
**ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Παραγωγή Βιοαποικοδομήσιμων Πολυμερών (PHAs)
με το Βακτήριο *Thermus thermophilus* στο Τυρόγαλα.**



ΑΣΤΡΟΠΕΚΑΚΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

ΕΙΣΗΓΗΤΗΣ: ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΟΥ Δ.

Θεσσαλονίκη 2009

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ο κλώνος HB8 του θερμόφιλου βακτηρίου *T. thermophilus*, το οποίο αναπτύχθηκε σε τροποποιημένα μέσα ανάπτυξης και έγιναν πειράματα με σκοπό την συσσώρευση πολυμερούς PHAs στα κύτταρα του. Αρχικά έγινε αναβίωση των κυττάρων σε κανονικό μέσο ανάπτυξης και έπειτα έγινε εμβολιασμός τεσσάρων κωνικών φιαλών με τροποποιημένο μέσο ανάπτυξης (TMA). Οι τέσσερις φιάλες περιείχαν τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις τυρογάλακτος 10, 20, 50 και 100% (v/v) τυρόγαλα. Ανά διαστήματα 8, 10 και 12 ωρών γινόταν μετρήσεις και μελετήθηκαν οι παράμετροι όπως η ανάπτυξη των κυττάρων, το ξηρό βάρος των κυττάρων (mg/l), Η συγκέντρωση PHA ανά λίτρο καλλιέργειας (mg/l), η επί τοις εκατό κατά βάρος απόδοση της παραγωγή του PHA (% κ.β) και έγιναν τα κατάλληλα γραφήματα. Το ξηρό βάρος των κυττάρων σε όλες τις καλλιέργειες κυμαινόταν στα ίδια επίπεδα σε όλη τη διάρκεια του πειράματος, εκτός από την καλλιέργεια με μηδενική συγκέντρωση τυρογάλακτος. Η συσσώρευση του πολυμερούς στα βακτήρια ήταν μεγαλύτερη σε όλες τις χρονικές στιγμές στην καλλιέργεια με την υψηλότερη αρχική συγκέντρωση τυρογάλακτος, 50%, όπως και η απόδοση της παραγωγής PHA με μέγιστη τιμή περίπου 26% μετά από 24 ώρες ανάπτυξης. Τόσο η συσσώρευση όσο και η απόδοση της παραγωγής PHA παρουσιάζουν μείωση μετά από 48 ώρες ανάπτυξης, όμως σε μεγαλύτερους χρόνους ανάπτυξης αυξήθηκε και πάλι. Η τιμή της απόδοσης παραγωγής PHA που έδωσε το άγριο στέλεχος του *T. thermophilus* είχε μέγιστη τιμή, 26% και μπορεί να θεωρηθεί αρκετά ικανοποιητική.

Στη συνέχεια έγινε ταυτοποίηση των μονομερών του πολυμερούς με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας χρησιμοποιώντας πρότυπα διαλύματα PHA. Τα δείγματα που μελετήθηκαν με την (GC) από τις καλλιέργειες σε συνδυασμό με τα πρότυπα διαλύματα έδειξαν ότι, το πολυμερές που συντίθεται μέσα στο κύτταρο του *T. thermophilus* σε αυτές τις συνθήκες αποτελείται κυρίως από μονομερή με 6, 9, 10 και 11 άτομα άνθρακα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
1.1 Γενικά για τα <i>Thermus thermophilus</i>	2
1.1.1. Μορφολογία των βακτηρίων.....	2
1.2. Πολυυδροξυαλκανοϊκά (PHAs).....	4
1.2.1. Γενικά για τα PHAs.....	4
1.2.1. Γενικά για τα PHAs.....	6
1.2.3. Διάκριση πολυυδροξυαλκανοϊκών (PHAs).....	8
1.2.4. Μορφολογία και δομή των PHA κόκκων.....	10
1.2.4.1. Μοντέλο για τη δημιουργία των κόκκων PHA στα βακτήρια.....	11
1.2.5. Παραγωγή PHAs από ανανεώσιμες πηγές ενέργειας	14
1.2.5.1. Παραγωγή πολυ-υδροξυαλκανοϊκών με πηγή άνθρακα το τυρόγαλα.....	16
1.2.6. Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή των PHAs.....	17
1.2.6.1. Ο ρόλος της πηγής του άνθρακα στην βιοσύνθεση των PHAs.....	17
1.2.6.2. Ο ρόλος της έλλειψης θρεπτικών συστατικών (nutrient limitation) στη βιοσύνθεση των PHAs.....	23
1.2.6.3. Ο ρόλος της χρονικής διάρκειας ανάπτυξης των βακτηρίων στην παραγωγή των PHAs.....	27
1.2.7. Ιδιότητες πολυ-υδροξυαλκανοϊκών (PHAs).....	29
1.2.7.1. Γενικές ιδιότητες PHAs.....	29
1.2.7.2. Βιοαποικοδομησιμότητα.....	30
1.2.8. Εφαρμογές πολυ-υδροξυαλκανοϊκών.....	31
1.2.8.1. Τα PHAs ως φορείς φαρμακευτικών ουσιών (Drug delivery).....	31
1.2.8.2. Εμφυτεύσιμες ενδοπροσθέσεις (stents) επικαλυπτόμενες με φάρμακα προς ελεγχόμενη αποδέσμευση.....	35
1.2.8.3. Άλλες εφαρμογές.....	37
2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	38
2.1. Ανάπτυξη μικροοργανισμού.....	38
2.2 Μέσα ανάπτυξης μικροοργανισμού.....	39

2.2.1 Κανονικό μέσο ανάπτυξης (Κ.Μ.Α.).....	39
2.2.2 Τροποποιημένο μέσο ανάπτυξης (Τ.Μ.Α).....	39
2.3 Επεξεργασία τυρογάλακτος (Whey).....	40
2.4 Παραγωγή πολυμερούς στο τυρόγαλα.....	41
2.4 Απομόνωση του πολυμερούς.....	42
2.5. Υπολογισμός ξηρού βάρους κυττάρων	43
2.6. Υπολογισμός απόδοσης παραγωγής πολυμερούς.....	44
2.7. Επίδραση της συγκέντρωσης των φωσφορικών ιόντων στην παραγωγή ΡΗΑ στο <i>T. thermophilus</i>	44
2.8. Ταυτοποίηση πολυ-υδροξυαλκανοϊκών.....	45
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	46
3.1 Παραγωγή πολυμερούς.....	46
3.2 Ταυτοποίηση παραγόμενου πολυμερούς	50
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	54
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	56
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	61

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα πολυ(3-υδροξυαλκανοϊκά οξέα) PHAs είναι αποθηκευτικά υλικά ενέργειας και άνθρακα, τα οποία συντίθενται από πολλούς μικροοργανισμούς όταν βρεθούν σε κατάσταση “τροφικού stress”, όταν δηλ. οι μικροοργανισμοί υφίστανται έλλειψη από κάποιο από τα κύρια θρεπτικά συστατικά του μέσου ανάπτυξης όπως π.χ. οξυγόνο για τους αερόβιους οργανισμούς, άζωτο, ιχνοστοιχεία και ιόντα ‘εν διαλύσει’ (θειικά, φωσφορικά, αμμωνιακά κλπ) καθώς και διαφοροποίηση της κύριας πηγής του άνθρακα. Τα PHAs θεωρούνται πολύ καλοί υποψήφιοι για την παραγωγή βιοαποικοδομήσιμων πλαστικών, αφού παρουσιάζουν παρόμοιες ιδιότητες με τα πολυπροπυλένια. Τα πολύ (3-υδροξυαλκανοϊκά οξέα) μπορούν να χρησιμοποιηθούν επίσης σε πολλές βιοϊατρικές εφαρμογές όπως για παράδειγμα ως φορείς φαρμακευτικών υλικών (drug delivery), στην κατασκευή συνθετικών ιστών καθώς και στην κατασκευή βιο-υμενίων με εξαιρετικές ιδιότητες. Παρόλο που τα PHAs παρουσιάζουν τις πολύ σπουδαίες ιδιότητες της βιοαποικοδομησιμότητας και βιοσυμβατότητας, το μειονέκτημα του ψηλού κόστους παραγωγής τους εμποδίζει την ευρύτερη διάθεση τους στην αγορά.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ταυτοποίηση των πολυμερών PHAs τα οποία παράγονται μέσα στο κύτταρο του θερμοφίλου βακτηρίου *T. Thermophilus* σε τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις τυρογάλακτος. Η ταυτοποίηση έγινε με τον αέριο χρωματογράφο του εργαστηρίου τεχνολογίας τροφίμων χρησιμοποιώντας πρότυπα διαλύματα PHA.

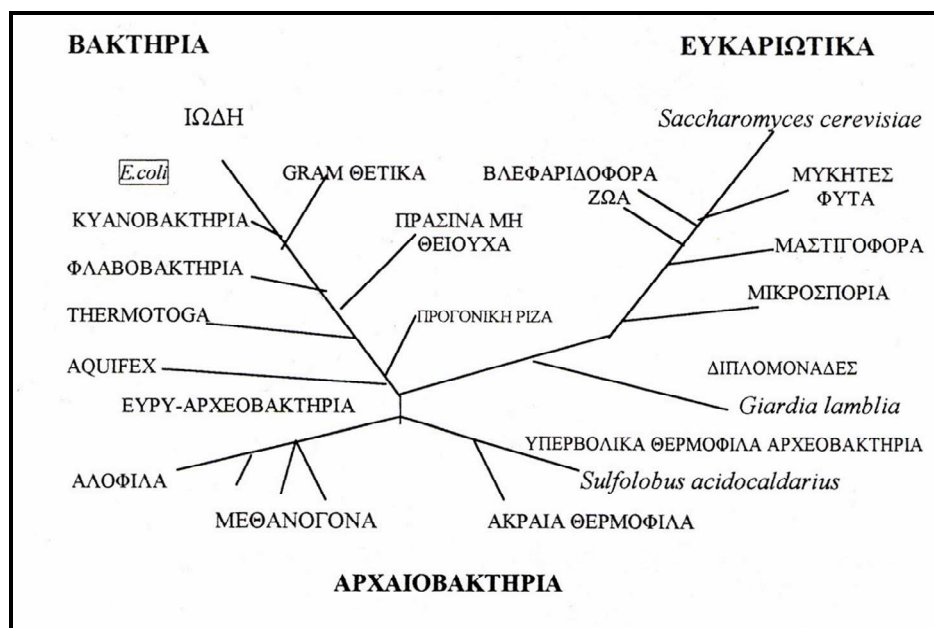
1.ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Γενικά για τα *Thermus thermophilus*

1.1.1. Μορφολογία των βακτηρίων

Τα βακτήρια *Thermus thermophilus* είναι θερμοφιλά βακτήρια τα οποία κατατάσσονται στην κατηγορία των ευβακτηρίων (σχήμα 1).

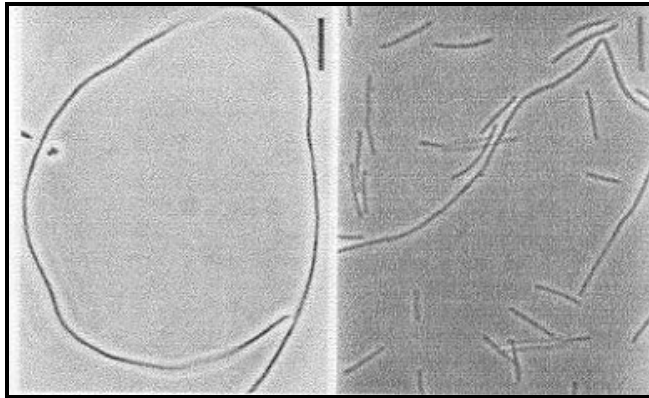
Το στέλεχος HB8 που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία απομονώθηκε για πρώτη φορά από θερμές πηγές στην Ιαπωνία (Oshima et al., 1974), ανήκει στα αερόβια gram -αρνητικά βακτήρια, έχει κίτρινο χρώμα και αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες από 65 μέχρι και 85 °C. Το *T. thermophilus* δεν παράγει σπόρια και δεν εμφανίζει κινητικότητα.



Σχήμα 1: Φυλογενετικό δέντρο των οργανισμών όπου διακρίνονται τρεις κύριες ομάδες: Βακτήρια, Αρχαιοβακτήρια και Ευκαριωτικά. Η κατάταξη βασίζεται στην ανάλυση ακολουθιών ριβοσωμικών RNAs (Woese et al., 1990)

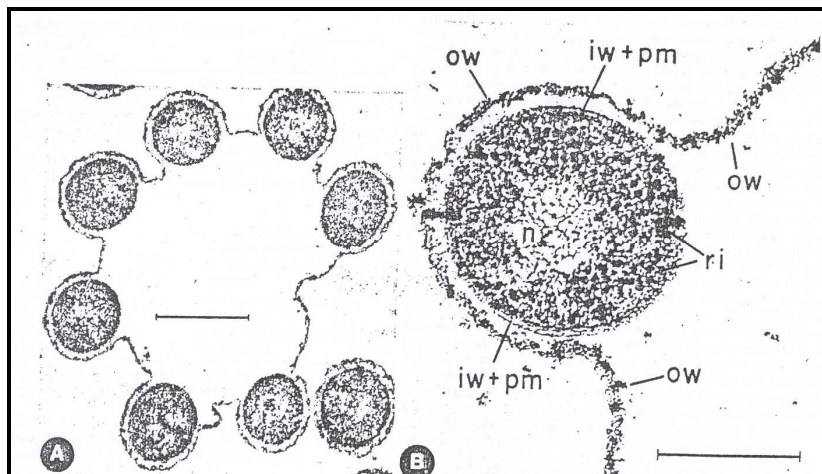
Τα κύτταρα του *T. thermophilus*, εμφανίζονται με τη μορφή ράβδων και νηματίων. Η μορφή των κυττάρων εξαρτάται από τη θερμοκρασία και από το χρόνο

ανάπτυξης. Σε θερμοκρασίες άνω από 75 °C αλλά και στη στατική φάση επικρατεί ο σχηματισμός νηματίων, τα οποία έχουν διάμετρο από 0.5 μέχρι και 0.8 μm. Οι ράβδοι έχουν την ίδια διάμετρο και μήκος από 5 μέχρι 10 μm (σχήμα 2).



Σχήμα 2. Αριστερά η νηματική και δεξιά η ραβδοειδής περιοχή των *T. thermophilus*

Σε παλαιότερες καλλιέργειες εμφανίζονταν και μεγάλες σφαίρες με διαμέτρους από 10 έως 20 μm. Οι σφαίρες αυτές σχηματίζονται από ράβδους όταν ενώνονται τα εξωτερικά στρώματα τους και απομακρύνονται από τα εσωτερικά με αποτέλεσμα οι ράβδοι να τοποθετούνται συνήθως παράλληλα, στην περιφέρεια μια σφαίρας με σύνδεσμο το ενιαίο εξωτερικό στρώμα, όπως φαίνεται στο σχήμα που ακολουθεί.



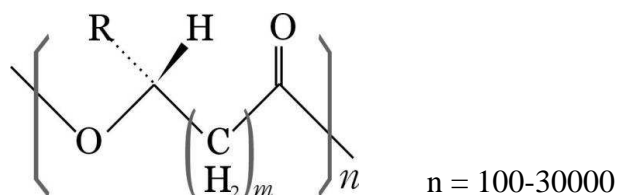
Σχήμα 3. A: Εγκάρσια τομή σφαίρας (x 40000). Η μπάρα αντιστοιχεί σε 0.5 μm. **B:** Τμήμα της σφαίρας όπου φαίνεται η εγκάρσια τομή μιας από τις ράβδους της σφαίρας. Το εξωτερικό τοίχωμα (ow) διαχωρίζεται με μία λεπτή ζώνη από το εσωτερικό (iw) το οποίο παραμένει

ενωμένο με τη μεμβράνη του κυτταροπλάσματος (pm) (x 120000). Η μπάρα αντιστοιχεί σε 0.25 μm.

1.2. Πολυδροξυαλκανοϊκά (PHAs)

1.2.1. Γενικά για τα PHAs

Τα πολυδροξυαλκανοϊκά είναι εστέρες των υδροξυαλκανοϊκών με γενικό τύπο:



όπου :

R	Πολυμερές	
m=1		
H	πολυ-3-υδροξυπροπιονικό	(3HP)
CH ₃ -	πολυ-3-υδροξυβουτυρικό	(3HB)
CH ₃ CH ₂ -	πολυ-3-υδροξυβαλερικό	(3HV)
CH ₃ CH ₂ CH ₂ -	πολυ-3-υδροξυεξανοϊκό	(3HE ή 3HH)
CH ₃ (CH ₂) ₄ -	πολυ-3-υδροξυοκτανοϊκό	(3HO)
CH ₃ (CH ₂) ₈ -	πολυ-3-υδροξυδωδεκανοϊκό	(3HDD)
m=2		
H	πολυ-4-υδροξυβουτυρικό	(4HB)
m=3		
H	πολυ-5-υδροξυβαλερικό	(3HV)

Έχουν αναφερθεί περιπτώσεις PHAs όπου η ομάδα R δεν είναι κορεσμένη, αλλά είναι ακόρεστη, αρωματική ή διακλαδισμένη (Curley et al., 1996, Doi, 1990).

Τα PHAs συντίθενται από μεγάλο αριθμό βακτηρίων σαν ενδοκυτταρική αποθηκευτική πηγή άνθρακα και ενέργειας όταν τα βακτήρια βρίσκονται σε κατάσταση “τροφικού stress”, όταν δηλαδή οι μικροοργανισμοί υφίστανται έλλειψη από κάποιο από τα κύρια θρεπτικά συστατικά του μέσου ανάπτυξης όπως π.χ. οξυγόνο για τους αερόβιους οργανισμούς, άζωτο, ιχνοστοιχεία και ιόντα εν διαλύσει (θειικά, φωσφορικά, αμμωνιακά κλπ) καθώς και διαφοροποίηση της κύριας πηγής του άνθρακα (Lee et al., 2000, Hazenberg and Witholt, 1997). Τα PHAs συσσωρεύονται με τη μορφή σωματιδίων εγκλεισμού (κόκκων) στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων. Όταν η παροχή των τροφικών μέσων σταματήσει, το παραγόμενο πολυμερές μπορεί να αρχίσει να αποικοδομείται με ενδοκυτταρικές αποπολυμεράσεις και να χρησιμοποιηθεί ως πηγή ενέργειας.

Τα πλαστικά αποτελούν την κυριότερη πρώτη ύλη για την κατασκευή διαφόρων προϊόντων και συσκευών που χρησιμοποιούνται καθημερινά, λόγω των ιδιοτήτων που παρουσιάζουν όπως ελαστικότητα, σταθερότητα και χαμηλό κόστος παραγωγής. Το μοναδικό ίσως μειονέκτημα των πλαστικών είναι ότι δεν αποικοδομούνται με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται στο περιβάλλον σε ποσοστό που ανέρχεται τα 24 εκατομμύρια τόνους το χρόνο (Lee et al., 1996). Τα πολυδροξυαλκανοϊκά (PHAs) είναι πολύ καλοί υποψήφιοι για την αντικατάσταση των κοινών πλαστικών λόγω της βιοαποικοδομησιμότητας που παρουσιάζουν και λόγω του ότι έχουν ιδιότητες θερμοπλαστικών ή ελαστομερών. Επιπλέον, μοιάζουν σε πολλές ιδιότητες με τα πολυπροπυλένια. Η υψηλή τιμή τους όμως συγκρινόμενη με τα συμβατικά πολυμερή έχει περιορίσει πολύ τη χρήση τους.

Σήμερα το πιο ευρέως διαδεδομένο και καλά χαρακτηρισμένο ομοπολυμερές είναι το πολυ(3-υδροξυβουτυρικό) PHB, που παράγεται χρησιμοποιώντας τον μικροοργανισμό *Alkaligenes eutrophus*. Πρόσφατα, έχουν βρεθεί βακτήρια που παράγουν PHAs συμπολυμερή που περιέχουν μονομερείς μονάδες μικρής και μεγάλης αλυσίδας άνθρακα. Για παράδειγμα συμπολυμερή που συνίστανται από 3-υδροξυβουτυρικό, και 3-υδροξυβουτυρικό ή 3-υδροξυβουτυρικό και 3-υδροξυεξανοϊκό έχουν πολύ καλύτερες ιδιότητες υλικών (Doi, 1990). Η προσθήκη ενός μικρού ποσοστού μονομερών μονάδων μεγάλης αλυσίδας στο πολυ(3-υδροξυβουτυρικό) προκαλεί αύξηση στην ευκαμπτότητα του συμπολυμερούς. Έτσι, το συμπολυμερές πολυ(3-υδροξυβουτυρικό-3-υδροξυβουτυρικό), P(HB-co-HV) που παράγεται από τον

μικροοργανισμό *Alkaligenes eutrophus* παρουσιάζει ειδικό ενδιαφέρον εξ αιτίας του ότι είναι πιο εύκαμπτο απ'ότι το ομοπολυμερές πολυ-υδροξυβουτυρικό (PHB) και επιτυγχάνεται σχετικά εύκολα προσθέτοντας προπιονικό στην καλλιέργεια ανάπτυξης του μικροοργανισμού.

Επί πλέον η περιεκτικότητα του 3-υδροξυβουβαλικού (3-HV) μπορεί να ρυθμιστεί δια μέσου της μεταβολής των επιπέδων του προπιονικού στο μέσο ανάπτυξης καταλήγοντας σε μια σειρά διαφορετικών θερμοπλαστικών που έχουν διαφορετικό βαθμό ευκαμπτότητας. Σήμερα παράγεται βιομηχανικά σε μεγάλη κλίμακα, από την ZENEKA (πρώην Imperial Chemical Industries, Billingham) στο Ηνωμένο Βασίλειο (Anderson and Dawes, 1990, Holmes, 1985). Αυτά τα πολυμερή είναι βιομηχανικά διαθέσιμα με το όνομα Biopol. Ένα μεγάλο μειονέκτημα στην εμπορευματοποίηση των βακτηριακών PHAs είναι το υψηλό κόστος παραγωγής σε σύγκριση με τα συνθετικά πλαστικά υλικά ή άλλα βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή όπως το πολυγαλακτικό οξύ (Lee, 1996).

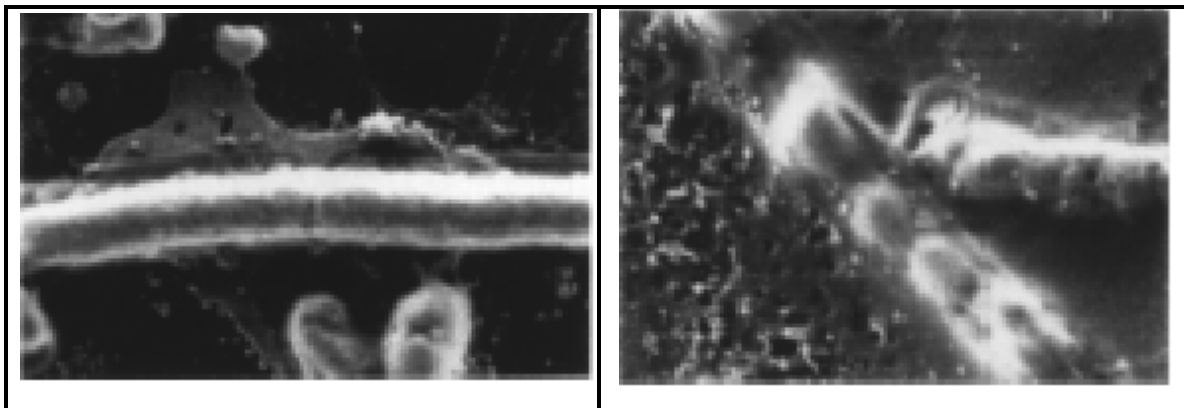
Έχουν ανιχνευθεί περισσότερα από 81 HAs ως συστατικά των PHAs και αυτό έχει σαν συνέπεια τα θερμοπλαστικά αυτά πολυμερή να έχουν διαφορετικές μηχανικές ιδιότητες. Ανάλογα με τα μονομερή από τα οποία αποτελούνται εμφανίζονται σαν κρυσταλλικά στερεά ή σαν ελαστικές ουσίες. Επίσης ανάλογα με τις συνθήκες ανάπτυξης των βακτηρίων παράγονται PHAs, αλειφατικοί πολυεστέρες, πολυσακχαρίτες και άλλα συμπολυμερή μίγματα αυτών.

Τα μονομερή HAs έχουν πάντα τη (D-) διαμόρφωση λόγω της στερεοειδικότητας των ενζύμων και το υποκατεστημένο με OH άτομο άνθρακα έχει (R-) διαμόρφωση. Τα μοριακά βάρη των πολυμερών κυμαίνονται από $2 \cdot 10^5$ μέχρι $3 \cdot 10^6$ Da, ανάλογα με το βακτήριο στο οποίο παράγονται και από τις συνθήκες ανάπτυξης τους.

1.2.2. Συσσώρευση PHAs στα βακτήρια

Τα PHAs συσσωρεύονται στα κύτταρα των βακτηρίων με τη μορφή σωματιδίων εγκλεισμού (κόκκων). Ο αριθμός και το μέγεθος των κόκκων ανά κύτταρο διαφέρει ανάμεσα στα είδη των βακτηρίων. Στο βακτήριο *Alcaligenes eutrophus* συσσωρεύονται 8

-13 κόκκοι ανά κύτταρο με διάμετρο 0.2-0.5 μm (Byrom, 1994). Οι κόκκοι διακρίνονται με μικροσκόπιο αντίστροφης φάσης είτε με μικροσκόπιο σάρωσης (σχήμα 4).



Σχήμα 4: Φωτογραφίες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο του βακτηρίου *Thermus thermophilus*, αριστερά: Βακτήρια που δεν περιέχουν σωματίδια εγκλεισμού και δεξιά: Βακτήρια που περιέχουν σωματίδια εγκλεισμού με πολυμερή (Pantazaki et al., 2003).

Έχει ήδη μελετηθεί μεγάλος αριθμός βακτηρίων για την δυνατότητα συσσώρευσης κόκκων πολυμερούς και έχει υπολογιστεί ότι περισσότερα από 300 είδη βακτηρίων έχουν την ικανότητα αυτή και ανήκουν τόσο στην κατηγορία των gram-θετικών όσο και στην κατηγορία των gram-αρνητικών. Ανάμεσα σε αυτά είναι τα βακτήρια *Alcaligenes eutrophus*, *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*, μεθυλότροφα βακτήρια, ψευδομονάδες και ανασυνδυασμένα βακτήρια *E.coli*. Η απόδοση αυτών των βακτηρίων βρέθηκε μεγαλύτερη των 2 g PHAs/l/h. Γίνονται επίσης πολλές μελέτες για την κατανόηση του μηχανισμού βιοσύνθεσης των πολυμερών, τον μεταβολισμό και την μοριακή βιολογία των γονιδίων των ενζύμων που συνθέτουν PHAs.

Ως σήμερα έχουν απομονωθεί και κλωνοποιηθεί 44 διαφορετικά γονίδια που συνθέτουν PHAs και έχουν δημιουργηθεί πολλοί ανασυνδυασμένοι κλώνοι που επιτρέπουν την σύνθεση πολυεστέρων με διαφορετικά μονομερή, όπως και αύξηση της απόδοσης της σύνθεσης των πολυμερών. Τέλος μελετούνται γενετικά ανασυνδυασμένα φυτά για την ικανότητα παραγωγής PHAs.

Επίσης κρίνεται απαραίτητο να γίνει βελτιστοποίηση στις μεθόδους ανάπτυξης των βακτηρίων, στην απομόνωση του πολυμερούς. Πρέπει ακόμη να αναπτυχθούν βακτηριακοί κλώνοι ή φυτά που θα επιτρέπουν την παραγωγή PHAs με ανταγωνιστικό κόστος με αυτό των συμβατών πλαστικών.

1.2.3. Διάκριση πολυυδροξυαλκανοϊκών (PHAs)

Τα PHAs μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό των ατόμων άνθρακα στα μονομερή τους:

PHA με μικρή πλευρική αλυσίδα άνθρακα. (S.C.L., short chain length). Αυτή η ομάδα περιλαμβάνει τα πολυμερή που έχουν μονομερή με μήκος αλυσίδας 3 με 5 άτομα άνθρακα, όπως π.χ. PHB και PHV όπου $R=C_2H_5$ και το συμπολυμερές P(HB-co-HV). Ο συμπολυεστέρας αποτελείται από 3-υδροξυβουτυρικό και 3-υδροξυβουβαλικό παράγεται ήδη σε βιομηχανική κλίμακα για την παραγωγή φιαλών από βακτήρια *Alkaligenes eutrophus* με πρώτη ύλη γλυκόζη και προπιονικό με το βιομηχανικό όνομα Biopol και παρήχθη για πρώτη φορά από τον Holmes το 1981. Αυτό το πολυμερές δεν μπορεί να συναγωνιστεί τα διαθέσιμα πλαστικά από άποψη κόστους παραγωγής (10 φορές υψηλότερο από αυτό του προπυλενίου). Τελευταία προτείνονται μεθυλότροφοι οργανισμοί που χρησιμοποιούν ως πρώτη ύλη μεθανόλη για την παραγωγή των PHA. (Από το 1980 έγιναν 51 πατέντες σ' αυτό το πεδίο).

PHA με μέτρια πλευρική αλυσίδα: (M.C.L., medium chain length). Αυτή η ομάδα περιλαμβάνει πολυμερή PHA που συνίστανται από μονομερή που περιέχουν 6 έως 12 άτομα άνθρακα. Η ποικιλία των PHA συντίθενται είναι πολύ μεγάλη ανάλογα με το υπόστρωμα (την πηγή του άνθρακα που μπορεί να αξιοποιήσει το κάθε βακτήριο και μπορεί να ποικίλλει).

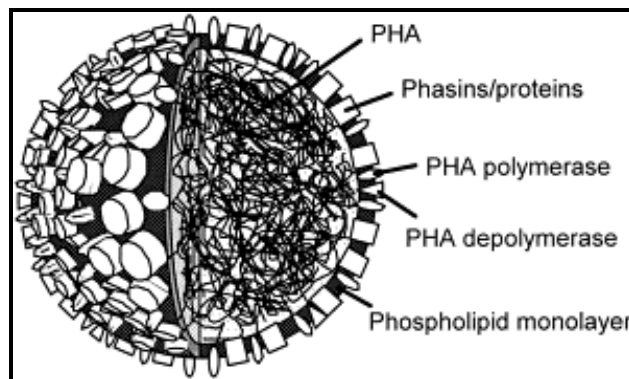
Πολυμερή που προέρχονται από S.C.L υποστρώματα έχουν ιδιότητες θερμοπλαστικών ενώ πολυμερή που προέρχονται από M.C.L έχουν ιδιότητες ελαστομερών.

Ο διαχωρισμός αυτός οφείλεται στην εξειδίκευση του ενζύμου συνθάση η οποία μπορεί να δεχθεί και να πολυμερίσει μονομερή HAs με συγκεκριμένο αριθμό ατόμων άνθρακα ανάλογα με το βακτήριο από το οποίο προέρχεται. Για παράδειγμα η ΡΗΑ συνθάση των *Alcaligenes eutrophus* πολυμερίζει 3 HAs που αποτελούνται από 3 έως 5 άτομα άνθρακα και όχι μεγαλύτερα από 6 ενώ, η συνθάση των *P. oleovorans* πολυμερίζει 3 HAs με 6 έως 14 άτομα άνθρακα.

Για τα S.C.L έχουν βρεθεί μονομερή που οξειδώνονται στη θέση 14 όπως 4-HB, 4HV, 5HV. Για τα M.C.L το μόνο μονομερές που οξειδώνεται σε άλλη θέση εκτός της 3 είναι το 4-HO. Έχουν βρεθεί όμως και M.C.L μονομερή που περιέχουν άλλες ομάδες όπως ολεφίνες, διακλαδισμένα αλκύλια, αλογόνα, φαινύλιο και κυάνιο.

1.2.4. Μορφολογία και δομή των ΡΗΑ κόκκων

Γενικά τα PHAs συσσωρεύονται με την μορφή διακριτών, με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, κόκκων στο εσωτερικό των κυττάρων. Οι κόκκοι αυτοί μπορούν να βαφούν με Sudan blank ή με Nile red και Nile blue. Ο αριθμός των κόκκων ανά κύτταρο ποικίλει ανάλογα με τον μικροοργανισμό στον οποίο συσσωρεύονται. Για παράδειγμα, στον *Ralstonia eutropha* (*Algaligenes eutrophus*) δημιουργούνται 8 έως 12 κόκκοι ποικίλων μεγεθών, ενώ αντίθετα στο *Pseudomonas oleovorans* εκτιμάται ότι συσσωρεύονται ένας ή δύο μεγάλοι κόκκοι.



Σχήμα 5: Σχηματική παράσταση κόκκου ΡΗΑ. Το εσωτερικό αποτελείται από πολυμερές (ΡΗΑ) το οποίο περιβάλλεται από ένα στρώμα φωσφολιπιδίων (Phospholipid monolayer) με τις προσδεμένες πρωτεΐνες. Το υδροφοβικό μέρος του στρώματος λιπιδίων κατευθύνεται προς το κέντρο του κόκκου. Οι πρωτεΐνες που περιβάλλουν το εξωτερικό του κόκκου είναι η ΡΗΑ πολυμεράση, η ΡΗΑ αποπολυμεράση, δομικές πρωτεΐνες (phasins) και πρωτεΐνες η λειτουργία των οποίων παραμένει άγνωστη. (Zinn et al., 2001)

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η πρόταση ότι οι κόκκοι που συγκροτούν τα sclPHA και mclPHA έχουν διαφορετική δομή. Κόκκοι που περιέχουν sclPHA και απομονώθηκαν από το *B. megaterium*, αποδείχθηκε ότι το εξωτερικό τους περιβάλλεται από στρώμα λιπιδίων (0.5% w/w) και πρωτεΐνες (0.2 % w/w). Κανένα στοιχείο δεν βρέθηκε που να αποδεικνύει την ύπαρξη λιπιδίων ή πρωτεϊνών στο εσωτερικό του κόκκου. Αντίθετα κόκκοι που περιείχαν mclPHA βρέθηκαν να έχουν μεγαλύτερο μέγεθος και να έχουν

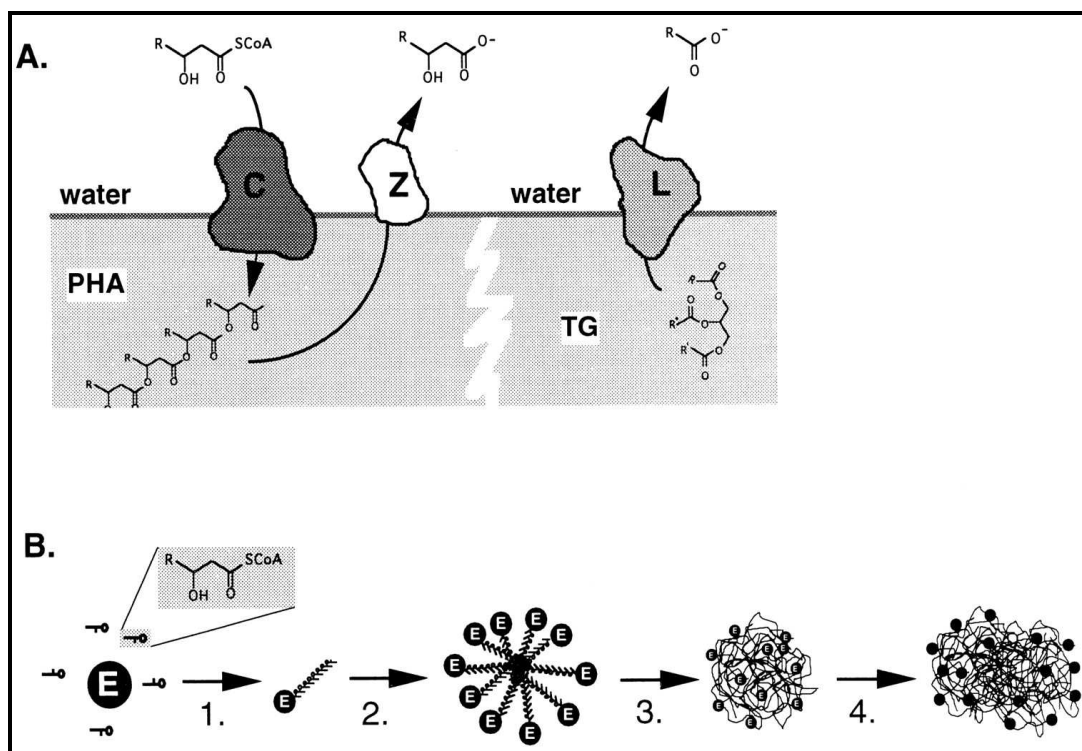
διαφορετική δομή. Από εικόνες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου προτάθηκε ότι η επιφάνεια τους περιβάλλεται από ένα στρώμα φωσφολιπιδίων το οποίο διαχωρίζει δυο πρωτεϊνικές περιοχές κρυσταλλικής δομής. Οι πρωτεΐνες οι οποίες υπάρχουν και στους δύο τύπους κόκκων, χωρίζονται σε τέσσερις κατηγορίες: α) PHA πολυμεράση, β) PHA αποπολυμεράση, γ) phasins (πρωτεΐνες που ο ρόλος τους είναι να σταθεροποιούν τη δομή των κόκκων) και δ) πρωτεΐνες η λειτουργία των οποίων παραμένει άγνωστη (πιθανόν πρόκειται για ένζυμα τα οποία καταλύουν τον αρχικό σχηματισμό των κόκκων και ρυθμιστικές πρωτεΐνες) (Zinn et al., 2001).

1.2.4.1. Μοντέλο για τη δημιουργία των κόκκων PHA στα βακτήρια

Η μελέτη για την εύρεση του μοντέλου δημιουργίας των κόκκων πολυμερούς βοηθήθηκε από την ομοιότητα των ενεργών αλληλουχιών που παρουσιάζει η PHA συνθάση με τις λιπάσες. Και τα δύο ένζυμα ενεργούν σε εστερικούς δεσμούς στην επιφάνεια ενός υδρόφοβου μορίου σε υδατικό περιβάλλον. Η PHA συνθάση δρα στην επιφάνεια των κόκκων PHA όπου διαλυτά μόρια πολυμερίζονται αποθηκεύονται στο εσωτερικό του υδρόφοβου περιβάλλοντος του κόκκου, ενώ η λιπάση διασπά εστερικούς δεσμούς στα τριγλυκερίδια, ελευθερώνοντας σε υδατικό περιβάλλον ελεύθερα οξέα. Η διαφορά τους είναι ότι η PHA συνθάση είναι ένα ένζυμο που δημιουργεί αντίδραση εστεροποίησης κάτω από μη ευνοϊκές συνθήκες (σχήμα 13 Α).

Σύμφωνα με το μοντέλο των Gerngross και Martin (σχήμα 13 Β) η διαλυτή αρχικά PHA συνθάση αλληλεπιδρά με αυξανόμενες συγκεντρώσεις του 3-υδρόξυβουτύρυλ-CoA στο κυτταρόπλασμα. Το γεγονός αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την έναρξη μηχανισμού πολυμερισμού με τρόπο που δεν είναι ακόμη γνωστός. Ακολουθεί μια λανθάνουσα φάση (lag phase) όπου με αργό ρυθμό δημιουργούνται HB ολιγομερή τα οποία παραμένουν συνδεδεμένα με το ένζυμο (στάδιο 1). Στη συνέχεια σε ένα κρίσιμο μήκος και συγκέντρωση ολιγομερούς-ενζύμου τα HB ολιγομερή δημιουργούν μικκύλια, με το ένζυμο να βρίσκεται στην επιφάνεια διαχωρίζοντας έτσι το πολυμερές από το κυτταρόπλασμα (στάδιο 2) ενώ τα ολιγομερή αυξάνονται σε μέγεθος και υδροφοβικότητα. Η αντίδραση πολυμερισμού σ' αυτό το στάδιο επιταχύνεται επειδή το υδρόφοβο πολυμερές εκτείνεται στο εσωτερικό του υδρόφοβου περιβάλλοντος του

μικκυλίου και όχι στο υδατικό περιβάλλον του κυτταροπλάσματος. Τα μικκύλια σ' αυτή τη φάση εμφανίζονται σαν ενδοκυττάριοι κόκκοι που είναι ορατοί σε μικροσκόπιο αντίθετης φάσης (στάδιο 3). Καθώς ο αριθμός των κόκκων μεγαλώνει, αυτοί συγχωνεύονται και συνασπίζονται σε μεγάλα συσσωματώματα (στάδιο 4).



Σχήμα 6: **A.** Ομοιότητες μεταξύ της PHA συνθάσης και της λιπάσης. Η PHA συνθάση (C) ενεργεί στην επιφάνεια των PHA κόκκων όπου διαλυτά μονομερή πολυμερίζονται και αποθηκεύονται στο υδρόφοβο περιβάλλον του κόκκου. Η PHA αποπολυμεράση (Z) εντοπίζεται στην επιφάνεια του κόκκου και ελευθερώνει τα μονομερή από το PHA πολυμερές. Οι δύο ενζυμικές αντιδράσεις μοιάζουν με αυτή της λιπάσης (L) όπου διασπώνται οι εστερικοί δεσμοί των τριγλυκεριδίων και ελευθερώνονται λιπαρά οξέα και αλκανοϊκά. **B.** Προτεινόμενος μηχανισμός σχηματισμού των κόκκων PHA. Το διαλυτό ένζυμο μετατρέπει τα μονομερή σε ολιγομερή τα οποία παραμένουν δεσμευμένα με το ένζυμο (στάδιο 1). Σε ένα κρίσιμο μήκος και συγκέντρωση, το σύμπλεγμα του ενζύμου-ολιγομερούς δημιουργεί μικκύλια, με το ένζυμο να βρίσκεται στην ενδιάμεση επιφάνεια διαχωρίζοντας τον κόκκο από το κυτταρόπλασμα (στάδιο 2). Η διαδικασία πολυμερισμού επιταχύνεται και τα μικκύλια εμφανίζονται σαν μεγαλύτερου μεγέθους κόκκοι (στάδιο 3). Καθώς το μέγεθος των κόκκων αυξάνει, συγχωνεύονται και δημιουργούνται μεγαλύτερου μεγέθους συσσωματώματα PHAs. (Madison and Huisman, 1999).

Η P(3HB) πολυμεράση εμφανίζεται και στις δύο μορφές, δηλαδή διαλυτή στο κυτταρόπλασμα και δεσμευμένη στους κόκκους. Οι δύο αυτές μορφές διαχωρίζονται εύκολα με φυγοκέντριση αλλά η συνύπαρξη των δύο μορφών έχει κάνει δύσκολη την διευκρίνιση βασικών κινητικών παραμέτρων. Η διαλυτή συνθάση εμφανίζει μικρότερη δραστικότητα από την δεσμευμένη στους κόκκους και άρα μεγαλύτερη συσσώρευση πολυμερούς παρουσιάζεται όταν το ένζυμο βρίσκεται σ' αυτή την μορφή (Madison and Huisman, 1999). Με *in vitro* πειράματα αποδείχθηκε ότι η λανθάνουσα φάση που παρατηρείται κατά την δημιουργία ολιγομερών (HB) προκαλείται από το γεγονός ότι η συνθάση που είναι ήδη δεσμευμένη στους κόκκους, είναι αυτή που μετατρέπει την διαλυτή σε πλήρως δραστική μορφή ένζυμου (Gerngross et al., 1995) και ότι ο χρόνος της λανθάνουσας φάσης εξαρτάται από το αρχικό στάδιο της αλκυλίωσης (Wodiska et al., 1996).

Επίσης οι Gerngross και Martin παρατήρησαν ότι η διατήρηση της ωφέλιμης επιφάνειας των κόκκων είναι κρίσιμη για την αποδοτική παραγωγή των P(3HB) και ότι το μέγεθος των κόκκων που συνθέτονται (*in vitro*) επηρεάζεται από την ποσότητα της πρωτεΐνης που προστίθεται στο μίγμα ανεξάρτητα αν αυτή είναι PHA συνθάση ή κάποια άσχετη πρωτεΐνη όπως η αλβουμίνη (Madison and Huisman, 1999).

Σε μελέτες που έγιναν στους κόκκους διαφόρων βακτηρίων που δημιουργούνται PHAs παρατηρήθηκε η ύπαρξη μιας πρωτεΐνης που δεσμεύεται σ' αυτούς και καθορίζει το μέγεθος τους. Το γονίδιο αυτής απομονώθηκε στον *R. eutropha* και αποδείχθηκε ότι πρόκειται για μια πρωτεΐνη 24 kDa. Η πρωτεΐνη αυτή ονομάστηκε *phasin* ανάλογα με τις *oleosins* πρωτεΐνες που βρίσκονται στην επιφάνεια των τρικυλογλυκεριδίων στα φυτά.

Πρωτεΐνες με παρόμοια δράση εντοπίστηκαν και σε άλλα βακτήρια που μελετήθηκαν, όπως η GA 14 στον *Rhodococcus ruber*. Αν και το μέγεθος των δυο πρωτεϊνών διαφέρει, παρουσιάζονται δυο υδροφοβικές σχετικές αλληλουχίες που βρίσκονται στο καρβοξυ-τελικό άκρο τους. Αποδείχθηκε ότι οι αλληλουχίες αυτές είναι απαραίτητες για την δέσμευση της phaP στους κόκκους γιατί παράγωγα της phaP που τους έλειπε αυτή η περιοχή του γονιδίου δεν μπορούσαν να δεσμευτούν. Επίσης όταν αυτές οι υδρόφοβες καρβοξυ-τελικές περιοχές συγχωνεύτηκαν στην αφυδρογονάση της ακεταλδεΐδης II, η πρωτεΐνη σύντηξης δεσμεύτηκε στην επιφάνεια των κόκκων *in vivo* και *in vitro* και όχι στο κυτταρόπλασμα (Madison and Huisman, 1999).

Με ανοσολογικές μελέτες με το αντί-phaP αντισώματα αποδείχθηκε ότι βρίσκεται πάντοτε δεσμευμένη στους κόκκους και ποτέ στο κυτταρόπλασμα. Είναι το κύριο συστατικό των μεμβρανών και βρίσκεται σε ποσοστό πάνω από 5% της συνολικής πρωτεΐνης των κυττάρων που συσσωρεύουν πολυμερές. (Wieczorek, 1996).

Μελέτες γενετικής απέδειξαν ότι η συγκέντρωση της *phasin* είναι σχετική με το μέγεθος των κόκκων, αφού υπερέκφραση της phaP είχε σαν αποτέλεσμα την δημιουργία πολλών μικρών κόκκων, μικρότερων από το μέγεθος του wild type. Αντίθετα η έκφραση μίας μεταλλαγμένης phaP οδήγησε στην δημιουργία ενός μεγάλου κόκκου.

Επίσης όταν εκφράστηκε η μεταλλαγμένη *phasins* η PHA συνθάση παρουσίασε μικρότερη ενζυμική δραστηριότητα από αυτή του wild type. Πως ακριβώς αλληλεπιδρά η phaP με τις άλλες πρωτεΐνες που δεσμεύονται στους κόκκους όπως η συνθάση και η αποπολυμεράση δεν είναι γνωστό.

Η *phasins* θεωρείται ότι έχει σταθεροποιητικό ρόλο, εμποδίζοντας τη διάσπαση του σχηματιζόμενου κόκκου σε υδατικό περιβάλλον. Επίσης η παρουσία της αποδείχθηκε ότι παρεμποδίζει τη δέσμευση άλλων πρωτεϊνών στην επιφάνεια του κόκκου, μια και η δέσμευση μη σχετικών πρωτεϊνών φαίνεται να είναι επιβλαβής.

1.2.5. Παραγωγή PHAs από ανανεώσιμες πηγές ενέργειας

Τα πολυδροξυαλκανοϊκά, όπως έχει ήδη αναφερθεί είναι πολυμερή με πολύ καλές ιδιότητες, παρόμοιες με αυτές των πολυπροπυλενίων. Επιπλέον εμφανίζουν τις πού σημαντικές ιδιότητες, της βιοαποικοδομησιμότητας και της βιοσυμβατότητας, που τα κάνουν ακόμα πιο ελκυστικά, δεδομένου των δεκάδων τόνων πλαστικών αποβλήτων που παράγονται κάθε χρόνο, καθώς και του τεράστιου πεδίου εφαρμογών που θα μπορούσαν να έχουν στην ιατρική. Τα μοναδικά-ίσως- μειονέκτημα που παρουσιάζουν τα PHA είναι το ψηλό κόστος παραγωγής τους καθώς και το ψηλό ενεργειακό φορτίο που απαιτεί η διαδικασία παραγωγής τους. Για το λόγο αυτό οι έρευνες στρέφονται στη χρήση ανανεώσιμων πηγών ενέργειας, βιομηχανικά δηλαδή παραπροϊόντα που θα μπορούσαν να μειώσουν σημαντικά το κόστος των PHAs.

Το 1997 η Gargill, μια γιγαντιαία αγροτική επιχείρηση και η Dow Chemical, μια επιφανής εταιρεία χημικών, ένωσαν τις δυνάμεις τους για να υλοποιήσουν την μετατροπή σακχάρων από καλαμπόκι και άλλα φυτά σε πλαστικό, το πολυλακτίδιο (PLA). Μικροοργανισμοί μετατρέπουν τα σάκχαρα του φυτού σε λακτικό οξύ και σε επόμενο στάδιο συνδέουν χημικά τα μόρια μεταξύ τους κατά τέτοιο τρόπο ώστε να παράγεται πλαστικό με ιδιότητες παρόμοιες με αυτές του τερεφθαλικού πολυαιθυλενίου (PET).

Πρόσφατα έρευνες έδειξαν ότι με εισαγωγή γονιδίων, που απομονώθηκαν από βακτήρια και έχουν την ικανότητα να παράγουν πλαστικό σε φυτά, τα ένζυμα που θα παραχθούν θα μετατρέψουν το ακετύλο-CoA (προϊόν που σχηματίζεται κατά τη φωτοσύνθεση) σε ένα τύπο πλαστικού. Έτσι ξεκίνησαν οι εργασίες για την παραγωγή PHA μέσω του καλαμποκιού και για να μην υπάρχει ανταγωνισμός της παραγωγής πλαστικού και της παραγωγή τροφής οι έρευνες στόχευσαν στα φύλλα και στο κορμό του καλαμποκιού. Η καλλιέργεια καλαμποκιού θα επέτρεπε στους αγρότες να θερίζουν το καρπό και στη συνέχεια να θερίζουν για δεύτερη φορά τους ξηρούς κορμούς και να συλλέγουν το πλαστικό (Gerngross, 2000).

Επίσης για την κάλυψη των υψηλών ενεργειακών αναγκών παραγωγής πλαστικού, προτάθηκε η χρήση των ξηρών παραπροϊόντων (βλαστός και φύλλα) για την παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας και ατμού. Αν και το κόστος της διεργασίας μειώνεται σημαντικά και το περιβάλλον προστατεύεται από την έκλυση των μεγάλων ποσοτήτων CO₂ που παράγεται κατά την παρασκευή συμβατικών πλαστικών από ορυκτέλαια και άλλα παραπροϊόντα της διύλισης του πετρελαίου, το κόστος παραμένει πολύ ψηλό έτσι ώστε η παραγωγή του πολυμερούς σε ευρεία κλίμακα να είναι αποτρεπτική.

1.2.5.1. Παραγωγή πολυ-υδροξυαλκανοϊκών με πηγή άνθρακα το τυρόγαλα

Το τυρόγαλα είναι το κύριο παραπροϊόν της βιομηχανίας γάλακτος και καζεΐνης αποτελώντας τον κύριο όγκο του τροποποιημένου γάλακτος. Διάθεση απόβλητων τυρογάλακτος προκαλεί σημαντικά περιβαλλοντολογικά προβλήματα που οφείλονται στον τεράστιο όγκο που παράγεται λόγω μεγάλης ζήτησης τυροκομικών.

Το τυρόγαλα μπορεί να είναι ένα ελκυστικό ακατέργαστο υλικό για την παραγωγή PHAs, εφ'όσον η λακτόζη που μπορεί να χρησιμεύσει σαν πηγή άνθρακα βρίσκεται σε υψηλή περιεκτικότητά (4.5-5.5 % w/v), καθιστά το τυρόγαλα πολύτιμο θρεπτικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη μικροοργανισμών και την παραγωγή βιοτεχνολογικών προϊόντων (αν και η ανικανότητα κάποιων βακτηρίων να αξιοποιούν την λακτόζη έχει περιορίσει την χρήση τυρογάλακτος και λακτόζης).

Ως οικονομική εκτίμηση της διαδικασίας παραγωγής PHAs θεωρείται ότι το κόστος του υποστρώματος (κυρίως της πηγής του άνθρακα) συμβάλλει σημαντικότερα (πάνω από το 50%) του συνολικού κόστους παραγωγής. Συνεπώς η παραγωγή PHAs μπορεί να γίνει οικονομικά περισσότερο συναγωνιστική εάν παραχθεί από φτηνά υποστρώματα για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας.

Ανασυνδιασμένα βακτήρια *Escherichia coli* δίνουν πολύ καλή παραγωγή πολυ-3-υδροξυβουτυρικού P(3HB), όταν χρησιμοποιηθεί το τυρόγαλα ως πηγή άνθρακα (Hong and Lee, 1998; Ahn et al., 2000) όπως φαίνεται στο παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 1. Παραγωγή PHA σε ανασυνδιασμένα βακτήρια *E. coli* με πηγή άνθρακα το τυρόγαλα

E.Coli strain	Ξηρό βάρος κυττάρων (g/l)	PHB (g/l)	Απόδοση παραγωγής PHB (% κ.β)	Αναφορά
CGSC 4401	6.6	5.0	76	Ahn et al, 2000
CGSC 2507	6.8	3.4	50	Ahn et al, 2000
CGSC 3121	3.0	1.3	43	Ahn et al, 2000
DSM 499	6.1	2.7	45	Ahn et al, 2000
KCTC 2223	6.2	0.57	9.2	Ahn et al, 2000
GCSC6576	87	69	80	Wong and Lee, 1998

1.2.6. Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή των PHAs

Οι κυριότεροι παράγοντες που επηρεάζουν την βιοσύνθεση των PHA στα βακτήρια είναι οι ακόλουθοι:

- Η πηγή του άνθρακα
- Η έλλειψη κάποιων θρεπτικών συστατικών (θειικά, φωσφορικά, αμμωνιακά κλπ)
- Η χρονική διάρκεια της ανάπτυξης των βακτηρίων

1.2.6.1. Ο ρόλος της πηγής του άνθρακα στην βιοσύνθεση των PHAs

Η πηγή του άνθρακα φαίνεται να επηρεάζει το είδος του παραγόμενου πολυμερούς και κυρίως το είδος των μονομερών που απαρτίζουν το πολυμερές όπως έχει ήδη αναφερθεί σε προηγούμενη παράγραφο, αφού κάθε πηγή άνθρακα φαίνεται να ακολουθεί διαφορετικό μεταβολικό μονοπάτι. Σημαντικός φαίνεται να είναι ο ρόλος της πηγής του άνθρακα και στην απόδοση της παραγωγής PHA καθώς και στην ανάπτυξη των κυττάρων του βακτηρίου (Gross et al., 1989).

Σε πειράματα που έγιναν στο *P. oleovorans* όταν αναπτύχθηκε σε διαφορετικά μέσα ανάπτυξης με άλατα νατρίου αλκανοϊκών οξέων ως πηγή άνθρακα, προέκυψαν διαφορετικά αποτελέσματα τόσο στην τιμή του ξηρού βάρους των κυττάρων (cell yield, g/l) όσο και στην συσσώρευση (PHA yield, g/l) και στην απόδοση παραγωγής PHA (PHA content, wt%), (Gross et al., 1989) όπως φαίνεται στον πίνακα 2.

Σημειώνεται ότι η απόδοση παραγωγής PHA (% κ.β) δίνεται από τον τύπο :

$$\%PHA \text{ Content} = \frac{PHA(mg)}{CDW(mg)} \times 100$$

Πίνακας 2. Παραγωγή PHA στο *P. oleovorans* σε διάφορα άλατα νατρίου αλκανοϊκών οξέων ως πηγή άνθρακα (Gross et al., 1989)

Πηγή άνθρακα	Ξηρό βάρος κυττάρων (g/l)	Απόδοση παραγωγής PHA (% κ.β)	Συσσωρευση PHA (g/l)
Εξανοϊκό νάτριο	0.9	5	0.1
Επτανοϊκό νάτριο	0.9	22	0.2
Οκτανοϊκό νάτριο	1.5	41	0.6
Εννιανοϊκό νάτριο	1.5	49	0.7
Δεκανοϊκό νάτριο	1.2	37	0.4

Η μικρή αλλαγή του αριθμού των ατόμων άνθρακα στην αλυσίδα του αλκανοϊκού οξέος που χρησιμοποιείται ως πηγή άνθρακα φαίνεται να έχει τεράστια επίδραση τόσο στην τιμή του ξηρού βάρους των κυττάρων όσο και στην συσσωρευση του πολυμερούς στο *P. oleovorans*. Όταν ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται παρουσία εξανοϊκού νατρίου η τιμή του ξηρού βάρους των κύτταρων είναι 0.9 g/l, η συσσωρευση PHA είναι 0.1 g/l και η απόδοση παραγωγής 5 % (w/w). Καθώς η αλυσίδα της πηγής του άνθρακα μεγαλώνει κατά 3 άτομα δηλαδή όταν αναπτύσσεται παρουσία εννιανοϊκού νατρίου το ξηρό βάρος σχεδόν διπλασιάζεται φτάνοντας στα 1.5 g/l ενώ η συσσωρευση του PHA είναι 0.7 g/l αυξάνεται δηλαδή επτά φορές. Σημαντική αύξηση παρατηρείται και στην απόδοση της παραγωγής PHA όπου δεκαπλασιάζεται φτάνοντας στο 49%. Αντίθετα, όταν η πηγή άνθρακα είναι το δεκανοϊκό νάτριο μειώνονται τόσο η τιμή του ξηρού βάρους όσο και η απόδοση παραγωγής PHA.

Σημαντική διαφοροποίηση παρατηρείται και στην σύσταση του παραγόμενου πολυμερούς όπως φαίνεται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 3. Σύσταση (μονομερή) πολυμερών που παράχθηκαν στο *P. oleovorans* σε άλατα νατρίου αλκανοϊκών οξέων ως πηγή άνθρακα. (Gross et al., 1989)

Πηγή άνθρακα	Μονομερές (mol %)								
	HB	HV	HC	HH	HO	HN	HD	HUD	HDD
Εξανοϊκό νάτριο	3	<1	72		22		3		
Επτανοϊκό νάτριο		7	<1	86	<1	7			
Οκτανοϊκό νάτριο	<1	1	6		75		17		
Εννιανοϊκό νάτριο		3	<1	20	5	72			
Δεκανοϊκό νάτριο	<1	1	7		44		47		<1

Σημαντική διαφορά τόσο στην απόδοση της παραγωγή PHA όσο και στην σύσταση του παραγόμενου πολυμερούς παρατηρήθηκε στη *Pseudomonas putida* (KT2442) όταν αναπτύχθηκε παρουσία διαφόρων πηγών άνθρακα (Huijberts et al., 1991) (πίνακας 3).

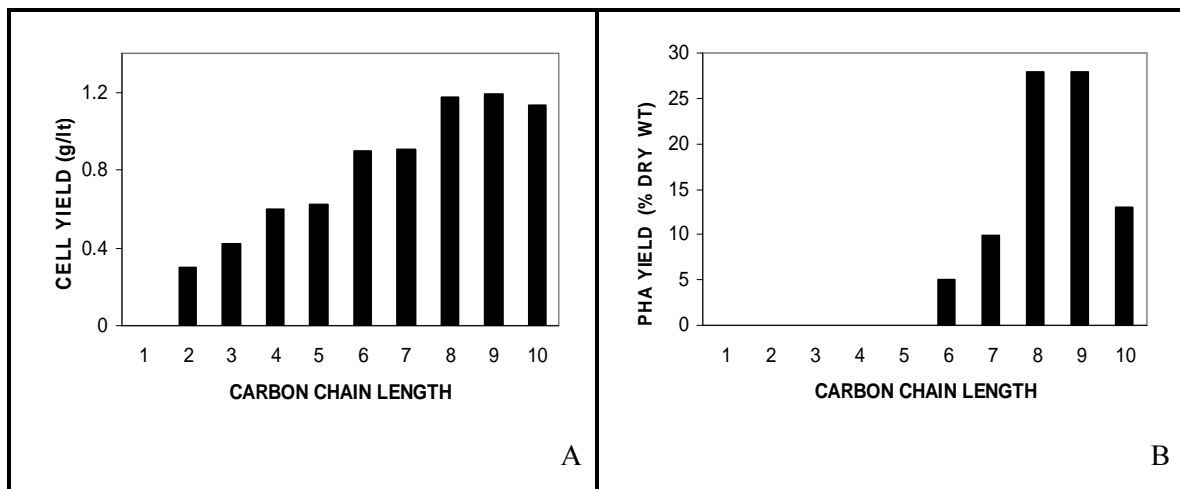
Πίνακας 4. Απόδοση παραγωγής PHA (% κ.β) και σύσταση PHAs που παράχθηκαν στη *P. putida* σε διάφορες πηγές άνθρακα (Huijberts et al., 1991)

Πηγή άνθρακα	PHA (% κ.β)	Μονομερές (% w/w)						
		C ₆	C ₈	C ₁₀	C _{12:1}	C ₁₂	C _{14:1}	C ₁₄
Γλυκόζη	16.9	<0.1	6.9	74.3	8.8	7.7	1.6	<0.1
Φρουκτόζη	24.5	0.5	12.1	70.8	8.5	5.7	1.6	0.3
Γλυκερόλη	22.0	1.7	21.4	63.6	8.6	3.8	0.8	0.1
Δεκανοϊκό νάτριο	27.6	5.3	52.3	42.3	Δ.Α*	Δ.Α	Δ.Α	Δ.Α

*Δ.Α= Δεν ανιχνεύθηκε

C₆= 3-υδροξυεξανοϊκό, C₈ = 3-υδροξυοκτανοϊκό, C₁₀=3-υδροξυδεκανοϊκό, C_{12:1} = 3-υδροξυ-5-cis-δωδεκανοϊκό, C₁₂=3-υδροξυδωδεκανοϊκό, C_{14:1}=3-υδροξυ-7-cis-δεκατετραεκανοϊκό, C₁₄=3-υδροξυδεκατετραεκανοϊκό

Η επίδραση της πηγής του άνθρακα και συγκεκριμένα το μήκος της ανθρακικής της αλυσίδας, τόσο στην τιμή του ξηρού βάρους όσο και στην απόδοση της παραγωγής PHA, επιβεβαιώνεται και από πειράματα που έγιναν στην *P. oleovorans* όταν αναπτύχθηκε σε διαφορετικές καλλιέργειες που περιείχαν άλατα κ-αλκανοϊκών οξέων ως πηγές άνθρακα, από το οξικό (2 άνθρακες) μέχρι και το δεκανοϊκό (10 άνθρακες) (Brandl et al., 1988). Τα αποτελέσματα φαίνονται στα διαγράμματα που ακολουθούν.



Σχήμα 7. Α. Η ανάπτυξη των βακτηρίων της *P. oleovorans* εκφρασμένη σε ξηρό βάρος κυττάρων και **Β.** Απόδοση παραγωγής PHA (% κ.β) στη *P. oleovorans*, σε καλλιέργειες με κ-αλκανοϊκά οξέων ως πηγές άνθρακα, από το οξικό μέχρι και το δεκανοϊκό, μετά από 44 ώρες ανάπτυξης (Brandl et al., 1988).

Μέγιστη ανάπτυξη βακτηρίων όσο και μέγιστη απόδοση της παραγωγής PHA παρατηρήθηκε στις καλλιέργειες με οκτανοϊκό και εννεανοϊκό ως πηγές άνθρακα. Επίσης παραγωγή PHA παρατηρήθηκε στις καλλιέργειες που περιείχαν πηγή άνθρακα με 6 ή περισσότερα άτομα άνθρακα (σχήμα 14.B). Σημαντική υπήρξε και η διαφοροποίηση στη σύστασης (μονομερή) καθώς και στα μοριακά βάρη των παραγόμενων πολυμερών όπως φαίνεται στον πιο κάτω πίνακα.

Πίνακας 5. Σύσταση (μονομερή) και μοριακά βάρη πολυμερών που παράχθηκαν στο *P. oleovorans* σε άλατα κ-αλκανοϊκών οξέων ως πηγή άνθρακα.

Πηγή άνθρακα	Μονομερές (mol %)						Μοριακό Βάρος		
	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉	C ₁₀	C ₁₁	M _w	M _n	M _w /M _n
Εξανοϊκό	81.5	0.7	17.5	-	0.3	-	330,000	150,00	2.2
Επτανοϊκό	0.8	93.5	1.2	3.6	0.2	0.7	370,000	150,00	2.5
Οκτανοϊκό	9.6	-	86.1	-	4.3	-	210,000	94,000	2.2
Εννιανοϊκό	1.1	31.2	6.1	54.8	2.8	0.4	190,000	85,000	2.2
Δεκανοϊκό	19.6	-	62.9	1.4	11.1	3.0	92,000	46,000	2.0

M_w: μέσο μοριακό βάρος, M_n: μέσο κατ' αριθμό μοριακό βάρος, M_w/M_n: συντελεστής πολυδιασποράς

Διαφοροποίηση στην απόδοση παραγωγής PHA καθώς και στη σύσταση του παραγόμενου πολυμερούς παρατηρήθηκε στους μικροοργανισμούς *A. eutrophus* και συγκεκριμένα στο στέλεχος ATCC 17699 (πίνακας 6) και στο *P. oleovorans* (πίνακας 7) όταν αναπτύχθηκαν παρουσία διαφορετικών πηγών άνθρακα (Anderson and Dawes, 1990).

Πίνακας 6. Απόδοση παραγωγής PHA (% κ.β) και σύσταση PHAs που παράχθηκαν στη *P. putida* ATCC 17699 σε διάφορες πηγές άνθρακα (Anderson and Dawes, 1990)

Carbon source	Concn (g/liter)	PHA (% wt/wt)	Monomer composition (mol%)			
			3HB	4HB	3HV	5HV
CH ₃ (CH ₂) ₃ COOH	20	36	10	- ^b	90	-
Cl(CH ₂) ₃ COOH	18	27	89	11	-	-
HO(CH ₂) ₃ COOH	16.5	30	67	33	-	-
HO(CH ₂) ₃ COOH	9.6	43	82	18	-	-
CH ₃ (CH ₂) ₂ COOH	8					
HO(CH ₂) ₄ OH	20	8	75	25	-	-
Cl(CH ₂) ₄ COOH	15	29	63	37	-	-
CH ₃ (CH ₂) ₂ COOH	5					
O(CH ₂) ₃ CO	20	21	83	17	-	-
O(CH ₂) ₂ CO	10	65	76	24	-	-
CH ₃ (CH ₂) ₂ COOH	10					
Cl(CH ₂) ₄ COOH ^c	20	1	24	-	24	52
Cl(CH ₂) ₄ COOH ^c	5	19	26	-	65	9
CH ₃ (CH ₂) ₃ COOH	15					
HO(CH ₂) ₃ COOH	17.5	18	32	45	23	-
CH ₃ (CH ₂) ₃ COOH	2.5					

Πίνακας 7 .Απόδοση παραγωγής PHA (% κ.β) και σύσταση PHAs που παράχθηκαν στο *P. oleovorans* σε διάφορες πηγές άνθρακα (Anderson and Dawes, 1990)

Carbon source	PHA (% wt/wt)	3-Hydroxyacid monomers in PHA (mol%)										
		C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉	C ₁₀	C ₁₁	C ₁₂		
Alkane												
Hexane	2	- ^a	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-
Heptane	11.4	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-
Octane	25.3	-	-	11	-	89	-	-	-	-	-	-
Nonane	24.3	-	-	-	37	-	63	-	-	-	-	-
Decane	21.9	-	-	10	-	66	-	24	-	-	-	-
Undecane	14.3	-	-	-	23	-	63	14	-	-	-	-
Dodecane	5.8	-	-	2	-	31	-	36	-	-	-	31
Alkanoate												
Hexanoate	5	3	<1	72	-	22	-	3	-	-	-	-
Heptanoate	22	-	<1	<1	86	<1	-	-	-	-	-	-
Octanoate	41	<1	1	6	-	75	-	17	-	-	-	-
Nonanoate	49	-	3	<1	20	5	72	-	-	-	-	-
Decanoate	37	<1	1	7	-	44	-	47	-	-	-	<1
Alcohol												
Octanol	15	-	-	6	-	91	-	3	-	-	-	-
Nonanol	33	-	-	-	27	-	73	-	-	-	-	-
Decanol	6	-	-	-	-	63	-	37	-	-	-	-

^a Monomer not reported.

1.2.6.2. Ο ρόλος της έλλειψης θρεπτικών συστατικών (nutrient limitation) στη βιοσύνθεση των PHAs

Η παραγωγή του πολυμερούς επάγεται όταν τα βακτήρια βρίσκονται σε κατάσταση “τροφικού stress”, όταν δηλαδή οι μικροοργανισμοί υφίστανται έλλειψη από κάποιο από τα κύρια θρεπτικά συστατικά του μέσου ανάπτυξης όπως π.χ. οξυγόνο για τους αερόβιους οργανισμούς, άζωτο, ιχνοστοιχεία και ιόντα εν διαλύσει (θειικά, φωσφορικά, αμμωνιακά κλπ) (Lee et al., 2000, Hazenberg and Witholt, 1997). Ανάλογα με τον μικροοργανισμό και τις συνθήκες ανάπτυξης η βέλτιστη συγκέντρωση καθώς και η παρουσία ή απουσία ενός από τα πιο πάνω συστατικά ποικίλουν.

Σε συνθήκες έλλειψης φωσφορικών (PO_4^{3-}) ή αμμωνιακών (NH_4^+) ιόντων η παραγωγή και η συσσώρευση πολυμερούς στα βακτήρια επάγεται σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι σε συνθήκες έλλειψης άλλου συστατικού (Jung et al., 2001). Αυτό επιβεβαιώνεται και από πειράματα που έγιναν στη *P.oleovorans*, όταν αναπτύχθηκε παρουσία οκτανοϊκού νατρίου ως πηγή άνθρακα, σε καλλιέργειες με περιορισμό (limitation) αζώτου (NH_4^+), φωσφόρου (PO_4^{3-}), μαγνησίου, σιδήρου και οξυγόνου αντίστοιχα προέκυψε ότι ο περιορισμός του αζώτου επάγει καλύτερα την παραγωγή PHA στο βακτήριο αυτό, όπως φαίνεται και στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακα 8. Απόδοση παραγωγής PHA στη *P.oleovorans*, όταν αναπτύχθηκε σε καλλιέργειες με περιορισμό θρεπτικών συστατικών (Hazenberg and Witholt, 1997)

Περιοριστικό συστατικό	Απόδοση παραγωγής PHA (% κ.β)
N	33
P	17
Mg	5-10
Fe	5-8
O	5-10

α. Περιορισμός αζώτου (Nitrogen Limitation)

Στο πιο πάνω πείραμα παρατηρήθηκε επίσης ότι οι χαμηλές αρχικές συγκεντρώσεις αμμωνιακών ιόντων (16.7 και 33.4 mM) επάγουν την συσσώρευση PHA στο βακτήριο καθώς η τιμή του ξηρού βάρους των κυττάρων παραμένει σε σχετικά χαμηλές τιμές. Η τιμή της απόδοσης παραγωγής του πολυμερούς ήταν μέγιστη, 33 % (w/w). Με αύξηση της αρχική συγκέντρωσης των αμμωνιακών ιόντων στα 83 mM, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στην τιμή του ξηρού βάρους (τριπλασιασμός), ενώ η τιμή της απόδοσης της παραγωγής PHA μειώθηκε ελαφρά. Με περαιτέρω αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης αμμωνιακών στα 167 mM η τιμή του ξηρού βάρους αυξήθηκε ακόμη περισσότερο, η απόδοση της παραγωγής PHA μειώθηκε μόλις στο 9%.

Οι χαμηλές αρχικές συγκεντρώσεις αμμωνιακών ιόντων, 0.005 -0.05% w/v (0.3-3 mM) φαίνεται να επάγουν την συσσώρευση PHA και στο *A. eutrophus* και *E. coli* (Liebergesell, and Steinbüchel, 1992).

Σε πειράματα που έγιναν από μια άλλη ερευνητική ομάδα (Brandl et al 1988) με παραγωγή PHA στη *P. oleovorans* προέκυψε ότι απουσία αμμωνιακών ιόντων τόσο το ξηρού βάρους των κυττάρων όσο και η συσσώρευση και η απόδοση της παραγωγής PHA παραμένουν σε πολύ χαμηλές τιμές. Αντίθετα οι μικρές αρχικές συγκεντρώσεις αμμωνιακών ιόντων (5-25 mM ή 0.008-0.043% w/v) έδειξαν να επάγουν την αύξηση της τιμής του ξηρού βάρους καθώς και την συσσώρευση και την απόδοση παραγωγής PHA. Σε μεγαλύτερη αρχική συγκέντρωση αμμωνιακών ιόντων στα 50 mM (0.085% w/v), παρατηρήθηκε μείωση των τιμών των προαναφερόμενων παραμέτρων όπως φαίνεται στον πίνακα που ακολουθεί:

Πίνακας 9. Αποτελέσματα παραγωγής PHA στο *P.oleovorans*, σε καλλιέργειες με διαφορετική αρχική συγκέντρωση αμμωνιακών ιόντων (Brandl et al., 1988)

NH_4^+ (mM) ή (% w/v)	Ξηρό βάρος κυττάρων (mg /lt)	Συσσώρευση PHA (mg/lt)	Απόδοση παραγωγής PHA (% κ.β)
0	47	18	37.2
5 (0.0085)	680	240	35.6
10 (0.017)	800	265	30.8
25 (0.04)	865	260	30.1
50 (0.085)	795	190	24.2

Μετά από πειράματα στη *Pseudomonas oleovorans* προτάθηκε ότι υπάρχει μια κρίσιμη τιμή στο λόγο συγκέντρωσης άνθρακα / αζώτου (C/N) που ευνοεί την παραγωγή του πολυμερούς. Ο λόγος αυτός φτάνει ή όχι στην κρίσιμη τιμή ανάλογα με την αρχική συγκέντρωση τόσο της πηγής άνθρακα, όσο και των αμμωνιακών ιόντων και γι' αυτό παρατηρούνται διακυμάνσεις στην παραγωγή του πολυμερούς (Ramsay et al., 1992).

β. Περιορισμός φωσφόρου (Phosphate Limitation)

Πολύ σημαντικό ρόλο στην βιοσύνθεση των PHAs φαίνεται να έχει και η αρχική συγκέντρωση των φωσφορικών ιόντων. Ανάλογα με τον μικροοργανισμό, την πηγή άνθρακα που χρησιμοποιείται και τις συνθήκες ανάπτυξης των βακτηρίων η παραγωγή του πολυμερούς επάγεται είτε από χαμηλή είτε από υψηλή αρχική συγκέντρωση φωσφορικών ιόντων. Σχεδόν όλα τα πειράματα έδειξαν ότι υπάρχει μια περιοχή συγκεντρώσεων φωσφορικών ιόντων από 30 μέχρι και 50 mM, που ευνοεί την συσσώρευση πολυμερούς στα βακτήρια.

Συγκεκριμένα σε πειράματα που έγιναν στο βακτήριο *Algaligenes eutrophus*, όταν αναπτύχθηκε σε καλλιέργειες με πηγή άνθρακα γλυκόζη, παρατηρήθηκε ότι με αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης των φωσφορικών ιόντων αυξάνεται η συσσώρευση και απόδοση της παραγωγής PHA. Η συσσώρευση PHA ήταν μέγιστη, 232 g/l, όταν η συγκέντρωση των φωσφορικών ιόντων ήταν η μεγαλύτερη που δοκιμάστηκε 5.5 g/l (40

mM). Η απόδοση της παραγωγής PHA ήταν περίπου 80% σε όλες τις συγκεντρώσεις φωσφορικών που δοκιμάστηκαν. Η τιμή του ξηρού βάρους των κυττάρων αυξανόταν με την αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης των φωσφορικών ιόντων. Ως πηγή PO_4^{3-} , χρησιμοποιήθηκε KH_2PO_4 . (Ryu et al. 1997). Τα αποτελέσματα από αυτό το πείραμα αναγράφονται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 10. Αποτελέσματα παραγωγής PHA στο *Algaligenes eutrophus*, σε καλλιέργειες με διαφορετική αρχική συγκέντρωση φωσφορικών ιόντων (Ryu et al. 1997)

PO_4^{3-} (g/l) ή (mM)	Ξηρό βάρος κυττάρων (g/l)	Συσώρευση PHA (g/l)	Απόδοση παραγωγής PHA (% κ.β)
2.2 (16)	125	101	81
3.1 (23)	160	130	81
4.3 (32)	221	180	81
5.5(40)	281	232	82

Στο πείραμα αυτό παρατηρήθηκε επίσης ότι η αύξηση της συσώρευσης PHA στα βακτήρια αρχίζει περίπου μετά από 35 ώρες ανάπτυξης, και την χρονική στιγμή οι μετρήσεις έδειξαν ότι η συγκέντρωση των φωσφορικών ιόντων μέσα στην καλλιέργεια μειώθηκαν από 5.5 g/l σε 0.4 g/l, επομένως η αύξηση της παραγωγής του πολυμερούς σχετίζεται με την κατανάλωση (την χρησιμοποίηση) των φωσφορικών ιόντων από τα βακτήρια.

Η αρχική συγκέντρωση των φωσφορικών ιόντων φαίνεται να επηρεάζει και την συσώρευση του πολυμερούς και στη *Pseudomonas putida*, όπου όταν αναπτύχθηκε σε καλλιέργειες με ολεϊκό οξύ ως πηγή άνθρακα, παρατηρήθηκε ότι με μείωση της αρχικής συγκέντρωσης των φωσφορικών ιόντων αυξάνεται τόσο η συσώρευση όσο και η απόδοση παραγωγής PHA. Αντίθετα η τιμή του ξηρού βάρους μειώνεται καθώς αυξάνεται η αρχική συγκέντρωση των φωσφορικών ιόντων. Επίσης στο πείραμα αυτό παρατηρήθηκε ότι η παραγωγή του PHA αυξάνεται την χρονική στιγμή που μειώνεται η

συγκέντρωση των φωσφορικών ιόντων στο μέσο ανάπτυξης (Lee et al., 2000). Τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού δίνονται στον πίνακα 11.

Πίνακας 11. Αποτελέσματα παραγωγής PHA στη *Pseudomonas putida*, σε καλλιέργειες με διαφορετική αρχική συγκέντρωση φωσφορικών ιόντων (Lee et al., 2000)

PO_4^{3-} (g/l) ή (mM)	Ξηρό βάρος κυττάρων (g/l)	Συσώρευση PHA (g/l)	Απόδοση παραγωγής PHA (% κ.β)
22 (167)	173	32.3	18.7
7.5 (55)	168	60.7	36.1
4 (30)	141	72.6	51.4

Οι πολύ χαμηλές αρχικές συγκεντρώσεις φωσφορικών ιόντων (1-2 mM) φαίνεται να μην ευνοούν τόσο την ανάπτυξη (εκφρασμένη σε ξηρό βάρος κυττάρων, g/l) όσο και συσώρευση πολυμερούς στο βακτήριο *P. oleovorans* όταν αναπτύσσεται παρουσία οκτανοϊκού ως πηγή άνθρακα. Αντίθετα με αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης των φωσφορικών στα 4 και 6 mM παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στην τιμή του ξηρού βάρους των κυττάρων καθώς και της συσώρευσης του πολυμερούς (Hazenberg and Witholt, 1997).

1.2.6.3. Ο ρόλος της χρονικής διάρκειας ανάπτυξης των βακτηρίων στην παραγωγή των PHAs

Η χρονική διάρκεια της ανάπτυξης των βακτηρίων είναι μια άλλη σημαντική παράμετρος αύξησης της απόδοσης παραγωγής PHA (Brandl et al., 1988). Ο βέλτιστος χρόνος παραγωγής PHA εξαρτάται από το βακτήριο στο οποίο συντίθενται, την πηγή άνθρακα καθώς και από τις αρχικές συγκεντρώσεις των άλλων θρεπτικών συστατικών που είναι απαραίτητα για την βιοσύνθεση του πολυμερούς. Γενικά η χρονική διάρκεια της ανάπτυξης των βακτηρίων κυμαίνεται από 22 μέχρι και 160 ώρες.

Η σύσταση του μονομερούς, δηλαδή τα μονομερή που απαρτίζουν το πολυμερές καθώς και το ποσοστό τους, δεν παρουσιάζει αξιόλογη μεταβολή με την πάροδο του χρόνου ανάπτυξης στο βακτήριο *Pseudomonas putida* όταν αναπτύχθηκε σε καλλιέργειες με οκτανοϊκό νάτριο ως πηγή άνθρακα (Yoon et al., 1999) όπως φαίνεται στον πίνακα 12.

Πίνακας 12. Σύσταση πολυμερούς που παράγεται στο βακτήριο *P.putida* με πηγή άνθρακα οκτανοϊκό νάτριο σε συνάρτηση με το χρόνο ανάπτυξης. (Yoon et al., 1999)

Χρόνος (ώρες)	Σύσταση πολυμερούς (mol %)		
	HC	HO	HD
8	18.9	74.5	6.2
12	15.8	80.6	3.6
16	14.2	80.9	4.9
22	14.2	81.5	4.3
24.5	14.5	81.1	4.4
28.5	14.0	80.4	5.6
32.5	14.1	81.1	4.8
36.5	13.7	81.6	4.6
40.5	14.1	81.1	4.8

Από τον πιο πάνω πίνακα φαίνεται ότι σε όλη τη διάρκεια τα μονομερή που απαρτίζουν το πολυμερές στο μικροοργανισμό αυτό είναι: 3-υδροξυοκτανοϊκό (3HO), 3-υδροξυκαπροϊκό (3HC), και 3-υδροξυβουτυρικό (3HB) σε αναλογία mole 85: 13:2.

1.2.7. Ιδιότητες πολυ-υδροξυαλκανοϊκών (PHAs)

1.2.7.1. Γενικές ιδιότητες PHAs

Το μοριακό βάρος των PHAs ποικίλει ανάλογα με τις συνθήκες ανάπτυξης και το βακτήριο στο οποίο παράγονται, αλλά γενικά κυμαίνεται από 50,000 έως 1,000,000 Da. Το πολυ-3-υδροξυβουτυρικό P(3HB) και άλλα PHAs που παράγονται σε βακτήρια, έχουν αρκετά υψηλό μοριακό βάρος και ιδιότητες παρόμοιες με αυτές των συμβατικών πλαστικών όπως το πολυπροπυλένιο (πίνακας 10).

Πίνακας 13. Ιδιότητες PHAs και πολυπροπυλενίου (Madison and Huisman, 1999)

Ιδιότητα	Πολυμερές*				
	P(3HB)	P(3HB-3HV)	P(3HB-4HB)	P(3HO-3HH)	PP
T_m (°C)	177	145	150	61	176
T_g (°C)	2	-1	-7	-36	-10
Κρυσταλλικότητα (%)	70	56	45	30	60
Διατμητική τάση (%)	5	50	444	300	400

T_m : θερμοκρασία τήξης

T_g : θερμοκρασία υαλώδους μεταπτώσεως

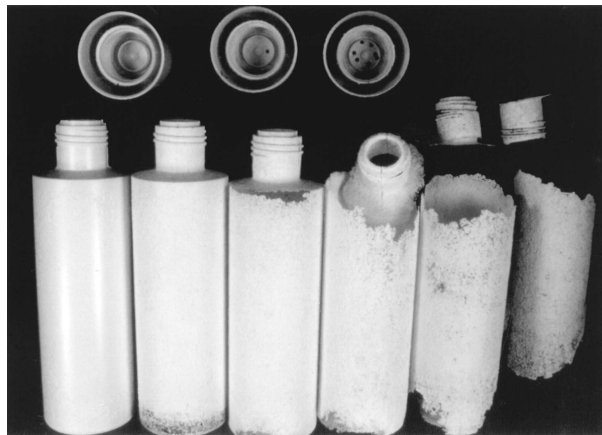
* P(3HB) = πολυ(3-υδροξυβουτυρικό), P(3HB-3HV) = πολυ(3-υδροξυβουτυρικό-co-υδροξυβουτυρικό) το οποίο περιέχει 20% 3HV, P(3HB-4HB)= πολυ(3-υδροξυβουτυρικό-co-4- υδροξυβουτυρικό) το οποίο περιέχει 16% 4HB, P(3HO-3HH)= πολυ(3-υδροξυβουτυρικό-co-3-υδροξυεξανοϊκό) το οποίο περιέχει 11% 3HH και PP= πολυπροπυλένιο.

Μέσα στο κύτταρο το P(3HB) βρίσκεται σε ρευστή άμορφη κατάσταση. Όμως μετά την εκχύλιση από το κύτταρο με οργανικούς διαλύτες, το P(3HB) γίνεται πολύ κρυσταλλικό (με κρυσταλλικότητα 55-80), (Lee, 1996) και σε αυτή τη φάση είναι σκληρό αλλά εύθραυστο υλικό. Λόγω της ευθραυστότητας του, το P(3HB) δεν είναι πολύ ανθεκτικό. Το ψηλό σημείο τήξεως του (~170 °C) το οποίο είναι πολύ κοντά στην θερμοκρασία θερμικής αποικοδόμησης του, εμποδίζει την περαιτέρω επεξεργασία του πολυμερούς. Επίσης μετά από αποθήκευση μερικών ημερών γίνεται ιδιαίτερα εύθραυστο. Όμως, πρόσφατες βιοτεχνολογικές μελέτες εστιάστηκαν στην κατασκευή PHAs των οποίων ο χειρισμός θα ήταν πιο εύκολος. Με την ενσωμάτωση 3HV στο

P(3HB) προέκυψε το συμπολυμερές πολυ(3-υδροξυβουτυρικό-co-υδροξυβαλερικό) [P(3HB-3HV)] το οποίο είναι λιγότερο σκληρό και εύθραυστο από το P(3HB), και το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην κατασκευή υμενίων (films) με πολύ καλή αντίσταση στο νερό και σε διάφορα αέρια, παραπλήσια με το πολυπροπυλένιο. Το συμπολυμερές αυτό μπορεί να κατεργάζεται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες αφού διατηρεί τις υπόλοιπες εξαιρετικές ιδιότητες του P(3HB). Σε αντίθεση με το P(3HB) και P(3HB-3HV) τα mclPHAs παρουσιάζουν λιγότερη κρυσταλλικότητα και περισσότερη ελαστικότητα. Συνεπώς τα mclPHAs έχουν διαφορετικό πεδίο εφαρμογών από τα scl PHAs. (Madison and Huisman, 1999).

1.2.7.2. Βιοαποικοδομησιμότητα

Η βιοαποικοδομησιμότητα είναι ίσως η πιο σημαντική ιδιότητα των PHAs. Στη φύση υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός μικροοργανισμών που μπορεί να αποικοδομήσει τα πολυμερή αυτά με τη χρήση υδρολασών και αποπολυμερασών. Ο χρόνος αποικοδόμησης ποικίλει αντίστοιχα από λίγους μήνες (σχήμα 15) όταν τοποθετηθούν σε απόβλητα έως λίγα χρόνια στην θάλασσα (Madison and Huisman, 1999).



Σχήμα 9. Βιοαποικοδόμηση του P(3HB-3HV) σε αερόβια απόβλητα. Τα μπουκάλια που αποτελούνται από βιοαποικοδομήσιμο πλαστικό έχουν υποστεί επώαση σε μέση θερμοκρασία 20 °C για 0, 2, 4, 6, 8 και 10 εβδομάδες (από αριστερά προς τα δεξιά) (Madison and Huisman, 1999).

Η βιοαποικοδομησιμότητα των πολυμερών αυτών παρουσιάζει όμως ένα σημαντικό μειονέκτημα. Κατά τη σχάση των δεσμών του πολυμερούς παράγεται CO₂ και H₂O σε αερόβιες συνθήκες, αλλά CH₄ σε αναερόβιες συνθήκες, ουσίες που ευθύνονται για το φαινόμενο του θερμοκηπίου. Με σκοπό την άρση αυτής της περιβαλλοντικής επιβάρυνσης προτάθηκε τα πολυμερή PHAs να θάβονται στο έδαφος ώστε ο άνθρακας που απελευθερώνεται να γίνεται συστατικό του εδάφους (Gerngross et al., 2000).

1.2.8. Εφαρμογές πολυ-υδροξυαλκανοϊκών

Τα πολυ(3-υδροξυαλκανοϊκά) PHAs εμφανίζουν δύο κύριες ενδιαφέρουσες ιδιότητες την βιοαποικοδομησιμότητα και την βιοσυμβατότητα. Δεδομένου ότι το υδροξυβουτυρικό είναι κανονικό συστατικό του αίματος, τα πολυ(3-υδροξυαλκανοϊκά) PHAs είναι βιοσυμβατά και ανεκτά από τον ανθρώπινο και αποικοδομούνται σε ανθρώπινους και ζωικούς ιστούς (Hrabak, 1992). Αυτή η τελευταία ιδιότητα δίνει στα PHAs φαρμακευτική και κλινική σπουδαιότητα, συμπεριλαμβανομένης της χρήσης σε ελεγχόμενη αργή απελευθέρωση φαρμάκων, αντικατάσταση οστών και κατασκευή χειρουργικών ραμμάτων (Lafferty et al., 1988)

1.2.8.1. Τα PHAs ως φορείς φαρμακευτικών ουσιών (Drug delivery)

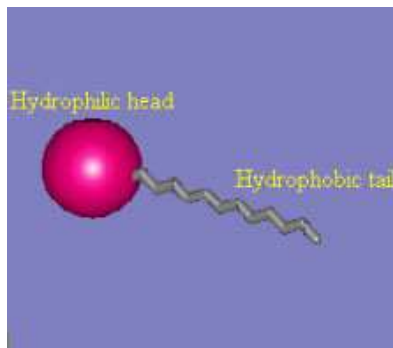
Πολλά επιστημονικά εργαστήρια ασχολούνται με ερευνητικά προγράμματα για την ανάπτυξη νέων μεθόδων μεταφοράς φαρμάκων (Drug Delivery) για την θεραπεία ανθρωπίνων ασθενειών. Οι διάφορες μέθοδοι χρησιμοποιούν την επιστήμη των υλικών και ιδιαίτερα την ανάπτυξη βιο-αποικοδομήσιμων πολυμερών τα οποία θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την χορηγία των φαρμάκων και την εστίαση της δράσης τους στα κύτταρα ή στους ιστούς που χρειάζονται θεραπεία. Με την εστιασμένη μεταφορά φαρμάκων το φάρμακο μεταφέρεται στην περιοχή της ασθένειας και όχι σε ολόκληρο το σώμα, ώστε η δράση/απόδοση του φαρμάκου μεγαλώνει και οι παρενέργειες ελαχιστοποιούνται ή και εξαφανίζονται. Η ερευνητική πρόκληση είναι να βρεθεί ο

συνδυασμός φαρμάκου-υλικού ο οποίος θα είναι αποτελεσματικός και ασφαλής για κάθε ασθένεια.

Για την επιτυχή “συνεργασία” μεταξύ των φαρμάκων και των νέων συσκευών είναι απαραίτητη όχι μόνο η γνώση της δομής των υλικών αλλά και η φυσιολογική διεργασία που συσχετίζεται με την μεταφορά, τον μεταβολισμό και την δράση της φαρμακευτικής ουσίας. Τα περισσότερα ερευνητικά εργαστήρια δίνουν ιδιαίτερη έμφαση πρώτον στον σχεδιασμό μοριακών φαρμάκων και συστημάτων μεταφοράς τους και δεύτερο στον βιολογικό μεταβολισμό των φαρμάκων και την κατανομή τους στους ιστούς.

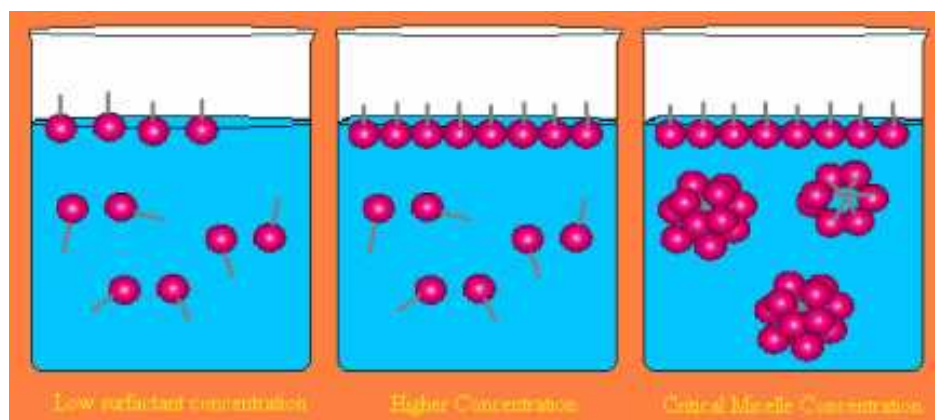
Η πρόσφατη τεχνολογία χρησιμοποιεί μικροσκοπικούς μεταφορείς φαρμάκων κατασκευασμένους κυρίως από πολυμερές. Τέτοιου είδους υλικά μπορούν να κατασκευαστούν σε σχήμα σφαίρας με διαμέτρους μέχρι και 10^{-12} m. Με τον τρόπο αυτό κατορθώνεται η μεταφορά φαρμάκων ακόμα και στα μικρότερα τριχοειδή αγγεία του σώματος. Τα νανοσφαιρίδια αυτά σχεδιάζονται έτσι ώστε να ταξιδεύουν σε συγκεκριμένα μέρη του σώματος, να ελευθερώνουν το φορτίο τους σε φάρμακο και στη συνέχεια να βιοαποικοδομούνται. Τα παραπροϊόντα της αποικοδόμησης τους δεν είναι τοξικά και θα αποβάλλονται από το σώμα. Η ανάπτυξη στην επιστήμη των πολυμερών είχε μεγάλη επίδραση στην τεχνολογία του Drug Delivery. Είναι δυνατόν πλέον να κατασκευάζονται βιοσυμβατά και βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή τα οποία θα ελευθερώνουν τη φαρμακευτική ουσία ακόμα και με ελεγχόμενο τρόπο. Για ένα συγκεκριμένο πολυμερές, όσο χαμηλότερο το μοριακό βάρος τόσο γρηγορότερα αυτό θα διασπαστεί μέσα στο σώμα και έτσι τόσο γρηγορότερο το μεταφερόμενο φάρμακο απελευθερώνεται.

Η κατασκευή τέτοιων νανοσφαιρίων είναι μια περίπλοκη διαδικασία και περιλαμβάνει τη χρήση των μορίων που αυτο-συγκεντρώνονται κατά τη διάρκεια μιας χημικής διαδικασίας και τη χρήση των αυτο-συγκεντρωμένων (self-assemble) σφαιρών ως μοριακή “φόρμα” (mould) στην οποία το αντιδραστικό μονομερές διασκορπίζεται και πολυμερίζεται για να διαμορφώσει τις στερεές σφαίρες.



Σχήμα 10: Σχηματική παράσταση επιφανειοδραστικού (surfactant) μορίου

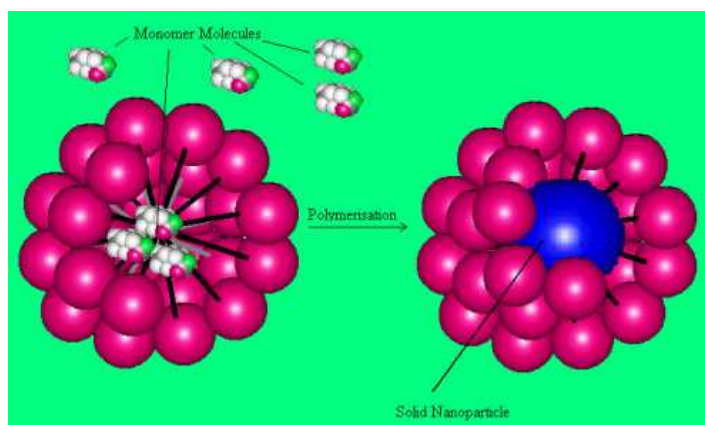
Τα επιφανειοδραστικά μόρια εκτελούν αυτήν την παράξενη σύζευξη λόγω της ασυνήθιστης δομής τους. Ο μηχανισμός που αναγκάζει τα επιφανειοδραστικά μόρια να συσσωματωθούν είναι αποτέλεσμα της αμφίφυλης (amphiphilic) φύσης τους. Αυτό σημαίνει ότι τα μόρια αποτελούνται από δύο ή περισσότερα μέρη με κάθε μέρος που είναι διαλυτό σε ένα διαφορετικό μέσο. Γενικά, ένα επιφανειοδραστικό μόριο μπορεί να έχει ένα υδρόφιλο κεφάλι και μια υδροφοβική ουρά όπως φαίνεται σχήμα 16.



Σχήμα 11: Μηχανισμός αυτο-οργάνωσης επιφανειοδραστικών μορίων καθώς αυξάνει η συγκέντρωσή τους

Μόλις η συγκέντρωση των μορίων αυτών σε ένα διάλυμα ύδατος φτάσει σε μια κρίσιμη τιμή θα διαταχθούν έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθεί η αλληλεπίδραση της υδροφοβικής ουράς με το νερό. Προκειμένου επιτευχθεί αυτό οι υδροφοβικές ουρές ευθυγραμμίζονται και σε μερικές περιπτώσεις σχηματίζεται μια σφαιρική δομή η οποία ονομάζεται μικκύλιο (micelle) όπως φαίνεται στο σχήμα 17.

Το μέγεθος των μικκυλίων εξαρτάται από το μήκος του επιφανειοδραστικού μορίου και έχουν διάμετρο από $10 - 100 \times 10^{-12}$ m. Όταν σχηματιστούν εκατομμύρια μικκυλίων που περιστρέφονται μέσα στο υδατικό μέσο ένα δραστικό μονομερές που είναι επίσης υδροφοβικό εισάγεται σε αυτά. Όπως μπορεί φαίνεται στο σχήμα 20 τα μόρια των μονομερών θέλουν να ελαχιστοποιήσουν την αλληλεπίδρασή τους με το νερό και για τον λόγο αυτόν ταξιδεύουν στο εσωτερικό των μικκυλίων. Τα μικκύλια θα διογκωθούν για να προσαρμόσουν το μονομερές. Το τελικό μέρος της προετοιμασίας των nanoparticles περιλαμβάνει την προσθήκη των μορίων-εκκινητών που προκαλούν μια αλυσιδωτή αντίδραση μέσα στο μικκύλιο- πυρήνα και οδηγεί σε πολυμερισμό. Μόλις ο πυρήνας μικκυλίου μετατραπεί σε μια στερεά πολυμερή σφαίρα με διάμετρο περίπου $200 - 1000 \times 10^{-12}$ m, οι σφαίρες μπορούν να αφαιρεθούν από το γαλάκτωμα και είναι έτοιμες για τη χρήση.



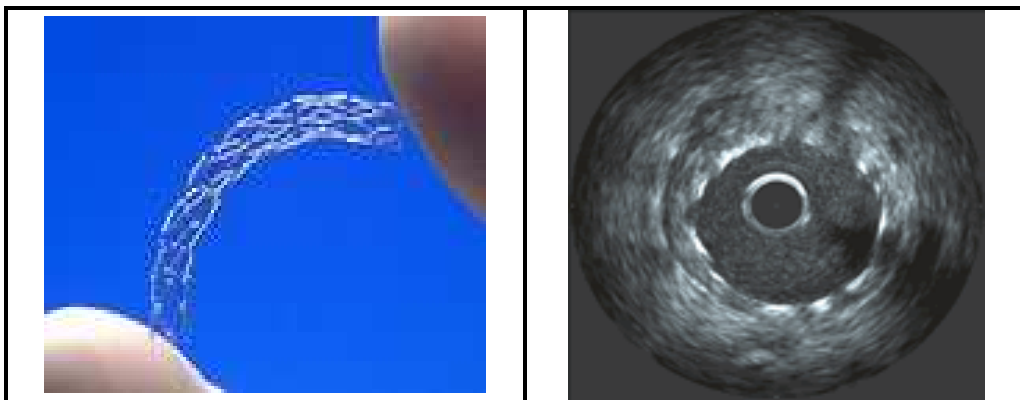
Σχήμα 12. Εισαγωγή και πολυμερισμός της δραστικής ουσίας στο μικκύλιο

Μόλις παραχθούν αυτά τα μικροσκοπικά μόρια εμφανίζονται ως λεπτή σκόνη και μπορεί να έχουν μόρια φαρμάκων είτε προσκολλημένα στην επιφάνειά τους είτε προσροφημένα μέσα στον πυρήνα τους. Σε αυτή τη φάση τα νανοσφαιρίδια είναι στερεές σφαίρες που αποτελούνται από πολυμερείς αλυσίδες ενός σταθερού μήκους. Το μήκος της αλυσίδας εξαρτάται άμεσα από το μοριακό βάρος του πολυμερούς. Για ένα συγκεκριμένο πολυμερές, όσο χαμηλότερο το μοριακό βάρος τόσο γρηγορότερα αυτό θα διασπαστεί μέσα στο σώμα και έτσι τόσο γρηγορότερο το μεταφερόμενο φάρμακο απελευθερώνεται.

Η συγκεκριμένη περιοχή μέσα στο σώμα στην οποία τα νανοσωματίδια θα ταξιδέψουν ελέγχεται από τη χημεία επιφάνειας (surface chemistry) των σωματιδίων. Τα μόρια μπορούν να δεθούν στην επιφάνεια των σωματιδίων, που θα προκαλέσουν την εκλεκτική λήψη, από τα διάφορα όργανα μέσα στο σώμα.

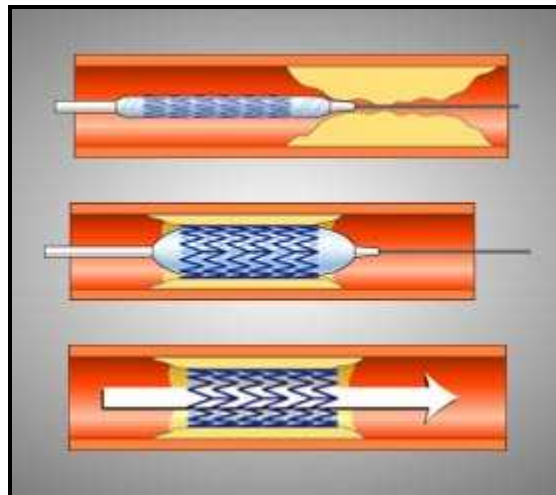
1.2.8.2. Εμφυτεύσιμες ενδοπροσθέσεις (stents) επικαλυπτόμενες με φάρμακα προς ελεγχόμενη αποδέσμευση

Stent ονομάζεται το βιοσυμβατό εμφύτευμα σε σχήμα διάτρητου σωλήνα, που χρησιμοποιείται για τη διάνοιξη φραγμένων αιμοφόρων αγγείων και την αποκατάσταση της ομαλής ροής του αίματος (σχήμα 19).



Σχήμα 13: Αριστερά. μεταλλικό stent. Δεξιά: Τοποθέτηση stent σε φραγμένο αιμοφόρο αγγείο.

Τα stent αρχικά έχουν πολύ μικρή διάμετρο και εισέρχονται στο αιμοφόρο αγγείο και με τη βοήθεια καθετήρα (balloon catheter) κινείται στο τμήμα όπου υπάρχει η παρεμπόδιση. Όταν το μπαλόνι του καθετήρα διογκωθεί, το stent διαστέλλεται και εφαρμόζει στο αγγείο διαμορφώνοντας ένα ικρίωμα. με αποτέλεσμα να το κρατά ανοικτό (σχήμα 20).



Σχήμα 14. Διαδικασία τοποθέτησης stent σε φραγμένο αιμοφόρο αγγείο

Τα υλικά κατασκευής των stents είναι κυρίως μέταλλα (Τιτάνιο, Λευκόχρυσος, Ανοξείδωτος Χάλυβας). Τα τελευταία χρόνια τα μεταλλικά υλικά κατασκευής των stents, τείνουν να αντικατασταθούν από πολυμερικά βιοσυμβατά υλικά. Τα πολυμερικά stents θα μπορούσαν να επικαλυφθούν από φαρμακευτικές ουσίες οι οποίες θα απελευθερώνονται με πολύ βραδύ ρυθμό, με τη βοήθεια της ροής του αίματος, και οποίες θα βοηθούν τη διάνοιξη και τη διατήρηση της καλής κατάστασης των αρτηριών.

Στο ινστιτούτο **ECRI**-(Emergency Care Research Institute) (Plymouth Meeting, Pa., Sept. 10 /PR Newswire), μελετήθηκαν οι επιδράσεις επικαλυμμένων Stents με Sirolimus (Sirolimus-eluting -SES) και Paclitaxe (Paclitaxel-eluting-PES) στην αντιμετώπιση της στεφανιαίας νόσου με εκπληκτικά αποτελέσματα.

Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι τα drug eluted stents με βάση πολυμερή μειώνουν το ποσοστό επαναστένωσης (restenosis) των αγγείων μέχρι και 64 φορές σε σύγκριση με τα μεταλλικά stents. Συγκεκριμένα οι μελέτες έδειξαν ότι οι πιθανότητες για επαναστένωση των αγγείων με χρήση SES ήταν 4 έως 64 φορές λιγότερες σε σύγκριση με τα μεταλλικά Stents ενώ οι πιθανότητες από τη χρήση PES ήταν περίπου 8 φορές λιγότερες.

1.2.8.3. Άλλες εφαρμογές

Η βιοαποικοδομησιμότητα των πολυμερών τα καθιστά πολύ καλούς υποψήφιους για την αντικατάσταση των συμβατικών πλαστικών σε πολλές βιομηχανικές εφαρμογές.

Στον τομέα του περιβάλλοντος μελετάται η χρήση των PHAs στη δημιουργία καψυλλίων που θα επιτρέπουν την παρατεταμένη απελευθέρωση του περιεχομένου (μυκητοκτόνα, λιπάσματα κλπ).

Μελέτες γίνονται επίσης για την χρήση τους στον τομέα των τροφίμων (σαν συστατικά που παράγουν γεύση και άρωμα ή σαν υλικά συσκευασίας) στον τομέα των καλλυντικών (σαν υλικά για την παρασκευή κολλοειδών διαλυμάτων στα γαλακτώματα), στον τομέα των υφασμάτων (συνθετικές ίνες) ή ακόμα στον τομέα της φωτογραφίας για την παραγωγή φιλμ. Επίσης στον τομέα της συσκευασίας για την παραγωγή ευρείας κατανάλωσης πλαστικών όπως σακούλες, μπουκάλια, στυλό, κλπ. Τέλος, στον τομέα της βιοτεχνολογίας έχει προταθεί μεγάλη παραγωγή βιοπολυμερών και με λογικό κόστος σε διαγονιδιακά φυτά., φυτά που φέρουν βιοσυνθετικά γονίδια, ή γενετικά ανασυνδυασμένα φυτά.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Ανάπτυξη μικροοργανισμού

Για την παραγωγή των πολυ-β-υδροξυαλκανοϊκών χρησιμοποιήθηκε ο κλώνος HB8 του θερμόφιλου βακτηρίου *Thermus thermophilus* (Oshima et al. , 1974).

Ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται στους 70°C κάτω από αερόβιες συνθήκες ανάπτυξης σε κανονικό μέσο ανάπτυξης (Κ.Μ.Α), ενώ σε συνθήκες τροφικού stress όπου συσσωρεύεται το πολυμερές η ανάπτυξη έγινε σε τροποποιημένο μέσο ανάπτυξης (Τ.Μ.Α). Η σύσταση των δύο μέσων ανάπτυξης δίνεται στη συνέχεια.

Η ανάπτυξη του μικροοργανισμού στο Τ.Μ.Α έγινε με την παρακάτω μεθόδο:

➤ Γίνεται αναβίωση των κυττάρων σε κανονικό μέσο ανάπτυξης (100ml) και στη συνέχεια γίνεται εμβολισμός καλλιέργειας Κ.Μ.Α (1000 ml) και η αναβίωση συνεχίζεται για άλλες 24 ώρες. Στη συνέχεια γίνεται εμβολιασμός των φιαλών που περιέχουν το Τ.Μ.Α με 10-20% Κ.Μ.Α και τα βακτήρια επωάζονται στους 70°C.

Ανάλογα με τις συνθήκες του πειράματος και τις προς βελτιστοποίηση παραμέτρους διαφέρει ο αριθμός των φιαλών με το Τ.Μ.Α, καθώς και ο όγκος που φέρει η κάθε φιάλη, όπως και η χρονική διάρκεια της ανάπτυξης των βακτηρίων.

Ως πηγές άνθρακα στα Τ.Μ.Α χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις τυρογάλακτος 10% -20%-50% και 100%(v/v). Το υπόλοιπο ποσοστό μέχρι την πλήρωση των 100 ml γινόταν με ΚΜΑ.

2.2 Μέσα ανάπτυξης μικροοργανισμού

2.2.1 ΚΑΝΟΝΙΚΟ ΜΕΣΟ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ (Κ.Μ.Α)

Ουσία	Ποσότητα
Εκχύλισμα ζύμης	0.3%(w/v)
Τρυπτόνη	0.5%(w/v)
NaCl	0.2 %(w/v)
FeCl ₃	2μM
CaCl ₂	0.2 mM
MgCl ₂	1 mM
Γλυκόζη	0.1 % (w/v)

Το pH ρυθμίζεται στο 7.0 με NaOH 5N και το μέσο αποστειρώνεται. Η γλυκόζη προστίθεται μετά την αποστείρωση του μέσου για αποφευχθεί η καρραμελλοποίηση της .

2.2.2 ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΟ ΜΕΣΟ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ (Τ.Μ.Α)

Διάλυμα Ιχνοστοιχείων (Microelement Solution)

Σε 1 lt 0.5 N HCl διαλύματος περιέχονται :

Ουσία	Ποσότητα, g
FeSO ₄	11.2
CaCl ₂	8.23
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.03
MnCl ₂ .4H ₂ O	0.2
ZnSO ₄	0.15
H ₃ BO ₃	0.06
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0.67
MgSO ₄ .7H ₂ O	80

Το διάλυμα φιλτράρεται σε αποστειρωμένο φίλτρο και προστίθεται στο τέλος για αποφυγή καθίζησης των μετάλλων.

Σε υδατικό διάλυμα 1 l T.M.A περιέχονται:

- 10 g NaCl
- 2.5 ml διαλύματος ιχνοστοιχείων
- Πηγή άνθρακα
- Διάλυμα φωσφορικών $\text{KH}_2\text{PO}_4 / \text{K}_2\text{HPO}_4$ σε αναλογία 3.6 / 1 (He et al. 1998)
- $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ ή NH_4Cl

Οι ποσότητες του διαλύματος των φωσφορικών ιόντων καθώς και του $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ ή NH_4Cl διαφέρουν ανάλογα εάν εξετάζεται η συσσώρευση πολυμερούς σε συνθήκες έλλειψης φωσφόρου ή αζώτου.

2.3 Επεξεργασία τυρογάλακτος (Whey)

Το τυρόγαλα πριν χρησιμοποιηθεί ως πηγή άνθρακα για την παραγωγή PHA στο *T. Thermophilus* πρέπει να υποστεί ειδική επεξεργασία. Συγκεκριμένα, λαμβάνεται η απαιτούμενη ποσότητα τυρογάλακτος και ρυθμίζεται το pH στο 4.5 με προσθήκη HCl 0.1 N. Στη συνέχεια αποστειρώνεται στους 121 °C για 30 λεπτά. Μετά την απομάκρυνση της φιάλης από την αποστείρωση παρατηρείται ότι οι πρωτεΐνες μετουσιώνονται και καθιζάνουν σε στερεή μορφή. Ακολουθεί διήθηση του υγρού (τα στερεά παραμένουν στον πυθμένα) υπό κενό με τη βοήθεια αποστειρωμένου φίλτρου laminae για την απομάκρυνση αιωρούμενων στερεών. Το καθαρό και απαλλαγμένο από στερεά τυρόγαλα μεταφέρεται σε αποστειρωμένες κωνικές φιάλες οι οποίες τοποθετούνται στο ψυγείο. Σημειώνεται ότι από 1l μη-επεξεργασμένου με την πιο πάνω μέθοδο τυρογάλακτος λαμβάνονται περίπου 850 ml καθαρού υγρού.

Το pH πρέπει να ρυθμιστεί στην τιμή 7.0 πριν γίνει προσθήκη του στο TMA ως πηγή άνθρακα. Για το λόγο αυτό και για την αποφυγή επιμολύνσεων λαμβάνονται 100 ml του πιο πάνω υγρού και υπολογίζεται όγκος σε ml NaOH 5 N που απαιτούνται για να αυξηθεί η τιμή του pH από 4.5 στο 7.0.

2.4 Παραγωγή πολυμερούς στο τυρόγαλα.

Σκοπός του συγκεκριμένου πειράματος είναι η διερεύνηση του κατά πόσο το *T. thermophilus* παράγει PHA όταν χρησιμοποιείται τυρόγαλα ως πηγή άνθρακα καθώς και η ταυτοποίηση των μονομερών του πολυμερούς, όπως και ο καθορισμός του βέλτιστου χρόνου καλλιέργειας στην παραγωγή πολυυδροξυαλκανοϊκών στο *T. thermophilus*. Για την καθορισμό των πιο πάνω, έγιναν πειράματα όπου αναπτύχθηκαν καλλιέργειες με διαφορετική συγκέντρωση τυρογάλακτος και προσδιορίστηκαν σε συνάρτηση με το χρόνο καλλιέργειας οι ακόλουθες παράμετροι:

- α. Ανάπτυξη των κυττάρων
- β. Το ξηρό βάρος των κυττάρων (mg /l)

Αρχικά γίνεται αναβίωση των βακτηρίων γίνεται σε διάλυμα ΚΜΑ 100 ml για 24 ώρες και στη συνέχεια ακολουθεί εμβολιασμός (προσθήκη) με το μέσο αυτό φιάλης που περιέχει 500 ml ΚΜΑ με την ίδια σύσταση και η ανάπτυξη συνεχίζεται για άλλες 24 ώρες, όπου και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 600 nm και η λαμβανόμενη τιμή ήταν $A_{600}=1.198$. Η τιμή της απορρόφησης θεωρείται αρκετά ικανοποιητική και ακολουθεί εμβολιασμός των φιαλών με το τροποποιημένο μέσο ανάπτυξης (TMA).

Στο πείραμα αυτό γίνεται εμβολιασμός 5 φιαλών που η κάθε μία περιέχει 1000 ml (τελικός όγκος) TMA με 10% (v/v) δηλαδή 100 ml ΚΜΑ. Το κάθε διάλυμα έχει διαφορετική συγκέντρωση σε τυρόγαλα 10, 20, 50, και 100%(v/v), η οποία αποτελεί την πηγή άνθρακα. Η συγκέντρωση του NH_4Cl σε όλα τα διαλύματα είναι επίσης σταθερή και ίση με 0.1% (w/v).

Ανά τακτά χρονικά διαστήματα λαμβάνεται 1 ml από την κάθε καλλιέργεια και μετράται η απορρόφηση στα 600 nm για να διαπιστωθεί εάν η ανάπτυξη των βακτηρίων γίνεται κανονικά.

Για τον υπολογισμό των βέλτιστων συνθηκών παραγωγής του πολυμερούς αφαιρούνται 200 ml κάθε 24 ώρες από κάθε καλλιέργεια, υπολογίζεται το ξηρό βάρος, όπως περιγράφεται στην προηγούμενη ενότητα. Πιο συγκεκριμένα ο υπολογισμός των πιο πάνω μεγεθών γίνεται μετά από 15, 24, 44, 72 και 96 ώρες ανάπτυξης .

2.4 Απομόνωση του πολυμερούς

Η συλλογή των κυττάρων γίνεται με φυγοκέντρηση στις 4000 rpm στους 4°C και ακολουθεί έκπλυση με NaCl 0.9%.

Η απομόνωση του πολυμερούς στηρίζεται στην εκχύλιση του πολυμερούς από τα κύτταρα, στην διαλυτοποίηση του σε πολικό διαλύτη (CHCl_3) και στην κατακρήμνισή του στην συνέχεια με μεθανόλη.

Δοκιμάστηκαν οι ακόλουθες μέθοδοι λύσης των κυττάρων και απομόνωσης του πολυμερούς:

1. Λύση των κυττάρων με λουotρίβιση σε υγρό άζωτο

Στη μέθοδο αυτή προστίθεται ποσότητα υγρού αζώτου στα συλλεγμένα κύτταρα και ακολουθεί κονιοποίηση τους σε γουδί. Το υγρό άζωτο πιθανόν να παγώνει τα κυτταρικά τοιχώματα των βακτηρίων και με την κονιοποίηση λύνονται και ελευθερώνεται το πολυμερές. Όμως με βαφή και έλεγχο στο οπτικό μικροσκόπιο παρατηρήθηκε ότι η λύση των κυττάρων δεν είναι επαρκής και έτσι η μέθοδος δεν εφαρμόστηκε περαιτέρω.

2. Απομόνωση PHA με SDS

Σε λυοφυλιμένα κύτταρα προστίθενται 5 ml διαλύματος SDS 10 g/l. Το διάλυμα τοποθετείται στους 100°C για ένα λεπτό και στη συνέχεια “ψύχονται” ακαριαία στους 55°C για 15 λεπτά και ακολούθως φυλάσσεται στους -18 °C για τη διάρκεια μιας νύχτας. Τα κύτταρα απομακρύνονται από την κατάψυξη και θερμαίνονται στους 55 °C για 30 λεπτά. Ακολουθεί προσθήκη ίσου όγκου χλωροφορμίου (αναλογία όγκου χλωροφορμίου - SDS 1:1) και τοποθέτηση των δειγμάτων στους 62 °C για τη διάρκεια μιας νύχτας (Dong et al, 2000).

Μετά την απομάκρυνση από την κατεργασία αυτή παρατηρείται ο σχηματισμός τριών στιβάδων. Η ανώτερη περιέχει το SDS, η μεσαία η οποία έχει λευκό χρώμα και πιθανόν να περιέχει SDS και προϊόντα λύσης των κυττάρων όπως για παράδειγμα διάφορες πρωτεΐνες. Η κατώτερη στιβάδα περιλαμβάνει το χλωροφόρμιο μαζί με το παραγόμενο πολυμερές. Ο διαχωρισμός των στιβάδων επιτυγχάνεται με φυγοκέντρηση

στις 8000 rpm για 15 λεπτά έτσι ώστε να γίνουν πιο διακριτές και οι δύο ανώτερες στιβάδες απομακρύνονται με πιπέτα. Το πολυμερές ανακτάται από την χλωροφορμική στιβάδα με κατακρήμνιση με δεκαπλάσιο όγκο μεθανόλης όπως και στη προηγούμενη μέθοδο. Η μέθοδος αυτή δεν έδωσε ικανοποιητική ανάκτηση πολυμερούς και γι 'αυτό δεν εφαρμόστηκε περαιτέρω.

3. Μεθανόλυση

Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται κατευθείαν πάνω στα λυοφιλυμένα κύτταρα. Κατά την οποία επιτυγχάνεται ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των PHA πολυμερών. Σκοπός αυτής της μεθόδου είναι να σπάσει το πολυμερές που βρίσκεται μέσα στα κύτταρα στα μονομερή του. Έτσι θα έχουμε μικρότερες ενώσεις οι οποίες είναι πιο εύκολο να ταυτοποιηθούν με την αέρια χρωματογραφία.

2.5. Υπολογισμός ξηρού βάρους κυττάρων

Για τον υπολογισμό του ξηρού βάρους των κυττάρων λαμβάνονται 10 ml από κάθε καλλιέργεια, σε καθορισμένες χρονικές στιγμές και διηθούνται υπό κενό σε προξυγισμένα και προξηραμένα για 24 ώρες στους 80°C χάρτινα φίλτρα Wattmann No 5., έτσι ώστε να απομακρυνθεί η υγρασία και να αποκτήσουν σταθερό βάρος, (Lemos et al., 1988; Lee et Chang 1994).

Ακολουθεί ξέπλυμα των φίλτρων τα οποία έχουν συγκρατήσει τα παραγόμενα κύτταρα με $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 10 mM (Hazenbergh, and Witholt 1997) και τοποθέτηση τους στους 80°C για 48 ώρες και στη συνέχεια επαναζυγίζονται και υπολογίζεται η ποσότητα του ξηρούς βάρους των κυττάρων (Cell Dry Weight – C.D.W).

2.6. Υπολογισμός απόδοσης παραγωγής πολυμερούς

Η επί τοις εκατό απόδοση της παραγωγής του πολυμερούς (% PHA Content) ορίζεται από τον λόγο της ποσότητας (mg) του παραγόμενου πολυμερούς προς την ποσότητα (mg) του ξηρού βάρους των κυττάρων που παράγονται σε κάθε καλλιέργεια επί 100, και δίνεται από τον τύπο (Gross et. al, 1989).

$$\% \text{ PHA Content} = \frac{\text{PHA}(\text{mg})}{\text{CDW}(\text{mg})} \times 100$$

Μεγάλη απόδοση της παραγωγής του πολυμερούς σημαίνει και μεγάλη συσσώρευση του στα βακτήρια, γίνεται δηλαδή καλύτερη αξιοποίηση της πηγής του άνθρακα καθώς όσο μικρότερη ποσότητα PHA υπάρχει στα βακτήρια τόσο μεγαλύτερο είναι το ποσοστό της που αναλώνεται στην υπολειπόμενη βιομάζα (residual biomass). (Hazenberg and Witholt, 1997)

2.7. Επίδραση της συγκέντρωσης των φωσφορικών ιόντων στην παραγωγή PHA στο *T. thermophilus*

Τα πολυ-υδροξυαλκανοϊκά παράγονται, όπως έχει ήδη αναφερθεί σε προηγούμενη παράγραφο, από αρκετούς μικροοργανισμούς σαν αποθήκη ενέργειας και άνθρακα όταν βρεθούν σε κατάσταση τροφικού “stress” και κυρίως όταν βρεθούν σε συνθήκες έλλειψης αμμωνιακών και φωσφορικών ιόντων (Jung et al., 2000; Hazenberg and Witholt, 1997).

Η αρχική συγκέντρωση των φωσφορικών ιόντων φαίνεται να σχετίζεται άμεσα με την παραγωγή PHA στη *Pseudomonas pudita* και στο *Alcaligenes eutrophus*. Από πειραματικές μετρήσεις έχει βρεθεί ότι η συγκέντρωση του πολυμερούς στους μικροοργανισμούς αυτούς αυξάνεται καθώς μειώνεται η συγκέντρωση των φωσφορικών ιόντων με τη πάροδο του χρόνου. Επίσης από πειράματα στους ίδιους μικροοργανισμούς προκύπτει ότι υπάρχει μία βέλτιστη περιοχή αρχικών συγκεντρώσεων φωσφορικών ιόντων που επάγουν καλύτερα την παραγωγή του πολυμερούς και κυμαίνεται από 30 έως

και 50 mM, ανάλογα βέβαια με τη πηγή άνθρακα που χρησιμοποιείται (Lee et al. 2000, Ryu et al. 2000)

2.8. Ταυτοποίηση πολυ-υδροξυαλκανοϊκών

Για την ταυτοποίηση του παραγόμενου προϊόντος, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αέριας χρωματογραφίας (GC). Η χρωματογραφία στήλης που πειραματιστήκαμε, ήταν χρωματογραφία αέριου-στερεού, όπου ο διαχωρισμός γίνεται με προσρόφηση πάνω στην στερεά στατική φάση ενώ η κινητή φάση είναι αέριο.

Ο χρωματογράφος με τον οποίο έγιναν οι αναλύσεις ήταν ο GC-17A της SHIMADZU ,ο οποίος είναι αέριος χρωματογράφος για υψηλού βαθμού αναλύσεις τριχοειδούς στήλης. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η CP-SIL88 , μήκους 50 μέτρων, εσωτερικής διαμέτρου 0.25mm, εξωτερικής διαμέτρου 0,39mm και είναι καλυμμένη με φιλμ πάχους 0.20mm από silica gel. Η θερμοκρασία της βαλβίδας εισόδου του δείγματος ήταν 240 °C ενώ για τον ανιχνευτή (φλόγα ιονισμού) ήταν 250 °C . Η τελική θερμοκρασία στήλης ήταν 200 °C με ρυθμό αύξησης 60 °C για 3 λεπτά , ως τους 190 °C με βήμα 20 °C /λεπτό. Η ποσότητα του ενέσιμου δείγματος ήταν 2μl. Η κινητή φάση ήταν το ήλιο ενώ για τον ανιχνευτή χρησιμοποιήθηκε υδρογόνο και αέρας. Ο χρόνος ανάλυσης του κάθε δείγματος ήταν 70 λεπτά.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Παραγωγή πολυμερούς

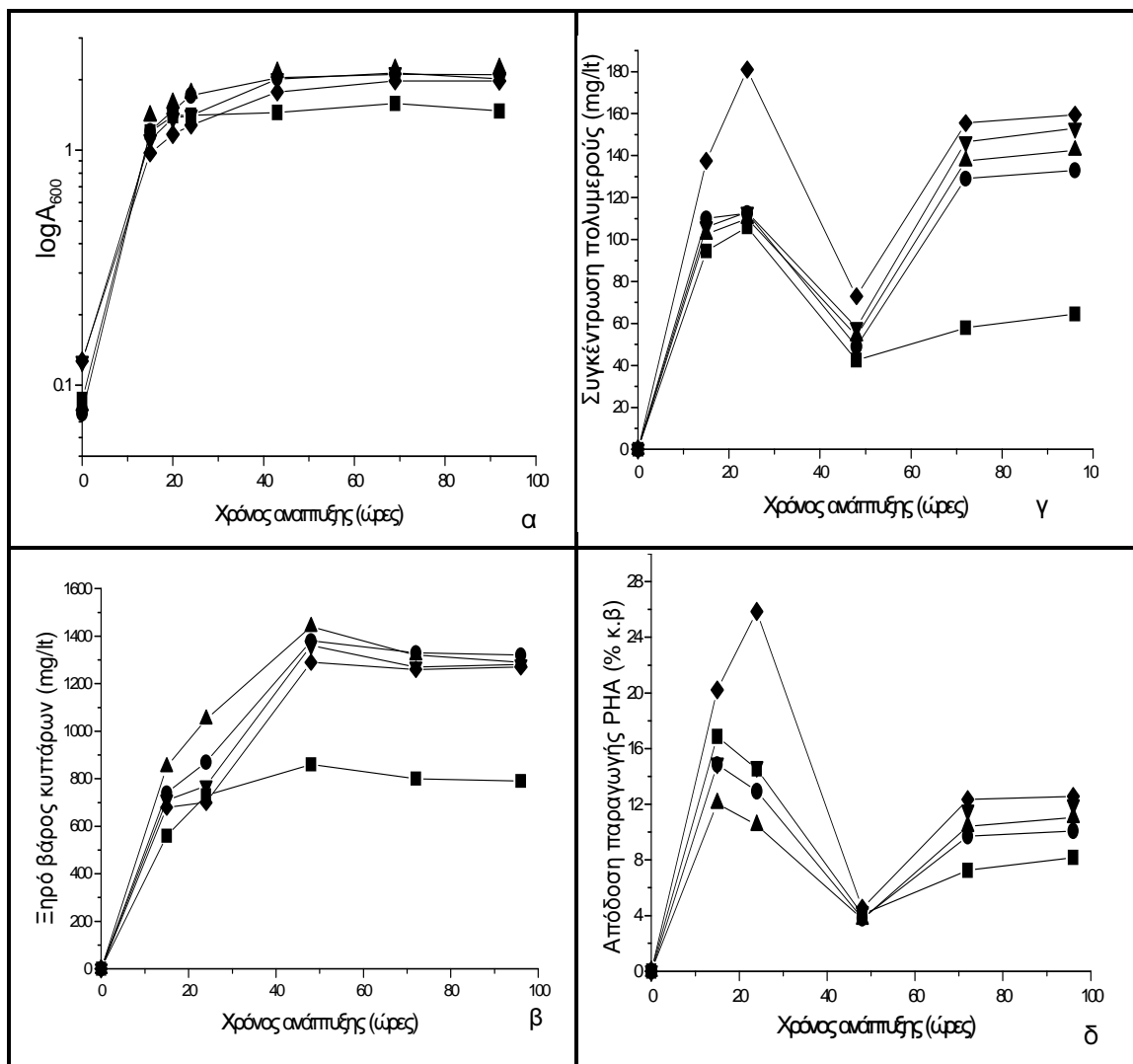
Το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus thermophilus* αναπτύσσεται στους 70°C σε αερόβιες συνθήκες. Για την συσσώρευση του πολυμερούς χρησιμοποιήθηκε τροποποιημένο μέσο ανάπτυξης T.M.A που περιείχε μία από τις ακόλουθες πηγές άνθρακα.

Είναι γνωστό ότι η παραγωγή πολυμερούς επάγεται όταν τα βακτήρια βρίσκονται σε κατάσταση “τροφικού stress”, όταν δηλαδή οι μικροοργανισμοί υφίστανται έλλειψη από κάποιο από τα κύρια θρεπτικά συστατικά του μέσου ανάπτυξης όπως π.χ. οξυγόνο για τους αερόβιους οργανισμούς, άζωτο, ιχνοστοιχεία και ιόντα εν διαλύσει (θειικά, φωσφορικά, αμμωνιακά κλπ) καθώς και διαφοροποίηση της κύριας πηγής του άνθρακα (Lee et al., 2000; Hazenberg and Witholt, 1997).

Στη παρούσα εργασία μελετήθηκε η παραγωγή πολυμερούς με τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις τυρογάλακτος 10, 20, 50 και 100% .

Μία άλλη σημαντική παράμετρος που επηρεάζει την αύξηση της συσσώρευσης πολυμερούς καθώς και το είδος του, δηλαδή το μήκος της πολυμερικής αλυσίδας, το μοριακό βάρος και τα μονομερή που απαρτίζουν το πολυμερές είναι η χρονική διάρκεια της καλλιέργειας (Brandl et al., 1988; Kusaka et al., 1997). Η χρονική διάρκεια της ανάπτυξης των βακτηρίων αποτελεί σημαντική παράμετρο κατά την παραγωγή του πολυμερούς στην παρούσα εργασία

Στο σχήμα 15 φαίνονται τα αποτελέσματα της ανάπτυξης των βακτηρίων, του ξηρού βάρους των κυττάρων και της παραγωγής πολυμερούς στις πιο πάνω συνθήκες.



Σχήμα 15 . α. Καμπύλη ανάπτυξης του βακτηρίου *T. thermophilus* παρουσία διάφορων συγκεντρώσεων τυρογάλακτος, **β.** Μεταβολή ξηρού βάρους κυττάρων (CDW, mg/l), **γ.** Μεταβολή συγκέντρωσης του παραγόμενου πολυμερούς (PHA, mg/l) και **δ.** Μεταβολή απόδοσης παραγωγής πολυμερούς (PHA content, wt %), σε συνάρτηση με τον χρόνο ανάπτυξης της καλλιέργειας. Οι συγκεντρώσεις τυρογάλακτος που χρησιμοποιήθηκαν στο συγκεκριμένο πείραμα είναι : ■ KMA ● 10%, ▲ 20%, ▼ 50%, ◆ 100%.

Οι καμπύλες ανάπτυξης έχουν σχεδόν ταυτόσημες τιμές για όλες τις συγκεντρώσεις τυρογάλακτος που όπως φαίνεται στο σχήμα 25.α. Στο ίδιο σχήμα

φαίνεται ότι η ανάπτυξη των βακτηρίων σε όλες τις καλλιέργειες μετά από 48 ώρες ανάπτυξης βρίσκεται στα ίδια επίπεδα.

Η μεταβολή του ξηρού βάρους σε συνάρτηση με τον χρόνο ανάπτυξης (σχήμα 25.β) ακολουθεί αυξητική πορεία σε όλες τις καλλιέργειες μέχρι τις 48 ώρες ανάπτυξης και στη συνέχεια, σε μεγαλύτερους χρόνους ανάπτυξης παρατηρείται μικρή πτώση, όπου η καλλιέργεια έχει φτάσει σε πλατό. Οι τιμές του ξηρού βάρους είναι παραπλήσιες σε όλες τις καλλιέργειες σε όλη τη διάρκεια του πειράματος με εξαίρεση την καλλιέργεια ΚΜΑ όπου το ξηρό βάρος παραμένει σε χαμηλότερες τιμές. Πιο συγκεκριμένα η καλλιέργεια με αρχική συγκέντρωση τυρογάλακτος 20% δίνει μέγιστη τιμή ξηρού βάρους, 1440 mg/lt μετά από 48 ώρες ανάπτυξης. Την ίδια χρονική στιγμή, η τιμή του ξηρού βάρους για τις καλλιέργειες με αρχικές συγκεντρώσεις τυρογάλακτος 10, 50 και 100 % κυμαίνεται από 1290 μέχρι 1380 mg/lit, ενώ η αντίστοιχη τιμή της καλλιέργεια με μηδενική συγκέντρωση φωσφορικών είναι 860 mg/lit. Σε μεγαλύτερους χρόνους ανάπτυξης και συγκεκριμένα μετά από 72 ώρες, το ξηρό βάρος μειώνεται σε μικρό ποσοστό σε όλες τις καλλιέργειες και κυμαίνεται μεταξύ 1260-1330 mg/lit, εκτός βέβαια από την καλλιέργεια ΚΜΑ όπου η τιμή του ξηρού βάρους μειώνεται στα 800 mg/lit. Οι τιμές του ξηρούς βάρους παραμένουν περίπου αναλλοίωτες για όλες τις καλλιέργειες μετά από 96 ώρες ανάπτυξης. Σε μικρότερους χρόνους ανάπτυξης και συγκεκριμένα μετά από 24 ώρες, η καλλιέργεια με αρχική συγκέντρωση τυρογάλακτος 20% παρουσιάζει και πάλι τη μεγαλύτερη τιμή ξηρού βάρους, 1050 mg/lit, έναντι των υπολοίπων οι τιμές των οποίων κυμαίνονται από 700-870 mg/lit.

Διαφορετική εικόνα παρουσιάζεται στην μεταβολή της συγκέντρωσης του πολυμερούς όπως φαίνεται στο σχήμα 25.γ., όπου η μέγιστη τιμή, 181 mg/lit παρατηρείται στην καλλιέργεια με συγκέντρωση τυρογάλακτος 100% μετά από 24 ώρες ανάπτυξης. Η τιμή της συγκέντρωσης του πολυμερούς στις υπόλοιπες καλλιέργειες κυμαίνεται στα 95-110 mg/lit. Μετά από 48 ώρες ανάπτυξης η συσσώρευση του πολυμερούς υποδιπλασιάζεται περίπου, σε όλες τις καλλιέργειες φτάνοντας τα 42 mg/lit στη καλλιέργεια ΚΜΑ, στα 72 mg/lit στην καλλιέργεια με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση τυρογάλακτος (100%) και γύρω στα 55 mg/lit στις υπόλοιπες καλλιέργειες. Μετά από 72 ώρες ανάπτυξης η συσσώρευση του πολυμερούς αυξάνεται κατά περίπου 2-3 φορές στις καλλιέργειες με 10, 20 και 50% τυρογάλα με τιμές 129, 137.5 και 146.5 mg/lit

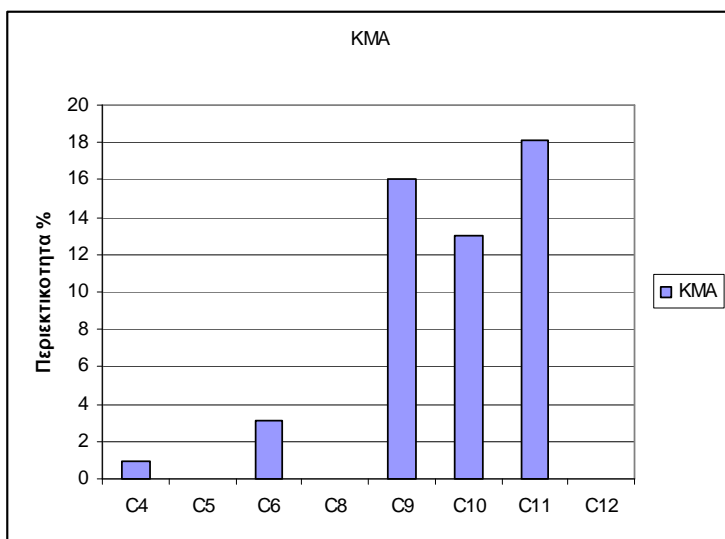
αντίστοιχα, ενώ στην καλλιέργεια με ΚΜΑ παρατηρείται πολύ μικρότερη αύξηση φτάνοντας τα 58 mg/lit, ενώ στην 100% ανέρχεται στα 155 mg/lit. Η μεταβολή της συγκέντρωσης του πολυμερούς είναι αμελητέα σε όλες τις καλλιέργειες στην επόμενη μέτρηση, δηλαδή στις 96 ώρες ανάπτυξης, φτάνοντας στα 159 mg/lit στην καλλιέργεια με 100% τυρόγαλα, στα 133, 142 και 153 όταν οι αρχικές συγκεντρώσεις τυρογάλακτος είναι 10, 20 και 50% αντίστοιχα και στα 65 mg/lit στην καλλιέργεια ΚΜΑ.

Παρόμοιες αυξομειώσεις παρατηρούνται και στην απόδοση της παραγωγής του πολυμερούς όπως φαίνεται στο σχήμα 25.δ. Στις πρώτες ώρες ανάπτυξης και συγκεκριμένα στις 15 ώρες η καλλιέργεια με αρχική συγκέντρωση τυρογάλακτος 100% δίνει υψηλή τιμή απόδοσης παραγωγής, 20% και μέγιστη τιμή, 26% μετά από 24 ώρες ανάπτυξης. Υψηλή τιμή απόδοσης παραγωγής ΡΗΑ, 17 % δίνει και η καλλιέργεια ΚΜΑ στις 15 ώρες ανάπτυξης, ενώ οι τιμές στις υπόλοιπες καλλιέργειες κυμαίνονται από 12-15%. Μετά από 24 ώρες ανάπτυξης, παρατηρείται μικρή μείωση της απόδοσης παραγωγής ΡΗΑ σε όλες τις καλλιέργειες (εκτός από αυτή με συγκέντρωση τυρογάλακτος 100%) και οι τιμές της κυμαίνονται από 10-14.5%. Στις 48 ώρες ανάπτυξης παρατηρείται απότομη μείωση στο 5.5% (περίπου 5 φορές), της απόδοσης παραγωγής ΡΗΑ στην καλλιέργεια με 100% συγκέντρωση τυρογάλακτος, ενώ μείωση κατά 2 έως 3 φορές, φτάνοντας στο 3.5 -5 %, παρατηρείται στις υπόλοιπες καλλιέργειες. Μικρή άνοδος της απόδοσης παραγωγής πολυμερούς παρουσιάζεται σε όλες τις καλλιέργειες στις 72 ώρες ανάπτυξης, και ανέρχεται στο 7% περίπου για την καλλιέργεια ΚΜΑ και γύρω στο 10-12% για τις υπόλοιπες καλλιέργειες. Παραπλήσιες τιμές προκύπτουν και στις 96 ώρες ανάπτυξης με πολύ μικρή άνοδο, στο 8% για την καλλιέργεια ΚΜΑ και στο 12.5 % για την καλλιέργεια με την υψηλότερη αρχική συγκέντρωση (100%). Στο 10% περίπου παραμένει η τιμή της απόδοσης παραγωγής πολυμερούς για τις υπόλοιπες καλλιέργειες.

3.2 Ταυτοποίηση παραγόμενου πολυμερούς

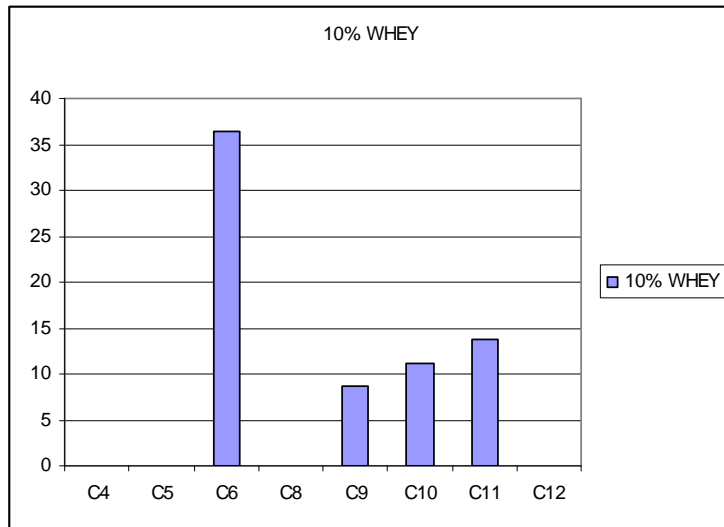
Η ταυτοποίηση του παραγόμενου προϊόντος, έγινε με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας (GC). Τα δείγματα που μελετήθηκαν με την (GC) είναι από τις πέντε καλλιέργειες σε ΚΜΑ, 10,20,50 και 100% περιεκτικότητα σε τυρόγαλα. Έπειτα για να γίνει η ταυτοποίηση των μονομερών του πολυμερούς χρησιμοποιήθηκαν οκτώ διαφορετικά πρότυπα διαλύματα αλκανοϊκών οξέων. Τα οκτώ πρότυπα διαλύματα περιείχαν ένα (3ύδροξυ αλκανοϊκό) οξύ το καθένα. Τα διαλύματα ονομάστηκαν C 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 και 12 σύμφωνα με τα άτομα άνθρακα που είχε το οξύ. Έπειτα από

Τα χρωματογραφήματα του παραγόμενου πολυμερούς για την κάθε περίπτωση σε συνδυασμό με αυτά των πρότυπων διαλυμάτων έδωσαν τα ακόλουθα αποτελέσματα..



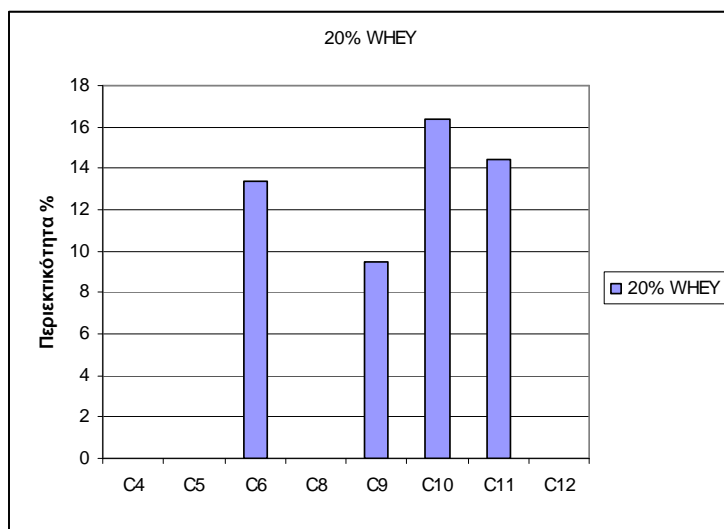
Σχήμα 16. Περιεκτικότητα % σε 3 ύδροξυ αλκανοϊκά στην καλλιέργεια ΚΜΑ.

Βλέπουμε ότι τα μονομερή του πολυμερούς στην καλλιέργεια ΚΜΑ αποτελούνται κυρίως από 9,10 και 11 άτομα άνθρακα . Επίσης εμφανίζεται σε μικρό ποσοστό το 3 ύδροξυ βουτυρικό (C4) και το 3 ύδροξυ εξανοϊκό C6. Ενώ τα (C5), (C8) και (C12) δεν εμφανίζονται καθόλου.



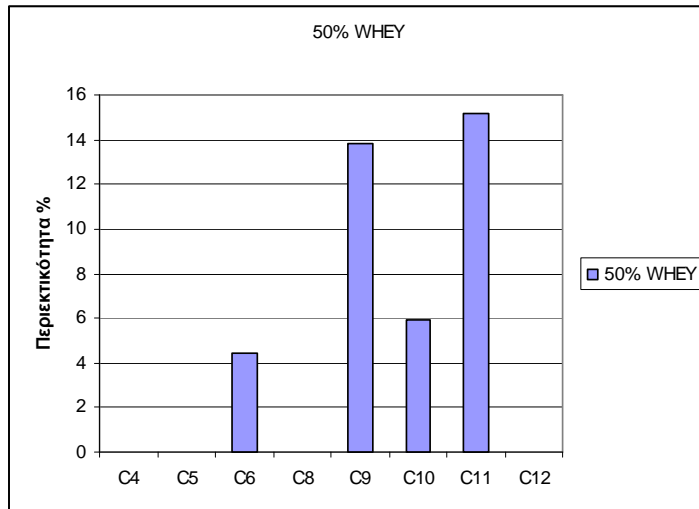
Σχήμα 17. Περιεκτικότητα % σε 3 ύδροξυ αλκανοϊκά στην καλλιέργεια με 10% συγκέντρωση σε τυρόγαλα..

Στο σχήμα 17 βλέπουμε ότι τα μονομερή αποτελούνται κυρίως από το 3 ύδροξυ εξανοϊκό (C6) σε πολύ μεγάλο ποσοστό που φτάνει το 36%. Ενώ τα (C9), (C10) και (C11) περιορίζονται σε μικρότερα ποσοστά έως 14 %. Τα αλκανοϊκά με 4, 5, 8 και 12 άτομα άνθρακα δεν εμφανίζονται καθόλου.



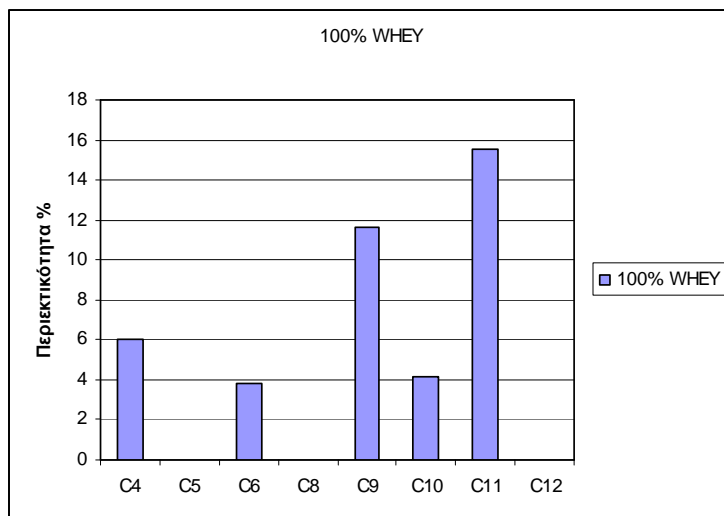
Σχήμα 18. Περιεκτικότητα % σε 3 ύδροξυ αλκανοϊκά στην καλλιέργεια με 20% συγκέντρωση σε τυρόγαλα..

Στην καλλιέργεια με 20% τυρόγαλα βλέπουμε ομοίως να υπάρχουν μονομερή με 6, 9, 10 και 11 άτομα άνθρακα σε ποσοστό έως 16%. Ενώ τα αλκανοϊκά με 4, 5, 8 και 12 άτομα άνθρακα δεν εμφανίζονται καθόλου.



Σχήμα 18. Περιεκτικότητα % σε 3 ύδροξυ αλκανοϊκά στην καλλιέργεια με 50% συγκέντρωση σε τυρόγαλα..

Στην καλλιέργεια με 50% βλέπουμε ότι έχουμε τα ίδια αλκανοϊκά στα μονομερή όπως προηγούμενα αλλά με λίγο διαφοροποιημένα ποσοστά.



Σχήμα 19. Περιεκτικότητα % σε 3 ύδροξυ αλκανοϊκά στην καλλιέργεια με 100% συγκέντρωση σε τυρόγαλα.

Στην καλλιέργεια με συγκέντρωση 100% σε τυρόγαλα βλέπουμε να εμφανίζεται ξανά το 3 ύδροξυ βουτυρικό (C4) με ποσοστό 6%. Τα ύδροξυ αλκανοϊκά με 9 και 11 άτομα άνθρακα υπάρχουν σε μεγαλύτερο ποσοστό ενώ τα (C6) και (C10) σε λιγότερο.

Τα συνολικά αποτελέσματα που προκύπτουν από την ανάλυση με την αέρια χρωματογραφία φαίνονται παρακάτω.

Πίνακας 14. Περιεκτικότητα ύδροξυ αλκανοϊκών οξέων στις πέντε καλλιέργειες.

Υδροξυ αλκανοϊκά οξέα	KMA	10% (WHEY)	20% (WHEY)	50% (WHEY)	100% (WHEY)
C4	0,9	0,0	0,0	0,0	6,0
C5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C6	3,1	36,4	13,4	4,4	3,8
C8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C9	16,0	8,7	9,5	13,8	11,6
C10	13	11,2	16,4	5,9	4,2
C11	18,1	13,7	14,4	15,2	15,5
C12	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

C4: Υπάρχει μόνο στο 100% και στο κανονικό μέσο ανάπτυξης .Δεν υπάρχει στο 10% και 20%

C6: Αυξάνει όσο γίνεται πιο φτωχό το μέσο δηλαδή όσο μικραίνει η συγκέντρωση σε τυρόγαλα .Πολύ υψηλό στο 10%, 20% πολύ χαμηλό στο 50 % ,100% και στο κανονικό μέσον.

C9 : Πολύ φτωχό στα 10%, 20% ,πολύ υψηλό στο 50% και 100% και στο κανονικό μέσον ανάπτυξης.

C10: Δεν υπάρχει κάποια διαφορά . Βρίσκεται σε ίδια ποσά στο 10 % ,20% και στο κανονικό μέσο ανάπτυξης ενώ είναι μικρότερο στο 50% και 100%

C11: Δεν παρουσιάζεται κάποια σημαντική διαφορά στα ποσοστά.

Τα **C5**, **C8** και **C12** δεν εμφανίζονται σε καμία από τις πέντε καλλιέργειες.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ο κλώνος HB8 του θερμοφίλου βακτηρίου *T. thermophilus*, το οποίο αναπτύχθηκε σε TMA και έγιναν πειράματα με σκοπό την συσσώρευση πολυμερούς PHAs στα κύτταρα και έπειτα να γίνει η ταυτοποίησή του .

Το γεγονός ότι χρησιμοποιήθηκε θερμοφίλο βακτήριο για την παραγωγή PHA αποτελεί και την καινοτομία της εργασίας αυτής, δεδομένου ότι το *T. thermophilus* αναπτύσσεται στους 70 °C, σε αντίθεση με άλλους μικροοργανισμούς, που έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι τώρα για την παραγωγή PHA και οι οποίοι αναπτύσσονται στους 37 °C.

Τα PHAs συντίθενται από μεγάλο αριθμό βακτηρίων σαν ενδοκυτταρική αποθηκευτική πηγή άνθρακα και ενέργειας όταν τα βακτήρια βρίσκονται σε κατάσταση “τροφικού stress”, όταν δηλαδή οι μικροοργανισμοί υφίστανται έλλειψη από κάποιο από τα κύρια θρεπτικά συστατικά του μέσου ανάπτυξης όπως π.χ. οξυγόνο για τους αερόβιους οργανισμούς, άζωτο, ιχνοστοιχεία και ιόντα εν διαλύσει (θειικά, φωσφορικά, αμμωνιακά κλπ) καθώς και διαφοροποίηση της κύριας πηγής του άνθρακα (Lee et al., 2000, Hazenberg and Witholt, 1997). Η χρονική διάρκεια της ανάπτυξης των βακτηρίων είναι μια άλλη σημαντική παράμετρος αύξησης της απόδοσης παραγωγής PHA (Brandl et al., 1988) και αποτελεί άλλη μια παράμετρο βελτιστοποίησης.

Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια παραγωγής από μια ανανεώσιμη πηγή ενέργειας και συγκεκριμένα από το τυρόγαλα. Για το σκοπό αυτό έγινε πείραμα όπου αναπτύχθηκε το *T. thermophilus* σε καλλιέργειες με πηγή άνθρακα το τυρόγαλα σε τέσσερις διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις. Οι παράμετροι που μελετήθηκαν είναι οι εξής :

- α. Ανάπτυξη των κυττάρων
- β. Το ξηρό βάρος των κυττάρων (mg/l)
- γ. Η συγκέντρωση PHA ανά λίτρο καλλιέργειας (mg/l), και
- δ. Η επί τοις εκατό κατά βάρος απόδοση της παραγωγή του PHA (% κ.β)

Το ξηρό βάρος των κυττάρων σε όλες τις καλλιέργειες κυμαινόταν στα ίδια επίπεδα σε όλη τη διάρκεια του πειράματος, εκτός από την καλλιέργεια με μηδενική συγκέντρωση τυρογάλακτος. Η συσσώρευση του πολυμερούς στα βακτήρια ήταν μεγαλύτερη σε όλες τις χρονικές στιγμές στην καλλιέργεια με την υψηλότερη αρχική συγκέντρωση τυρογάλακτος, 50%, όπως και η απόδοση της παραγωγής PHA με μέγιστη τιμή περίπου 26% μετά από 24 ώρες ανάπτυξης. Τόσο η συσσώρευση όσο και η απόδοση της παραγωγής PHA παρουσιάζουν μείωση μετά από 48 ώρες ανάπτυξης, όμως σε μεγαλύτερους χρόνους ανάπτυξης αυξήθηκε και πάλι. Το γεγονός αυτό αποδίδεται στο γεγονός ότι η πηγή του άνθρακα ή κάποιο άλλο θρεπτικό συστατικό τελειώνει σε σχετικά μικρό χρονικό διάστημα και έτσι τα βακτήρια αναγκάζονται να χρησιμοποιήσουν το πολυμερές που έχουν παράγει για να επιβιώσουν (Ruiz et al., 2001, Zinn et al., 2001). Στη συνέχεια παράγουν νέα αποθέματα πολυμερούς και γι' αυτό παρατηρείται νέα αύξηση της απόδοσης της παραγωγής του πολυμερούς. Σε αντίστοιχα πειράματα που έγιναν με ανασυνδιασμένα στελέχη *E. coli*, η τιμή της απόδοσης της παραγωγής PHA κυμαινόταν μεταξύ 9 και 80 %, συνεπώς η αντίστοιχη μέγιστη τιμή, 26% που έδωσε το άγριο στέλεχος του *T. thermophilus* μπορεί να θεωρηθεί αρκετά ικανοποιητική.

Η ταυτοποίηση του παραγόμενου προϊόντος, έγινε με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας (GC). Τα δείγματα που μελετήθηκαν με την (GC) από τις καλλιέργειες σε συνδυασμό με τα πρότυπα διαλύματα έδειξαν ότι, το πολυμερές που συντίθεται μέσα στο κύτταρο του *T. thermophilus* σε αυτές τις συνθήκες αποτελείται κυρίως από μονομερή με 6, 9, 10 και 11 άτομα άνθρακα. Το 3-ύδροξυ βουτυρικό (PHB) συναντάται μόνο στο κανονικό μέσο ανάπτυξης και στην καλλιέργεια με 100% συγκέντρωση σε τυρόγαλα. Αυτό οφείλεται κυρίως στην χρονική διάρκεια της καλλιέργειας καθώς έχει άμεση σχέση ο χρόνος με το μήκος της αλυσίδας του πολυμερούς και τα μονομερή που την απαρτίζουν. Το υπόλοιπο ποσοστό του πολυμερούς είναι άλλες ενώσεις με διαφορετική χημική δομή και ίσως περισσότερα άτομα άνθρακα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Ahn, W. S., Park S., J., and Lee S., Y.** 2000. Production of Poly(3-Hydroxybuturate) by Fed-Batch Culture of Recombinant *Escherichia coli* with a Highly Concentrated Whey Solution, Applied and Environmental Microbiology 66(8): 3624-3627.
2. **Anderson, A.J., Dawes E.A.** 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. Microbiol. Rev. 54: 450-472.
3. **Brandl H., Gross R.A., Lenz R. W., and Fuller R. C.** 1988. *Pseudomonas oleovorans* as a source of Poly (β -Hydroxyalkanoates) for Potential Applications as Biodegradable Polyesters, Applied and Environmental Microbiology 54(8): 1977-1982.
4. **Byrom D.,** 1994. Polyhydroxyalkanoates, p5-33, In: D.P. Mobley (ed.) Plastics from microbes: microbial synthesis of polymers and polymers precursors. Hanser Munich.
5. **Curley J. M., Hazer B., Lenz R. W., and Fuller R. C.** 1996. Production of poly(3-Hydroxyalkanoates) containing aromatic substitutes by *P. oleovorans*. Macromolecules 29: 1762-1766
6. **Doi, Y.** 1990. Microbial polyesters. Verlag Chemie, New York .
7. **Dong Z., and Sun X.** 2000. A new method of recovering polyhydroxyalkanoate from *Azobacter chroococcum*. Chinese Science Bulletin, Vol 45(3): 252- 255.
8. **Friedel S., Steinbuchel A., Rehm B.H.A.** 2000. PhaG-mediated synthesis of poly(3-hydroxyalkanoate) consisting of medium chain-length constituents from nonrelated carbon sources in recombinant *Pseudomonas fragi*. Appl. Envir. Microbiol.66:2117-2124.

-
9. **Gerngross U.T., Slater C.S.** 2000. Πόσο 'πράσινα' είναι τα οικολογικά πλαστικά; Scientific American Νοέμβριος p.95-101.
 10. **Gross R.A., DeMello C., Lenz R. W., Brandl H., and Fuller R.C.** 1989. Biosynthesis and Characterization of poly(β -hydroxyalkanoates) Produced by *Pseudomonas oleovorans*, *Macromolecules* 22: 1106-1115.
 11. **Hazenberg W., and Witholt B.** 1997. Efficient production of medium – chain – length poly(3-hydroxyalkanoates) from octane by *Pseudomonas oleovorans*: economic considerations, *Appl Microbiol Biotechnol* 48: 588-596.
 12. **He W., Tian W., Zhang G., Chen G., and Zhang Z.** 1998. Production of novel Polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas stutzeri* 1317 from glucose and soyabean oil, *FEMS Microbiology Letters* 169: 45-49.
 13. **Henry, E., V., and Douglas, D.** 1997. production of (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in recombinant *Escherichia coli* grown on glucose, *Journal of Biotechnology* 58: 33-38, 1997.
 14. **Hoffmann N., Steinbuchel A., Rehm B.H.** 2000. The *Pseudomonas aeruginosa* phaG gene product is involved in the synthesis of polyhydroxyalkanoic acid consisting of medium-chain-length constituents from nonrelated carbon sources. *FEMS.Microbiol.Lett.*184:253-9
 15. **Holmes, P.A.** 1985. Applications of PHB: a microbially produced biodegradable thermoplastic. *Phys. Technol.* 16: 32-36.
 16. **Hong K., Sun S., Tian W., Chen G., Q., Huang W.** 1999. A rapid method for detecting bacterial polyhydroxyalkanoates in intact cells by Fourier transform infrared spectroscopy. *Appl Microbiol* (51): 523-526.
 17. **Hrabak, O.** 1992. Industrial production of poly- β -hydroxybutyrate. *FEMS Microbiol Rev* 103: 251-256.
 18. **Huijberts G.N., Eggink G., P. de Waard, Huisman G.W., and Witholt B.** 1992. *Pseudomonas putida* KT2442 Cultivated on Glucose Accumulates Poly(3-Hydroxyalkanoates) Consisting of Saturate and Unsaturated Monomers. *Applied and Environmental Microbiology* 58(2):536-544.

-
19. **Huijberts G.N., T.C de Rijk, P de Waard and G. Eggin.** 1994. ^{13}C nuclear magnetic resonance studies of *Pseudomonas putida* fatty acid metabolic routes involved in poly(3-hydroxyalkanoate) synthesis. *J. Bacteriol.* 176: 1661-6
 20. **Huisman G.W., Wonink E., Meima R., Kazemier B., Terpstra P. and Witholt B.** 1991. Metabolism of poly(3-hydroxyalkanoates) (PHAs) by *Pseudomonas oleovorans*. Identification and sequences of genes and function of the encoded proteins in the synthesis and degradation of PHA. *J. Biol. Chem.* 266:2191-2198.
 21. **Jung, K., Hazenberg, W., Pietro, M., and Witholt, B.** 2001. Two-Stage Continues Process Development for the Production of Medium-Chain-Lenth Poly (3-Hydroxyalkanoates), *Biotechnology and Bioengineering* 72(1):19-24.
 22. **Kusaka S., Abe H., Lee S.Y., and Doi Y.** 1997. Molecular mass of poly[(R)-3-hydroxybutiric acid] produced in a recombinant *Escherichia Coli*, *Appl Microbiol Biotechnol* 47: 140-143.
 23. **Lafferty, R.M., Korsatko, B. & Korsatko, W.** 1988) Microbial production of poly- β -hydroxybutyric acid. In *Biotechnology*, Vol. 6b, eds Rehm, H.J. & Reed, G. pp. 136-176. Weinheim: Verlag Chemie.
 24. **Lee S. H., Oh D. H., Ahn W. S., Lee Y., Choi J., and Lee S. Y.** 2000. Production of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyhexanoate) by High- Cell-Density Cultivation of *Aeromonas hydrophila*, *Biotechnology and Bioengineering* Vol 67 (2), 240-244.
 25. **Lee S. Y., Wong H.H., Choi J., Lee S. H., Lee S. C., Han C. S., 2000.** Production of Medium -Chain-Length Polyhydroxyalkanoates by High -Cell-density Cultivation of *Pseudomonas putita* Under Phosphorus Limitation. *Biotechnology and Bioengineering* 68 (4): 466-470.
 26. **Lee, S.Y.** 1996. Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Trends Biotechnol* 14: 431-438.
 27. **Lemos P.C., Viana. C., Salgueiro E. N., Ramos., A.M., Crespo J.P.S.G., and Reis M.A.M.** 1998. Effect of Carbon source on the formation of

-
- polyhydroxyalkanoates (PHA) by a phosphate-accumulating mixed culture, *Enzyme and Microbial Technology* 22: 662-671.
28. **Liebergessell M., and Steinbüchel A.** 1992. Cloning and nucleotide sequences of genes relevant for biosynthesis of poly(3-hydroxybutyric acid) in *Chromatium vinosum* strain D, *Eur.J. Biochem* 209: 135-150.
29. **Oshima, T. and Imahori K.** 1974. Description of *Thermus thermophilus*, com. Nov. a non sporulating thermophilic bacterium from a Japanese thermal spring. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 24: 102-112
30. **Pantazaki A.A., Tambaka M.G., Langlois V., Guerin P. and Kyriakidis D.A.** 2003. Polyhydroxyalkanoate (PHA) biosynthesis in *Thermus thermophilus*: Purification and biochemical properties of PHA synthase, *Mol and Cel Biochem* 254: 173-183.
31. **Peoples O.P and Sinskey A.J.**1989. Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Identification and characterization of the PHB polymerase gene (phbC). *J. Biol. Chem.* 264: 15298-15303.
32. **Ramsay B., A., Saracovan I., Ramsay J., A., and Marchessault R., H.** 1992. Effect of Nitrogen Limitation on Long-Side-Chain Poly- β -Hydroxyalkanoates Synthesis by *Pseudomonas resinovorans*, *Applied and Environmental Microbiology*, 58(2): 744-746.
33. **Rangan V.S., and Smith S.** 1996. *J.Biol.Chem.*271: 31749-31755
34. **Rehm B.H.A., Kruger N., and Steinbuchel A.** 1998. A new metabolic link between fatty acid de novo synthesis and polyhydroxyalkanoic acid synthesis. *J.Biol.Chem.*273:240044-24051.
35. **Ruiz, J.A., Lopez, N., I., Fernandez, R., O., and Mendez B. S.** 2001. Polyhydroxyalkanoate Degradation is Associated with Nucleotide Accumulation and Enhances Stress Resistance and Survival of *Pseudomonas oleovorans* in Natural Water Microcosms, *Applied and Environmental Microbiology* 67(1): 225-230.

-
36. **Ryu, H., W., Hahn., S., K., Chang Y., K., Chang H., N.** 1997. Production of Poly(3-hydroxybutyrate) by High Cell Density Fed- Batch Culture of *Alcaligenes eutrophus* with Phosphate Limitation, *Biotechnology and Bioengineering* 55(1), 28-32.
 37. **Slater S., Houmiel K.L., Tran M., Mitsky T.A., Taylor N.B., Padgett S.R., and Gruys K.S.,** 1998. Multiple β -ketothiolase mediate poly(β -hydroxyalkanoates) copolymer synthesis in *Rastoria eutropha*. *J. Bacteriol.*180: 1979-1987.
 38. **Steinbüchel A., and H. E. Valentin.** 1995. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiol. Lett.* 128:219-228.
 39. **Steinbüchel, A., and Schubert P.** 1989. Expression of the *Alcaligenes eutrophus* poly (β -hydroxybutyric acid) –synthetic pathway in *Pseudomonas* sp. *Arch Microbiol.*153: 101-104.
 40. **Tsuge T., Fukui T., Matsusaki H., Taguchi K., Kobayashi G., Ishizaki A., and Doi A.** 1999. Molecular cloning of two (R)-specific enoyl-CoA hydratase genes from *Pseudomonas aeruginosa* and their use for polyhydroxyalkanoate synthesis. *FEMS Microbiol.Lett.*184:193-198.
 41. **Wieczorek R., Steinbuchel A., Schmidt B.** 1996. Occurrence of polyhydroxyalkanoic acid granule-associated proteins related to the *Alcaligenes eutrophus* H16 GA24 protein in other bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*135:23-30.
 42. **Wodzinska J., Snell K.D., Rhomberg A., Sinskey A.J., Biemann K., and Stubbe J.** 1996. Polyhydroxybutyrate synthase: evidence for covalent catalysis. *J.Am.Chem. Soc.*118: 6319-6320.
 43. **Wong H., H., and Lee S., Y.,** 1998. Poly-(3-hydroxybutyrate) production from whey by high- density cultivation of recombinant *Escherichia coli*. *Appl Microbiol. Biotechnol* 50: 30-33.
 44. **Zinn, M., Witholt B., and Egli, T.** 2001. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate, *Advanced Drug Delivery Reviews* 53: 5-21

**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ
ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑΤΑ**