

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ ΠΟΛΥ- β - ΥΔΡΟΞΥΒΟΥΤΥΡΙΚΟΥ ΕΣΤΕΡΑ (PHB) ΣΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ *ALCALIGENES LATUS*

Γ. Πενλόγλου, Χ. Χατζηδούκας, Σ. Παρούτη, Κ. Κυπαρισσίδης
Τμήμα Χημικών Μηχανικών και Εθνικό Κέντρο Έρευνας & Τεχνολογικής Ανάπτυξης
Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Τ.Θ. 472, 54124, Ελλάδα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι να αναλυθεί και να ερμηνευτεί ποιοτικά και ποσοτικά η επίδραση συγκεκριμένων παραμέτρων της διεργασίας βακτηριακής ζύμωσης με χρήση του βακτηρίου *Alcaligenes latus*, στο μηχανισμό παραγωγής και συσσώρευσης του πολυμερούς: πολυ-β-υδροξυβουτυρικός εστέρας (PHB). Σε μια τυπική καλλιέργεια του βακτηρίου σε θρεπτικό μέσο κατάλληλο για τη συσσώρευση του PHB η συγκέντρωση της βιομάζας που επιτυγχάνεται είναι της τάξεως των 2 g/l σε κωνική φιάλη και 15 g/l στο βιοαντιδραστήρα, ως ξηρή μάζα κυττάρων (ασυνεχείς συνθήκες, χωρίς τροφοδοσία κάποιου υποστρώματος). Η συσσώρευση του πολυμερούς μπορεί να φτάσει το 45-50 % κ.β. της ξηρής μάζας κυττάρων, ενώ το μέσο κατά βάρος μοριακό βάρος εκτείνεται στην περιοχή (100.000 - 2.500.000 g/mol) ανάλογα με την αρχική σύσταση του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης και το χρόνο παραμονής της καλλιέργειας στη στατική φάση. Στις καλλιέργειες του αντιδραστήρα η μέγιστη συσσώρευση πολυμερούς δεν ξεπερνά το 37 % κ.β., αλλά το μοριακό βάρος του εκτείνεται σε συγκρίσιμες με τις κωνικές φιάλες τιμές. Κατά τη θερμική ανάλυση των ιδιοτήτων του πολυμερούς οι ιδιότητες του προκύπτουν: Σημείο τήξης: 170,88 °C, σημείο κρυστάλλωσης: 105,68 °C και βαθμός κρυσταλλικότητας: 45,52 %. Τέλος, διαπιστώνεται μια ισχυρή εξάρτηση της αποτελεσματικότητας της μεθόδου διάνοιξης των κυτταρικών τοιχωμάτων και ανάκτησης του PHB με τη χρήση υπερήχων, από τις μοριακές ιδιότητες του πολυμερούς και κυρίως το μέσο κατά βάρος μοριακό βάρος (M_w).

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το βακτήριο *Alcaligenes latus* είναι γνωστό, ανάμεσα σε πλήθος άλλων μικροοργανισμών, για την παραγωγή των πολυ-υδροξυαλκανοϊκών οξέων (PHAs), και συγκεκριμένα του πολυ-β-υδροξυβουτυρικού εστέρα (PHB)^[1]. Το PHB αποτελεί το σημαντικότερο εκπρόσωπο της ομάδας αυτής των βιοαποικοδομήσιμων και βιοσυμβατών πολυμερών. Πρόκειται για ένα σκληρό και άκαμπτο πολυμερές με πολύ υψηλή κρυσταλλικότητα και μηχανικές ιδιότητες παρόμοιες με αυτές του πολυπροπυλενίου. Σήμερα πραγματοποιείται διεθνώς μια προσπάθεια ώστε το PHB ή κάποιο συμπολυμερές του (π.χ. με πολυβαλερικό οξύ, PHV) να αντικαταστήσει το πολυπροπυλένιο σε πλήθος εφαρμογών, εισάγοντας στην καθημερινότητα σημαντικά οφέλη για το περιβάλλον και την ανθρώπινη υγεία^[2]. Από την άλλη, τα βιοπολυμερή αυτά είναι, τουλάχιστον προς το παρόν, πολύ πιο ακριβά από τα συμβατικά τους ανάλογα, ως προς την παραγωγή τους και για αυτό χρησιμοποιούνται μόνο σε εφαρμογές που τίθενται θέματα τοξικότητας, βιοσυμβατότητας και βιοαποικοδομησιμότητας, όπως για παράδειγμα σε βιο-ιατρικές εφαρμογές^[3].

Η σύνθεση και συσσώρευση του βιοπολυμερούς πραγματοποιείται στο κυτταρόπλασμα του βακτηρίου ως αποθήκη ενέργειας και άνθρακα, κάτω από συνθήκες έλλειψης συγκεκριμένων θρεπτικών συστατικών (π.χ. άζωτο, φωσφόρος)^[4]. Από το σύνολο των βακτηρίων, άλγεων, μυκήτων κλπ. που δύνανται να παράγουν ενδοκυττάρια PHB, το βακτήριο *Alcaligenes latus* παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα αφού χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα μια φθηνή πρώτη ύλη (σακχαρόζη) και παράγει το πολυμερές με μεγάλη απόδοση κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής του^[1].

Οι μοριακές και θερμικές ιδιότητες του παραγόμενου και ανακτώμενου πολυμερούς, επηρεάζουν σε πολύ σημαντικό βαθμό τις μηχανικές ιδιότητες του τελικού πολυμερικού υλικού. Οι μηχανικές ιδιότητες είναι το τελικό κριτήριο για την εμπορική αξιοποίηση ενός

τέτοιου υλικού^[5]. Η μελέτη των ιδιοτήτων αυτών έχει πραγματοποιηθεί γενικά από διάφορα εργαστήρια, αλλά η επιρροή συγκεκριμένων παραμέτρων της διεργασίας πάνω σε αυτές δεν έχει ακόμη μελετηθεί συστηματικά.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Το βακτηριακό στέλεχος που χρησιμοποιείται είναι αυτό του *Alcaligenes latus* DSM1123 (ή ATCC 29714). Πρόκειται για ένα τυπικό μεσόφιλο βακτήριο που αναπτύσσεται ταχύτατα στους 30 °C.

Οι καλλιέργειες του *A. latus* μελετώνται σε κωνικές φιάλες (1 και 2 λίτρων) και σε γυάλινο βιοαντιδραστήρα (3 λίτρων), σε θρεπτικό μέσο με κύρια συστατικά τη σακχαρόζη (ως πηγή άνθρακα) και το θειικό αμμώνιο (ως πηγή αζώτου). Η θερμοκρασία διατηρείται πάντα σταθερή (30 °C), ενώ στην περίπτωση του βιοαντιδραστήρα ρυθμίζεται και το διαλυμένο στο μέσο ανάπτυξης οξυγόνο, στο 30 % του κορεσμού, με βάση την παροχή αέρα στην είσοδο του αντιδραστήρα και τη συχνότητα περιστροφής του αναδευτήρα. Από την άλλη, για την κατάλληλη ανάδευση και τον απαραίτητο αερισμό της καλλιέργειας, οι κωνικές φιάλες τοποθετούνται σε αναδεδόμενο επωαστήρα με συχνότητα ανάδευσης 230 rpm.

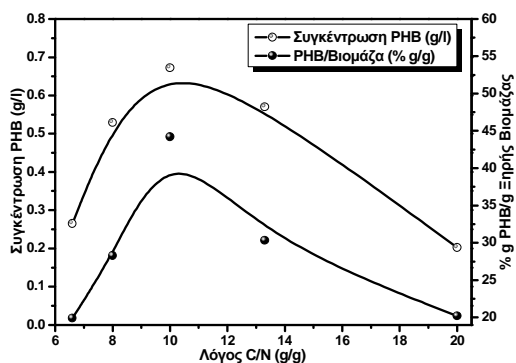
Η σύσταση του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης εξαρτάται από το αν η καλλιέργεια πραγματοποιείται σε κωνική φιάλη ή στον βιοαντιδραστήρα. Για τις κωνικές φιάλες το μέσο (AL1) περιέχει (ανά λίτρο)^[4]: σουκρόζη (σακχαρόζη) 20 g, KH₂PO₄ 1,5 g, Na₂HPO₄·12H₂O 9 g, MgSO₄·7H₂O 0,2 g, CaCl₂·2H₂O 0,01 g, κιτρικό οξύ 0,1 g και διάλυμα ιχνοστοιχείων 1 ml. Το διάλυμα αυτό περιέχει (ανά λίτρο, 1N HCl): FeSO₄·7H₂O 20 g, H₃BO₄ 0,3 g, CoCl₂·6H₂O 0,2 g, ZnSO₄·7H₂O 0,03 g, MnCl₂·4H₂O 0,03 g, (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 0,03 g, NiSO₄·7H₂O 0,03 g και CuSO₄·5H₂O 0,01 g. Για το βιοαντιδραστήρα το μέσο (AL2) περιέχει (ανά λίτρο): σουκρόζη (σακχαρόζη) 30 g, KH₂PO₄ 0,6 g, Na₂HPO₄·12H₂O 3,6 g, MgSO₄·7H₂O 1 g, CaCl₂·2H₂O 0,1 g, κιτρικό οξύ 0,1 g και διάλυμα ιχνοστοιχείων 3 ml. Σε κάθε περίπτωση ως πηγή αζώτου χρησιμοποιείται το θειικό αμμώνιο [(NH₄)₂SO₄] και η συγκέντρωση του στο μέσο μεταβάλλεται μεταξύ 1 και 3 g/l, δίνοντας διαφορετικούς λόγους άνθρακα αζώτου C/N.

Η ανάπτυξη της καλλιέργειας παρακολουθείται δυναμικά με τακτικές δειγματοληψίες και μέτρηση της οπτικής πυκνότητας της μάζας των κυττάρων στα 600 nm και της συγκέντρωσης επιλεγμένων συστατικών (αμμωνιακά άλατα). Η συγκέντρωση της βιομάζας προκύπτει από τη φυγοκέντρωση δειγμάτων της καλλιέργειας, τη λυοφιλοποίηση τους μέχρι την απομάκρυνση του συνόλου του νερού και τη ζύγιση της ξηρής πλέον βιομάζας. Η συγκέντρωση του ενδοκυττάρια παραγόμενου πολυμερούς προσδιορίζεται με συνδυασμό αέριας χρωματογραφίας (GC) και φασματοσκοπίας υπερύθρου (FT-IR)^[6].

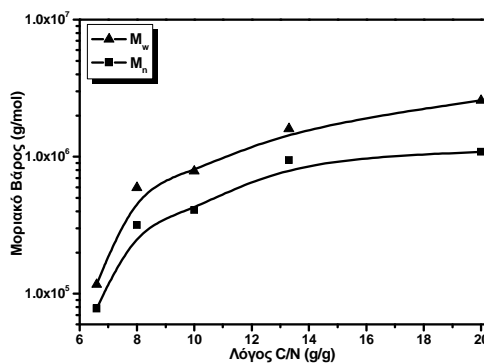
Για τον ποιοτικό χαρακτηρισμό του προϊόντος, γίνεται ανάκτηση και καθαρισμός του με συνδυασμό μηχανικής διάρρηξης των κυττάρων με υπερήχους, εκχύλισης του PHB με χλωροφόρμιο και σταδιακής καταβύθισης με κρύα μεθανόλη. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται λεπτομερής χαρακτηρισμός των ιδιοτήτων του πολυμερούς. Προσδιορίζονται οι μοριακές ιδιότητες (μέσο κατά αριθμό και κατά βάρος μοριακό βάρος, κατανομή μοριακών βαρών και πολυδιασπορά) και οι θερμικές ιδιότητες (σημείο τήξης, σημείο κρυστάλλωσης και ποσοστιαίος βαθμός κρυσταλλικότητας) με χρωματογραφία διείσδυσης πηκτής (GPC) και διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (DSC), αντίστοιχα^[7].

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αρχικά η ανάπτυξη της καλλιέργειας και η συσσώρευση του PHB μελετάται σε κωνικές φιάλες. Πραγματοποιούνται καλλιέργειες με διαφορετικές αρχικές συστάσεις του μέσου ανάπτυξης, όσον αφορά το λόγο άνθρακα/αζώτου (C/N g/g). Παρατηρείται ότι ο μεταβολισμός της σουκρόζης από τον *A. latus* για αύξηση της βιομάζας και για ενδοκυττάρια συσσώρευση PHB, σχετίζεται άμεσα με την παρουσία ή την έλλειψη από το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης, συγκεκριμένων θρεπτικών συστατικών (αμμωνιακά άλατα). Στο Σχήμα 1 φανερώνεται η ισχυρή εξάρτηση της συγκέντρωσης του πολυμερούς και της ποσοστιαίας περιεκτικότητας (g πολυμερούς/g ξηρής βιομάζας) από τον αρχικό λόγο C/N στο μέσο (από 6.6 ως 20). Και οι δύο καμπύλες εμφανίζουν ευδιάκριτα ακρότατα (μέγιστα) για λόγο ίσο με 10. Η μέγιστη συγκέντρωση PHB που επιτυγχάνεται είναι 0,65 g/l, ενώ η ενδοκυττάρια συσσώρευση αγγίζει το 45 % κ.β. της ξηρής μάζας των κυττάρων.



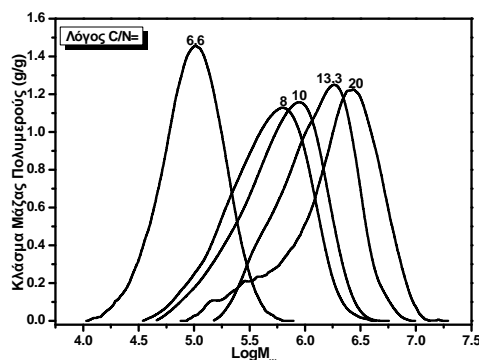
Σχήμα 1. Ενδοκυττάρια συσσώρευση PHB σε σχέση με την αρχική αναλογία C/N στο μέσο ανάπτυξης.



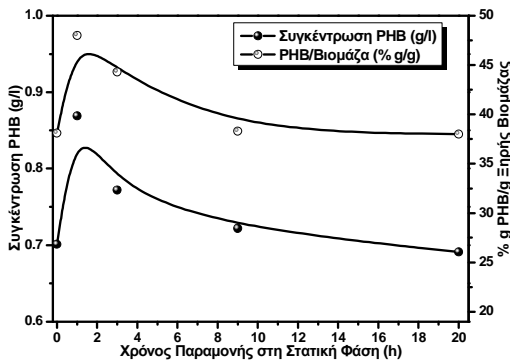
Σχήμα 2. Μεταβολή των μέσων μοριακών βαρών του πολυμερούς για διάφορους αρχικούς λόγους C/N.

Όσον αφορά τις μοριακές ιδιότητες του πολυμερούς η εξάρτηση από τον ίδιο παράγοντα είναι σαφώς διαφορετική. Στο Σχήμα 2 παρουσιάζεται μια συνεχής αύξηση των μέσων μοριακών βαρών (κατά αριθμό, M_n και κατά βάρος, M_w), κατά την αύξηση του λόγου C/N ή κατά τη μείωση της αρχικής συγκέντρωσης της πηγής αζώτου. Για μικρό λόγο C/N το M_w είναι της τάξης των 120.000 g/mol, ενώ για υψηλό λόγο η τιμή είναι σαφώς μεγαλύτερη φτάνοντας τα 2.000.000 g/mol. Σε κάθε περίπτωση, όπως φαίνεται στο Σχήμα 3 η κατανομή του μοριακού βάρους του παραγόμενου πολυμερούς παρουσιάζει μία μόνο, σχετικά στενή, κορυφή, μετατοπιζόμενη συνεχώς προς τα αριστερά, καθώς αυξάνεται ο λόγος C/N. Συνεπώς είναι φανερό ότι οι μοριακές ιδιότητες του αναπτυσσόμενου πολυμερούς δύναται να ελεγχθούν σε πρώτο βαθμό από την αρχική σύσταση του μέσου ανάπτυξης ως προς το λόγο C/N. Σε αυτό το σημείο αξίζει να σημειωθεί πως όλες οι καλλιέργειες που αναφέρονται σε αυτό το μέρος των πειραμάτων σταματούν στο τέλος της εκθετικής ανάπτυξης του κυτταρικού πληθυσμού.

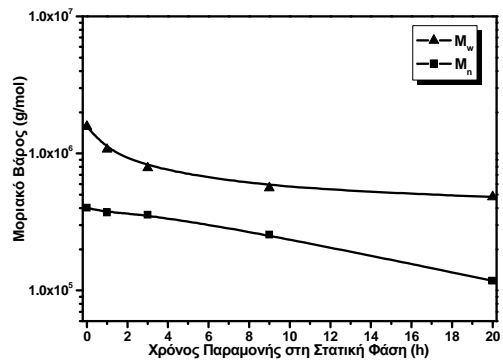
Ο χρόνος παραμονής στη στατική φάση της βακτηριακής καλλιέργειας είναι μια παράμετρος της διεργασίας που μελετάται σχετικά με την επιρροή της τόσο στην παραγωγικότητα του συστήματος όσο και στις μοριακές ιδιότητες του πολυμερούς. Τα πειράματα πραγματοποιούνται με αρχική σύσταση του μέσου: 20 g/l σουκρόζη και C/N=10. Όπως προκύπτει από το Σχήμα 4 η μέγιστη συγκέντρωση PHB (0.85 g/l) επιτυγχάνεται αμέσως μετά την έναρξη της στατικής φάσης (1 h). Στο ίδιο χρονικό σημείο της καλλιέργειας εμφανίζεται και το μέγιστο στην ενδοκυττάρια ποσοστιαία περιεκτικότητα πολυμερούς/ξηρής



Σχήμα 3. Μεταβολή της κατανομής του μοριακού βάρους σχετικά με την αρχική αναλογία C/N.



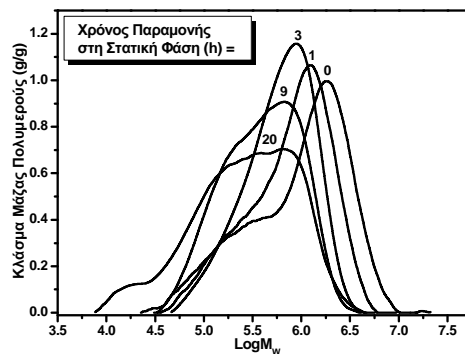
Σχήμα 4. Παραγωγή PHB για διάφορους χρόνους παραμονής στη στατική φάση της καλλιέργειας.



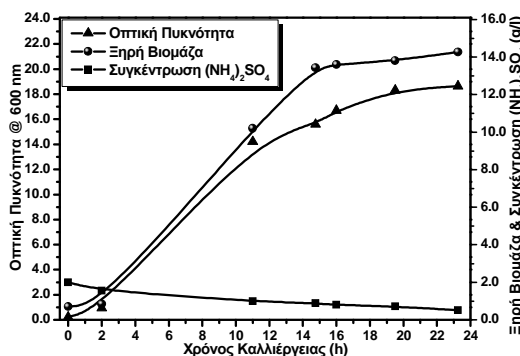
Σχήμα 5. Ελάττωση των μοριακών βαρών του πολυμερούς με το χρόνο παραμονής στη στατική φάση.

βιομάζας (48 %). Περαιτέρω παραμονή στη φάση αυτή οδηγεί στην ενδοκυττάρια αποικοδόμηση του πολυμερούς από τον κυτταρικό πληθυσμό και τη χρήση του ως πηγή άνθρακα και ενέργειας. Εκτός από τη μείωση της συγκέντρωσης του πολυμερούς, εμφανίζεται και αποπολυμερισμός των πολυμερικών αλυσίδων του από το βακτήριο, με αποτέλεσμα την ελάττωση των μέσων μοριακών βαρών (Σχήμα 5). Η τιμή του M_w μπορεί να μειωθεί από τη μέγιστη της τιμή, 1.600.000 g/mol στην ελάχιστη στο τέλος της καλλιέργειας, 500.000 g/mol. Πλέον η κατανομή του μοριακού βάρους παύει να είναι στενή και με μία μόνο κορυφή, ενώ ταυτόχρονα μεγαλώνει σημαντικά η πολυδιασπορά (Σχήμα 6). Όπως είναι φανερό ο χρόνος παύσης και συγκομιδής της καλλιέργειας, είναι πολύ σημαντική επιλογή τόσο για την αποδοτικότητα της διεργασίας όσο και για την ποιότητα του προϊόντος.

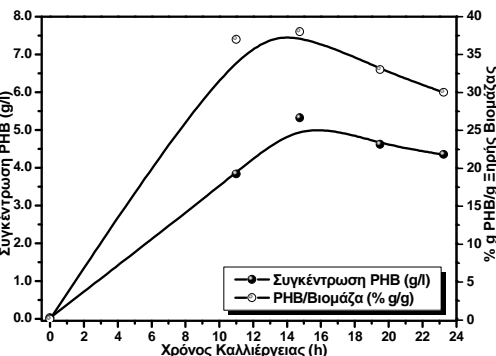
Με βάση τα πειραματικά αποτελέσματα των καλλιεργειών σε κωνικές φιάλες, πραγματοποιείται μεταφορά της διεργασίας σε γυάλινο βιοαντιδραστήρα 3 λίτρων. Το μέσο ανάπτυξης σε αυτήν την περίπτωση είναι το AL2 με αρχική αναλογία άνθρακα/αζώτου 10 g/g. Το pH του αντιδραστήρα ελέγχεται στην τιμή 7 ± 0.05 με δύο κατάλληλα διαλύματα NaOH 5M και H₃PO₄ 5% v/v. Η ανάπτυξη της καλλιέργειας σε όρους οπτικής πυκνότητας, ανάπτυξης ξηρής βιομάζας και κατανάλωσης πηγής αζώτου περιγράφεται στο Σχήμα 7. Η συγκέντρωση της βιομάζας είναι σαφώς μεγαλύτερη (14 g/l) από ότι στην περίπτωση της



Σχήμα 6. Μεταβολή της κατανομής του μοριακού βάρους του PHB κατά την αποικοδόμηση του στη στατική φάση.



Σχήμα 7. Ανάπτυξη της βιομάζας και κατανάλωση της πηγής αζώτου κατά την καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα.



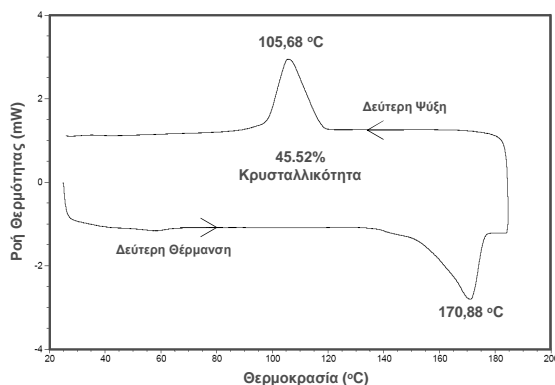
Σχήμα 8. Χρονική εξέλιξη της παραγωγής-κατανάλωσης του PHB κατά την καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα.

Πίνακας 1. Δυναμική μεταβολή των μέσων μοριακών βαρών και του δείκτη πολυδιασποράς, κατά την καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα.

Χρόνος Καλλιέργειας (h)	M_w (g/mol)	M_n (g/mol)	Δείκτης Πολυδιασποράς (M_w/M_n)
11	860.000	221.000	3,9
14	472.000	177.000	2,9
19	582.000	99.000	5,9
23	767.000	198.000	3,9

καλλιέργειας σε κωνικές φιάλες, κυρίως λόγω καλύτερης ανάμιξης και αερισμού του συστήματος. Το μέγιστο της συγκέντρωσης της ξηρής βιομάζας εντοπίζεται στο τέλος της καλλιέργειας, στις 24 h. Κατά το ίδιο χρονικό διάστημα η τελική συγκέντρωση του PHB, όπως προκύπτει από το Σχήμα 8, είναι 4,5 g/l, τιμή που αντιστοιχεί στο 32% της ξηρής βιομάζας. Η μέγιστη συγκέντρωση πολυμερούς, 5,5 g/l, επιτυγχάνεται περίπου στις 15 h καλλιέργειας, ενώ από το σημείο εκείνο και έπειτα αρχίζει και η κατανάλωσή του από το μικροοργανισμό. Η μέγιστη ποσοστιαία περιεκτικότητα πολυμερούς στα κύτταρα σε αυτήν την περίπτωση είναι περίπου 37 %, σαφώς μικρότερη από ότι στις κωνικές φιάλες. Το γεγονός αυτό φανερώνει την ισχυροποίηση του μεταβολικού μονοπατιού που οδηγεί στην ανάπτυξη της βιομάζας, σε σχέση με το μονοπάτι μέσω το οποίου συσσωρεύεται το πολυμερές^[8]. Η δυναμική εξέλιξη των μοριακών βαρών κατά την πορεία της καλλιέργειας παρουσιάζονται στον Πίνακα 1. Για τον αρχικό λόγο C/N ίσο με 10 η μέγιστη τιμή του μέσου κατά βάρους μοριακού βάρους είναι συγκρίσιμη με την τιμή που προσδιορίστηκε από την καλλιέργεια στις κωνικές φιάλες και για τον ίδιο ακριβώς λόγο. Αξίζει επίσης να αναφερθεί ότι στο τέλος της καλλιέργειας η πηγή του αζώτου έχει σχεδόν καταναλωθεί στο σύνολό της.

Οι θερμικές ιδιότητες του πολυμερούς προσδιορίζονται με Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης. Δείγματα καθαρού πολυμερούς επεξεργάζονται ως εξής: αρχικά το θερμοκρασιακό περιβάλλον στο οποίο υποβάλλονται τα πολυμερούς ρυθμίζεται στους 20 °C και το σύστημα αφήνεται να ισορροπήσει. Έπειτα πραγματοποιείται αύξηση της θερμοκρασίας με ρυθμό 10 °C το λεπτό μέχρι τους 185 °C. Το δείγμα παραμένει σε αυτή τη θερμοκρασία για 5 λεπτά, ενώ ακολουθεί ψύξη μέχρι την αρχική θερμοκρασία με τον ίδιο ρυθμό. Ο ίδιος κύκλος επαναλαμβάνεται και δεύτερη φορά. Από τον πρώτο κύκλο πηγάζουν πληροφορίες για τη



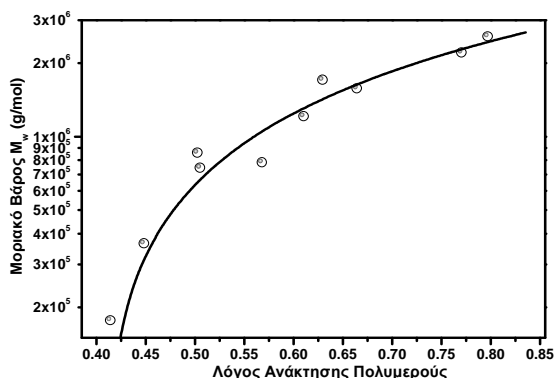
Σχήμα 9. Θερμική ανάλυση του ανακτώμενου PHB. Παρουσιάζεται μόνο ο δεύτερος κύκλος θέρμανσης και ψύξης.

θερμική ιστορία του δείγματος, ενώ από το δεύτερο προκύπτουν οι θερμικές ιδιότητες του προϊόντος. Στο Σχήμα 9 παρουσιάζεται ο δεύτερος κύκλος της θερμικής ανάλυσης του PHB. Οι ιδιότητες που προέκυψαν από τη θερμική ανάλυση είναι: Σημείο Τήξεως: 170,88 °C, Σημείο Κρυστάλλωσης: 105,66 °C και Κρυσταλλικότητα: 45,52 %. Το ποσοστό κρυστάλλωσης υπολογίζεται από τη θερμότητα τήξης, η οποία για θεωρητικά 100% κρυσταλλικό πολυμερές είναι 146 J/g^[7].

Για να εντοπιστεί η αποτελεσματικότητα της μεθόδου διάνοιξης των κυττάρων με υπερήχους, ανάκτησης του πολυμερούς με εκχύλιση του με χλωροφόρμιο και καταβύθισή του με μεθανόλη συγκρίθηκε σε κάθε καλλιέργεια η ποσοστιαία περιεκτικότητα πολυμερούς μετρούμενη με τη ζύγιση του ανακτώμενου πολυμερούς, με την αντίστοιχη περιεκτικότητα μετρούμενη με το συνδυασμό αέριας χρωματογραφίας (GC) και φασματοσκοπίας υπερύθρου (FT-IR). Σε κάθε περίπτωση η μέγιστη απόδοση θεωρείται ότι είναι αυτή που μετράται με το συνδυασμό GC/FT-IR. Όπως φαίνεται από το Σχήμα 10 ο λόγος αυτός της ανάκτησης του πολυμερούς εξαρτάται από το μέσο κατά βάρος μοριακό βάρος του. Σε περιπτώσεις χαμηλών μοριακών βαρών (λιγότερο από 500.000 g/mol) η ανάκτηση που επιτυγχάνεται είναι της τάξεως του 45 %. Στα υψηλά μοριακά βάρη η μέθοδος ανάκτησης γίνεται πιο αποτελεσματική με περίπου το 80 % του ενδοκυττάριου πολυμερούς να ανακτάται. Τέλος, σε θεωρητικό επίπεδο και αν μπορεί να επιτευχθεί πολυμερές με πολύ υψηλό μοριακό βάρος (της τάξεως των 3,000,000 - 4,000,000 g/mol), η μέθοδος ανάκτησης θα έχει πρακτικά 100 % αποτελεσματικότητα.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η ικανότητα της ενδοκυττάριας συσσώρευσης του PHB στις καλλιέργειες του *Alcaligenes latus* και οι μοριακές ιδιότητες του ανακτώμενου πολυμερούς εκδηλώνουν έντονη εξάρτηση από συγκεκριμένες παραμέτρους του συστήματος. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής φανερώνουν τη ρυθμιστική δράση που ασκούν παράμετροι όπως η αρχική αναλογία άνθρακα αζώτου (C/N g/g) στο θρεπτικό μέσο, καθώς και ο χρόνος παραμονής της καλλιέργειας στην στατική φάση, στη συμπεριφορά του συστήματος. Συγκεκριμένα, η παραγωγή του PHB ενισχύεται σημαντικά σε συνθήκες έλλειψης της πηγής αζώτου από το θρεπτικό μέσο. Επίσης, όσο μικρότερη είναι η αρχική συγκέντρωση της ίδιας πηγής, τόσο μεγαλύτερο είναι το μοριακό βάρος που προκύπτει μετά την ανάκτηση του πολυμερούς. Αντίθετα, όσο περισσότερο χρόνο παραμένει μια καλλιέργεια στη στατική φάση (έπειτα της λογαριθμικής ανάπτυξης), τόσο μειώνεται το μοριακό βάρος του PHB, γεγονός που φανερώνει την αποικοδόμησή του ενδοκυτταρικά από το ίδιο το βακτήριο με τη δράση συγκεκριμένων



Σχήμα 10. Σχέση αποτελεσματικότητας μεθόδου ανάκτησης πολυμερούς με το μοριακό του βάρος.

ενζύμων (αποπολυμεράσες). Ακόμη, στις καλλιέργειες που πραγματοποιούνται στο βιοαντιδραστήρα, επιτυγχάνεται μεγαλύτερη συγκέντρωση βιομάζας (λόγο καλύτερου ελέγχου των συνθηκών ανάμιξης και αερισμού της καλλιέργειας), με αποτέλεσμα να ενισχύεται και η παραγωγή του πολυμερούς. Σε αυτήν την περίπτωση το μέσο μοριακό βάρος του παραγόμενου πολυμερούς είναι συγκρίσιμο με τις καλλιέργειες σε κωνικές φιάλες. Τέλος παρατηρείται μια ισχυρή εξάρτηση της απόδοσης της μεθόδου ανάκτησης του πολυμερούς, από τις μοριακές ιδιότητες του PHB.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1]. Lee S. Y., Choi J., Wong H. H., International Journal of Biological Macromolecules **25**:31, (1999).
- [2]. Grothe E., Chisti Y., Bioprocess Engineering **22**:441, (2000).
- [3]. Reddy C. S. K., Ghai R., Rashmi, Kalia V. C., Bioresource Technology **87**:137, (2003).
- [4]. Wang F., Lee S. Y., Applied and Environmental Microbiology **63**:3703, (1997).
- [5]. Bradel R., Reichert K.-H., Makromol. Chem. **194**:1983, (1993).
- [6]. Randriamahefa S., Renard E., Guerin P., Lanlois V., Biomacromolecules **4**:1092, (2003).
- [7]. Yezza A., Halasz A., Levadoux W., Hawari J., Appl. Microbiol. Biotechnol. **77**:269, (2007).
- [8]. Madison L. L., Huisman G. W., Microbiology and Molecular Biology Reviews **63**:21 (1999).