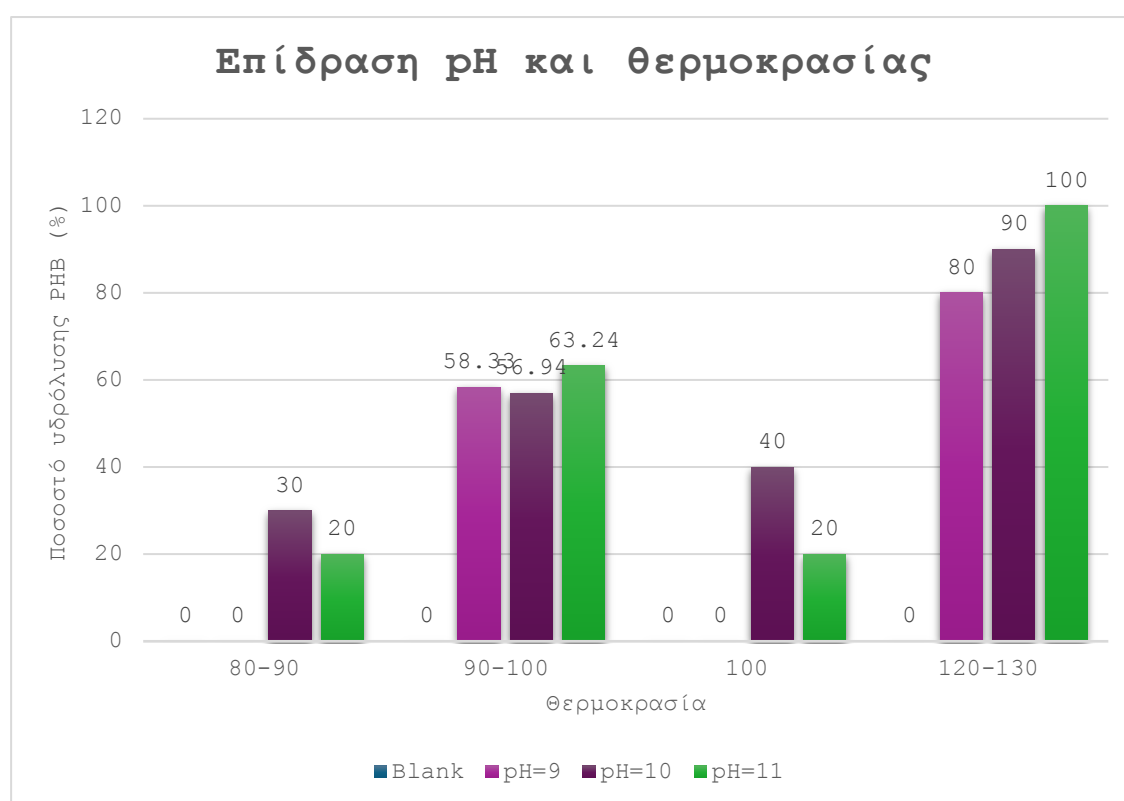
pH	$\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Na_2HPO_4
6	13,616g/L	1,806g/L
7	5,812g/L	8,906g/L
8	0,83g/L	13,439g/L
9	0,83g/L	13,439g/L

Σε Duran χωρητικότητας 25mL αναμειγνύονται τα ρυθμιστικά διαλύματα με το PHB και τοποθετούνται σε υδατόλουτρο υπερήχων για 10 λεπτά. Σε κάθε Duran προστίθενται 4mL από τα υπερκείμενα που προκύπτουν από κάθε καλλιέργεια. Ακολουθεί επώαση στους 37 °C σε θερμαινόμενη πλάκα υπό ανάδευση με τη βοήθεια μαγνητών.

3. Αποτελέσματα

3.1. Επίδραση pH και θερμοκρασίας

Το κεφάλαιο αυτό παρουσιάζει και αναλύει τα αποτελέσματα της πειραματικής μελέτης σχετικά με την επίδραση της θερμοκρασίας και του pH στη μεταβολή της συγκέντρωσης του πολυ-υδροξυβουτυρικού οξέος (PHB). Η μεταβολή εκφράζεται ως ποσοστό (%), για κάθε συνδυασμό θερμοκρασίας και pH. Επιπλέον περιλαμβάνεται ομάδα αναφοράς σε pH 7,6, η οποία χαρακτηρίζεται ως "Blank".



Γράφημα 1: Συγκριτικό διάγραμμα του ποσοστού υδρόλυσης PHB (άξονας y) σε διαφορετικές θερμοκρασίες (άξονας x) και σε διαφορετικές τιμές pH (κάθετες στήλες διαφορετικού χρώματος). Η μέγιστη μεταβολή παρατηρείται σε θερμοκρασίες 120-130 °C και σε pH=11.

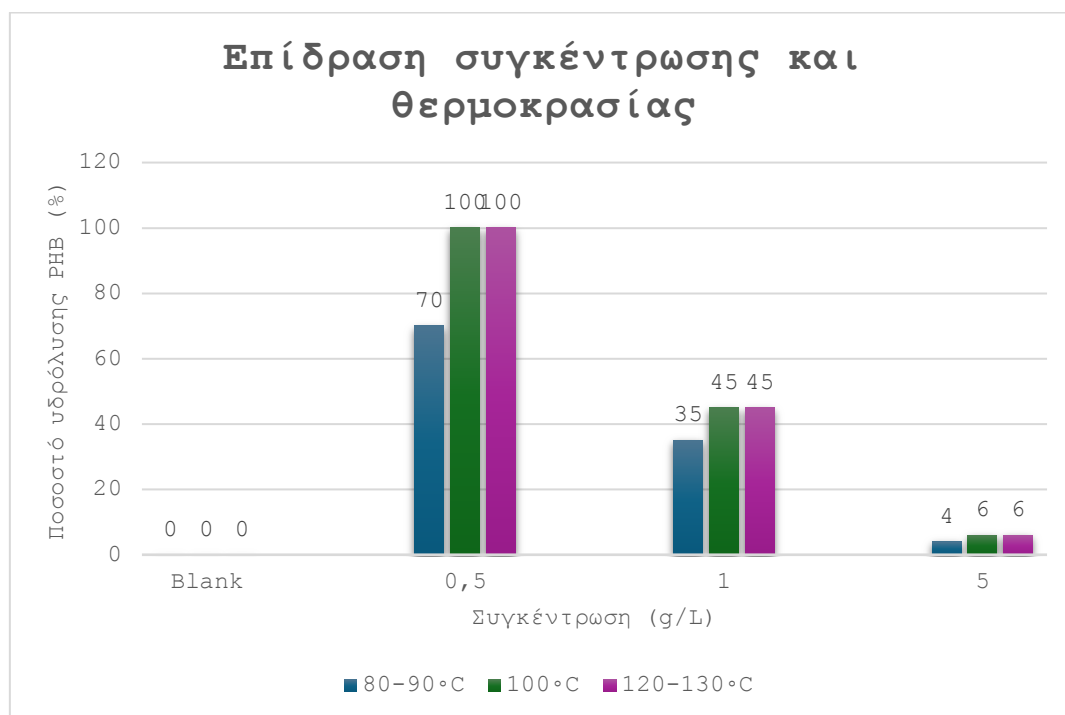
Τα πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι το pH είναι ένας καθοριστικός παράγοντας στις αλλαγές της συγκέντρωσης PHB. Η μέγιστη αλλαγή (100%) σημειώθηκε σε επίπεδο pH 11 και σε θερμοκρασία 120–130 °C. Σε όλες σχεδόν τις θερμοκρασίες, παρατηρήθηκε μεγαλύτερος ρυθμός αλλαγής σε pH 11 από ό,τι σε pH 9 ή 10. Επιπλέον, σημαντικές αλλαγές παρατηρήθηκαν σε επίπεδα pH 10 και 11 εντός του εύρους θερμοκρασίας 90–100 °C, φθάνοντας το 63,4% σε pH 11.

Η θερμοκρασία αναδείχθηκε επίσης ως κρίσιμος παράγοντας στην αποικοδόμηση του PHB. Γενικά, οι χαμηλές θερμοκρασίες (κάτω των 90 °C) συνδέονται με χαμηλά ή μηδενικά ποσοστά αποικοδόμησης.

Για όλες τις τιμές pH, η αύξηση της θερμοκρασίας πάνω από 90 °C συνοδεύτηκε από αύξηση του βαθμού αλλαγής. Οι υψηλότερες αποδόσεις καταγράφηκαν σε θερμοκρασίες μεταξύ 120 και 130 °C για όλες τις τιμές pH: 80% για pH 9, 90% για pH 10 και 100% για pH 11. Αντίθετα, οι αλλαγές ήταν αμελητέες στο εύρος 80–90 °C, με αποδόσεις που κυμαίνονταν από 20% έως 30% ανεξάρτητα από το pH.

3.2. Επίδραση συγκέντρωσης PHB και θερμοκρασίας

Στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης εξετάστηκε επίσης η επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης PHB (g/L) στη μεταβολή του υλικού, υπό τρεις διαφορετικές θερμοκρασιακές συνθήκες: 80–90°C, 100°C και 120–130°C.



Γράφημα 2: Συγκριτικό διάγραμμα του ποσοστού μεταβολής της συγκέντρωσης PHB (άξονας y) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (άξονας x) και σε διαφορετικές θερμοκρασίες (κάθετες στήλες διαφορετικού χρώματος). Η μέγιστη μεταβολή παρατηρείται σε θερμοκρασίες 120–130 °C και συγκέντρωση 0,5g/L.

Με βάση το γράφημα 2 παρατηρείται ότι το ποσοστό της μεταβολής είναι άμεσα εξαρτώμενο από την αρχική ποσότητα του πολυμερούς στο προς εξέταση

διάλυμα. Έτσι παρατηρείται η μέγιστη απόδοση μεταβολής, με το ποσοστό να φθάνει το 100% όταν η αρχική συγκέντρωση είναι 0,5 g/L και σε θερμοκρασίες 100°C και 120-130°C. Η μεταβολή στην ίδια συγκέντρωση παραμένει σημαντική, φθάνοντας το 70%, όταν το δείγμα εξετάζεται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (80–90°C).

Όταν η συγκέντρωση είναι στην τιμή 1g/L τότε η μεταβολή μειώνεται σημαντικά, φθάνοντας σε μέγιστο ποσοστό 45% σε θερμοκρασίες 100°C και 120-130°C. Η παρατηρούμενη μείωση στο ποσοστό υποδηλώνει ότι η αυξημένη συγκέντρωση πιθανώς να περιορίζει την χημική και θερμική αλληλεπίδραση των μορίων του PHB με το περιβάλλον του. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο αυξημένο ιξώδες ή στην χαμηλότερη διάχυση θερμοκρασίας.

Στα δείγματα με συγκέντρωση 5g/L παρατηρήθηκε ακόμα πιο περιορισμένη επίδραση, καθώς η μεταβολή δεν ξεπερνά το 6% σε καμία θερμοκρασιακή συνθήκη. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η πολύ υψηλή συγκέντρωση PHB αυξάνει την ανθεκτικότητα του πολυμερούς σε θερμικές και χημικές διαδικασίες αποικοδόμησης, πιθανώς λόγω κορεσμού του συστήματος ή συσσωμάτωσης του υλικού.

Στην ομάδα αναφοράς (Blank), δεν παρατηρήθηκε μεταβολή. Αυτή η περιορισμένη αυτή απόκριση δείχνει ότι χωρίς ρυθμιστικούς παράγοντες ή ενεργά συστατικά, η αποικοδόμηση του PHB είναι ελάχιστη ή ανύπαρκτη.

3.3. Μελέτη ενζυμικής υδρόλυσης

Στο Γράφημα 3 απεικονίζονται οι αποδόσεις που καταγράφηκαν στα διαλύματα υδρόλυσης του βακτηρίου *Alcaligenes faecalis* NRRL-1695. Φαίνονται οι αποδόσεις στις 48 ώρες επώασης των διαλυμάτων που περιέχουν τις αποπολυμεράσεις του στελέχους αυτού. Η απόδοση στο διάλυμα με pH 6 είναι 40 %, ενώ στα διαλύματα με pH 7 και pH 9 είναι 20%.



Γράφημα 3: Η απόδοση της υδρόλυσης στα διαλύματα όπου εμπεριέχεται Na_2HPO_4 - $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ pH 6,7,8 και 9 στις 48 ώρες υδρόλυσης.

4. Συζήτηση

Η μελέτη αυτή διερευνά τη θερμική αποικοδόμηση του πολύ(3)-υδροξυβουτυρικού εστέρα (PHB) υπό την επίδραση διαφορετικών φυσικοχημικών συνθηκών, με σκοπό να εντοπιστούν και να κατανοηθούν οι παράγοντες που επηρεάζουν την σταθερότητα και τη διάσπασή του. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η θερμοκρασία, το pH και η αρχική συγκέντρωση του πολυμερούς έχουν σημαντική επίδραση στην απόδοση της διαδικασίας.

Ο PHB εμφανίζει σημαντικά αυξημένη αποικοδόμηση, ιδιαίτερα σε υψηλές θερμοκρασίες σε έντονα αλκαλικό περιβάλλον (pH 11). Συνεπώς η επίδραση του pH είναι καθοριστική για την αποικοδόμηση του PHB. Το εύρημα αυτό συμφωνεί και με την διεθνή βιβλιογραφία. Στους Kim et al., 2023 και στους Sudesh et al., 2000, οι πολυεστέρες, όπως ο PHB, εμφανίζουν επιταχυνόμενη υδρόλυση σε αλκαλικά μέσα λόγω της ευνοϊκής χημικής δράσης στην ρήξη των εστερικών δεσμών. Αντίθετα, σε ουδέτερο ή όξινο περιβάλλον η αποικοδόμηση που παρατηρήθηκε ήταν σημαντικά περιορισμένη, κάτι που επιβεβαιώνει την ανθεκτικότητα του PHB σε τέτοιες συνθήκες.

Η θερμοκρασία θεωρείται ευρέως ένας καθοριστικός παράγοντας για την αποικοδόμηση του PHB. Στην παρούσα μελέτη η ανάλυση την οδήγησε σε μεγαλύτερο ποσοστό αποικοδόμησης ειδικά σε συνδυασμό με υψηλό pH. Η θερμική αποικοδόμηση ξεκινά στους 180 °C, σύμφωνα με αναλύσεις θερμοβαρυμετρίας (TGA). Η διαδικασία αποικοδόμησης περιλαμβάνει μείωση του μοριακού βάρους, η οποία περιλαμβάνει διάσπαση της αλυσίδας και υδρόλυση. Η ταχύτερη θερμική αποικοδόμηση του PHB σε αυτές τις θερμοκρασίες οφείλεται στην τυχαία διαδικασία διάσπασης της αλυσίδας. Ε αυτή την θερμοκρασία περιλαμβάνεται η διάσπαση των δεσμών C=O και C—O σε εστέρες με διάσπαση β και καταστροφή των κρυσταλλικών περιοχών. (Pradhan et al., 2018). Σε άλλες έρευνες το πολυμερές αποικοδομείται σε θερμοκρασιακό εύρος 260-300°C υπό αδρανείς χημικά συνθήκες (Mohapatra & Aswathy, 2024; Vahabi et al., 2019). Στην παρούσα μελέτη όμωςδείχθηκε ότι υπό αλκαλικές συνθήκες, η αποικοδόμηση μπορεί να επιτευχθεί σε πολύ χαμηλότερη θερμοκρασία (120-130°C). Μπορούμε λοιπόν να συμπεράνουμε ότι εμπλέκονται μηχανισμοί διάσπασης χημικής φύσης, οι οποίοι μπορούν να μελετηθούν περαιτέρω.

Η αποτελεσματικότητα της ανάλυσης επηρεάστηκε ουσιαστικά από την συγκέντρωση του πολυμερούς. Παρατηρήθηκε μέγιστη αποικοδόμηση σε χαμηλή αρχική συγκέντρωση PHB (0,5g/L), αντίθετα σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (1-5 g/L)

το ποσοστό μεταβολής μειώθηκε σημαντικά. Τα αποτελέσματα αυτά οφείλονται πιθανότατα σε φαινόμενα αυξημένου ιξώδους, ίσως και περιορισμένης διάχυσης θερμότητας και αντιδραστηρίων που πιθανώς μειώνουν ή απαγορεύουν την πρόσβαση του πολυμερούς στο αλκαλικό μέσο. Στην διεθνή βιβλιογραφία δεν υπάρχουν σχετικές εκτενείς μελέτες που να συσχετίζουν την αρχική συγκέντρωση του PHB με την θερμική αποικοδόμηση του. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας μπορούν να θεωρούν το έναυσμα για την κατανόηση της θερμικής συμβολής στην αποικοδόμηση του PHB.

Οι PHB αποπολυμεράσεις του *A.faecalis* NRRL-1695 παρουσιάζουν βέλτιστη δραστηριότητα σε ελαφρώς αλκαλικό περιβάλλον. Συγκεκριμένα, σε ρυθμιστικό διάλυμα $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από το pH. Η μέγιστη τιμή εμφανίζεται σε pH 8. Αντιθέτως παρουσιάζεται μείωση σε όξινο ή περισσότερο αλκαλικό περιβάλλον (pH 9). Σε άλλες έρευνες έχει δειχθεί ότι το pH επηρεάζει την δραστηριότητα των PHB αποπολυμερασών που απομονώνονται από τα βακτήρια *A.faecalis*. Οι PHB αποπολυμεράσεις αυτές είναι δραστικές σε ουδέτερο έως ελαφρά αλκαλικό pH, σε τιμές 7.0-8.0. (Abe & Doi, 1999; Kasuya et al., 1995) Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης επιβεβαιώνουν ότι η χρήση του συγκεκριμένου ρυθμιστικού διαλύματος παρέχει το κατάλληλο pH για την επίτευξη της βέλτιστης δραστηριότητας.

Συγκεντρωτικά, τα ευρήματα της παρούσας μελέτης καταδεικνύουν ότι η αποικοδόμηση του PHB δεν εξαρτάται αποκλειστικά και μόνο από την θερμότητα. Εμφανίζεται αλληλεπίδραση θερμικών και χημικών παραγόντων. Οι πιο ευνοϊκές συνθήκες για αποτελεσματική διάσπαση είναι ο συνδυασμός του αλκαλικού pH, της υψηλής θερμοκρασίας και χαμηλής συγκέντρωσης του πολυμερούς. Είναι φανερό ότι η δυνατότητα ελεγχόμενης αποικοδόμησης υπό συγκεκριμένες συνθήκες δίνει την ικανότητα χρήσης της σε εφαρμογές όπως η ανακύκλωση. Ο PHB είναι ένα πολλά υποσχόμενο βιοαποικοδομήσιμο βιοπολυμερές. Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύουν τη σημασία του έναντι των συμβατικών πλαστικών. (Koch & Forchhammer, 2021; Lu et al., 2020).

5. Συμπεράσματα

Η παρούσα εργασία εξέτασε τη θερμική αποικοδόμηση του πολυ(3)-υδροξυβουτυρικού εστέρα (PHB) υπό διαφορετικές συνθήκες pH, θερμοκρασίας και συγκέντρωσης. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν ότι το pH αποτελεί κρίσιμο παράγοντα, καθώς η αποικοδόμηση του PHB ήταν σαφώς εντονότερη σε αλκαλικό περιβάλλον (pH 11), όπου παρατηρήθηκε πλήρης διάσπαση σε συνδυασμό με υψηλές θερμοκρασίες. Αντιθέτως, σε ουδέτερο ή όξινο περιβάλλον η αποικοδόμηση ήταν περιορισμένη.

Η θερμοκρασία λειτούργησε ως καταλυτικός μηχανισμός στη διαδικασία, καθώς η αύξησή της επιτάχυνε σημαντικά την αποικοδόμηση. Οι υψηλότερες θερμοκρασίες (120–130°C) οδήγησαν στη μέγιστη απόδοση, γεγονός που αναδεικνύει τη σημασία του συνδυασμού θερμικής επεξεργασίας και αλκαλικότητας. Παράλληλα, η συγκέντρωση του πολυμερούς αποδείχθηκε καθοριστική, αφού οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις (0,5 g/L) παρουσίασαν την υψηλότερη αποικοδόμηση, ενώ οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (1–5 g/L) περιόρισαν σημαντικά το ποσοστό διάσπασης, πιθανότατα λόγω μειωμένης διάχυσης και αυξημένου ιξώδους.

Συνολικά, η μελέτη ανέδειξε ότι η αποικοδόμηση του PHB δεν είναι απλώς αποτέλεσμα της θερμότητας, αλλά εξαρτάται από την αλληλεπίδραση πολλών παραγόντων. Ο συνδυασμός αλκαλικού pH, υψηλής θερμοκρασίας και χαμηλής συγκέντρωσης του πολυμερούς δημιουργεί τις ευνοϊκότερες συνθήκες για αποτελεσματική διάσπαση. Τα ευρήματα αυτά συμβάλλουν στην κατανόηση των μηχανισμών θερμικής αποικοδόμησης του PHB και μπορούν να αξιοποιηθούν για τη βελτιστοποίηση της βιομηχανικής επεξεργασίας και ανακύκλωσής του. Παράλληλα, αναδεικνύουν τη δυνατότητα ανάπτυξης στοχευμένων στρατηγικών για τη μείωση του περιβαλλοντικού αποτυπώματος των βιοπολυμερών και την ενίσχυση της βιωσιμότητάς τους ως εναλλακτικών στα συμβατικά πλαστικά.

6. Βιβλιογραφία

- Abe, H., & Doi, Y. (1999). Structural effects on enzymatic degradabilities for poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] and its copolymers. In *International Journal of Biological Macromolecules* (Vol. 25).
- Ali, S. S., Elsamahy, T., Al-Tohamy, R., Zhu, D., Mahmoud, Y. A. G., Koutra, E., Metwally, M. A., Kornaros, M., & Sun, J. (2021). Plastic wastes biodegradation: Mechanisms, challenges and future prospects. In *Science of the Total Environment* (Vol. 780). Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146590>
- Bachmann, M., Zibunas, C., Hartmann, J., Tulus, V., Suh, S., Guillén-Gosálbez, G., & Bardow, A. (2023). Towards circular plastics within planetary boundaries. *Nature Sustainability*, 6(5), 599–610. <https://doi.org/10.1038/s41893-022-01054-9>
- Barham, P. J., Keller, A., Otun, E. L., Wills, H. H., & Holmes, P. A. (1984). Crystallization and morphology of a bacterial thermoplastic: poly-3-hydroxybutyrate. In *JOURNAL OF MATERIALS SCIENCE* (Vol. 19).
- Becker, N., Hannover, H., & Siebert-Raths, A. (n.d.). *Biopolymers facts and statistics 2022*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.24122.06081>
- Chae, Y. J., & Lee, T. G. (2025). Controlled biodegradability of polyhydroxybutyrate via surface coating with cellulose triacetate. *Scientific Reports*, 15(1).
<https://doi.org/10.1038/s41598-025-10782-9>
- Chamas, A., Moon, H., Zheng, J., Qiu, Y., Tabassum, T., Jang, J. H., Abu-Omar, M., Scott, S. L., & Suh, S. (2020). Degradation Rates of Plastics in the Environment. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 8(9), 3494–3511.
<https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b06635>
- Chanprateep, S. (2010). Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110(6), 621–632.
<https://doi.org/10.1016/J.JBIOSEC.2010.07.014>
- Chen, H. J., Pan, S. C., & Shaw, G. C. (2009). Identification and characterization of a novel intracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Bacillus megaterium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(16), 5290–5299.
<https://doi.org/10.1128/AEM.00621-09>
- Dalton, B., Bhagabati, P., De Micco, J., Padamati, R. B., & O'Connor, K. (2022). A Review on Biological Synthesis of the Biodegradable Polymers

- Polyhydroxyalkanoates and the Development of Multiple Applications. In *Catalysts* (Vol. 12, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/catal12030319>
- Dawes, E. A., & Senior, P. J. (n.d.). *The Role and Regulation of Energy Reserve Polymers in Micro-organisms*.
- dos Santos, A. J., Oliveira Dalla Valentina, L. V., Hidalgo Schulz, A. A., & Tomaz Duarte, M. A. (2017). From Obtaining to Degradation of PHB: Material Properties. Part I. *Ingeniería y Ciencia*, 13(26), 269–298. <https://doi.org/10.17230/ingciencia.13.26.10>
- Eggers, J., & 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), 3213–3223. <https://doi.org/10.1128/JB.00358-13>
- Eggers, J., & Steinbüchel, A. (2014). Impact of *Ralstonia eutropha*'s poly(3-Hydroxybutyrate) (PHB) depolymerases and phasins on PHB storage in recombinant *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(24), 7702–7709. <https://doi.org/10.1128/AEM.02666-14>
- Higuchi-Takeuchi, M., Morisaki, K., Toyooka, K., & Numata, K. (2016). Synthesis of high-molecular-weight polyhydroxyalkanoates by marine photosynthetic purple bacteria. *PLoS ONE*, 11(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160981>
- Hisano, T., Kasuya, K. I., Tezuka, Y., Ishii, N., Kobayashi, T., Shiraki, M., Oroudjev, E., Hansma, H., Iwata, T., Doi, Y., Saito, T., & Miki, K. (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), 993–1004. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.12.028>
- Kabir, E., Kaur, R., Lee, J., Kim, K. H., & Kwon, E. E. (2020). Prospects of biopolymer technology as an alternative option for non-degradable plastics and sustainable management of plastic wastes. In *Journal of Cleaner Production* (Vol. 258). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.120536>
- Kasuya, K.-I., Inoue, Y., Yamada, K., & Doi, Y. (1995). *Polymer Degradation and Stability* (Vol. 48).
- Kendall, A. (2012). A life cycle assessment of biopolymer production from material recovery facility residuals. *Resources, Conservation and Recycling*, 61, 69–74. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2012.01.008>

- Koch, M., & Forchhammer, K. (2021). Polyhydroxybutyrate: A Useful Product of Chlorotic Cyanobacteria. In *Microbial Physiology* (Vol. 31, Issue 2, pp. 67–77). S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/000515617>
- Li, P., Wang, X., Su, M., Zou, X., Duan, L., & Zhang, H. (2021). Characteristics of Plastic Pollution in the Environment: A Review. In *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* (Vol. 107, Issue 4, pp. 577–584). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00128-020-02820-1>
- Liu, G., Cai, S., Hou, J., Zhao, D., Han, J., Zhou, J., & Xiang, H. (2016). Enoyl-CoA hydratase mediates polyhydroxyalkanoate mobilization in *Haloferax mediterranei*. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep24015>
- Lu, H., Yuan, G., Strauss, S. H., Tschaplinski, T. J., Tuskan, G. A., Chen, J. G., & Yang, X. (2020). Reconfiguring Plant Metabolism for Biodegradable Plastic Production. In *BioDesign Research* (Vol. 2020). American Association for the Advancement of Science. <https://doi.org/10.34133/2020/9078303>
- Magalhães Júnior, A. I., Soccol, C. R., Camara, M. C., Molina Aulestia, D. T., Porto de Souza Vandenberghe, L., & Cesar de Carvalho, J. (2021). Challenges in the production of second-generation organic acids (potential monomers for application in biopolymers). *Biomass and Bioenergy*, 149, 106092. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2021.106092>
- Mangaraj, S., Yadav, A., Bal, L. M., Dash, S. K., & Mahanti, N. K. (2019). Application of Biodegradable Polymers in Food Packaging Industry: A Comprehensive Review. *Journal of Packaging Technology and Research*, 3(1), 77–96. <https://doi.org/10.1007/s41783-018-0049-y>
- Meereboer, K. W., Misra, M., & Mohanty, A. K. (2020). Review of recent advances in the biodegradability of polyhydroxyalkanoate (PHA) bioplastics and their composites. In *Green Chemistry* (Vol. 22, Issue 17, pp. 5519–5558). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/d0gc01647k>
- Miu, D. M., Eremia, M. C., & Moscovici, M. (2022). Polyhydroxyalkanoates (PHAs) as Biomaterials in Tissue Engineering: Production, Isolation, Characterization. In *Materials* (Vol. 15, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ma15041410>
- Mohapatra, A. K., & Aswathy, N. R. (2024). Mechanical, thermal, and morphological properties of poly(3-hydroxy butyrate) nanocomposites prepared by melt mixing method. *Journal of Polymer Engineering*, 44(4), 263–274. <https://doi.org/10.1515/polyeng-2023-0204>

- Narancic, T., Cerrone, F., Beagan, N., & O'Connor, K. E. (2020). Recent advances in bioplastics: Application and biodegradation. In *Polymers* (Vol. 12, Issue 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/POLYM12040920>
- Organ, S. J., Barham, P. J., & Wills, H. H. (1991). Nucleation, growth and morphology of poly(hydroxybutyrate) and its copolymers. In *JOURNAL O'F MATERIALS SCIENCE* (Vol. 26).
- Paloyan, A., Tadevosyan, M., Ghevondyan, D., Khoyetsyan, L., Karapetyan, M., Margaryan, A., Antranikian, G., & Panosyan, H. (2025). Biodegradation of polyhydroxyalkanoates: current state and future prospects. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 16). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1542468>
- Panagiotidou, E., Konidaris, C., Baklavaridis, A., Zuburtikudis, I., Achilias, D., & Mitlianga, P. (2014). A simple route for purifying extracellular poly(3-hydroxybutyrate)-depolymerase from penicillium pinophilum. *Enzyme Research*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/159809>
- Patel, D., Mamtara, D., Kamath, A., & Shukla, A. (2022). Rogue one: A plastic story. *Marine Pollution Bulletin*, 177, 113509. <https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2022.113509>
- Pradhan, S., Dikshit, P. K., & Moholkar, V. S. (2018a). Production, ultrasonic extraction, and characterization of poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) using *Bacillus megaterium* and *Cupriavidus necator*. *Polymers for Advanced Technologies*, 29(8), 2392–2400. <https://doi.org/10.1002/pat.4351>
- Pradhan, S., Dikshit, P. K., & Moholkar, V. S. (2018b). Production, ultrasonic extraction, and characterization of poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) using *Bacillus megaterium* and *Cupriavidus necator*. *Polymers for Advanced Technologies*, 29(8), 2392–2400. <https://doi.org/10.1002/pat.4351>
- Puppi, D., Pecorini, G., & Chiellini, F. (2019). Biomedical processing of polyhydroxyalkanoates. In *Bioengineering* (Vol. 6, Issue 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/bioengineering6040108>
- Rajan, K. P., Thomas, S. P., Gopanna, A., & Chavali, M. (2019). Polyhydroxybutyrate (PHB): A Standout Biopolymer for Environmental Sustainability. In *Handbook of Ecomaterials* (pp. 1–23). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-48281-1_92-2

- Rao, M. G., Bharathi, P., & Akila, R. M. (2014). A COMPREHENSIVE REVIEW ON BIOPOLYMERS. *Sci. Revs. Chem. Commun*, 4(2), 61–68.
www.sadgurupublications.com
- Roohi, Zaheer, M. R., & Kuddus, M. (2018). PHB (poly- β -hydroxybutyrate) and its enzymatic degradation. In *Polymers for Advanced Technologies* (Vol. 29, Issue 1, pp. 30–40). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/pat.4126>
- Sharma, R., & Ray, A. R. (1995). Polyhydroxybutyrate, Its Copolymers and Blends. *Journal of Macromolecular Science, Part C*, 35(2), 327–359.
<https://doi.org/10.1080/15321799508009640>
- Stanier, R. Y., Doudoroff, M., Kunisawa, R., & Contopoulou, R. (n.d.). *THE ROLE OF ORGANIC SUBSTRATES IN BACTERIAL PHOTOSYNTHESIS**.
<https://www.pnas.org>
- Sudesh, K., Abe, H., & Doi, Y. (n.d.). *Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters*.
- Tapadiya, A., & Vasanthan, N. (2017). Crystallization and alkaline hydrolysis of poly(3- hydroxybutyrate) films probed by thermal analysis and infrared spectroscopy. *International Journal of Biological Macromolecules*, 102, 1130–1137. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.095>
- Taroncher-Oldenburg, G., Nishina, K., & Stephanopoulos, G. (2000). Identification and Analysis of the Polyhydroxyalkanoate-Specific-Ketothiolase and Acetoacetyl Coenzyme A Reductase Genes in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC6803. In *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* (Vol. 66, Issue 10). <http://www.kazusa.or.jp/cyano/>
- Vahabi, H., Michely, L., Moradkhani, G., Akbari, V., Cochez, M., Vagner, C., Renard, E., Saeb, M. R., & Langlois, V. (2019). Thermal stability and flammability behavior of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) based composites. *Materials*, 12(14). <https://doi.org/10.3390/ma12142239>
- Verlinden, R. A. J., Hill, D. J., Kenward, M. A., Williams, C. D., & Radecka, I. (2007). Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. In *Journal of Applied Microbiology* (Vol. 102, Issue 6, pp. 1437–1449). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03335.x>
- Yu, J., Plackett, D., & Chen, L. X. L. (2005). Kinetics and mechanism of the monomeric products from abiotic hydrolysis of poly[(R)-3-hydroxybutyrate]

under acidic and alkaline conditions. *Polymer Degradation and Stability*, 89(2), 289–299. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2004.12.026>