



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ IV: ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΠΟΛΥΜΕΡΩΝ ΑΠΟ ΑΠΟΒΛΗΤΑ

Διπλωματική Εργασία

ΜΠΟΥΖΑΝΗ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ

Επιβλέπων Καθηγητής

Λυμπεράτος Γεράσιμος, Καθηγητής Σχολής Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ

Αθήνα, Φεβρουάριος 2023

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημικής Τεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ. Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω, καταρχάς, στον Καθηγητή κ. Γεράσιμο Λυμπεράτο, επιβλέποντα της εργασίας, ο οποίος μου έδωσε τη δυνατότητα να ασχοληθώ με αυτό επίκαιρο θέμα.

Επιπλέον, ευχαριστώ την Επίκουρο Καθηγήτρια κα. Μαμμά Διόμη και την ερευνητική της ομάδα, για τη διάθεση του freeze dryer του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων ανάκτησης βιοπλαστικών.

Ευχαριστίες οφείλω, επίσης, και σε όλους τους συνεργαζόμενους συμφοιτητές και ερευνητές του Εργαστηρίου Οργανικής Χημικής Τεχνολογίας για την ευχάριστη συνεργασία μας. Επιπλέον, ευχαριστώ την Δρ. Ντάικου Ιωάννα, η οποία με τις γνώσεις και την εμπειρία της συνεισέφερε στην αξιολόγηση της πορείας των πειραμάτων. Κυρίως όμως, ευχαριστώ την υποψήφια διδάκτορα Φιλίππου Κωνσταντίνα για την ουσιαστική καθοδήγηση, τις γνώσεις που μου μετέδωσε και την πολύτιμη βοήθειά της, τόσο κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων, όσο και κατά την συγγραφή της εργασίας.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ ανήκει στην οικογένειά μου για την ηθική στήριξή τους, και την διαχρονική συμπαράστασή τους σε όλες μου τις επιλογές και προσπάθειες καθώς και τους φίλους μου οι οποίοι αποτέλεσαν ορόσημο στην φοιτητική μου ζωή και ήταν πάντα δίπλα μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στη σύγχρονη καθημερινότητα η χρήση πλαστικών υλικών με βάση το πετρέλαιο κυριαρχεί κυρίως λόγω των εξαιρετικών ιδιοτήτων τους. Ωστόσο, η αλόγιστη παραγωγή τους και η μη ορθή διαχείριση μετά τη χρήση τους, αποτελεί σοβαρή απειλή για την οικολογική ισορροπία του πλανήτη, καθώς είναι βιολογικά αδρανή και συμβάλλουν σε σοβαρά προβλήματα ρύπανσης. Ταυτόχρονα, παρατηρείται ραγδαία αύξηση στην παραγωγή τροφικών υπολειμμάτων. Στα πλαίσια κυκλικής οικονομίας προωθείται η αξιοποίηση τους ως παραγωγικοί πόροι για την εύρεση εναλλακτικών, βιώσιμων και φιλικών προς το περιβάλλον υλικών, τα οποία θα έχουν την ικανότητα να αποδομούνται από το περιβάλλον. Μεταξύ αυτών των υλικών, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι πολυυδροξυαλκανοϊκοί εστέρες (ΠΥΑ) οι οποίοι παράγονται ενδοκυτταρικά μέσω μικτών ή καθαρών καλλιιεργειών με χρήση διάφορων τύπων αποβλήτων ως πηγές άνθρακα.

Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε μικτή εμπλουτισμένη μικροβιακή καλλιέργεια με σκοπό την παραγωγή ΠΥΑ, σε αντιδραστήρα άντλησης – πλήρωσης (Draw-Fill). Η στρατηγική που ακολουθήθηκε, ήταν η εναλλαγή μεταξύ περιοριστικών υποστρωμάτων άνθρακα και αζώτου. Ως πηγή αζώτου χρησιμοποιήθηκε η ουρία και ως πηγή άνθρακα συνθετική τροφοδοσία μίγματος οξικού, βουτυρικού, προπιονικού και γαλακτικού οξέος, αιθανόλης και γλυκόζης, που προσομοιάζει τη σύσταση συμπυκνώματος, το οποίο λαμβάνεται από τεμαχισμό και ξήρανση τροφικών υπολειμμάτων. Πραγματοποιήθηκαν δύο κύκλοι πειραμάτων σε δύο όμοιους βιοαντιδραστήρες όγκου 1L, με ίδιο λόγο άνθρακα προς άζωτο $C/N = 100$ και ίδιες συνθήκες λειτουργίας (250 rpm, 27°C). Στον πρώτο αντιδραστήρα DFR-1, στόχος είναι η επιτυχής συσσώρευση ΠΥΑ με οργανική φόρτιση $2025 \pm 460 \text{ mg O}_2/\text{L}$ και συγκέντρωση οργανικού άζωτου $18 \pm 6 \text{ mg/L}$. Στον δεύτερο αντιδραστήρα (DFR-2) η οργανική φόρτιση και η συγκέντρωση του οργανικού αζώτου διπλασιάστηκαν ($3571 \pm 523 \text{ mg O}_2/\text{L}$, $36 \pm 9 \text{ mg/L}$) με στόχο τη διερεύνηση της απόδοσης και της σύστασης σε ΠΥΑ.

Ο περιορισμός αζώτου στη φάση του άνθρακα επιτεύχθηκε και στους δύο αντιδραστήρες ευνοώντας τη συσσώρευση ΠΥΑ. Παράλληλα παρατηρήθηκε ανάπτυξη της βιομάζας, με τη κυτταρική συγκέντρωση στον DFR-2 να είναι μεγαλύτερη, συγκεκριμένα στον DFR-1 η μέση τιμή των ολικών και πτητικών στερεών ήταν $2,60 \pm 1,77 \text{ gr TSS/L}$ και $2,13 \pm 1,49 \text{ gr VSS/L}$ αντίστοιχα και στον DFR-2 $4,45 \pm 2,14 \text{ gr TSS/L}$ και $3,82 \pm 1,94 \text{ gr VSS/L}$ αντίστοιχα. Τα παραγόμενα ΠΥΑ και στους δύο κύκλους πειραμάτων ανακτήθηκαν μέσω χώνευσης με χρήση χλωροφορμίου και οξινισμένης μεθανόλης. Η απόδοση υπολογίστηκε ως ο λόγος του αθροίσματος των βαρών των μονομερών μονάδων προς τη ξηρή μάζα των κυττάρων και δεν παρουσίασε σημαντική διαφορά μεταξύ των αντιδραστήρων αφού στον DFR-1 η μέση απόδοση είναι $16 \pm 4\%$ και στον DFR-2 $16 \pm 5\%$. Σε όλα τα πειράματα, ανιχνευθήκαν τα μονομερή 3HB και 3HV, συνεπώς παράχθηκε είτε το συμπολυμερές P(3HBco3HV), είτε μίγμα του με τα ομοπολυμερή P3HB και P3HV. Διαφορά εντοπίστηκε στη σύσταση των ΠΥΑ η οποία αποδίδεται στο διπλασιασμό του οργανικού φορτίου. Συγκεκριμένα η αναλογία HV:HB στον DFR-1 είναι $(18 \pm 7) : (82 \pm 7)$, ενώ στον DFR-2 $(25 \pm 3) : (75 \pm 3)$.

ABSTRACT

In modern everyday life, the use of petroleum-based plastic materials predominates mainly due to their excellent properties. However, their reckless production and improper management after their use is a serious threat to the ecological balance of the planet, as they are biologically inert and contribute to serious pollution problems. At the same time, there is a rapid increase in the production of food waste. In the context of circular economy, the utilization of the later as resources is promoted in order to find alternative, sustainable and environmentally friendly materials, which will have the ability to be degraded during environmental processes. Among these materials, of particular interest are polyhydroxyalkanoates (PHAs), which are produced intracellularly through mixed or pure cultures using various types of wastes as carbon sources.

In the present work, a mixed enriched microbial culture was used for the production of PHAs, in a Draw-Fill reactor. The strategy followed was to alternate between carbon and nitrogen limiting substrates. Urea was used as a nitrogen source and a synthetic feed of a mixture of acetate, butyrate, propionate and lactic acid, ethanol and glucose, simulating the composition of a concentrate obtained from shredding and drying of food residues, was used as a carbon source. Two cycles of experiments were performed in two identical 1L volume bioreactors, with the same carbon to nitrogen ratio $C / N = 100$ and the same operating conditions (250 rpm, 27°C). In the first DFR-1 reactor, the goal was the successful accumulation of PHAs with an organic loading of $2025 \pm 460 \text{ mg O}_2/\text{L}$ and an organic nitrogen concentration of $18 \pm 6 \text{ mg / L}$. In the second reactor (DFR-2) the organic loading and concentration of organic nitrogen were doubled ($3571 \pm 523 \text{ mgO}_2/\text{L}$, $36 \pm 9 \text{ mg/L}$) with the aim of investigating the effect of this increase on the yield and composition of the produced PHAs.

Nitrogen limitation in the carbon phase was achieved in both reactors favoring PHAs accumulation. At the same time, microbial biomass increase was observed, with the concentration in the DFR-2 being higher, as in DFR-1 the average value of total and volatile solids is $2.60 \pm 1.77 \text{ gr TSS /L}$ and $2.13 \pm 1.49 \text{ gr VSS/L}$ respectively and in DFR-2 $4.45 \pm 2.14 \text{ gr TSS/L}$ and $3.82 \pm 1.94 \text{ gr VSS/L}$ respectively. The produced PHAs in both obtained from both bioreactors were recovered by digestion using chloroform and acidified methanol. The yield was calculated as the ratio of the sum of the monomer's weights over the dry cell weight. The two bioreactors showed similar yield results, since in DFR-1 and DFR-2 the mean yield was $16 \pm 4\%$ and $16 \pm 5\%$, respectively. In both experimental cycles, monomers 3HB and 3HV were observed. Therefore, it is derived that either the copolymer P(3HBco3HV) or a mixture of the aforementioned copolymer and the homopolymers P3HB and P3HV is produced. However, a difference was observed in the PHA composition. More specifically, the ratio HV:HB in DFR-1 and DFR-2 was $(18 \pm 7): (82 \pm 7)$ and $(25 \pm 3): (75 \pm 3)$, respectively. This difference is attributed to the doubling of the carbon concentration in DFR-2.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	iii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	viii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	x
ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ	xi
1. Θεωρητικό μέρος	1
1.1 Παγκόσμια παραγωγή πλαστικών	1
1.2 Πλαστική ρύπανση	2
1.3 Βιοπλαστικά	4
1.3.1 Απευθείας εξαγωγή από βιομάζα.....	5
1.3.2 Σύνθεση από βιοβασιζόμενα μονομερή	6
1.3.3 Σύνθεση από πετροχημικά προϊόντα.....	6
1.3.4 Παραγωγή από φυσικούς ή γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς	6
1.4. Πόλυ-υδροξυαλκανοϊκά πολυμερή (ΠΥΑ)	7
1.4.1 Δομή και χαρακτηριστικά των ΠΥΑ	7
1.4.2 Ιδιότητες των ΠΥΑ	9
1.4.3. Βιομηχανική παραγωγή ΠΥΑ.....	12
1.4.5. Εφαρμογές των ΠΥΑ.....	13
1.5. Παραγωγή ΠΥΑ.....	15
1.5.1. Παραγωγή ΠΥΑ από καθαρές καλλιέργειες.....	15
1.5.2. Παραγωγή από Μικτές καλλιέργειες	16
1.5.3. Παράμετροι επιρροής της συσσώρευσης.....	18
1.5.4. Ανάκτηση των ΠΥΑ από τους κόκκους των κυττάρων	20
1.5.5. Μεταβολικές οδοί	22
1.6. ΠΥΑ και κυκλική οικονομία	25
1.7. Τροφικά υπολείμματα.....	26
1.7.1 Διαχείριση τροφικών υπολειμμάτων.....	27
1.7.2 Αξιοποίηση των αποβλήτων τροφίμων	28
1.7.3 Προεπεξεργασία τροφικών αποβλήτων	29
1.7.4 Πιλοτικό πρόγραμμα διαχείρισης και επεξεργασίας τροφικών υπολειμμάτων: Waste4Think.....	31
2. Πειραματικό μέρος.....	34
2.1 Πειραματική διάταξη	34
2.2 Πειραματική διαδικασία	35

2.2.1 Κύκλοι πειραμάτων	35
2.2.2 Τροφοδοσία πειραματικών διατάξεων.....	35
2.2.3 Εγκλιματισμός βιομάζας για παραγωγή ΠΥΑ.....	36
2.2.4 Ανάκτηση βιοπλαστικού.....	38
2.3 Αναλυτικές μέθοδοι	39
2.3.1 Μέτρηση ΡΗ	39
2.3.2 Μέτρηση οπτικής πυκνότητας (OD).....	39
2.3.3 Μέτρηση Χημικά Απαιτούμενου Οξυγόνου (COD).....	40
2.3.4 Μετρήσεις στερεών TSS και VSS	42
2.3.5 Μέτρηση αμμωνιακών ιόντων (NH ₄ +)	42
2.3.6 Μέτρηση ολικού αζώτου (N)	43
2.3.7 Μέτρηση Πτητικών Λιπαρών Οξέων (VFAs).....	44
2.3.8 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC).....	45
2.3.9 Ποσοτικός προσδιορισμός ανακτημένου βιοπλαστικού	46
3. Αποτελέσματα και Συζήτηση.....	47
3.1 Διεργασία παραγωγής ΠΥΑ σε αντιδραστήρες Άντλησης Πλήρωσης (Draw and Fill)..	47
3.1.1 Αντιδραστήρας άντλησης – πλήρωσης με συγκέντρωση COD 2000 mg O ₂ /L (Draw and Fill Reactor 1, DFR-1)	47
3.1.1.1 pH	47
3.1.1.2 Οπτική πυκνότητα (Optical Density, OD)	48
3.1.1.3 Ολικά και Πτητικά Αιωρούμενων Στερεών (Total and Volatile Suspended Solids)	49
3.1.1.4 Χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (Chemical Oxygen Demand, COD).....	50
3.1.1.5 Ολικό Άζωτο (Total Nitrogen) και Αμμωνιακά Ιόντα (Ammonium).	51
3.1.1.6 Πτητικά Λιπαρά Οξέα (Volatile Fatty Acids).....	52
3.1.1.7 Γλυκόζη (Glucose), Αιθανόλη (Ethanol) και Γαλακτικό οξύ (Lactic Acid)	53
3.1.2 Αντιδραστήρας άντλησης – πλήρωσης με συγκέντρωση COD 4000mg O ₂ /L (Draw and Fill Reactor 2, DFR-2)	54
3.1.2.1 pH	54
3.1.2.2 Οπτική πυκνότητα (Optical Density, OD)	55
3.1.2.3 Ολικά και Πτητικά Αιωρούμενων Στερεών (Total and Volatile Suspended Solids)	56
3.1.2.4 Χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (Chemical Oxygen Demand, COD).....	57
3.1.2.5 Ολικό Άζωτο (Total Nitrogen) και Αμμωνιακά Ιόντα (Ammonium).	57
3.1.2.6 Πτητικά Λιπαρά Οξέα (Volatile Fatty Acids).....	59
3.1.2.7 Γλυκόζη (Glucose), Αιθανόλη (Ethanol) και Γαλακτικό οξύ (Lactic Acid)	60

3.2 Συγκριτικά αποτελέσματα βιοσυσσώρευσης ΠΥΑ στους δύο αντιδραστήρες.....	61
4. Συμπεράσματα και Προτάσεις	65
4.1 Συμπεράσματα	65
4.2 Προτάσεις.....	66
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	67

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.1: Παγκόσμια παραγωγή πλαστικών από το 1950 έως το 2019 .	1
Σχήμα 1.2: Παραγωγή και απόρριψη πλαστικών από το 1950 έως το 2015 .	2
Σχήμα 1.3: Κατηγοριοποίηση πλαστικών ανάλογα με την βιοαποδομησιμότητα και την βιολογική προέλευση τους	4
Σχήμα 1.4: Κατηγοριοποίηση βιοπλαστικών ανάλογα με τη προέλευση τους.	5
Σχήμα 1.5: Εικόνα κόκκων ΠΥΑ στο εσωτερικό των κυττάρων με χρήση μικροσκοπίου	7
Σχήμα 1.6: Γενικός χημικός τύπος ΠΥΑ όπου $m=1,2$ ή 3 και $n=100$ έως αρκετές χιλιάδες .	8
Σχήμα 1.7 Χημική δομή των πολυμερών PHB, PHV και PHBV	9
Σχήμα 1.8: Μέγεθος της αγοράς των ΠΥΑ ανά εφαρμογή το 2021 και το 2030 .	13
Σχήμα 1.9: Τα τρία στάδια της διαδικασίας παραγωγής ΠΥΑ μέσω MMK	17
Σχήμα 1.10: Απεικόνιση των προφίλ συγκέντρωσης για τη στρατηγική μη συζευγμένης παροχής άνθρακα και αζώτου	19
Σχήμα 1.11: Απεικόνιση της εκτεταμένης καλλιέργειας	20
Σχήμα 1.12: Βήματα για την παραλαβή των ΠΥΑ από τους κόκκους των βακτηριακών κυττάρων.	21
Σχήμα 1.13: Μεταβολικές οδοί παραγωγής ΠΥΑ	23
Σχήμα 1.14: Διαγραμματική περιγραφή του μοντέλου της κυκλικής οικονομίας	25
Σχήμα 1.15 Επισκόπηση της αλυσίδας εφοδιασμού τροφίμων και η διάκριση μεταξύ απώλειας και σπατάλης τροφίμων	26
Σχήμα 1.16: Ιεράρχηση των μεθόδων διαχείρισης απορριμμάτων τροφίμων	28
Σχήμα 1.17: Σχηματική αναπαράσταση της παραγωγής ΠΥΑ από τροφικά απόβλητα	30
Σχήμα 1.18: Διάγραμμα χημικά απαιτούμενο οξυγόνο συμπυκνώματος ανά 1 h ενός κύκλου ξήρανσης ζυμώσιμων απορριμμάτων συλλεγόμενων σε περίοδο 12 μηνών.	32
Σχήμα 2.1: Πειραματική διάταξη παραγωγής βιοπλαστικών.	34
Σχήμα 2.2: Βιομάζα μετά από φυγοκέντηρηση.	37
Σχήμα 2.3: Μέτρηση pH με το ηλεκτρονικό πεχάμετρο πάγκου "Sanxin PHS-3D-01 Lab pH Meter" και ηλεκτρόδιο "SensoDirect pH electrode type 330"	39
Σχήμα 2.4 : Ηλεκτρονικό φασματοφωτόμετρο "Hach Lange (DR2800)"	40
Σχήμα 2.5: Φιαλίδια προς φωτομέτρηση μετά την ολοκλήρωση της οξειδωσης του οργανικού φορτίου	41
Σχήμα 2.6: Καμπύλη βαθμονόμηση χημικά απαιτούμενου οξυγόνου συναρτήσει απορρόφησης.....	41
Σχήμα 2.7 : Φωτόμετρο Hanna Aquaculture Photometer HI83303 και αντιδραστήρια (HI-93733-01 Ammonia HR kit) για τον προσδιορισμό του αμμωνιακού αζώτου.	43
Σχήμα 2.8: Αέριος χρωματογράφος Shimadzu GC-2010 plus με ανιχνευτή φλόγας ιονισμού (FID) για τον προσδιορισμό των Πτητικών Λιπαρών Οξέων (VFAs).....	44
Σχήμα 2.9: Διάταξη Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC) Agilent1260 Infinity II.	46
Σχήμα 3.1: Διάγραμμα των μετρήσεων του pH συναρτήσει του χρόνου του αντιδραστήρα DFR-1.	47
Σχήμα 3.2: Διάγραμμα των μετρήσεων της οπτικής πυκνότητας συναρτήσει του χρόνου του αντιδραστήρα DFR-1.	48
Σχήμα 3.3: Διάγραμμα των ολικών και πτητικών αιρούμενων στερεών συναρτήσει του χρόνου του αντιδραστήρα DFR-1.....	49
Σχήμα 3.4: Διάγραμμα κατανάλωσης του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου συναρτήσει του χρόνου του αντιδραστήρα DFR-1.....	50

Σχήμα 3.5: Διάγραμμα κατανάλωσης του ολικού αζώτου συναρτήσει του χρόνου για τον αντιδραστήρα DFR-1.	51
Σχήμα 3.6: Διάγραμμα κατανάλωσης αμμωνιακών ανιόντων (NH_4^+) συναρτήσει του χρόνου για τον αντιδραστήρα DFR-1.	51
Σχήμα 3.7: Κατανάλωση Α) του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου Β) του οξικού οξέος C) του προπιονικού οξέος D) του βουτυρικού οξέος συναρτήσει του χρόνου του κατά τη διάρκεια της φάσης άνθρακα στον αντιδραστήρα DFR-1.	52
Σχήμα 3.8: Μέση συγκέντρωση γλυκόζης αιθανόλης και γαλακτικού οξέος στην αρχή και στο τέλος της τροφοδοσίας άνθρακα σε όλη την διάρκεια λειτουργίας του αντιδραστήρα DFR-1.	53
Σχήμα 3.9: Διάγραμμα των μετρήσεων του pH συναρτήσει του χρόνου του αντιδραστήρα DFR-2.	54
Σχήμα 3.10: Διάγραμμα των μετρήσεων της οπτικής πυκνότητας συναρτήσει του χρόνου του αντιδραστήρα DFR-2.	55
Σχήμα 3.11: Διάγραμμα των ολικών και πτητικών αιρούμενων στερεών συναρτήσει του χρόνου του αντιδραστήρα DFR-2.	56
Σχήμα 3.12: Διάγραμμα κατανάλωσης του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου συναρτήσει του χρόνου του αντιδραστήρα DFR-2.	57
Σχήμα 3.13: Διάγραμμα κατανάλωσης του ολικού αζώτου συναρτήσει του χρόνου για τον αντιδραστήρα DFR-2.	57
Σχήμα 3.14: Διάγραμμα κατανάλωσης αμμωνιακών ανιόντων (NH_4^+) συναρτήσει του χρόνου για τον αντιδραστήρα DFR-2.	58
Σχήμα 3.15: Κατανάλωση Α) του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου Β) του οξικού οξέος C) του προπιονικού οξέος D) του βουτυρικού οξέος συναρτήσει του χρόνου του κατά τη διάρκεια της φάσης άνθρακα στον αντιδραστήρα DFR-2.	59
Σχήμα 3.16: Μέση συγκέντρωση γλυκόζης αιθανόλης και γαλακτικού οξέος στην αρχή και στο τέλος της τροφοδοσίας άνθρακα σε όλη την διάρκεια λειτουργίας του αντιδραστήρα DFR-2.	60
Σχήμα 3.17: Διάγραμμα απόδοσης ΠΥΑ ανά ξηρό βάρος βιομάζας στο τέλος της φάσης άνθρακα (συσσώρευση) για κάθε μήνα λειτουργίας στον DFR-1 και στον DFR2.	62
Σχήμα 3.18: Σύσταση πολυμερών ΠΥΑ για κάθε μήνα λειτουργίας στον DFR-1.	63
Σχήμα 3.19: Σύσταση πολυμερών ΠΥΑ για κάθε μήνα λειτουργίας στον DFR-2.	63

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1: Παραγόμενα ΠΥΑ για τις διαφορετικές δομικές μονάδες.....	8
Πίνακας 1.2: Ιδιότητες ομοπολυμερών ΠΥΑ μικρού και μεγάλου μήκους αλυσίδας.	10
Πίνακας 1.3 Ιδιότητες ομοπολυμερών και συμπολυμερών ΠΥΑ.....	11
Πίνακας 1.4: Βιομηχανική παραγωγή ΠΥΑ σε παγκόσμιο επίπεδο.....	12
Πίνακας 1.5: Είδη πολυμερών ΠΥΑ και εφαρμογές τους στην ιατρική.....	14
Πίνακας 1.6: Εναλλακτικές πηγές άνθρακα για την παραγωγή ΠΥΑ	29
Πίνακας 1.7: Χημικά χαρακτηριστικά συμπυκνώματος συλλεγόμενο σε διάρκεια 12 μηνών.	32
Πίνακας 2.1: Σύσταση ολικής τροφοδοσίας αντιδραστήρων.	35
Πίνακας 2.2: Σύσταση συνθετικής τροφοδοσίας άνθρακα.	35
Πίνακας 2.3: Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος.	36
Πίνακας 2.4: Σύσταση διαλύματος μετάλλων.	36
Πίνακας 2.5: Σύσταση διαλύματος ιχνοστοιχείων.....	36
Πίνακας 3.1: Αποτελέσματα των βασικότερων χαρακτηριστικών των αντιδραστήρων DFR-1 και DFR-2.	64

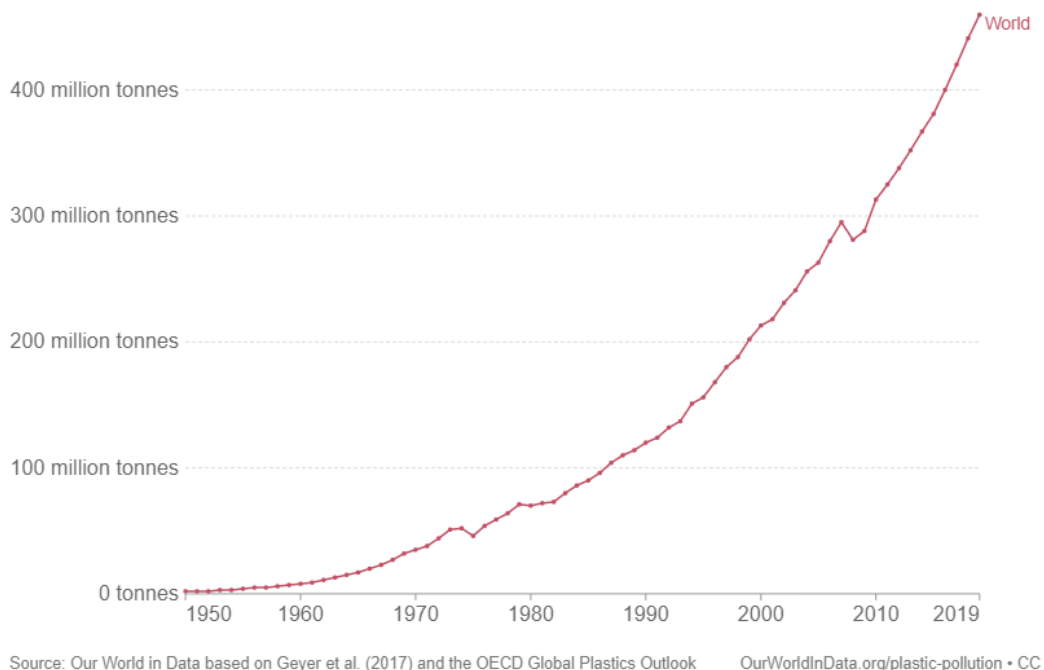
ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

PE	Πολυαιθυλένιο
PP	Πολυπροπυλένιο
PET	Τερεφθαλικό Πολυαιθυλένιο
PHA (ΠΥΑ)	Πολύ-υδροξυαλκανοϊκος εστέρας
PBS	Πολυβουτυλένιο
PCL	Πολυκαπρολακτόνη
PS	Πολυστυρένιο
HDPE	Πολυαιθυλένιο υψηλής πυκνότητας
LDPE	Πολυαιθυλένιο χαμηλής πυκνότητας
PLA	Πολυγαλακτικό Οξύ
PGA	Πολυγλυκολικό Οξύ
PVOH/PVA	Πολυβινυλική αλκοόλη
PVAC	Οξικός πολυβινυλεστέρας
scl – PHAs	ΠΥΑ μικρής ανθρακικής αλυσίδας
mcl – PHAs	ΠΥΑ μεσαίας ανθρακικής αλυσίδας
P3HB	Πόλυ – 3 – υδροξυβουτυρικό
P(4HB)	Πόλυ – 4 – υδροξυβουτυρικό
3HHx	3 –υδροξυεξανοϊκό οξύ
4HB	4 –υδροξυβουτυρικό οξύ
3HO	3 – υδροξυοκτανοϊκό οξύ
3HD	3 – υδροξυδεκανοϊκό οξύ
3HDD	3 – υδροξυδωδεκανοϊκό οξύ
3HB	3 – υδροξυβουτυρικο οξύ
3HV	3 – υδροξυβαλερικό οξύ
HBME	υδροξυβουτυρικός μεθυλεστέρας
HAME	υδροξυαλκανοϊκός μεθυλεστέρας
MMK	Μικτές Μικροβιακές Κοινότητες
PAOs	Οργανισμοί που συσσωρεύουν πολυφωσφορικά άλατα
GAOs	Οργανισμοί που συσσωρεύουν γλυκογόνο
ADF	Αερόβια Δυναμική Σίτιση
OLR	Ρυθμός Οργανικής Φόρτωσης
COD	Χημικά Απαιτούμενο Οξυγόνο
TOC	Ολικός Οργανικός Άνθρακας
TN	Ολικό Άζωτο
TSS	Ολικά Αιωρούμενα Στερεά
VSS	Πτητικά Αιωρούμενα Στερεά
ΧΥΤΑ	Χώροι Υγειονομικής Ταφής
VFA	Πτητικά Λιπαρά Οξέα
HPLC	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης

1. Θεωρητικό μέρος

1.1 Παγκόσμια παραγωγή πλαστικών

Τα πλαστικά είναι συνθετικά πολυμερή τα οποία παράγονται κυρίως από το αργό πετρέλαιο. Αυτές οι ενώσεις περιέχουν υδρογονάνθρακες, οι οποίοι αποτελούν τα μονομερή και μέσω μιας διαδικασίας πολυμερισμού ή πολυσυμπύκνωσης πολυμερίζονται προς την παραγωγή πλαστικών [1]. Το πρώτο συνθετικό πολυμερές εφευρέθηκε το 1907 από τον χημικό Leo Baekeland, ονομάστηκε «Βακελίτης» και παρασκευαζόταν από φαινόλη και φορμαλδεΐδη. Ωστόσο, η μαζική παραγωγή πλαστικού ξεκίνησε μετά τον 2^ο Παγκόσμιο Πόλεμο. Η πρωτοφανής οικονομική ανάπτυξη των μεταπολεμικών δεκαετιών, μαζί με την αύξηση των καταναλωτικών αναγκών της σύγχρονης κοινωνίας, οδήγησε σε μια ταχεία και διαρκή αύξηση της παγκόσμιας παραγωγής πλαστικών. Η παγκόσμια παραγωγή έχει αυξηθεί παγκοσμίως από 1.5 εκατομμύρια τόνους το 1950 σε 367 εκατομμύρια τόνους το 2020, όπως φαίνεται στο Σχήμα 1.1. Αξίζει να αναφερθεί ότι μόνο τρία χρόνια η παγκόσμια ετήσια παραγωγή πλαστικών μειώθηκε σε σχέση με το προηγούμενο έτος. Αυτά είναι τα έτη είναι το 1975, το 1980 και το 2008 και συμπίπτουν με οι δύο παγκόσμιες πετρελαϊκές κρίσεις και τη μεγάλη οικονομική ύφεση [2].



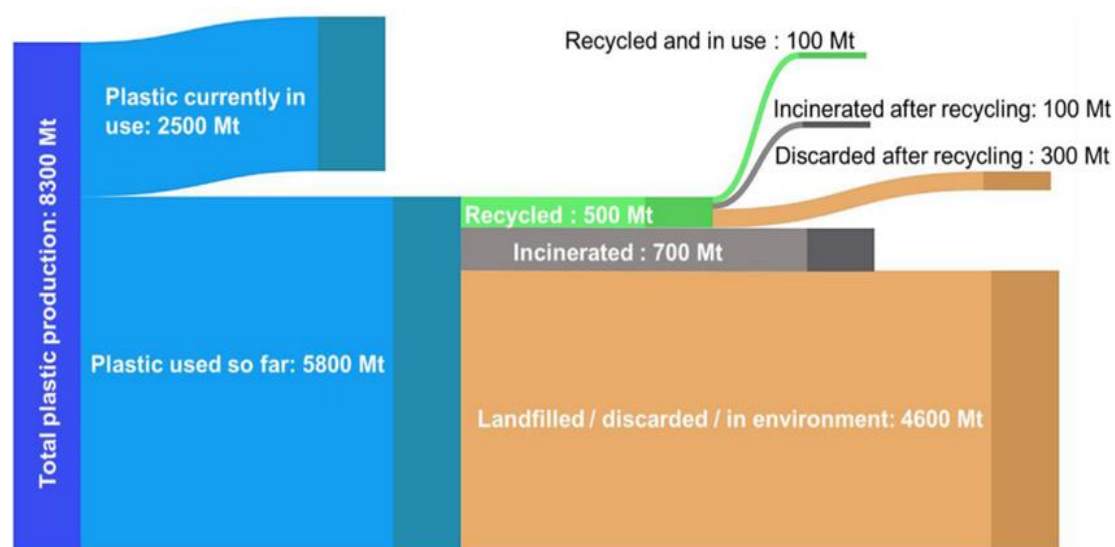
Σχήμα 1.1: Παγκόσμια παραγωγή πλαστικών από το 1950 έως το 2019 [3].

Η αυξημένη αποδοχή των πλαστικών από τους καταναλωτές και τη βιομηχανία οφείλεται στα πλεονεκτήματα που αυτά παρουσιάζουν έναντι άλλων υλικών. Το υψηλό μοριακό βάρος, η ανθεκτικότητα, η αδράνεια στη μικροβιακή δράση, συνδυαστικά με το χαμηλό κόστος παραγωγής, τη χρήση απλών παραγωγικών διαδικασιών και τη μεγάλη ποικιλία των πλαστικών βοήθησαν να αναπτυχθεί μια ακμάζουσα βιομηχανία [4].

Το πλαστικό χρησιμοποιείται ευρέως στις κατασκευές, τις μεταφορές, τον ηλεκτρικό και ηλεκτρονικό εξοπλισμό, τη γεωργία, σε είδη οικιακής χρήσης, είδη αναψυχής, αθλητικά είδη, καθώς και ιατρικές προμήθειες. Ωστόσο, η συσκευασία είναι ο βασικότερος τομέας στον οποίον κυριαρχεί το πλαστικό. Ειδικότερα, η συσκευασία τροφίμων καλύπτει το 36% της παγκόσμιας παραγωγής πλαστικών. Εάν εξαιρεθούν οι συνθετικές ίνες, δηλαδή υπολογίζοντάς μόνο τις πολυμερικές ρητίνες, το μερίδιό αυξάνεται στο 42%. Επιπλέον, πάνω από το 90% της συσκευασίας είναι κατασκευασμένο από πολυαιθυλένιο (PE), πολυπροποπυλένιο (PP) ή τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο (PET) ενώ σχεδόν όλη η παραγωγή PET χρησιμοποιείται για στη συσκευασία [2].

1.2 Πλαστική ρύπανση

Η διαρκώς αυξανόμενη παραγωγή πλαστικών εγείρει ανησυχίες που αφορούν ως επί το πλείστον τις περιβαλλοντικές συνέπειες. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 1.2 υπολογίζεται ότι από το 1950 έως το 2015 έχουν παραχθεί 8300 εκατομμύρια τόνοι πλαστικών από τα οποία οι 5800 εκατομμύρια τόνοι ορίζονται ως απόβλητα καθώς έχουν χρησιμοποιηθεί. Παρά τις προσπάθειες για αύξηση των ποσοστών ανακύκλωσης, ανακυκλώνονται μόνο οι 500 εκατομμύρια τόνοι ενώ από αυτούς επαναχρησιμοποιούνται μόνο οι 100 εκατομμύρια τόνοι. Περίπου το 12% αυτών των απορριμμάτων αποτεφρώνονται, ενώ το υπόλοιπο 79% καταλήγει στο φυσικό περιβάλλον [5].



Σχήμα 1.2: Παραγωγή και απόρριψη πλαστικών από το 1950 έως το 2015 [5].

Γίνεται αντιληπτό λοιπόν ότι η συσσωρευμένη ποσότητα πλαστικών αποβλήτων μπορεί να επιφέρει αρνητικές συνέπειες στο περιβάλλον λόγω της πλαστικής ρύπανσης. Ως πλαστική ρύπανση ορίζεται η συσσώρευση πλαστικών αντικειμένων και σωματιδίων στο περιβάλλον και επηρεάζει δυσμενώς τα οικοσυστήματα και τον άνθρωπο [6]. Σύμφωνα με στατιστικά στοιχεία, 275 εκατομμύρια τόνοι πλαστικών απορριμμάτων βρέθηκαν σε 192 παράκτιες περιοχές το 2010 και περίπου 8 εκατομμύρια τόνοι απορριμμάτων κατέληξαν στους ωκεανούς [7]. Άλλες προβλέψεις αναφέρουν πως η ποσότητα πλαστικών απορριμμάτων που θα εισρεύσουν στα υδάτινα οικοσυστήματα παγκοσμίως θα μπορούσε να φτάσει τους 90 εκατομμύρια τόνους ανά έτος έως το 2030, εάν η διαχείριση των πλαστικών αποβλήτων δεν

βελτιωθεί [8]. Ιδιαίτερα την περίοδο της πανδημίας COVID – 19 σημειώθηκε μεγάλη συσσώρευση πλαστικών λόγω της μαζικής κατανάλωσης, στον τομέα της ιατρικής, σε είδη εξοπλισμού ατομικής προστασίας μιας χρήσης [9].

Όπως ήδη έχει αναφερθεί υπάρχουν διάφοροι τρόποι διαχείρισης των πλαστικών απορριμμάτων όπως η ανακύκλωση η αποτέφρωση και η υγειονομική ταφή. Κατά την αποτέφρωση των πλαστικών απόβλητων, απελευθερώνονται τα αέρια του θερμοκηπίου (CO₂) και άλλα ερεθιστικά αέρια (HCl). Όσον αφορά την ανακύκλωση, υπάρχουν πολλά βήματα που απαιτούν χωριστή συλλογή, μεταφορά σε μεγάλες αποστάσεις, επεξεργασία και ανακατασκευή των πλαστικών. Αυτά τα βήματα οδηγούν σε αύξηση του κόστους. Το υψηλό κόστος αυτών των βημάτων σε συνδυασμό με το χαμηλό κόστος των πρώτων υλών για την παραγωγή των πλαστικών περιορίζουν την ανακύκλωση [4].

Τα πλαστικά έχουν εισβάλλει στην τροφική αλυσίδα υπονομεύοντας την ανθρώπινη υγεία. Αναλυτικότερα, τα συσσωρευμένα πλαστικά στο περιβάλλον μπορούν να αποσυντίθενται σε μικρά θραύσματα, σχηματίζοντας σταδιακά μικροπλαστικά ή ακόμα και νανοπλαστικά. Η ρύπανση από μικροπλαστικά στα αγροοικοσυστήματα αλλοιώνει τις βιοχημικές ιδιότητες του εδάφους. Επιπλέον, η παρουσία τους στα άκρα των ριζών αποτελεί κίνδυνο για τα ζώα τα οποία πρόκειται να καταναλώσουν τα φυτά. Αντίστοιχα, μικροπλαστικά τα οποία είναι συσσωρευμένα στο υδάτινο περιβάλλον μπορούν να καταναλωθούν από τους θαλάσσιους οργανισμούς. Τελικά, όταν οι άνθρωποι καταναλώνουν προϊόντα που προέρχονται από αυτές τις περιοχές, υπάρχει πιθανότητα να αναπτύξουν προβλήματα υγείας λόγω τοξικών επιδράσεων, καθώς τα συσσωρευμένα μικροπλαστικά έχουν την ικανότητα να διασχίζουν τους βιολογικούς φραγμούς. Ταυτόχρονα, οι άνθρωποι εκτίθενται σε μικροπλαστικά σωματίδια μέσω του πόσιμου νερού, της εισπνοής και της δερματικής απορρόφησης [10].

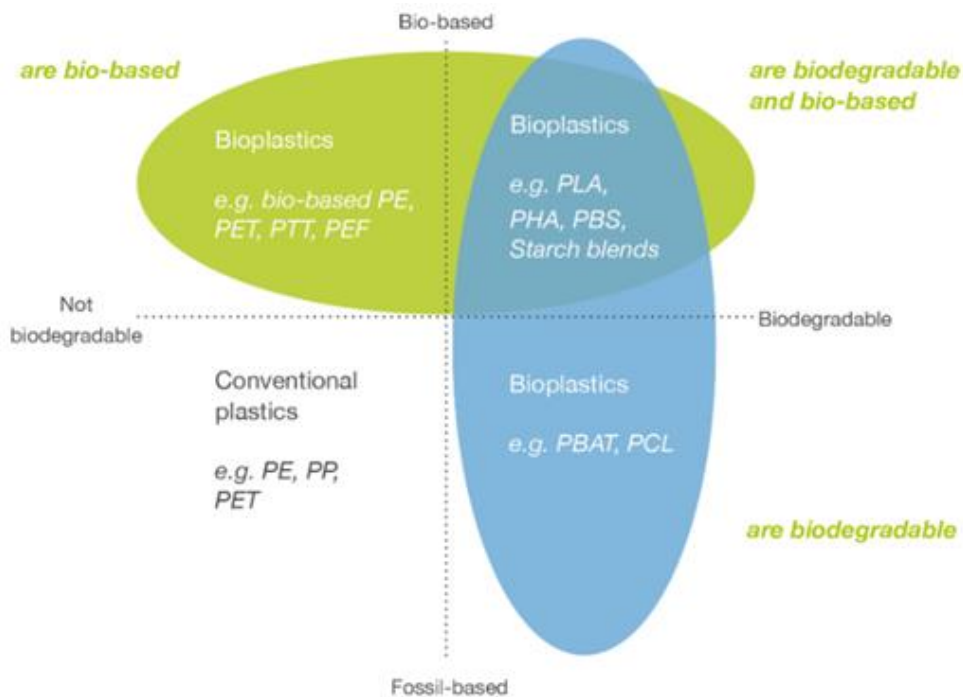
Μέχρι τώρα έχουν ληφθεί ορισμένα μέτρα για την αντιμετώπιση του προβλήματος των πλαστικών απορριμμάτων όπως η μείωση της χρήσης πλαστικών μέσω νομοθετικής διάταξης και της βελτίωσης της αποτελεσματικότητας επεξεργασίας των πλαστικών απορριμμάτων. Ωστόσο, αυτές οι μέθοδοι είναι αποτελεσματικές μόνο σε κάποιο βαθμό, επειδή η κλίμακα της παραγωγής πλαστικών είναι πολύ υψηλότερη από τη μείωση μέσω αυτών των μεθόδων επεξεργασίας [11].

Συνεπώς έχει ενταθεί η ανάγκη αντικατάσταση των «συμβατικών» πλαστικών από πλαστικά πιο φιλικά προς το περιβάλλον. Ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια, στα πλαίσια της ορθότερης διαχείρισης των πόρων, προωθείται η παραγωγή πλαστικών βιολογικής προέλευσης ή και βιοαποδομήσιμων πλαστικών. Τα βιοαποδομήσιμα πλαστικά μπορούν να διατηρήσουν τις επιθυμητές ιδιότητες κατά την περίοδο αποθήκευσης και χρήσης, ενώ μπορούν να αποικοδομηθούν από μικρόβια (βακτήρια, μύκητες, φύκια κ.λπ.) σε περιβαλλοντικά αβλαβείς χημικές ενώσεις (CO₂, H₂O, CH₄) και βιομάζα υπό συνθήκες φυσικού περιβάλλοντος μετά τη χρήση. Τελικά, αυτές οι ουσίες ενσωματώνονται στο φυσικό οικοσύστημα χωρίς οικοτοξική επίδραση [4,9].

1.3 Βιοπλαστικά

Τα βιοπλαστικά είναι πολυμερή που είναι βιοαποικοδομήσιμα δηλαδή μπορούν να αποσυντεθούν από τη δράση ζωντανών οργανισμών, βιολογικής προέλευσης (πλαστικά που συντίθενται από βιομάζα ή ανανεώσιμους πόρους) ή μπορεί να είναι και τα δύο. Πιο συγκεκριμένα, πλαισιώνεται κυρίως σε τρεις κατηγορίες βιοπλαστικών [12]:

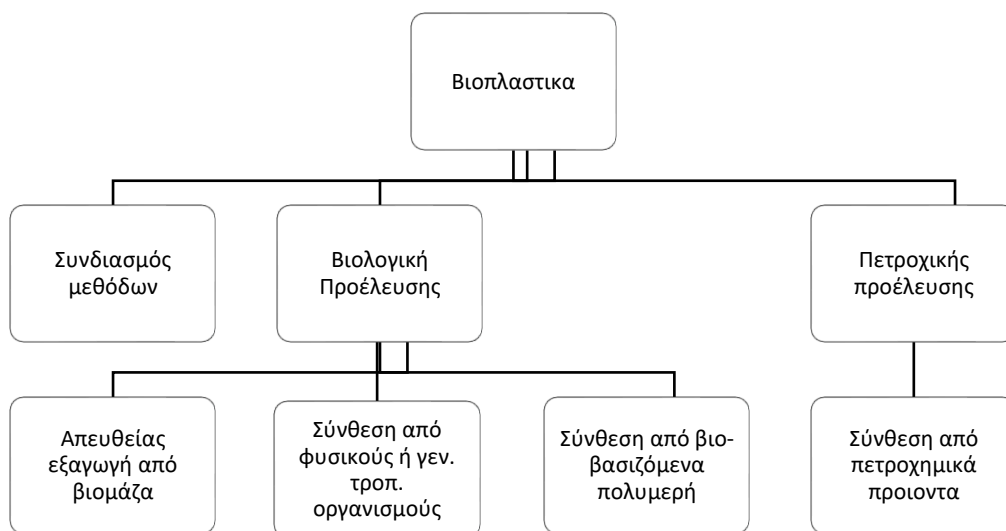
- Βιολογικής ή μερικώς βιολογικής προέλευσης και μη βιοαποδομήσιμα πλαστικά, όπως πολυαιθυλένιο με βιο-βάση (Bio-PE), τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο βιολογικής βάσης (Bio-PET)
- Βιοδιασπώμενα πλαστικά, όπως πολυγαλακτικά οξέα (PLA), πολυδροξυαλκανοϊκά (PHA) ή το πολυβουτυλένιο (PBS)
- Πλαστικά που βασίζονται σε συμβατικούς ορυκτούς πόρους και είναι επίσης βιοδιασπώμενα όπως η Πολυκαπρολακτόνη (PCL)



Σχήμα 1.3: Κατηγοριοποίηση πλαστικών ανάλογα με την βιοαποδομησιμότητα και την βιολογική προέλευση τους [12].

Η παγκόσμια παραγωγή βιοπλαστικών άγγιξε τα 2,4 εκατομμύρια τόνους το 2021. Από αυτά, τα βιοαποδομήσιμα πλαστικά αντιπροσωπεύουν το 64% (1,5 εκατομμύρια τόνοι) της παγκόσμιας παραγωγής. Το μεγαλύτερο πεδίο εφαρμογής αποτελεί η συσκευασία, λαμβάνοντας 48% (1,2 εκατομμύρια τόνους) της συνολικής αγοράς. Ενώ αναμένεται αύξηση της παραγωγής βιοπλαστικών μέχρι το 2026 σε 7,5 εκατομμύρια τόνους [13].

Τα βιοπλαστικά μπορούν να κατηγοριοποιηθούν επιπλέον ανάλογα με τη προέλευση τους. Ειδικότερα μπορούν να διακριθούν πέντε κατηγορίες. Βιοπλαστικά τα οποία προέρχονται απευθείας εξαγωγή από βιομάζα, βιοπλαστικά που παράγονται από βιο-βασιζόμενα μονομερή ή πετροχημικά προϊόντα, βιοπλαστικά που παράγονται από φυσικούς ή γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς καθώς και συνδυασμός όλων των παραπάνω [14]. Παρακάτω παρουσιάζονται κάποια παραδείγματα πλαστικών για κάθε κατηγορία.



Σχήμα 1.4: Κατηγοριοποίηση βιοπλαστικών ανάλογα με τη προέλευση τους.

1.3.1 Απευθείας εξαγωγή από βιομάζα

Βιοπλαστικά μπορούν να απομονωθούν με εξαγωγή φυσικών πολυμερών από ανανεώσιμους πόρους. Οι πολυσακχαρίτες όπως το άμυλο και η κυτταρίνη αντιπροσωπεύουν τα πιο άφθονα φυσικά πολυμερή στη βιόσφαιρα και επομένως έχουν σημαντικό μερίδιο αγοράς [14]. Ευρέως διαδεδομένο είναι το άμυλο το οποίο θεωρείται η δεύτερη σε αφθονία πηγή καθώς παράγεται από μια μεγάλη οικογένεια φυτών ως πηγή αποθηκευμένης ενέργειας. Φιλμ με βάση το άμυλο χρησιμοποιούνται ως υλικά επικάλυψης για τρόφιμα τα οποία προτείνονται ως εναλλακτική λύση για το πολυστυρένιο (PS). Η κυτταρίνη είναι διαθέσιμη σε διάφορες μορφές βιομάζας και μπορεί να προέλθει από ποικίλες πηγές, όπως το ξύλο. Πολυμερή με βάση την κυτταρίνη όπως το σελοφάν και η οξική κυτταρίνη μπορούν να αντικαταστήσουν τα συμβατικά πολυμερή όπως το πολυαιθυλένιο χαμηλής πυκνότητας (LDPE), το πολυαιθυλένιο υψηλής πυκνότητας (HDPE), το πολυστυρένιο (PS) και το πολυπροπυλένιο (PP) [15]. Βιοπλαστικά μπορούν επίσης να παραχθούν από τη γλουτένη, μια φυτική πρωτεΐνη που περιέχεται στους καρπούς αρκετών δημητριακών, όπως το σιτάρι, το κριθάρι και η σίκαλη και παράλληλα είναι παραπροϊόν από την παραγωγή βιοαιθανόλης [14]. Ωστόσο, τα βιοπλαστικά τα οποία λαμβάνονται απευθείας από τη βιομάζα εμφανίζουν λιγότερο ευνοϊκά χαρακτηριστικά όπως η υψηλή υδροφιλία και η έλλειψη θερμοπλαστικότητας συγκριτικά με τα συμβατικά πλαστικά [15]. Για να ξεπεραστούν οι ανεπιθύμητες ιδιότητες των υλικών και οι περιορισμοί χρήσης,

χρησιμοποιούνται επικάλυψη υλικού, ανάμειξη, πρόσθετα νανοσωματιδίων και διαφορετικές χημικές ή φυσικές τροποποιήσεις [14].

1.3.2 Σύνθεση από βιοβασιζόμενα μονομερή

Το πολυγαλακτικό οξύ (PLA) είναι ένας βιοαποικοδομήσιμος αλειφατικός πολυεστέρας, ο οποίος παράγεται με βιομηχανική πολυσυμπύκνωση γαλακτικού οξέος ή μεσώ πολυμερισμού λακτιδίου με άνοιγμα δακτυλίου. Τα βιοϋλικά που βασίζονται σε PLA έχουν παρόμοιες ιδιότητες με τα συμβατικά πλαστικά όπως το νάιλον, το PP και το PET. Για το λόγο αυτό, το PLA είναι επίσης ένα από τα πιο χρησιμοποιούμενα βιοπλαστικά [14]. Οι ερευνητές ανέφεραν ότι η παραγωγή του PLA χρησιμοποιεί 50% λιγότερη πρώτη ύλη πετρελαίου και απελευθερώνει 60% λιγότερο CO₂ από τα συμβατικά πλαστικά [15].

Σε αυτή τη κατηγορία ανήκει και το πολυγλυκολικό οξύ (PGA), ένας βιοαποικοδομήσιμος αλειφατικός πολυεστέρας που μπορεί να συντεθεί με πολυμερισμό γλυκολικού οξέος υπό την επίδραση καταλυτών μεταλλικών αλάτων σε χαμηλή συγκέντρωση. Τα υλικά με βάση το PGA είναι ανθεκτικά στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες, αλλά εξακολουθούν να είναι σχετικά ευαίσθητα στην υδρόλυση. Επί του παρόντος, το PGA χρησιμοποιείται κυρίως σε ιατρικές εφαρμογές, αλλά αναμένεται να έχει ευρύτερη χρήση και σε άλλους τομείς όπως η συσκευασία τροφίμων [14].

1.3.3 Σύνθεση από πετροχημικά προϊόντα

Τα βιοπλαστικά που συντίθενται από πετρελαϊκούς πόρους είναι κατά πολύ ακριβότερα από τα συμβατικά πετροχημικά πλαστικά. Για το λόγο αυτό, αυτά τα υλικά σπάνια χρησιμοποιούνται μόνα τους για εφαρμογές συσκευασίας και συχνά συνδυάζονται με κυτταρίνη ή άμυλο. Ένα παράδειγμα τέτοιου πολυμερούς είναι η πολυβινυλική αλκοόλη (PVOH ή PVA). Το PVOH είναι ένα συνθετικό υδατοδιαλυτό πολυμερές που συντίθεται από πετρελαϊκούς πόρους. Μπορεί να παραχθεί με διαδικασία πολυμερισμού οξικού βινυλίου σε οξικό πολυβινυλεστέρα (PVAC) και επακόλουθης υδρόλυσης. Το PVOH ως υλικό είναι βιοδιασπώμενο, υδρόφιλο και έχει καλή βιοσυμβατότητα [14].

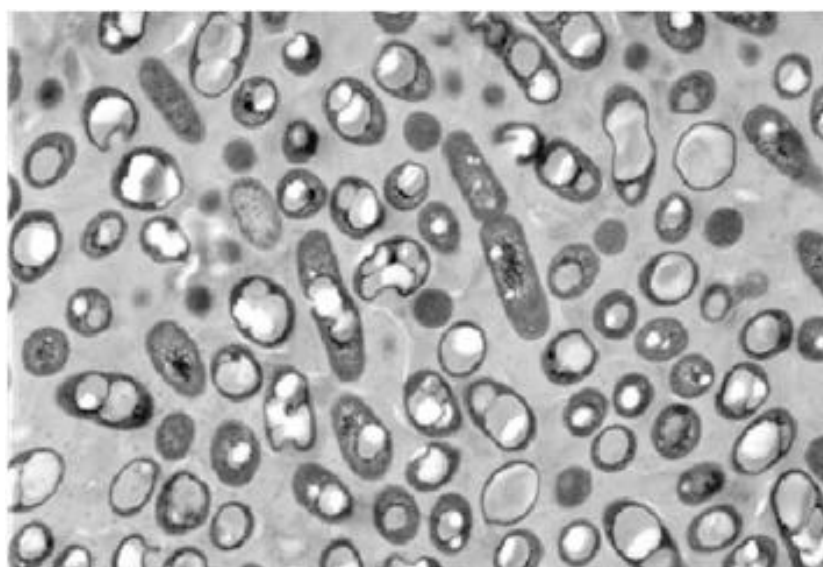
1.3.4 Παραγωγή από φυσικούς ή γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς

Σε αυτή τη κατηγορία ανήκουν τα πολύ-υδροξυαλκανοϊκά πολυμερή (ΠΥΑ). Τα ΠΥΑ είναι φυσικοί πολυεστέρες που συντίθενται από μικροοργανισμούς. Διακρίνονται δύο είδη μικροοργανισμών ικανοί να παράγουν ΠΥΑ. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει μικροοργανισμούς που συσσωρεύουν βιοπλαστικό υπό συνθήκες διατροφικού στρες. Περιορίζοντας κάποιο θρεπτικό συστατικό, όπως το άζωτο, το φώσφορο ή το οξυγόνο, καθώς και συγκεκριμένα μικροθρεπτικά συστατικά, όπως το θείο, το κάλιο, ο κασίτερος, ο σίδηρος και το μαγνήσιο, μπορεί να προκληθεί μετατόπιση του βακτηριακού μεταβολισμού προς την παραγωγή και αποθήκευση βιοπολυμερούς. Όσον αφορά τη δεύτερη ομάδα, δεν απαιτείται διατροφικός περιορισμός και τα ΠΥΑ συσσωρεύονται κατά τη φάση ανάπτυξης στην παρουσία πηγής άνθρακα. Τα ΠΥΑ γενικά συσσωματώνονται σε κοκκώδη μορφή μέσα στα μικροβιακά κύτταρα και αποτελούν έως και το 90% της κυτταρικής μάζας. Κύριο μειονέκτημα είναι το κόστος παραγωγής τους, ωστόσο αυτό δύναται να περιοριστεί χρησιμοποιώντας τροφικά απόβλητα και παραπροϊόντα καθώς αποτελεί μια φθηνή πηγή

άνθρακα [16]. Το 2022, τα ΠΥΑ αντιπροσώπευαν το 3,9% του παγκόσμιου όγκου παραγωγής βιοπλαστικών ενώ αναμένεται να αγγίξει το 8,9% μέχρι το 2027 [17].

1.4. Πόλυ-υδροξυαλκανοϊκά πολυμερή (ΠΥΑ)

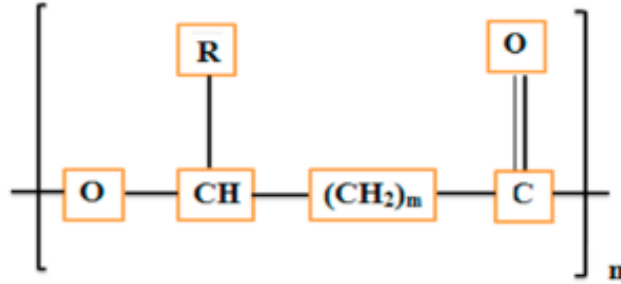
Ο όρος πόλυ – υδροξυαλκανοϊκά πολυμερή (ΠΥΑ) χρησιμοποιείται για να περιγράψει μια κατηγορία πολυεστέρων που παράγονται ως μια μορφή αποθήκευσης άνθρακα και ενέργειας σε βακτηριακά κύτταρα υπό μορφή κόκκων. Η ύπαρξη τέτοιων σωματιδίων παρατηρήθηκε για πρώτη φορά από τον Beijerinck το 1888. Ενώ, 1925 επιβεβαιώθηκε η σύνθεση τους από τον *Bacillus megaterium*. Αρκετά θετικά κατά Gram βακτήρια, αρνητικά κατά Gram βακτήρια, φωτοσυνθετικά βακτήρια και μείγματα διαφορετικών μικροοργανισμών που αναπτύσσουν συμβιωτική σχέση έχουν ταυτοποιηθεί ότι συσσωρεύουν ΠΥΑ τόσο αερόβια όσο και αναερόβια [18].



Σχήμα 1.5: Εικόνα κόκκων ΠΥΑ στο εσωτερικό των κυττάρων με χρήση μικροσκοπίου [19].

1.4.1 Δομή και χαρακτηριστικά των ΠΥΑ.

Ένα μόριο ΠΥΑ αποτελείται από μονομερείς μονάδες του (R)-υδροξυ λιπαρού οξέος. Η βασική δομή των ΠΥΑ φαίνεται στο Σχήμα 1.6. Οι μονομερείς μονάδες συνδέονται μεταξύ τους με έναν εστερικό δεσμό. Κάθε μονομερές έχει μια πλευρική αλυσίδα R, η οποία μπορεί να είναι μια κορεσμένη ή ακόρεστη αλκυλομάδα, υποκατεστημένη αλκυλομάδα και διακλαδισμένη αλκυλομάδα [19]. Το μοριακό βάρος των ΠΥΑ κυμαίνεται μεταξύ 2×10^5 έως 3×10^6 Daltons [18, 20]. Η συνηθέστερη μορφή των ΠΥΑ είναι αυτή όπου η υδροξυ-ομάδα βρίσκεται στο τρίτο άτομο άνθρακα, οπότε και προκύπτουν τα 3 – πολύ – υδροξυαλκανοϊκά. Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις όπου η υδροξυ-ομάδα βρίσκεται στο τέταρτο το πέμπτο ή το έκτο άτομο άνθρακα με αποτέλεσμα τον σχηματισμό των 4 - ή 5 - ή 6 - πολύ-υδροξυαλκανοϊκών αντίστοιχα [20].



Σχήμα 1.6: Γενικός χημικός τύπος ΠΥΑ όπου $m=1, 2$ ή 3 και $n=100$ έως αρκετές χιλιάδες [19].

Στον Πίνακα 1.1 παρουσιάζονται οι βασικότερες πλευρικές αλυσίδες R καθώς και τα παραγόμενα ΠΥΑ.

Πίνακας 1.1: Παραγόμενα ΠΥΑ για τις διαφορετικές δομικές μονάδες.

	Πλευρική αλυσίδα (R)	Παραγόμενα ΠΥΑ
m = 1	H	Πολυ - 3-υδροξυπροπιονικό (3HP)
	CH ₃ –	Πολυ -3-υδροξυβουτιρικό (3HB)
	CH ₃ CH ₂ –	Πολυ - 3-υδροξυβαλερικό (3HV)
	CH ₃ CH ₂ CH ₂ –	Πολυ - 3-υδροξυεξανοϊκό (3HP)
	CH ₃ (CH ₂) ₄ –	Πολυ - 3-υδροξυοκτανοϊκό (3HHx)
	CH ₃ (CH ₂) ₈ –	Πολυ - 3-υδροξυδωδεκανοϊκό (3HDD)
m = 2	H	Πολυ - 4-υδροξυβουτιρικό (4HP)
	CH ₃ –	Πολυ - 4-υδροξυβαλερικό (4HV)
m = 3	H	Πολυ - 5-υδροξυβαλερικό (5HP)
	CH ₃ –	Πολυ - 5-υδροξυβαλερικό (5HV)

Τα ΠΥΑ μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες, ανάλογα τον αριθμό των ατόμων άνθρακα που διαθέτουν τα μονομερή τους. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει τα πολυμερή μικρής ανθρακικής αλυσίδας (scl – PHAs) των οποίων η πλευρική ομάδα αποτελείται από ένα έως 3 άτομα άνθρακα. Τα πολυμερή μεσαίας αλυσίδας (mcl – PHAs) αποτελούν τη δεύτερη κατηγορία και διαθέτουν πλευρικές ομάδες με 3 έως 14 άτομα άνθρακα. Ο διαχωρισμός αυτός οφείλεται στην εξειδίκευση της ΡΗΑ-συνθεσάσης καθώς είναι το κύριο ένζυμο που ευθύνεται για τη βιοσύνθεση των ΠΥΑ καταλύοντας υδροξυοξέα συγκεκριμένου μήκους άνθρακα και ενσωματώνοντάς τα στη σχηματιζόμενη αλυσίδα πολυμερούς [20].

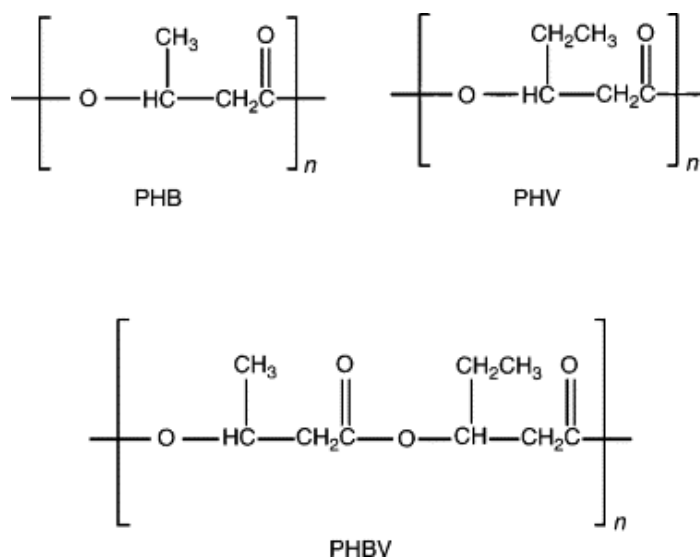
Τα ΠΥΑ μπορούν να διακριθούν και ανάλογα με τη σύστασή τους, σε ομοπολυμερή που περιέχουν μόνο έναν τύπο μονομερούς υδροξυ – οξέων και σε συμπολυμερή που περιέχουν διαφορετικούς τύπους μονομερών υδροξυ - οξέων. Ομοπολυμερή και συμπολυμερή ΠΥΑ μπορούν να παραχθούν ανάλογα με το βακτηριακό είδος και τις συνθήκες ανάπτυξης καθώς και τη πηγή άνθρακα [20].

1.4.2 Ιδιότητες των ΠΥΑ

Φυσικοχημικές και μηχανικές ιδιότητες των ΠΥΑ

Η συνηθέστερη και πλήρως χαρακτηρισμένη μορφή των ΠΥΑ είναι αυτή όπου η υδροξυ-ομάδα βρίσκεται στο τρίτο άτομο άνθρακα, οπότε και προκύπτει το πολύ - 3 - υδροξυβουτυρικό, P3HB. Το P3HB είναι ένα μη τοξικό ομοπολυμερές που περιέχει τέσσερις υπομονάδες άνθρακα 3 - υδροξυβουτυρικού οξέος (3HB). Παρουσιάζει πολλές χρήσιμες ιδιότητες όπως επίσης χαμηλή διαπερατότητα σε οξυγόνο και υψηλή οπτική καθαρότητα. Επιπλέον, είναι αδιάλυτο στο νερό ενώ είναι αρκετά ανθεκτικό στην υγρασία [20],[21]. Ωστόσο, εμφανίζει μεγάλο βαθμό κρυσταλλικότητας καθώς είναι 100% στερεοειδικό με τα ασύμμετρα άτομα άνθρακα να έχουν D(-) διαμόρφωση. Συνεπώς, είναι σχετικά εύθραυστο και άκαμπτο. Προκειμένου να μειωθεί ο βαθμός κρυσταλλικότητας αναζητούνται πλαστικοποιητές και παράγοντες πυρηνοποίησης [21]. Επιπλέον, η επεξεργασία του μέσω έγχυσης με πίεση καθίσταται δύσκολη καθώς το σημείο τήξης του (175°C) είναι ελαφρώς χαμηλότερο από τη θερμοκρασία αποικοδόμησής του (185°C) [22]. Οι φυσικές ιδιότητες αυτού του πολυμερούς θα μπορούσαν να βελτιωθούν με την παραγωγή πολυμερών υψηλού μοριακού βάρους. Έχει βρεθεί ότι ένα πολυμερές υψηλού μοριακού βάρους μπορεί να παραχθεί με ετερόλογη έκφραση του κλωνοποιημένου γονιδίου βιοσύνθεσης ΠΥΑ από το *C. necator* σε ανασυνδυασμένη *Escherichia coli* [20]. Επιπλέον, η θερμική σταθερότητα των PHA μπορεί να βελτιωθεί με την προσθήκη ανόργανων νανοπληρωτικών, συμπεριλαμβανομένων των MMTs και LDHs [18].

Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις όπου η υδροξυ-ομάδα βρίσκεται στο τέταρτο άτομο άνθρακα με αποτέλεσμα τον σχηματισμό του πολύ - 4-υδροξυβουτυρικό, P(4HB). Το P(4HB) από την άλλη πλευρά, είναι ένα ελατό και εύκαμπτο θερμοπλαστικό πολυμερές με αντοχή εφελκυσμού περίπου ισοδύναμη με αυτή του πολυαιθυλενίου [20].



Σχήμα 1.7 Χημική δομή των πολυμερών PHB, PHV και PHBV [23].

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, τα ΠΥΑ είναι μια οικογένεια πολυμερών, συνεπώς, ανάλογα με τη σύνθεση των μονομερών, τα ΠΥΑ εμφανίζουν ποικιλία μηχανικών και χημικών

ιδιοτήτων. Τα πολυμερή μικρής ανθρακικής αλυσίδας είναι άκαμπτα, εύθραυστα και διαθέτουν υψηλό βαθμό κρυσταλλικότητας που κυμαίνεται από 60% έως 80%. Επιπλέον, τα πολυμερή μεσαίας ανθρακικής αλυσίδας, συγκριτικά με τα πολυμερή μικρής αλυσίδας, έχουν χαμηλές θερμοκρασίες τήξης, χαμηλές θερμοκρασίες υαλώδους μετάπτωσης και υψηλότερους λόγους επιμήκυνσης προς θραύση [20,21]. Ενδεικτικά στον Πίνακα 1.2 παρουσιάζονται κάποιες από τις ιδιότητες [24].

Πίνακας 1.2: Ιδιότητες ομοπολυμερών ΠΥΑ μικρού και μεγάλου μήκους αλυσίδας.

Ιδιότητες	scl-Ομοπολυμερές ΠΥΑ (scl-PHAs)	mcl-Ομοπολυμερές ΠΥΑ (mcl-PHAs)
Βαθμός Κρυσταλλικότητας (%)	80	40
Σημείο Τήξης (°C)	179	86
Σημείο Υαλώδους Μετάπτωσης (°C)	4	-40
Τάση Εφελκυσμού (MPa)	5	20
Μέτρο Young (GPa)	3.5	1 – 2
Αντοχή στη θραύση (%)	40	300

Οι ιδιότητες των ΠΥΑ διαφέρουν σημαντικά ανάμεσα στα ομοπολυμερή και τα συμπολυμερή. Η ενσωμάτωση διαφορετικών μονομερικών μονάδων, όπως 3 – υδροξεξανοϊκό (3HHx), 4 υδροξυβουτυρικό (4HB), 3 – υδροξυοκτανοϊκό (3HO), 3 – υδροξυδεκανοϊκό (3HD), και 3 – υδροξυδωδεκανοϊκό (3HDD), με 3 – υδροξυβουτυρικό (3HB) οδηγεί σε διαφορετικές ιδιότητες. Για παράδειγμα τα συμπολυμερή που περιέχουν ένα μείγμα υπομονάδων μήκους τεσσάρων και πέντε ανθρακικών αλυσίδων μπορούν να παραχθούν μέσω βακτηριακών καλλιεργειών χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα το βαλερικό οξύ. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό μονομερών ΠΥΑ που περιέχουν 3 – υδροξυβαλερικό (3HV). Το συμπολυμερές PHBV που περιέχει 3 – υδροξυβαλερική μονάδα HV έχει βελτιωμένες μηχανικές ιδιότητες καθώς είναι σκληρό και πιο εύκαμπτο [20,21]. Επιπλέον, το σύνολο των βιβλιογραφικών πηγών συμφωνεί ότι η αύξηση της περιεκτικότητας σε HV σε ένα συμπολυμερές PHBV οδηγεί σε μείωση του σημείου τήξης ενώ η θερμοκρασία αποδόμησης παραμένει εντός αποδεκτών ορίων επιτρέποντας έτσι τη θερμική επεξεργασία του συμπολυμερούς [18,19,20]. Η προσθήκη μονάδας 3 – υδροξεξανοϊκού (3HHx) προς την παραγωγή του P(3HB-co-3HHx) οδηγεί σε αυξημένη αντοχή, ευκαμψία, ολκιμότητα, σκληρότητα, ελαστικότητα. Ακόμη έχει αποδειχθεί ότι η εισαγωγή περισσότερων από δύο μονομερικών μονάδων οδηγεί σε βελτιωμένες ιδιότητες. Για παράδειγμα το παραγόμενο τριπολυμερές P(3HB-co-3HV-co-3HHx) με 39 mol% 3HV και 3 mol% 3HHx παρουσιάζει χαμηλή κρυσταλλικότητα, ενώ βελτιωμένες είναι η αντοχή εφελκυσμού 12 MPa και επιμήκυνση στη θραύση 408%. Συμπερασματικά τα συμπολυμερή ΠΥΑ έχουν καλύτερες φυσικές και μηχανικές ιδιότητες οι οποίες μπορούν να μεταβληθούν με αλλαγή της σύστασης [20]. Στον Πίνακα 1.3 παρουσιάζονται οι διαφορετικές ιδιότητες των ΠΥΑ.

Πίνακας 1.3 Ιδιότητες ομοπολυμερών και συμπολυμερών ΠΥΑ [20].

Πολυμερές	Σύσταση	Μέτρο Ελαστικότητας (GPa)	Τάση Εφέλκυσμού (MPa)	Επιμήκυνση κατά τη θραύση (%)	Σημείο Τήξης (°C)	Σημείο Υαλώδους Μετάπτωσης (°C)
P(3HB-co-3HV)	0% mol 3HV	3,5 – 4	40	3 – 8	173 – 180	5 – 9
	9% mol 3HV	1,9	37	-	162	-
	14% mol 3HV	1,5	35	-	150	-
	25% mol 3HV	0,7	32	-	137	-
P(3HO)	-	-	6 – 10	300 – 450	61	-
P(3HHx-co-3HO)	-	-	10	300	61	-
P(3HB-co-3HHx)	-	-	20	850	52	-4
P(3HB – Co – 3HA)	6% mol HA	0,3	17	680	133	-8
P(4HB)	-	149	104	1000	53	-50

Βιολογικές ιδιότητες των ΠΥΑ

Τα ΠΥΑ πλεονεκτούν επιπλέον λόγω των βιολογικών ιδιοτήτων τους. Μέσα σε αυτές συμπεριλαμβάνονται η ικανότητα τους να βιοαποικοδομούνται, η δυνατότητα παραγωγής του από ανανεώσιμες πηγές και η βιοσυμβατότητα τους.

Η βιοαποδομησιμότητα οποιουδήποτε υλικού αναφέρεται στην αποδόμηση του υλικού από τη δράση μικροοργανισμών όπως τα βακτήρια, μύκητες και φύκια προς την δημιουργία τελικά CO₂ και H₂O. Οσον αναφορά τα ΠΥΑ ο ρυθμός βιοαποδόμησης επηρεάζεται από τη μοριακή μάζα, τη σύνθεση του πολυμερούς, τη κρυσταλλικότητα, τη στερεοχημεία, την υδρόφιλα και κινητικότητα αλυσίδας καθώς και από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως ο μικροβιακός πληθυσμός, η θερμοκρασία, η υγρασία, το pH και η ύπαρξη θρεπτικών ουσιών. Τα ΠΥΑ και έχουν την δυνατότητα να βιοαποικοδομούνται στο έδαφος, στο θαλάσσιο περιβάλλον και με βιομηχανική κομποστοποίηση τόσο σε αερόβιες όσο και σε αναερόβιες συνθήκες. Γενικά, όσο υψηλότερη είναι η κρυσταλλικότητα και το σημείο τήξης του πολυμερούς, τόσο χαμηλότερος είναι ο ρυθμός αποικοδόμησης. Συνεπώς, το συμπολυμερές PHBV με αυξημένη περιεκτικότητα σε HV αποδομείται ταχύτερα [18]. Η αποδόμηση συμβαίνει πιο γρήγορα στα αναερόβια λύματα και πιο αργά στο θαλασσινό νερό. Ενδεικτικά αναφέρεται το συμπολυμερές PHBV το οποίο αποδομήθηκε πλήρως μετά από 6 εβδομάδες σε αναερόβια λύματα, μετά από 75 εβδομάδες στο έδαφος και μετά από 350 εβδομάδες στο θαλασσινό νερό [22].

Η βιοσυμβατότητα ορίζεται από την έλλειψη οποιουδήποτε επιβλαβούς μορίου που παράγεται κατά τη διάσπαση του πολυμερούς, καθώς και από τη μορφή του υλικού και το

επιφανειακό πορώδες. Το P(3HB) είναι φυσικό συστατικό του αίματος και υπάρχει στην κυτταρική μεμβράνη των ευκαρυωτών συνεπώς χαρακτηρίζεται ως είναι βιοσυμβατό.

Η παραγωγή των ΠΥΑ μέσω ζύμωσης βασίζεται σε γεωργικά υποπροϊόντα και τροφικά απόβλητα με χρήση των σακχάρων και λιπαρών οξέων ως πηγές άνθρακα και ενέργειας. Ωστόσο, αυτά τα προϊόντα προέρχονται από CO₂ και H₂O. Τελικά, παράγονται τα βιοαποικοδομήσιμα ΠΥΑ, όπου όπως αναφέρεται και παραπάνω στο τέλος του κύκλου ζωής τους μετατρέπονται και αυτά σε CO₂ και H₂O. Έτσι, ενώ η βιοαποικοδομησιμότητα είναι κρίσιμη για κάποιες εφαρμογές, τα ΠΥΑ τραβούν την προσοχή επειδή βασίζονται σε ανανεώσιμες πηγές αντί στις μειωμένες αποθήκες ορυκτών καυσίμων [20].

1.4.3. Βιομηχανική παραγωγή ΠΥΑ

Οι πρώτες προσπάθειες για την εμπορευματοποίηση του PHB έγιναν το 1950 από την W.R. Grace Co., μια βορειοαμερικανική εταιρεία. Ωστόσο, αυτό δεν επιτεύχθηκε λόγω της μικρής παραγωγής καθώς και της έλλειψης κατάλληλης μεθόδου καθαρισμού. Το 1970, η Imperial Chemical Industries (ICI, UK) άρχισε να κατασκευάζει πολυμερή ΠΥΑ με την εμπορική ονομασία BIOPOL® με χρήση του μικροοργανισμού *Cupriavidus necator* NCIB11599 από διάφορα υποστρώματα άνθρακα όπως βουτυρολακτόνη. Σήμερα, υπάρχουν αρκετές εταιρείες οι οποίες συμμετέχουν στην βιομηχανία παραγωγής ΠΥΑ όπως παρουσιάζονται και στον Πίνακα 1.4.

Πίνακας 1.4: Βιομηχανική παραγωγή ΠΥΑ σε παγκόσμιο επίπεδο [25].

Εταιρία	Εμπορική Ονομασία Προϊόντος	Είδος Πολυμερούς
Biomer, Γερμανία	Biomer	P3HB
Danimer Scientific, ΗΠΑ	Nodax	PHB
Polyferm Canada, Καναδάς	VersaMer	mcl-PHA
Kaneka Corporation, Ιαπωνία	Green Planet	PHBH
Tianan Biologic, Κίνα	ENMAT	PHBV
Tianjin GreenBio Materials, Κίνα	Sogreen	P3HB-co-4HB
Tepha Inc., ΗΠΑ	TephaFLEX	P4HB, P3HB-co-4HB

Σημειώνεται ότι παραγωγή ΠΥΑ σε μεγάλη κλίμακα περιορίζεται κυρίως λόγω του υψηλού κόστους παραγωγής σε σύγκριση με τα συμβατικά πλαστικά. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι το κόστος παραγωγής των ΠΥΑ, ανάλογα με τη σύνθεση, κυμαίνεται από 2,2/kg έως 5,0 €/kg ενώ, το κόστος με την χρήση πετροχημικών προϊόντων, υποτριπλασιάζεται δηλαδή απαιτούνται λιγότερα από 1,0 €/kg [25].

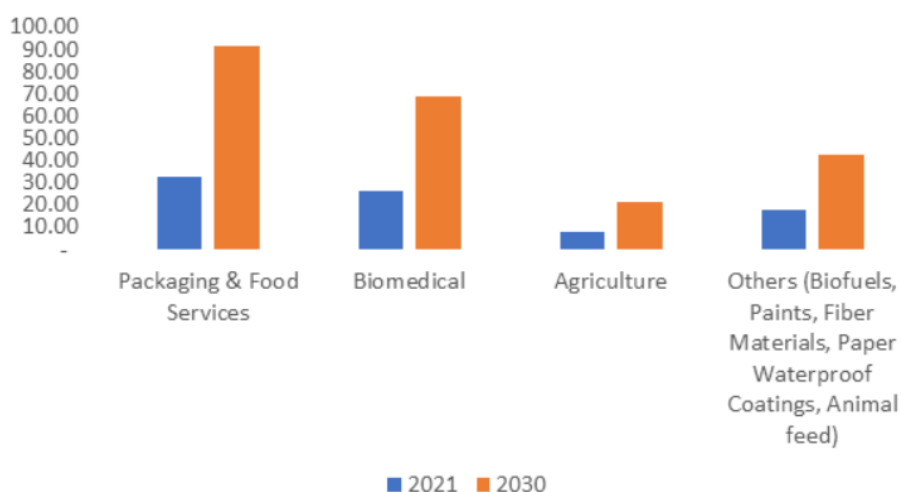
Έχουν εντοπιστεί τρεις βασικοί παράγοντες για την αξιολόγηση του κόστους παραγωγής των ΠΥΑ. Αυτοί είναι, η ενέργεια που χρησιμοποιείται για την αποστείρωση του εξοπλισμού ζύμωσης, η απόδοση των ΠΥΑ στο υπόστρωμα και η αποτελεσματικότητα της μεταγενέστερης επεξεργασίας καθαρισμού (Downstream Processing, DSP). Για τη μείωση του κόστους αποστείρωσης του εξοπλισμού, προτείνεται η χρησιμοποίηση μικτών

καλλιεργειών αντί μονοκαλλιεργειών καθώς δεν απαιτούνται ασηπτικές συνθήκες. Ένα ακόμη παράδειγμα μείωσης κόστους αποτελεί και η χρήση ανασυνδυασμένου *Escherichia coli* έναντι του φυσικού παραγωγού *Alcaligenes eutrophus* μειώνοντας το κόστος κατά 70% καθώς και η χρήση φθηνών οργανικών υποστρωμάτων που λαμβάνονται από τα βιοαπόβλητα. Η διαδικασία εκχύλισης και καθαρισμού των ΠΥΑ αποτελεί έως και το 60 % του κόστους παραγωγής. Ως εναλλακτική λύση χρησιμοποιήθηκε υψηλή πίεση και θερμότητα για την προεπεξεργασία της βιομάζας. Όπως γίνεται αντιληπτό η μείωση του κόστους παραγωγής αποτελεί ένα πολυπαραγοντικό πρόβλημα το οποίο πρέπει συνυπολογιστεί με τα περιβαλλοντικά κριτήρια και την μέγιστη δυνατή απόδοση ώστε να μπορούν να είναι τα ΠΥΑ ανταγωνιστικά με τα συμβατικά πλαστικά [26].

Ωστόσο, λόγω της αυξημένης παγκόσμιας ζήτησης για βιοαποδομήσιμα πλαστικά συνδυαστικά με κανονισμούς κατά των πλαστικών μιας χρήσης η αξία στην παγκόσμια αγορά των ΠΥΑ αναμένεται να αυξηθεί στα 121 εκατομμύρια δολάρια έως το 2025. Η αύξηση αυτή είναι σχεδόν διπλάσια από το 2020 όπου η αγοραστική αξία ανερχόταν στα 62 εκατομμύρια δολάρια [27].

1.4.5. Εφαρμογές των ΠΥΑ

Μέχρι τώρα έχουν εντοπιστεί 150 διαφορετικοί τύποι ΠΥΑ με ποικίλες ιδιότητες όπως αναφέρεται και παραπάνω γεγονός που τα καθιστούν συμβατά σε πολλές διαφορετικές εφαρμογές [18]. Οι κύριοι τομείς εφαρμογών αποτελούν η συσκευασία, η ιατρική, η γεωργία και τα βιοκαύσιμα, με τη συσκευασία να καταλαμβάνει το μεγαλύτερο ποσοστό όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 1.8.



Σχήμα 1.8: Μέγεθος της αγοράς των ΠΥΑ ανά εφαρμογή το 2021 και το 2030 [28].

Τα ΠΥΑ σε ιατρικές εφαρμογές

Τα ΠΥΑ όπως έχει αναφερθεί είναι βιοαποικοδομήσιμα και βιοσυμβατά γεγονός που τα καθιστά αποτελεσματικά βιοπροϊόντα για τη χορήγηση φαρμάκων. Συγκριτικά με άλλα βιοπολυμερή που χρησιμοποιούνται για την χορήγηση φαρμάκων όπως το PLA, τα ΠΥΑ πλεονεκτούν λόγω της πλευρικής αλυσίδας που καθορίζει τις θερμικές και φυσικές ιδιότητες,

επηρεάζοντας έτσι τη φόρτωση και την απελευθέρωση του φαρμάκου. Η απελευθέρωση του φαρμάκου από το πολυμερικό υλικό συμβαίνει μέσω μηχανισμού ώσμωσης, διάχυσης ή βιοαποδόμησης, όπως και στα φυσικά πολυμερή. Μια επίσης χρήσιμη ιδιότητα των ΠΥΑ είναι η ικανότητά τους να υποστηρίζουν τον πολλαπλασιασμό και την προσκόλληση των κυττάρων. Τα αντιφλεγμονώδη φάρμακα όπως η δικλοφενάκη και η δεξαμεθαζόνη που ενθυλακώνονται εντός των ΠΥΑ επιταχύνουν τις διαδικασίες επούλωσης πληγών. Περισσότερες εφαρμογές των ΠΥΑ για ιατρικούς σκοπούς παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.5. Το κυριότερο εμπόδιο που πρέπει να ξεπεραστεί στη περίπτωση που απαιτείται κλιμάκωση της παραγωγής για ιατρικές εφαρμογές, είναι ο καθαρισμός του αφού απαιτείται 100% καθαρότητα [26].

Πίνακας 1.5: Είδη πολυμερών ΠΥΑ και εφαρμογές τους στην ιατρική [29].

Βιο-πολυμερές	Λειτουργία
P(3HHxco-3HO)]	Αγγειακό μόσχευμα, καρδιακές βαλβίδες
[P(3HB)], [P(HB-coHV-coHHx)]	Προσκόλληση και πολλαπλασιασμός πάνω σε μεμβράνες PHA
[P(3HB-co3HV)]	Ράμματα, εμφυτεύσιμο έμπλαστρο, μηχανική τεχνητών οστών και ιστών
[P(3HB)]	Επιδιόρθωση νευρικών ιστών, ράμματα, περικαρδιακό έμπλαστρο

Εφαρμογές των ΠΥΑ στη βιομηχανία συσκευασίας

Από τις πιο σημαντικές εφαρμογές των ΠΥΑ αποτελούν αυτές στη βιομηχανία της συσκευασίας. Η κατασκευή υλικών συσκευασίας τροφίμων είναι πολύ σημαντική καθώς πρέπει να διασφαλιστεί ότι τα τρόφιμα δεν υποβαθμίζονται. Επιπλέον, βοηθά στην αυξημένη διάρκεια ζωής των προϊόντων διασφαλίζοντας ότι το προϊόν είναι ασφαλές από εξωτερικές αλλά και εσωτερικές επιδράσεις. Η εφαρμογή των ΠΥΑ στη βιομηχανία συσκευασίας έχει αυξηθεί με την πάροδο των ετών. Ανεξάρτητα από το υψηλό τους κόστος που έχει ως αποτέλεσμα την περιορισμένη παραγωγή του. Γενικά θεωρείται ότι είναι μια καλή εναλλακτική λύση στα συνθετικά μη αποικοδομήσιμα πολυμερή. Επιπλέον, υπολογίζεται ότι η παραγωγή ΠΥΑ στη βιομηχανία της συσκευασίας θα τριπλασιαστεί όπως παρουσιάζεται και στο Σχήμα 1.8 [26].

Εφαρμογές των ΠΥΑ στη γεωργία

Οι σάκοι καλλιέργειας σταθεροποιούν τη θερμοκρασία στο έδαφος, διατηρούν την υγρασία του εδάφους και επιτρέπουν επίσης τη συγκεκριμένη χρήση καλλιεργητικών μέσων. Η χρήση μη βιοαποδομήσιμων σάκων έχει απαγορευθεί. Συνεπώς μια φιλική προς το περιβάλλον εναλλακτική λύση αποτελεί το πολυαιθυλένιο χαμηλής πυκνότητας (LDPE) [26]. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία τα ΠΥΑ είναι κατάλληλα για την κατασκευή τέτοιων προϊόντων καθώς τα ΠΥΑ μεσαίας αλυσίδας έχουν χαρακτηριστικά παρόμοια με το LDPE [29]. Μια άλλη εφαρμογή είναι η χρήση τους ως βιοπλαστικά λιπάσματα (BpF). Τα βιοπλαστικά λιπάσματα χρησιμοποιούνται εδώ και δεκαετίες στη γεωργική βιομηχανία. Η γεωργική εφαρμογή του

νανοσύνθετου βιοπλαστικού γίνεται στη σύνθεση λιπασμάτων βραδείας αποδέσμευσης, που χρησιμοποιεί ως επικάλυψη τα ΠΥΑ. Ένα παράδειγμα αποτελεί η ενσωμάτωση λιπασμάτων σε βιοπλαστικούς κόκκους [26].

Τα ΠΥΑ ως πηγή βιοκαυσίμων

Τα ΠΥΑ μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοκαύσιμα μέσω μιας αντίδρασης μεθυλεστεροποίησης. Οι παραγόμενοι υδροξυαλκανοϊκοί εστέρες είναι παρόμοιοι με τους μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων μακράς αλυσίδας του βιοντίζελ συνεπώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως πρόσθετα. Η εστεροποίηση των ΠΥΑ μικρού μήκους και μεγάλου μήκους αλυσίδας με μεθανόλη δίνει υδροξυβουτυρικούς μεθυλεστέρες (HBME) και υδροξυαλκανοϊκούς μεθυλεστέρες (HAME) [26]. Ως μέτρο αξιολόγησης των καυσίμων χρησιμοποιείται η θερμότητα καύσης. Η τιμή θερμότητας καύσης του HBME είναι 20 kJ/gr ενώ είναι 30 kJ/ gr στην περίπτωση του HAME. Βρέθηκε επιπλέον ότι όταν το HBME αναμιγνύεται με αιθανόλη, η θερμότητα καύσης της αιθανόλης μπορεί να αυξηθεί έως και 30%. Ωστόσο, η θερμότητα της καύσης μειώθηκε όταν το HBME αναμιγνύεται με βενζίνη και ντίζελ. Η χρήση των ΠΥΑ για την παραγωγή βιοκαυσίμων είναι πολλά υποσχόμενη καθώς δεν απαιτεί ΠΥΑ υψηλής καθαρότητας γεγονός που βοηθάει στη μείωση του κόστους παραγωγής. Επιπλέον, καθώς τα ΠΥΑ μπορούν να παραχθούν από τα αστικά ή βιομηχανικά λύματα αφενός δεν ανταγωνίζονται με τις ανθρώπινες ή ζωικές πηγές τροφίμων και αφετέρου πραγματοποιείται ταυτόχρονα παραγωγή ενέργειας και επεξεργασία των λυμάτων [29].

1.5. Παραγωγή ΠΥΑ

Τα ΠΥΑ παράγονται κυρίως μικροβιακά και ενζυμικά. Με χρήση ενζύμων η διεργασία ανάκτησης είναι απλούστερη, αλλά απαιτείται ανακύκλωση των ενζύμων, το οποίο αυξάνει σημαντικά το κόστος. Έχει υπολογιστεί ότι το κόστος παραγωγής του PHB μέσω ενζυματικών αντιδράσεων είναι της τάξης των 286.000 USD/gr, έναντι 0,0025 USD/gr με χρήση μικροοργανισμών. Επιπλέον, δεν υπάρχει μεγάλη διαθεσιμότητα βιομηχανικών τεχνολογιών, για παραγωγή μεγάλης κλίμακας με χρήση ενζύμων συγκριτικά με τη χρήση μικροβιακών καλλιεργειών. Τα ΠΥΑ μπορούν επίσης να παραχθούν και χημικά, είτε μέσω της αντίδρασης πολυσυμπυκνωσης των α- και β-υδροξυοξέων, είτε μέσω πολυμερισμού με άνοιγμα δακτυλίου (ROP). Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας μελετάται η μικροβιακή παραγωγή των ΠΥΑ [30,31].

1.5.1. Παραγωγή ΠΥΑ από καθαρές καλλιέργειες

Τα ΠΥΑ μπορούν να παραχθούν από καθαρές καλλιέργειες. Όπως έχει ήδη αναφερθεί διακρίνονται δυο κατηγορίες μικροοργανισμών που συσσωρεύουν ΠΥΑ ανάλογα με τις συνθήκες καλλιέργειας υπό τις οποίες τα βακτήρια μπορούν συσσωρεύουν τα ΠΥΑ. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει αυτούς που απαιτούν τη έλλειψη κάποιου θρεπτικού συστατικού ενώ στη δεύτερη δεν απαιτείται κάποιος περιορισμός [16]. Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας μελετώνται οι ΠΥΑ που παράγονται από τη πρώτη κατηγορία. Η πιο απλή μέθοδος παραγωγής περιλαμβάνει δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο εισάγεται εμβόλιο βακτηρίων σε στειρό διάλυμα θρεπτικών ιχνοστοιχείων και μετάλλων με κατάλληλη πηγή άνθρακα καθώς και απαραίτητα θρεπτικά συστατικά. Σε αυτό το στάδιο συντελείται η φάση

ανάπτυξης. Στο δεύτερο στάδιο, περιορίζεται ένα θρεπτικό συστατικό, όπως το άζωτο ή ο φωσφόρος ώστε να επιτευχθεί η διαδικασία συσσώρευσης των ΠΥΑ [32]. Σημειώνεται ότι διεργασίες με τη χρήση καθαρών καλλιιεργειών εφαρμόζονται σε βιομηχανική κλίμακα σε πολλούς τομείς όπως τα φάρμακα τα τρόφιμα και τα καλλυντικά. Απαραίτητη προϋπόθεση για την επιτυχία των καθαρών καλλιιεργειών αποτελεί η χρήση υποστρωμάτων υψηλής καθαρότητας, το οποίο είναι και το κυριότερο μειονέκτημα καθώς αυξάνει αρκετά το κόστος. Έχει υπολογιστεί ότι μπορεί να αγγίξει το 45% του συνολικού κόστους παραγωγής. Το τελικό προϊόν που παράγεται εξαρτάται από τη πηγή άνθρακα που χρησιμοποιείται καθώς και τον ίδιο τον μικροοργανισμό που επιλέγεται. Στη βιβλιογραφία πολύ καλά χαρακτηριστικά συναντώνται σε μικροοργανισμούς που απομονώνονται από περιβάλλοντα υπεραλατότητας, μειώνοντας το κόστος παραγωγής. Επιπλέον, προκειμένου να βελτιωθεί η παραγωγή των ΠΥΑ και να γίνουν πιο ανταγωνιστικά στην αγορά, εφαρμόζονται τεχνικές της μεταβολικής μηχανικής για την βελτίωση του κλασσικού στελέχους [33].

1.5.2. Παραγωγή από Μικτές καλλιιεργειες

Τη τελευταία δεκαετία παρατηρείται μια αυξητική τάση για την ανάπτυξη μικτών μικροβιακών κοινοτήτων (MMK). Οι MMK είναι κοινοπραξία διαφορετικών μικροοργανισμών που αναπτύσσονται στο ίδιο μέσο καλλιιεργειας, αναπτύσσοντας συχνά συμβιωτικές σχέσεις. Κύριο πλεονέκτημα που παρουσιάζουν οι MMK είναι η μείωση το κόστους, καθώς δεν απαιτούνται αποστειρωμένες συνθήκες. Επιπλέον, οι MMK έχουν τη δυνατότητα να καταναλώσουν ένα ευρύτερο φάσμα πηγών άνθρακα, όπως γεωργικά και βιομηχανικά απόβλητα [33]. Παράλληλα, με τη χρήση των MMK είναι πιο εύκολο να παραχθούν συμπολυμερή καθώς χρειάζεται μικρότερη ποσότητα συν-υποστρωμάτων, συγκριτικά με τις μονοκαλλιιεργειες. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι μικτές καλλιιεργειες περιέχουν μια ποικιλία οργανισμών που είναι πιθανό να χρησιμοποιούν περισσότερα μονοπάτια παραγωγής ΠΥΑ [32,34]. Στα μειονεκτήματα συμπεριλαμβάνεται η χαμηλή περιεκτικότητα σε ΠΥΑ συγκριτικά με τις καθαρές καλλιιεργειες. Επίσης οι κυτταρικές πυκνότητες που επιτυγχάνονται είναι χαμηλότερες, συχνά μικρότερες από 10 g/L, σε σύγκριση με πυκνότητες κυττάρων που μπορεί να υπερβούν τα 150 g/L, σε βιομηχανική κλίμακα από καθαρά συστήματα καλλιιεργειας. Ωστόσο, μικτές και καθαρές καλλιιεργειες επιτυγχάνουν παρόμοια παραγωγικότητα έως και 1,2 g_{PHA}/L/h καθώς και υψηλές αποδόσεις ΠΥΑ έως και 0,8 mol_{PHA} /mol υποστρώματος [34].

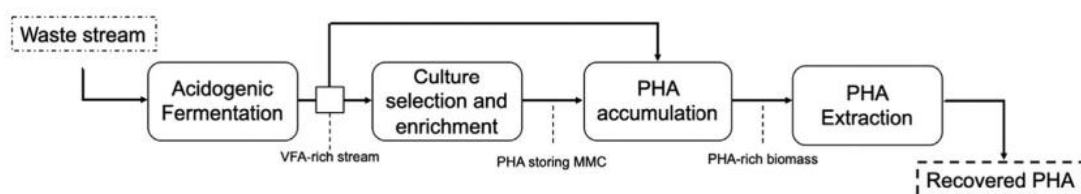
Για την παραγωγή βιοπλαστικού μπορούν να εφαρμοστούν εναλλασσόμενες αερόβιες/αναερόβιες συνθήκες. Σε αυτή την περίπτωση συμμετέχουν δύο τύποι μικροοργανισμών που συσσωρεύουν πολυφωσφορικά άλατα και γλυκογόνο (PAOs και GAOs) σε μορφή ΠΥΑ κατά την αναερόβια φάση. Οι PAOs χρησιμοποιούν την ενέργεια που αποθηκεύεται ως πολυφωσφορικά άλατα για την αποθήκευση εξωγενούς υποστρώματος, με τη μορφή ΠΥΑ, έτσι ώστε όταν δεν υπάρχει αποδέκτης ηλεκτρονίων (οξυγόνο ή νιτρικά) να διατίθεται για την παραγωγή ενέργειας. Οι GAOs αποθηκεύουν προϊόντα ζύμωσης στο εσωτερικό του κυττάρου, αντί της έκκρισης αυτών. Στην αερόβια φάση, οι μικροοργανισμοί καταναλώνουν το εσωτερικά αποθηκευμένο ΠΥΑ, χρησιμοποιώντας το διαθέσιμο οξυγόνο. Τα ΠΥΑ υδρολύονται και το προκύπτον ακετυλο - CoA χρησιμοποιείται στον κύκλο TCA για ανάπτυξη, και παραγωγή ενέργειας [35]. Αυτό σημαίνει ότι η συσσώρευση του γλυκογόνου ή πολυφωσφορικών, περιορίζουν την ικανότητα παραγωγής σε ΠΥΑ. Η μέγιστη

περιεκτικότητα σε ΠΥΑ που έχει αναφερθεί είναι 20% ωστόσο τελευταίες μελέτες στρέφονται στη παραγωγή του σε εναλλασσόμενες συνθήκες χωρίς την εξάρτηση από τα αποθέματα γλυκογόνου και φωσφορικών. Μέσω τέτοιων πειραμάτων λαμβάνονται ποσοστά ΠΥΑ 60%, ωστόσο απαιτείται περισσότερη διερεύνηση [33].

Τα τελευταία χρόνια η πιο μελετημένη μέθοδος αποτελεί η Αερόβια Δυναμική Σίτιση (ADF) [33]. Αυτή η διαδικασία πραγματοποιείται μέσω του εμπλουτισμού της βιομάζας και περιλαμβάνει την έκθεση της σε εναλλασσόμενα περιβάλλοντα επάρκειας και περιορισμού τροφής (feast/famine). Όταν οι οργανικές ουσίες είναι σε περίσσεια, οι οργανισμοί είναι σε θέση να αποθηκεύουν το πλεόνασμα άνθρακα σε μορφή ΠΥΑ. Ενώ, κατά τη φάση του περιορισμού η έκφραση των ενζύμων που σχετίζονται με την ανάπτυξη μειώνεται. Τα βακτήρια που είναι ικανά να συνθέτουν ΠΥΑ μπορούν να επιβιώσουν αλλάζοντας το μεταβολισμό τους, προκειμένου να καταναλώσουν το συσσωρευμένο ΠΥΑ στα κύτταρά τους. Σε αντίθεση, τα βακτήρια που δεν έχουν την ικανότητα να συσσωρεύουν ΠΥΑ είναι δύσκολο να επιβιώσουν στην φάση αυτή. Έτσι, στο τέλος κάθε κύκλου τα βακτήρια τα οποία δεν επιβίωσαν απομακρύνονται. Το βήμα εμπλουτισμού της καλλιέργειας είναι πολύ κρίσιμο καθώς οι μικροοργανισμοί που έχουν τη δυνατότητα να επιβιώσουν μπορούν να επηρεάζουν την απόδοση και τη σύνθεση των ΠΥΑ [36]. Σε MMK είναι απαιτούμενη η παροχή ενέργειας για τη συντήρηση και την ανάπτυξη των κυττάρων καθώς και την συσσώρευση των ΠΥΑ μέσω της παροχής υποστρωμάτων άνθρακα με συμπλήρωμα άλλων θρεπτικών συστατικών όπως άζωτο, φωσφόρο και θείο και ιχνοστοιχείων όπως μαγνήσιο, σίδηρος, κάλιο και μαγγάνιο στο θρεπτικό μέσο [37].

Η διαδικασία παραγωγής ΠΥΑ από MMK μέσω της ADF τυπικά περιλαμβάνει τρία βήματα και παρουσιάζεται στο Σχήμα 1.9. Να σημειωθεί ότι σε αυτή τη διαδικασία είναι δυνατό να παραληφθεί το πρώτο βήμα στην περίπτωση που οι οργανικές ενώσεις που βρίσκονται στο χρησιμοποιούμενο απόβλητο δεν απαιτούν προεπεξεργασία και είναι σε θέση να αποθηκευτούν ως ΠΥΑ σε μια μικτή καλλιέργεια [36].

1. Παραγωγή πρώτης ύλης εμπλουτισμένης με άμεσα βιοαποδομήσιμες οργανικές ουσίες με μεθόδους προεπεξεργασίας.
2. Εμπλουτισμός της MMK με στελέχη υψηλής παραγωγικότητας και συσσώρευσης ΠΥΑ
3. Συσσώρευση



Σχήμα 1.9: Τα τρία στάδια της διαδικασίας παραγωγής ΠΥΑ μέσω MMK [36].

Τα πτητικά λιπαρά οξέα μπορούν εύκολα να αποθηκευτούν ως ΠΥΑ από μικτές καλλιέργειες, επομένως οι περισσότερες μελέτες για την παραγωγή ΠΥΑ με μεικτές καλλιέργειες έχουν διεξαχθεί με τη χρήση οργανικών οξέων όπως οξικό, προπιονικό, βουτυρικό, καπροϊκό και βαλερικό ως πηγή άνθρακα. Όπως γίνεται αντιληπτό από τα παραπάνω με τη χρήση των

πητικών λιπαρών οξέων μπορεί να παραχθεί ένα ευρύ φάσμα ΠΥΑ μονομερείς μονάδες όπως το 3-υδροξυβαλερικό (3HV), το 3-υδροξυ-2-μεθυλοβουτυρικό (3H2MB), το 3-υδροξυ-2-μεθυλοβαλερικό (3H2MV) και το 3-υδροξυεξανοϊκό (3-HHx) [32].

Τα πτητικά λιπαρά οξέα πλεονεκτούν από μεταβολική άποψη συγκριτικά με τη γλυκόζη, καθώς η πλήρης οξείδωσή τους παράγει περισσότερη ισοδύναμη χημική ενέργεια [32]. Μία από τις πιο μελετημένες και πιο χρήσιμες πηγές άνθρακα αποτελεί το οξικό οξύ καθώς έχει αποδειχθεί ότι η παρουσία του βοηθάει την κατανάλωση βουτυρικού και προπιονικού λόγω της επανενεργοποίησης του ακετυλο-CoA [38]. Επιπλέον, σημαντικό να αναφερθεί είναι ότι ο διαφορετικά είδη μικροοργανισμών έχουν διαφορετική ικανότητά στο να καταβολίζουν συγκεκριμένα υποστρώματα. Για παράδειγμα το γένος *Paracoccus* είχε καταβολίζει ευκολότερα μείγματα που περιέχουν σε μεγαλύτερο ποσοστό οξικό ή βουτυρικό οξύ. Ενώ, το γένος *Thaueria* καταβολίζει ευκολότερα προπιονικό οξύ [36].

1.5.3. Παράμετροι επιρροής της συσσώρευσης

Θερμοκρασία και pH

Έχει μελετηθεί η επίδραση της θερμοκρασίας και φαίνεται ο ρυθμός σχηματισμού PHB να μειώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας λόγω της αύξησης του αναβολικού ρυθμού σε υψηλότερες θερμοκρασίες [39]. Αναφορικά με το pH, για το βήμα του εμπλουτισμού pH από 5,9 έως 9,0 αναφέρεται ότι είναι κατάλληλο για την ανάπτυξη ενώ στο βήμα συσσώρευσης το βέλτιστο pH είναι στην περιοχή 7,5– 8,5 [36].

Επίδραση πηγής άνθρακα

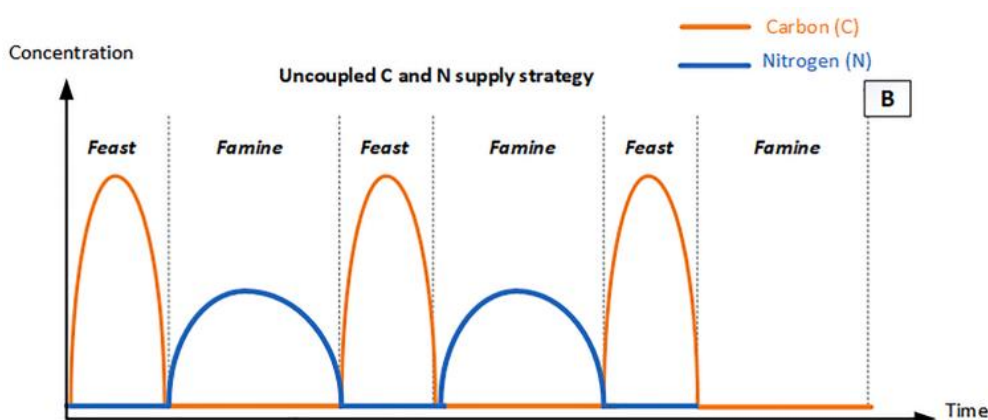
Η σύνθεση και τα χαρακτηριστικά της πρώτης ύλης μπορούν να επηρεάσουν την συνολική απόδοση παραγωγής των ΠΥΑ καθώς πρώτες ύλες με περίπλοκη δομή δεν μπορούν να καταναλωθούν άμεσα στις μεταβολικές οδούς και απαιτούν προεπεξεργασία [25]. Επιπλέον, η σύσταση της χρησιμοποιούμενης πρώτης ύλης καθορίζει και το είδος των ΠΥΑ το οποίο θα παραχθεί [39]. Πρέπει επίσης να ληφθεί υπόψη ο ρυθμός οργανικής φόρτωσης (OLR) για συνεχή συστήματα, ο οποίος αντιπροσωπεύει την ποσότητα του οργανικού περιεχομένου που τροφοδοτείται στον αντιδραστήρα στη μονάδα του χρόνου. Για παράδειγμα υποστρώματα πολυπλοκότερα και μη προεπεξεργασμένα τροφοδοτούνται σε χαμηλότερες τιμές ORL από εκείνα που έχουν πιο απλή δομή. Παρόμοια είναι και η επίδραση της συγκέντρωσης άνθρακα. Όλα τα παραπάνω πρέπει να καθορίζονται συνδυαστικά, δηλαδή σε περίπτωση αύξησης της συγκέντρωσης του άνθρακα χωρίς παράταση της διάρκειας του κύκλου, τα βακτήρια πιθανόν να χρειαστούν περισσότερο χρόνο για να καταναλώσουν το υπόστρωμα άνθρακα στη φάση επάρκειας, με αποτέλεσμα να μειωθεί η φάση περιορισμού και έτσι η συσσώρευση να είναι μικρότερη [37].

Επίδραση περιορισμού θρεπτικών συστατικών

Οι υψηλές συγκεντρώσεις φωσφόρου και αζώτου ευνοούν την κυτταρική ανάπτυξη ενώ ο περιορισμός ή η έλλειψη τους μπορεί να οδηγήσει σε μετατόπιση της μεταβολικής οδού προς τη συσσώρευση των ΠΥΑ. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι περιορίζοντας τα θρεπτικά συστατικά μπορεί να τριπλασιαστεί η συσσώρευση. Η απαίτηση για περιορισμό ή ανεπάρκεια θρεπτικών συστατικών, προκειμένου να μεγιστοποιηθεί η περιεκτικότητα σε κύτταρα ΠΥΑ, εξαρτάται από τον τύπο του υποστρώματος που χρησιμοποιείται και από τη

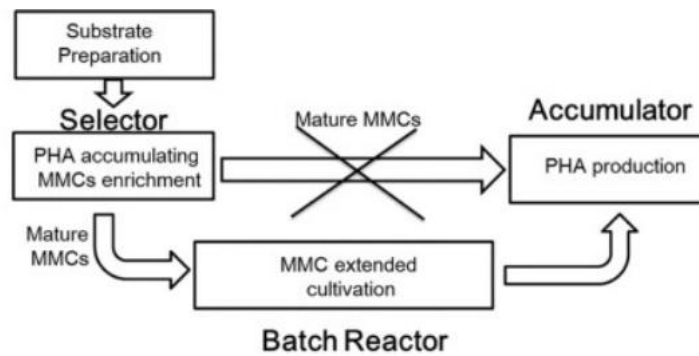
σύνθεση της εμπλουτισμένης καλλιέργειας. Όσον αφορά τη συνολική παραγωγικότητα του σταδίου συσσώρευσης ΠΥΑ, έχει παρατηρηθεί ότι ο περιορισμός των θρεπτικών συστατικών παρά η ανεπάρκεια οδηγεί σε μεγαλύτερη παραγωγικότητα. Αυτό συμβαίνει γιατί η έλλειψη κρίσιμων θρεπτικών συστατικών περιορίζει την ανάπτυξη των κυττάρων, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τον κορεσμό των ΠΥΑ. Ενώ, οι περιορισμένες συγκεντρώσεις θρεπτικών συστατικών επιτρέπουν στα βακτήρια να πολλαπλασιάζονται με παράλληλη συσσώρευση ΠΥΑ [34]. Ο περιορισμός των συγκεντρώσεων θρεπτικών συστατικών όπως το άζωτο ή ο φώσφορος, υποκινεί τις μεταβολικές οδούς προς τη συσσώρευση ΠΥΑ και όχι την ανάπτυξη βιομάζας επιπλέον ο λόγος C/N όχι μόνο μεταβάλλει την απόδοση του ΠΥΑ αλλά και τη σύνθεση των προϊόντων [36].

Στη βιβλιογραφία συναντώνται τρεις μέθοδοι περιορισμού. Η πρώτη ονομάζεται «συζευγμένη παροχή C και N» όπου παρέχονται και περιορίζονται ταυτόχρονα ο άνθρακας και το άζωτο ωστόσο τόσο η κυτταρική ανάπτυξη όσο και η συσσώρευση είναι χαμηλή. Η δεύτερη είναι η «ασύζευκτη παροχή C και N» όπου αρχικά στη φάση της επάρκειας παρέχεται άνθρακας χωρίς την παρουσία αζώτου, ενώ το τελευταίο παρέχεται μόνο στη φάση απουσίας άνθρακα όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 1.10. Με αυτόν τον τρόπο το κλίμα που δημιουργείται ένα ακόμα πιο μη-φιλικό κλίμα για τα βακτήρια που δεν συσσωρεύουν ΠΥΑ. Μέσω της τελευταίας επιτυγχάνονται υψηλότερες τιμές ρυθμού οργανικής φόρτωσης, καθώς και υψηλότερη παραγωγικότητα [37].



Σχήμα 1.10: Απεικόνιση των προφίλ συγκέντρωσης για τη στρατηγική μη συζευγμένης παροχής άνθρακα και αζώτου [37].

Η Τρίτη μέθοδος ονομάζεται «εκτεταμένη καλλιέργεια» και παρουσιάζεται στο Σχήμα 1.11. Σε αυτή τη μέθοδο μετά τον εμπλουτισμό, ο ώριμος μικροβιακός πληθυσμός παραγωγών ΠΥΑ καλλιεργείται υπό τις ίδιες συνθήκες εναλλαγής παροχής άνθρακα και αζώτου αλλά με μεγαλύτερη διάρκεια φάσεων ώστε να αναπτυχθούν περαιτέρω οι συσσωρευτές ΠΥΑ. Σε αυτή τη λειτουργία η παροχή άνθρακα πραγματοποιείται στη φάση της επάρκειας ενώ η παροχή αζώτου στη φάση του περιορισμού. Με αυτή τη μέθοδο βελτιώνεται η παραγωγικότητα καθώς η τελική πυκνότητα κυττάρων αυξάνεται [37].

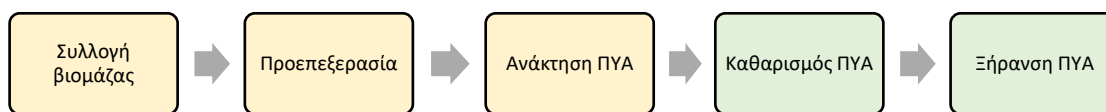


Σχήμα 1.11: Απεικόνιση της εκτεταμένης καλλιέργειας [40].

1.5.4. Ανάκτηση των ΠΥΑ από τους κόκκους των κυττάρων

Στη βιβλιογραφία συναντώνται αρκετές μέθοδοι για τη παραλαβή των ΠΥΑ. Όλες στοχεύουν στη λύση του βακτηριακού κυττάρου και στην αφαίρεση του πρωτεϊνικού στρώματος που επικαλύπτει τους κόκκους ΠΥΑ ή στην επιλεκτική διάλυση των ΠΥΑ σε έναν κατάλληλο διαλύτη που μπορεί να περάσει μέσω της κυτταρικής μεμβράνης. Η απόδοση της διεργασίας εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Αρχικά, εξαρτάται από την ευθραυστότητα του κυτταρικού τοιχώματος, η οποία είναι διαφορετική για καθαρές, για μικτές καλλιέργειες και για ανασυνδιαμένα στελέχη [34]. Για παράδειγμα τα ανασυνδυασμένα στελέχη έχουν πιο λεπτό και εύθραυστο κυτταρικό τοίχωμα [36]. Εξαρτάται ακόμη, από τον τύπο και τη ποσότητα του παραγόμενου ΠΥΑ, καθώς υψηλό ενδοκυτταρικό φορτίο ΠΥΑ διευκολύνει την απελευθέρωση κόκκων βιοπολυμερούς λόγω της αυξημένης ευθραυστότητας των κυττάρων. Σημαντικός παράγοντας είναι επίσης η τελική εφαρμογή για την οποία προορίζεται το πολυμερές, η οποία θα καθορίσει την απαιτούμενη καθαρότητα. Τέλος, σημαντική επίδραση έχει η μέθοδος που θα χρησιμοποιηθεί για την παραλαβή των ΠΥΑ [34].

Για την παραλαβή των ΠΥΑ μπορούν να διακριθούν πέντε βήματα. Αρχικά συλλέγεται επιθυμητή ποσότητα από τον αντιδραστήρα με σκοπό τη συλλογή της βιομάζας μέσω διήθησης ή φυγοκέντρησης. Ακολουθεί η προεπεξεργασία όπου έχει ως στόχο να διευκολύνει την ανάκτηση των ΠΥΑ από τη μικροβιακή βιομάζα. Η προεπεξεργασία περιλαμβάνει τεχνικές ξήρανσης όπως η λυοφιλοποίηση και θερμική ξήρανση, λείανσης, χημικές και βιοχημικές προκατεργασίες. Η φάση ανάκτησης μπορεί να διακριθεί σε τρεις κατηγορίες: εκχύλιση με διαλύτη, χώνευση και μηχανική διάλυση των κυττάρων. Τέλος, τα ανακτημένα ΠΥΑ μπορούν να καθαριστούν αφαιρώντας τα υπολείμματα από τα προηγούμενα βήματα και τέλος να ξηρανθούν. Παρακάτω αναλύεται εκτενέστερα η φάση της ανάκτησης [33].



Σχήμα 1.12: Βήματα για την παραλαβή των ΠΥΑ από τους κόκκους των βακτηριακών κυττάρων.

Εκχύλιση με διαλύτη

Τα ΠΥΑ είναι αδιάλυτα στο νερό ωστόσο είναι διαλυτά σε οργανικούς διαλύτες. Οι διαλύτες έχουν διπλό ρόλο, τροποποιούν τη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης διαλύοντας το λιπιδικό τμήμα του κυττάρου και διαλύουν τα ΠΥΑ με αποτέλεσμα της εκχύλιση τους. Οι οργανικοί διαλύτες μπορούν να είναι χλωριωμένοι όπως το χλωροφόρμιο, το 1,2-διχλωρομεθάνιο και το μεθυλοχλωρίδιο, κυκλικές ενώσεις όπως το προπυλένιο και το αιθυλένιο και αζεοτροπικά μείγματα όπως το τριχλωροαιθάνιο με νερό ή χλωροφόρμιο [34]. Η εκχύλιση με χρήση διαλυτών έχει πολύ καλή απόδοση για αυτό το λόγο χρησιμοποιείται όταν πρέπει να επιτευχθεί υψηλή καθαρότητα [36]. Ωστόσο, είναι μέθοδος μη φιλική προς το περιβάλλον, η οποία απαιτεί μεγάλη ποσότητα ενέργειας και διαλυτών, γεγονός που αυξάνει αρκετά το κόστος. Λόγω της υψηλής τοξικότητας και των επιβλαβών επιπτώσεων των χλωριωμένων ενώσεων οι επιστήμονες έχουν στραφεί τα τελευταία χρόνια σε πράσινους διαλύτες. Έχει προταθεί η χρήση ανισόλης, κυκλοεξανόνης και φαινετόλης ως πιο φιλικές προς το περιβάλλον εναλλακτικές λύσεις. Επιπλέον έχει μελετηθεί η χρήση διμεθυλθανθρακικό (DMC) για την εκχύλιση των ΠΥΑ από μια μικροβιακή μικτή καλλιέργεια δίνοντας παρόμοια καθαρότητα με αυτή που λαμβάνεται με χρήση χλωριωμένων διαλυτών [34,36].

Χώνευση

Η χώνευση βασίζεται στη λογική ότι είναι πιο εύκολο να αφαιρεθεί το περιβάλλον γύρω από τους κόκκους ΠΥΑ, διαλυτοποιώντας το σε κατάλληλο διαλύτη. Η χημική χώνευση πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας οξειδωτικές ουσίες όπως το υδροξείδιο του νατρίου και το υποχλωριώδες νάτριο ή οξέα όπως το θειικό οξύ. Η συγκέντρωση της χημικής ουσίας είναι κρίσιμη, καθώς μπορεί όχι μόνο να διαλύσει το κύτταρο αλλά και να καταστρέψει τα ΡΗΑ οδηγώντας σε χαμηλότερη καθαρότητα, μοριακό βάρος και μηχανική αντοχή των πολυμερών καθώς και περιορισμένη ανάκτηση πολυμερών. Με χρήση του υπερχλωριώδους νατρίου μεγαλύτερο μέρος της περιοχής γύρω από τους κόκκους ΠΥΑ οξειδώνεται και γίνεται υδατοδιαλυτή, ενώ τα ΠΥΑ παραμένουν στερεά καθιστώντας πιο εύκολο το διαχωρισμό. Το πλεονέκτημα της χρήσης υποχλωριώδους νατρίου είναι ότι το κύτταρο δεν χρειάζεται να λυοφιλοποιηθεί, γεγονός που εξοικονομεί χρόνο και μειώνει το κόστος. Η καθαρότητα του πολυμερούς μετά την εκχύλιση μπορεί να προσεγγίσει το 96%. Ωστόσο έχει παρατηρηθεί ότι τα ΠΥΑ δεν είναι πλήρως αδιάλυτα, και σε ορισμένες περιπτώσεις, έχει σημειωθεί μείωση στο μοριακό βάρος. Μια πιο φιλική προς το περιβάλλον επιλογή είναι η χρήση όξινων ή αλκαλικών ουσιών όπως το θειικό οξύ (H_2SO_4) ή το υδροξείδιο του νατρίου ($NaOH$) [34]. Τα λιπίδια του κυτταρικού τοιχώματος του μικροοργανισμού σαπωνοποιούνται από υδροξείδια,

γεγονός που αυξάνει τη διαπερατότητα της μεμβράνης και βοηθά στην απελευθέρωση πρωτεϊνών και της περιοχής γύρω από τους κόκκους ΠΥΑ. Η χώνευση μπορεί να πραγματοποιηθεί ακόμη και με χρήση επιφανειοδραστικών όπως το δωδεκυλοθειικό νάτριο (SDS) και Triton X-100. Σημαντικό πλεονέκτημα των επιφανειοδραστικών ουσιών είναι ότι καταστρέφουν τα κύτταρα χωρίς να διασπούν τους κόκκους του πολυμερούς. Ωστόσο απαιτείται υψηλή αναλογία επιφανειοδραστικής ουσίας/βιομάζας και η ανάκτηση επιφανειοδραστικών, γεγονός που οδηγεί σε σημαντική παραγωγή λυμάτων [33,34].

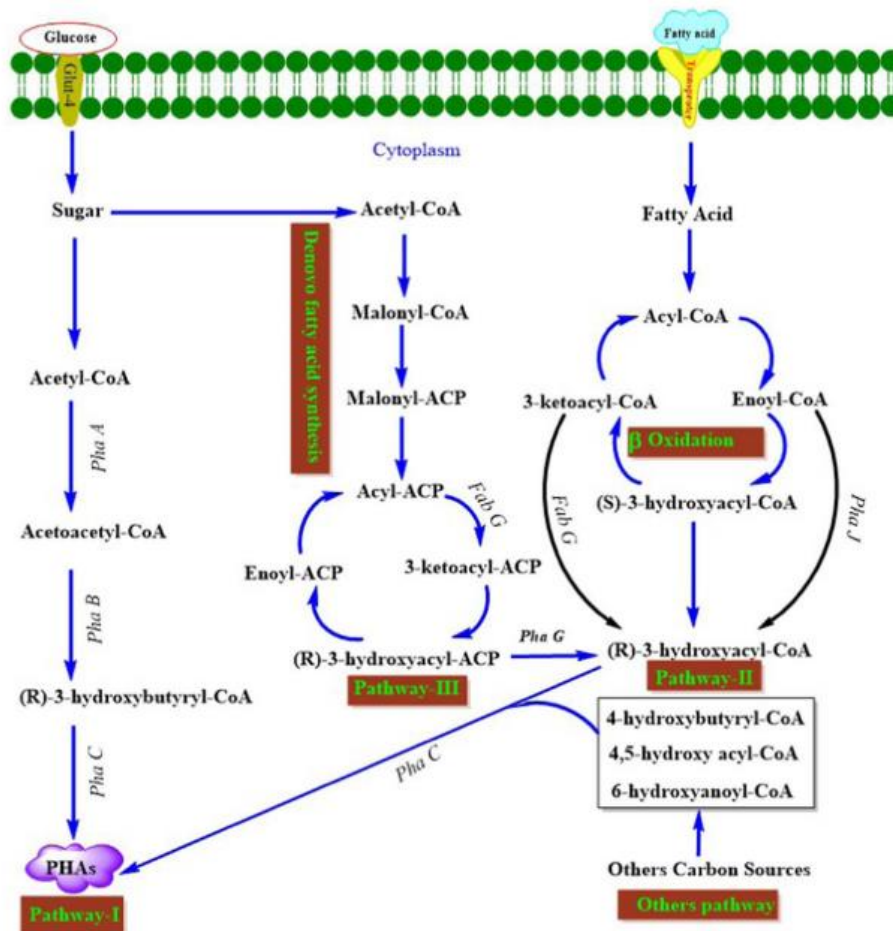
Η χώνευση μπορεί να πραγματοποιηθεί και με χρήση ενζύμων. Οι πρωτεάσες είναι τα κύρια ένζυμα που χρησιμοποιούνται στην ενζυμική διάσπαση, ωστόσο η διάσπαση πραγματοποιείται με επιτυχία και από άλλους τύπους ενζύμων ή ένα ενζυματικό κοκτέιλ. Τα πλεονεκτήματα της ενζυμικής χώνευσης είναι οι χαμηλές ενεργειακές απαιτήσεις, και την ελάχιστη επένδυση κεφαλαίου. Ωστόσο, το κύριο μειονέκτημα για την εμπορική ανάπτυξη είναι το κόστος παραγωγής των ενζύμων [33,34].

Μηχανική διάλυση

Οι πιο χρησιμοποιούμενες μηχανικές μέθοδοι για τη διάσπαση των κυττάρων είναι μέσω ομογενοποιητή υψηλής πίεσης και η άλεση. Οι μηχανικές μέθοδοι πλεονεκτούν από περιβαλλοντολογική σκοπιά καθώς δεν απαιτείται η χρήση χημικών. Ωστόσο, χρησιμοποιούνται λιγότερο για βιομηχανική παραγωγή ΡΗΑ μεγάλης κλίμακας καθιστώντας έτσι δύσκολη τη κλιμάκωση. Επίσης απαιτούνται μεγάλοι χρόνοι επεξεργασίας και υψηλά κόστη επένδυσης [34].

1.5.5. Μεταβολικές οδοί

Οι διάφορες πηγές άνθρακα μεταβολίζονται από διαφορετικές οδούς. Οι βιοσυνθετικές οδοί που συμμετέχουν στην παραγωγή ΠΥΑ συνδέονται άμεσα ή έμμεσα με διάφορες μεταβολικές οδούς, όπως του του κύκλου Krebs, της γλυκολυτικής οδού και των οδών βιοσύνθεσης και αποδόμησης αμινοξέων και λιπαρών οξέων [41]. Πιο συγκεκριμένα μπορούν να διακριθούν τρεις κύριες μεταβολικές οδοί. Οι οδοί I και III (de novo) μεταβολίζουν σάκχαρα όπως η γλυκόζη, ενώ τα πτητικά λιπαρά οξέα όπως το προπιονικό οξύ ακολουθούν την οδό II (B-οξειδωση). Να σημειωθεί ότι μέσω της οδού I είναι δυνατόν να παραχθούν ομοπολυμερή ενώ μέσω των οδών II και III συμπολυμερή [41,42]. Έχει παρατηρηθεί ότι μεγαλύτερη ποσότητα ΠΥΑ παράγεται μέσω της οδού II. Για αυτό το λόγο τα πτητικά λιπαρά οξέα αναφέρονται ως τα καταλληλότερα υποστρώματα [41].



Σχήμα 1.13: Μεταβολικές οδοί παραγωγής ΠΥΑ [42].

Η οδός I είναι η πιο γνωστή μεταξύ των βιοσυνθετικών οδών, προς παραγωγή P(3HB) και αποτελείται από τρεις ενζυμικά καταλυόμενες αντιδράσεις. Αρχικά, δύο μόρια ακετυλο-CoA συμπυκνώνονται προς τον σχηματισμό του ακετοακετυλο-CoA, το οποίο στη συνέχεια ανάγεται στερεοειδικά σε R-3-υδροξυβουτυλο-CoA. Αυτό το βήμα αναφέρεται συχνά ως «ψευδοζύμωση» καθώς αναγεννά την οξειδωμένη μορφή των ισοδυνάμων οξειδοαναγωγής. Τέλος, το R-3-υδροξυβουτυλο-CoA ενσωματώνεται στη μακριά γραμμική πολυεστερική αλυσίδα του P(3HB) [43]. Η οδός II εμπλέκεται στην οξείδωση των λιπαρών οξέων σε ενοϋλ-CoA, (S)-3-υδροξυακυλ-CoA και (R)-3-κετοακυλ-CoA. Στη συνέχεια μετατρέπονται σε (R)-3-υδροξυακυλο-CoA και ενσωματώνονται στην αλυσίδα του πολυμερούς. Μέσω της οδού III σάκχαρα, όπως γλυκόζη μετά από τη γλυκόλυση, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή της μηλονυλο-ακυλο φορέα πρωτεΐνης (malonyl-acyl carrier protein ή malonyl-ACP). Τα προκύπτοντα ενδιάμεσα ακυλ-ACP και μηλονυλ-ACP μετασχηματίζονται σε (R)-3-υδροξυακυλ-ACP και σε (R)-3-υδροξυακυλ-CoA όπου και ενσωματώνονται τελικά στην αλυσίδα [24].

Κατεύθυνση μεταβολικών οδών

Όταν υπάρχει πλεόνασμα άνθρακα και δεν υπάρχει άλλος περιορισμός που σχετίζεται με την ανάπτυξη, μέσω του κύκλου του Krebs παράγονται ποσότητες ακετυλο-CoA που εμποδίζουν τη σύνθεση των ΠΥΑ καθώς το ακετυλο-CoA αφομοιώνεται στον κύκλο του Krebs για παραγωγή ενέργειας και ανάπτυξη κυττάρων. Ενώ, διατηρώντας τις συνθήκες πλεονάσματος

άνθρακα και περιορίζοντας ένα βασικό θρεπτικό συστατικό, η συγκέντρωση CoA γίνεται μη ανασταλτική, οδηγώντας στην παροχή ακετυλο-CoA στις βιοσυνθετικές οδούς. Για αυτό το λόγο οι περισσότερες διαδικασίες παραγωγής ΠΥΑ αποτελούνται από δύο στάδια. Το πρώτο είναι το στάδιο ανάπτυξης, το οποίο στοχεύει στην αύξηση της συγκέντρωσης των κυττάρων μέσα στον αντιδραστήρα, όπου δεν υπάρχει περιορισμός θρεπτικών συστατικών. Ακολουθεί το στάδιο της παραγωγής, όπου εισάγεται ένας περιορισμός (π.χ. έλλειψη πηγής αζώτου), προκειμένου να κατευθυνθούν οι μεταβολικές οδοί στη συσσώρευση ΠΥΑ και να σταματήσουν οι διαδικασίες ανάπτυξης και πολλαπλασιασμού των κυττάρων [30].

Χρησιμοποιούμενα ένζυμα

Η ικανότητα ενός βακτηριακού είδους να συνθέτει συγκεκριμένα είδη ΠΥΑ οφείλεται στην εξειδίκευση του υποστρώματος του ενζύμου συνθεσάση. Οι συνθεσάσες των ΠΥΑ μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τέσσερις κατηγορίες με βάση την εξειδίκευσή τους σε διαφορετικά υποστρώματα και τη σύνθεση υπομονάδων τους. Οι συνθεσάσες κατηγορίας I και II αποτελούνται από μία υπομονάδα PhaC, της οποίας η μοριακή μάζα κυμαίνεται από 61kDa έως 73 kDa. Οι συνθεσάσες της κατηγορίας I καταλύουν το πολυμερισμό των CoA θειοεστέρων πολλών (R)-3-υδροξυ λιπαρών οξέων με 3 έως 5 άτομα άνθρακα. Ενώ, οι συνθεσάσες κατηγορίας II προτιμούν τους CoA θειοεστέρες διαφόρων (R)-3-υδροξυ λιπαρών οξέων με 6 έως 14 άτομα άνθρακα. Η συνθεσάση της τάξης III έχει υπομονάδες PhaC και PhaE με μοριακή μάζα περίπου 40 kDa. Τέλος, οι συνθεσάσες κατηγορίας IV αποτελούνται από δύο υπομονάδες PhaC και PhaR με μοριακή μάζα περίπου 20 kDa. Αυτές οι συνθεσάσες έχουν ειδικότητα υποστρώματος προς CoA θειοεστέρες αρκετών (R)-3-υδροξυ λιπαρών οξέων με 3 έως 5 άτομα άνθρακα. Όπως γίνεται αντιληπτό, οι συνθεσάσες των κατηγοριών I, III και IV μπορούν να παράγουν πολυμερή μικρής ανθρακικής αλυσίδας ενώ οι συνθεσάσες της κατηγορίας II πολυμερίζουν ΠΥΑ μεσαίας ανθρακικής αλυσίδας [43]. Επιπλέον, η μοριακή μάζα των ΠΥΑ που πολυμερίζονται από ένζυμα κατηγορίας I κυμαίνεται από μεταξύ 500 kDa έως αρκετά εκατομμύρια ενώ εκείνα που λαμβάνονται από την κατηγορία II από 50 kDa έως 500 kDa. Οι συνθεσάσες της κατηγορίας III και IV παράγουν ΠΥΑ με ενδιάμεσες μοριακές μάζες [30].

Ταυτόχρονα, κατά σχηματισμό των ΠΥΑ έχει προσδιοριστεί επιπλέον και η ύπαρξη αποπολυμερασών (PhaZ). Οι αποπολυμεράσες μπορούν να υδρολύουν τους άμορφους φυσικούς κόκκους των ΠΥΑ αποδίδοντας μονομερή ως τελικό προϊόν. Πρέπει να σημειωθεί ότι η βιοσύνθεση και η αποδόμηση των ΠΥΑ είναι αλληλένδετες διαδικασίες που συμβαίνουν στα κύτταρα ταυτόχρονα. Συνεπώς, ακόμα και κάτω από συνθήκες που ευνοούν την παραγωγή των ΠΥΑ, οι αποπολυμεράσες είναι ενεργές. Για αυτό το λόγο στη βιβλιογραφία συχνά ο μεταβολισμός των ΠΥΑ ονομάζεται «κύκλος ΠΥΑ» προκειμένου να τονιστεί ο κυκλικός του χαρακτήρας [43].

Βελτιστοποίηση απόδοσης

Έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές προσπάθειες για τη μεγιστοποίηση της παραγωγή ΠΥΑ. Τα πρώτα παραδείγματα συναντώνται μέσω τυχαίας μεταλλαξιογένεσης με έκθεση μικροβιακών κυττάρων σε χημικές ουσίες ή υπεριώδη ακτινοβολία. Επιπλέον, η προσαρμοστική εξέλιξη, είναι μια τεχνική που έχει βελτιώσει κλασσικά στελέχη για την αύξηση της συσσώρευσης ΠΥΑ σε μικροοργανισμούς. Σήμερα, γίνονται προσπάθειες ο

γενετικών τροποποιήσεων με σκοπό να βελτιώσουν την κυτταρική λειτουργία μέσω της μεταβολικής μηχανικής [36].

Η μεταβολική μηχανική εφαρμόζεται για τη βελτίωση των παραμέτρων καλλιέργειας όπως η απόδοση, η συγκέντρωση και ο ρυθμός παραγωγής. Κύριοι στόχοι είναι ο η υψηλή απόδοση μέσω γρήγορης και ταυτόχρονης κατανάλωσης πηγής άνθρακα, η μεγιστοποίηση του αριθμού των παραγόμενων κυττάρων ανά χρόνο και η βελτιστοποίηση της μορφολογίας των κυττάρων. Επιπλέον, η μεταβολική μηχανική έχει χρησιμοποιηθεί για την βελτίωση της ποιότητας των ΠΥΑ. Ένα παράδειγμα βελτιστοποίησης της μορφολογίας των κυττάρων αποτελεί το ανασυνδυσμένο *E. coli*, το οποίο τροποποιήθηκε με υπερέκφραση του γονιδίου *su1A* και είχε ως αποτέλεσμα περισσότερο από 100% αύξηση της περιεκτικότητας σε PHB. Η βελτιστοποίηση των μονοπατιών μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω της εξάλειψης των ανταγωνιστικών μονοπατιών και αύξησης της διαθεσιμότητας πρόδρομων ουσιών. Για παράδειγμα μια ανταγωνιστική αντίδραση στο μονοπάτι ΠΥΑ είναι η αποικοδόμηση του πολυμερούς, που είναι αποτέλεσμα της *rhaZ* όπως αναφέρεται παραπάνω. Έχει αποδειχθεί ότι η διαγραφή αυτού του γονιδίου στο *P. putida* βελτίωσε τη συσσώρευση του ΠΥΑ από 66 wt% σε 86 wt% σε ξηρη βάση [36].

1.6. ΠΥΑ και κυκλική οικονομία

Η κυκλική οικονομία αποκαλείται συχνά βιομηχανικό ή οικονομικό σύστημα το οποίο αποβλέπει στη κατάργηση του παραδοσιακού γραμμικού μοντέλου της οικονομίας το οποίο στηρίζεται στην “εξόρυξη-χρήση-απόρριψη”. Κεντρικός στόχος του νέου αυτού μοντέλου είναι η παραγωγή προϊόντων και υπηρεσιών με λιγότερους και πιο «πράσινους πόρους». Επιπλέον έχει ως στόχο την ελαχιστοποίηση ή και μηδενισμό των αποβλήτων σε όλα τα στάδια παραγωγής, αλλά και μετά το τέλος του κύκλου ζωής των προϊόντων και ενθαρρύνει την χρήση δευτερογενών υλικών και αποβλήτων ως παραγωγικών πόρων και χρήσιμων υλικών



Σχήμα 1.14: Διαγραμματική περιγραφή του μοντέλου της κυκλικής οικονομίας [44].

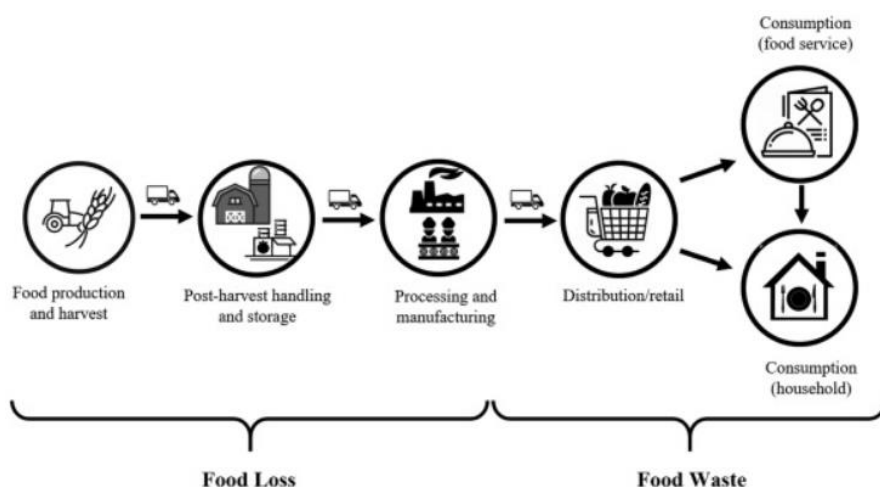
Αντιθέτως, το υπάρχον γραμμικό οικονομικό μοντέλο βασίζεται σε ένα μοτίβο “εξόρυξη-χρήση-απόρριψη”. Αυτό το μοντέλο βασίζεται σε μεγάλες ποσότητες φθηνών, εύκολα προσβάσιμων υλικών και ενέργειας. Ωστόσο, η ζήτηση για πρώτες ύλες αυξάνεται, ενώ οι προμήθειες είναι πεπερασμένες. Επιπλέον, η εκτεταμένη εξόρυξη και χρήση πρώτων υλών αυξάνει την κατανάλωση ενέργειας και τις εκπομπές CO₂. Πιο συγκεκριμένα, η Ευρωπαϊκή Ένωση παράγει περισσότερους από 2,5 δισεκατομμύρια τόνους απορριμμάτων κάθε χρόνο, ενώ η παραγωγή υλικών που χρησιμοποιούμε καθημερινά ευθύνεται για το 45% των εκπομπών CO₂. Η μετάβαση προς μια πιο κυκλική οικονομία θα ωφελήσει σημαντικά στη βελτίωση της ασφάλειας του εφοδιασμού με πρώτες ύλες, επιτρέποντας παράλληλα στις αναπτυσσόμενες χώρες να είναι πιο ανεξάρτητες. Επιπλέον, η πρόληψη των αποβλήτων και ο οικολογικός σχεδιασμός θα μειώσουν την πίεση στο περιβάλλον [44].

Τα ΠΥΑ είναι από τα πιο πολλά υποσχόμενα βιοπολυμερή καθώς μετατρέπουν τα βιοαπόβλητα σε βιοαποικοδομήσιμο πλαστικό. Με αυτόν τον τρόπο μειώνονται τα απορρίμματα και ως βιοαποικοδομήσιμα υλικά μπορούν να διασπαστούν στο περιβάλλον. Αυτό κλείνει τον κύκλο του άνθρακα και καθιστά τα ΠΥΑ επιλέξιμα ως προϊόν κυκλικής οικονομίας [26].

1.7. Τροφικά υπολείμματα

Σύμφωνα με τη Διεθνή Οργάνωση Τροφίμων και Γεωργίας οι απώλειες και τα υπολείμματα των τροφίμων αγγίζουν τους 1,3 δισεκατομμύρια τόνους παγκοσμίως. Παράλληλα, περίπου 3,49 δισεκατομμύρια τόνοι διοξειδίου του άνθρακα παράγονται από την απώλεια ή σπατάλη τροφίμων κατά μήκος της εφοδιαστικής αλυσίδας [45].

Ως απώλειες τροφίμων θεωρούνται τα τροφικά υπολείμματα από τον πρωτογενή τομέα πριν από την κατανάλωση. Σε αυτά συμπεριλαμβάνονται τα μη βρώσιμα μέρη των τροφίμων και τα τρόφιμα τα οποία δεν συμμορφώνονται τα οργανοληπτικά ή μικροβιολογικά πρότυπα. Ενώ ως τροφικά υπολείμματα ορίζονται οι απώλειες τροφίμων που σημειώνονται στο τέλος της τροφικής αλυσίδας. Τα τελευταία σχετίζονται με την συμπεριφορά του καταναλωτή, την ζήτηση της αγοράς και το μάρκετινγκ. Αυτή διάκριση μεταξύ απωλειών τροφίμων και τροφικών αποβλήτων απεικονίζεται στο Σχήμα 1.15 [46].



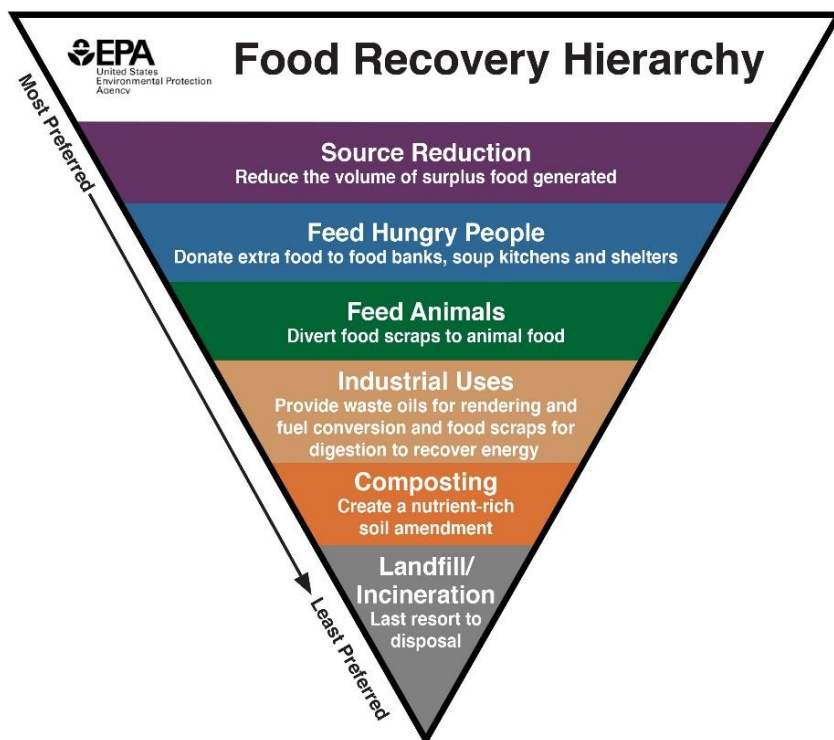
Σχήμα 1.15: Επισκόπηση της αλυσίδας εφοδιασμού τροφίμων και η διάκριση μεταξύ απώλειας και σπατάλης τροφίμων [46].

Σύμφωνα με υπολογισμούς η Ευρωπαϊκή Ένωση παράγει περίπου 128 εκατομμύρια τόνους απορριμμάτων τροφίμων ετησίως. Η μεγαλύτερη πηγή είναι τα νοικοκυριά με ποσοστό 42% ενώ υπολογίζεται ότι ένα μέσο νοικοκυριό απορρίπτει το 25% των τροφίμων που αγοράζει. Από τα συνολικά τροφικά απόβλητα οι μεγαλύτερες ομάδες είναι τα φρούτα και λαχανικά με ποσοστά 24% και 22% αντίστοιχα. Έπειτα ακολουθούν τα δημητριακά με ποσοστό 12%, το κρέας 11% και οι ελαιώδεις καλλιέργειες 10% [47].

1.7.1 Διαχείριση τροφικών υπολειμμάτων.

Η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει συντάξει κατευθυντήριες γραμμές για τις προτιμώμενες τεχνολογίες διάθεσης των τροφικών απορριμμάτων που ορίζει μια σειρά προτεραιότητας από τις περισσότερο έως τις λιγότερο προτιμώμενες το οποίο αναπαρίσταται σε σχήμα αντίστροφης πυραμίδας όπως φαίνεται στο Σχήμα 1.16. Η βέλτιστη μέθοδος είναι η μείωση των ποσοτήτων που απορρίπτονται. Έπειτα, ακολουθεί η επαναχρησιμοποίηση τροφίμων, είτε ως τροφή για ανθρώπους που το έχουν ανάγκη είτε ως ζωοτροφή. Η επόμενη επιλογή είναι για βιομηχανικές χρήσεις που στοχεύουν στην αντιμετώπιση περιβαλλοντικών και οικονομικών ζητημάτων που σχετίζονται με τα απόβλητα τροφίμων, αυξάνοντας παράλληλα τη χρήση εναλλακτικών πηγών ενέργειας. Ακολουθεί η κομποστοποίηση που αποτελεί μία βιολογική διεργασία μετατροπής στερεών ή ημιστερεών οργανικών υλικών σε ένα σταθερό προϊόν, το κομπόστ το οποίο χρησιμοποιείται ως εδαφοβελτιωτικό. Τέλος, η λιγότερο προτιμώμενη μέθοδος είναι η υγειονομική ταφή [48].

Η υγειονομική ταφή αποτελεί μία παλαιά μέθοδο για τη διάθεση των απορριμμάτων. Σκοπός ενός χώρου υγειονομικής ταφής αποβλήτων (ΧΥΤΑ) είναι να απομονώσει τα απορρίμματα και να προστατεύσει το περιβάλλον από ανεξέλεγκτες διαφυγές των συστατικών και των προϊόντων διάσπασης των απορριμμάτων. Κατά την αποσύνθεση των απορριμμάτων στους ΧΥΤΑ παράγεται υγρό, το οποίο εμπλουτίζεται ταυτόχρονα με νερό από βροχές, που ονομάζεται στράγγισμα (leachate). Το στράγγισμα έχει υψηλό ρυπαντικό φορτίο αποτελεί πιθανή πηγή ρύπανσης των επιφανειακών και υπόγειων νερών και είναι πλούσιο σε οργανικό άζωτο. Ταυτόχρονα, οι βιοχημικές δράσεις που αναπτύσσονται σε κάθε χώρο διάθεσης αποβλήτων, οδηγούν και στην παραγωγή βιοαερίου [49].



Σχήμα 1.16: Ιεράρχηση των μεθόδων διαχείρισης απορριμμάτων τροφίμων [48].

Επί του παρόντος για τη διαχείριση των τροφικών αποβλήτων χρησιμοποιούνται συμβατικές επιλογές όπως η υγειονομική ταφή, η αναερόβια χώνευση, η κομποστοποίηση, η θερμική επεξεργασία και η παραγωγή ζωοτροφών [14]. Στην Ελλάδα η μέθοδος της υγειονομικής ταφής εξακολουθεί να είναι η πιο διαδεδομένη μέθοδος διάθεσης αποβλήτων αγγίζοντας το 80% [50]. Επιπλέον, η χωριστή συλλογή βιοαποβλήτων έχει πραγματοποιηθεί σε μικρή κλίμακα, μέσω της εφαρμογής περιορισμένων πιλοτικών προγραμμάτων. Το παραπάνω συμβάλει στην απελευθέρωση μεγάλων ποσοτήτων βιοαερίου μέσω των ΧΥΤΑ, συνεισφέροντας σημαντικά στο φαινόμενο του θερμοκηπίου [51].

1.7.2 Αξιοποίηση των αποβλήτων τροφίμων

Όταν τα τρόφιμα δεν μπορούν να καταναλωθούν, μπορούν να εφαρμοστούν άλλες μέθοδοι, όπως η επαναχρησιμοποίηση, η ανακύκλωση και η ανάκτηση, προκειμένου να αποφευχθεί η διάθεση τους ως απόβλητα. Ωστόσο τέτοιες μέθοδοι δεν έχουν εφαρμοστεί ευρέως σε μεγάλη κλίμακα. Ο κύριος λόγος είναι η σχέση κόστους και αποδοτικότητας λόγω του υψηλού κόστους μεταφοράς και αποθήκευσης των απορριμμάτων και της συνολικής βιωσιμότητας της διαδικασίας. Επιπλέον, προκύπτουν εμπόδια που αφορούν τεχνικούς περιορισμούς για τη μετατροπή ενώσεων σε προϊόντα προστιθέμενης αξίας καθώς και η νομοθεσία για τη χρήση των απορριμμάτων είναι ανεπαρκής. Προς το παρόν, έχουν υιοθετηθεί τέσσερις κύριες τεχνικές αξιοποίησης των απορριμμάτων τροφίμων [14].

1. Παραγωγή σε βιοκαύσιμα
2. Ανάκτηση και εξαγωγή ενώσεων προστιθέμενης αξίας
3. Παραγωγή βιο-προσροφητικών για την επεξεργασία λυμάτων
4. Παραγωγή βιοϋλικών

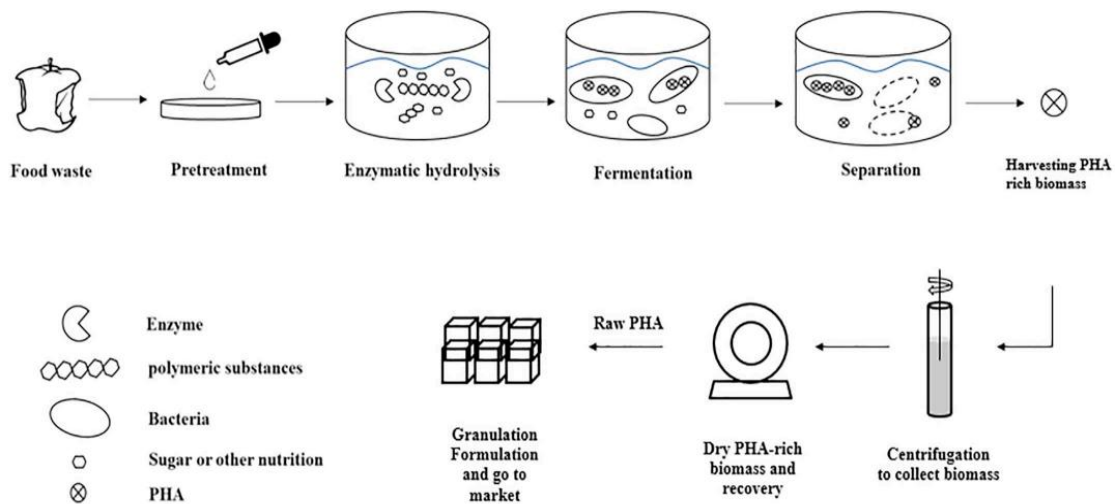
Όσον αφορά τα ΠΥΑ, η χρήση αποβλήτων τροφίμων αποτελεί μια φθηνή πηγή άνθρακα. Δεδομένου ότι η πρώτη ύλη αποτελεί έως και το 50% του κόστους παραγωγής, γίνεται αντιληπτό ότι η χρήση αποβλήτων μπορεί να καταστήσει την παραγωγή των ΠΥΑ πιο βιώσιμη. Για την παραγωγή των ΠΥΑ μπορούν να χρησιμοποιηθούν μονοσακχαρίτες και δισακχαρίτες. Ωστόσο για τη χρήση πολυσακχαριτών απαιτείται πρώτα η υδρόλυση ώστε να ληφθούν τα πιο απλά σάκχαρα. Τα πλέον χρησιμοποιούμενα σάκχαρα είναι το άμυλο, η ημικυτταρίνη, η κυτταρίνη και η γλυκόζη τα οποία εξάγονται από αγροτοβιομηχανικά και οικιακά απόβλητα. Ο Πίνακας 1.6 συνοψίζει μερικές από τις εναλλακτικές πηγές άνθρακα και τους παραγωγούς μικροοργανισμούς που έχουν χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή ΠΥΑ [16,36].

Πίνακας 1.6: Εναλλακτικές πηγές άνθρακα για την παραγωγή ΠΥΑ [16,36].

Πηγή Άνθρακα	Μικροοργανισμός	Παραγωγή ΠΥΑ
Ορός γάλατος	<i>Cupriavidus necator</i>	0,6 g PHA/g VFA
Απόβλητα κραμβέλαιου	<i>Cupriavidus necator</i>	0,83 g PHA/g oil
Φυτικό λάδι	<i>Recombinant pseudomonas putid</i>	0,62 ± 0,1 g PHA/ g oil
Ορός γάλατος	Ενεργοποιημένη ύλη	0,77 ± 0,14 g CODPHA/g CODorganicCODacids
Βιομηχανική γλυκερόλη	Ανερόβια λάσπη + αερόβια δευτερογενής λάσπη	0,42 Cmol PHA/Cmol substrate
Πλούσια σε υδατάνθρακες απόβλητα από εργοστάσιο παραγωγής γλυκών, οξικό οξύ και προπιονικό οξύ	Ενεργοποιημένη ύλη	0,41 g PHA/gVSS

1.7.3 Προεπεξεργασία τροφικών αποβλήτων

Προκειμένου να παραχθούν βιοπλαστικά με πρώτη ύλη τα τροφικά απόβλητα είναι απαραίτητο να υποβληθούν σε προεπεξεργασία με στόχο την βελτίωση ή και την τροποποίηση των φυσικών, χημικών και βιολογικών τους ιδιοτήτων. Στις τεχνολογίες προεπεξεργασίας περιλαμβάνεται η χημική, η βιολογική, η φυσική και η ενζυματική υδρόλυση. Σημειώνεται ότι ο συνδυασμός των διάφορων προεπεξεργασιών μπορεί να βελτιώσει την παραλαβή των πηγών άνθρακα, οδηγώντας σε μεγαλύτερη απόδοση και αποδοτικότητα παραγωγής των ΠΥΑ. Στόχος αυτών των διεργασιών είναι μερική ή πλήρη απελευθέρωση των μονομερών των τροφικών υπολειμμάτων και η αύξηση της προσβασιμότητας των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και πολυσακχαριτών για μελλοντική ενζυματική υδρόλυση και ζύμωση [52].



Σχήμα 1.17: Σχηματική αναπαράσταση της παραγωγής ΠΥΑ από τροφικά απόβλητα [52].

Μηχανική και θερμική προεπεξεργασία των τροφικών υπολειμμάτων

Η φυσική προεπεξεργασία διακρίνεται σε μηχανική και θερμική και περιλαμβάνει τη χρήση υπερήχων, μικροκυμάτων, φρεζαρίσματος και θέρμανσης. Η φυσική προεπεξεργασία χρησιμοποιείται συνήθως στην αρχή για την μείωση του μεγέθους των σωματιδίων με σκοπό για αύξηση της επιφάνειας και τον διαχωρισμό υλικών για περαιτέρω επεξεργασία. Ως αποτέλεσμα, η φυσική προεπεξεργασία δεν χρησιμοποιείται ποτέ μόνη της, αλλά συνδυάζεται με άλλες προεπεξεργασίες [52].

Χημική προεπεξεργασία των τροφίμων υπολειμμάτων

Η χημική προεπεξεργασία περιλαμβάνει τη χρήση οξέων και τη χρήση αλκαλικών διαλυμάτων ιδιαίτερα για τα λιγνοκυτταρινικά υλικά. Η λιγνοκυτταρίνη που έχει υποστεί επεξεργασία με οξύ μπορεί να αναστείλει ή να απενεργοποιήσει τα ένζυμα και να επηρεάσει την αποτελεσματικότητα των βακτηρίων που χρησιμοποιούνται στη διαδικασία ζύμωσης. Η αποτελεσματικότητα της μικροβιακής βιοπλαστικής σύνθεσης εξαρτάται από τις συνθήκες εργασίας όξινης προεπεξεργασίας.

Στη χημική προεπεξεργασία χρησιμοποιούνται και αλκαλικά διαλύματα όπως όπως το υδροξείδιο του νατρίου, το υδροξείδιο του ασβεστίου και η αμμωνία. Η διαλυτοποίηση είναι η πρώτη αντίδραση που πραγματοποιείται και οδηγεί σε διαστολή του στερεού. Ιδιαίτερα για τη διαλυτοποίηση λιγνίνης, η αλκαλική προεπεξεργασία υδρολύει τους εστερικούς δεσμούς μεταξύ των φυτικών πολυσακχαριτών και της λιγνίνης.

Βιολογική προεπεξεργασία των τροφικών

Αρκετές μελέτες χρησιμοποιούν και διάφορους μύκητες οι οποίοι βρέθηκαν να ενισχύουν τον ρυθμό και την απόδοση της ενζυματικής σακχαροποίησης. Σε σύγκριση με τη χημική επεξεργασία, η βιολογική προεπεξεργασία θεωρείται πιο φιλική προς το περιβάλλον και έχει μικρότερες ενεργειακές απαιτήσεις. Ωστόσο, μειονεκτεί ως προς τον ρυθμό υδρόλυσης από τα ένζυμα που παράγονται από τους μύκητες. Επιπλέον σημειώνεται σημαντική απώλεια πολυσακχαριτών κατά τη διάρκεια της βιολογικής διαδικασίας [52,53].

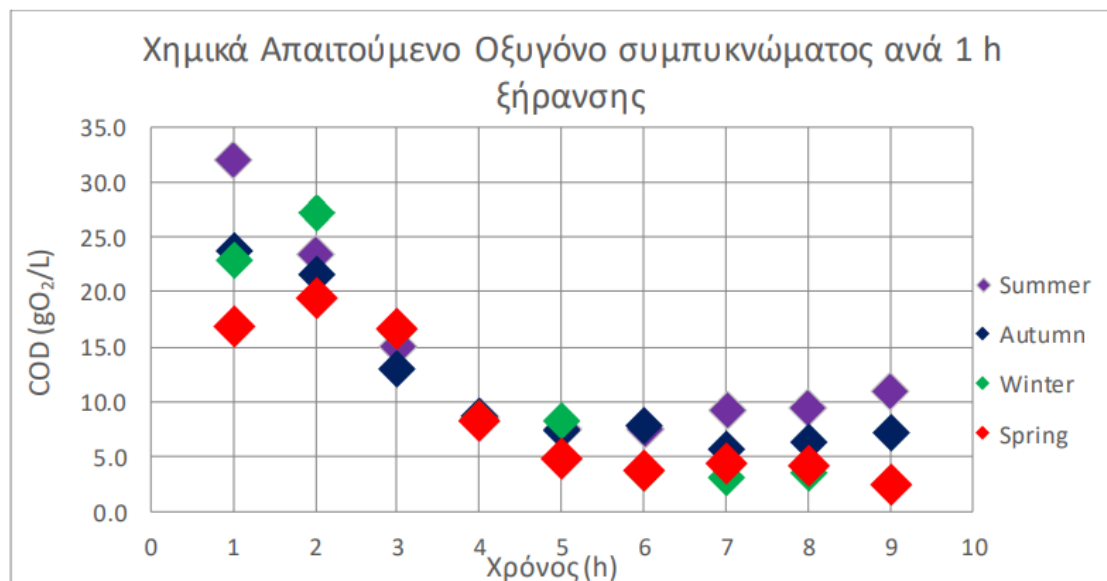
Η ενζυματική υδρόλυση ενισχύει την υδρολυτική ικανότητα των τροφικών υπολειμμάτων και μειώνει τα πτητικά αιωρούμενα στερεά. Το κυριότερο στάδιο σε αυτή τη διαδικασία είναι η μετατροπή πολυμερών υλικών σε ζυμώσιμα προϊόντα. Για παράδειγμα από ζύμωση ζάχαρης σε οικιακά απόβλητα, όπως ξηρές τροφές και προϊόντα αρτοποιίας μπορεί να προκύψουν ουσίες όπως όπως το ηλεκτρικό οξύ, το γαλακτικό οξύ, το φουμαρικό οξύ τα οποία αποτελούν πρώτη ύλη για τα ΠΥΑ. Επιπλέον, υδρολύματα και πλούσια σε πρωτεΐνες τροφικά υπολείμματα μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή των βιοπλαστικών [52]. Να σημειωθεί ότι ορισμένα υπολείμματα τροφίμων δεν έχουν αρκετά θρεπτικά συστατικά για να διατηρήσουν τη βιολογική δραστηριότητα κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, το οποίο μπορεί να αντιμετωπιστεί με συνδυασμό διαφορετικών υπολειμμάτων. Σχετικά με τη λιγνοκυτταρινούχο βιομάζα, το αδιάλυτο κλάσμα που απομένει μετά τη προεπεξεργασία ένα μείγμα κυτταρίνης, ημικυτταρίνης και λιγνίνης με το μεγαλύτερο μέρος των ημικυτταρικών να έχει διαλυθεί. Έτσι στην ενζυμική υδρόλυση είναι αναγκαία κυρίως η μετατροπή της κυτταρίνης σε ζυμώσιμα σάκχαρα. Σημειώνεται ότι η λιγνίνη είναι μια από τις πιο ανθεκτικές δομές λόγω των φαινυλοπροπανοειδών μονάδων της και δύσκολα υδρολύεται [53].

1.7.4 Πιλοτικό πρόγραμμα διαχείρισης και επεξεργασίας τροφικών υπολειμμάτων: Waste4Think

Ένα πιλοτικό πρόγραμμα διαχείρισης και επεξεργασίας τροφικών υπολειμμάτων είναι το Waste4think (Horizon2020), στο δήμο Χαλανδρίου σε συνεργασία με το Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο. Η διεργασία περιλάμβανε το διαχωρισμό στην πηγή τροφικών υπολειμμάτων από 250 νοικοκυριά καθώς και την ανάπτυξη καινοτόμου προσέγγισης για την αξιοποίηση τους. Τα τροφικά υπολείμματα οδηγούνταν σε θάλαμο ξήρανσης/τεμαχισμού. Η θερμοκρασία του θαλάμου διατηρούνταν στους 94°C με χρήση ηλεκτρικής αντίστασης για 9 ώρες, μέχρι να ολοκληρωθεί η διαδικασία ξήρανσης. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας οι παραγόμενοι ατμοί διέρχονταν από τον θάλαμο μέσω ενός συμπυκνωτή, δημιουργώντας ένα υγρό συμπύκνωμα. Τα προϊόντα της διαδικασίας ήταν ένα ομογενοποιημένο προϊόν στερεάς βιομάζας που ονομάζεται FORBI (Food Residue Biomass) το οποίο είναι πλούσιο σε άνθρακα και άζωτο και το συμπύκνωμα (condensate) που είναι πλούσιο σε οργανικό άνθρακα, αλλά φτωχό σε άζωτο. Το FORBI παρουσιάζει βέλτιστη αναλογία C: N και μέση υγρασία 10%, αφού έχει αφαιρεθεί το 75 – 80% της αρχικής περιεχόμενης υγρασίας των απορριμμάτων, γεγονός που το καθιστά ιδανικό υπόστρωμα για πολλές βιολογικές διεργασίες, όπως αναερόβια χώνευση, κομποστοποίηση και παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας μέσω μικροβιακών κυψελίδων καυσίμου. Το συμπύκνωμα περιέχει εύκολα αποικοδομήσιμο άνθρακα που μπορεί να καταναλωθεί από μικροοργανισμούς και λόγω υψηλής αναλογίας C: N θεωρείται καλή τροφοδοσία για παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας, όπως τα ΠΥΑ. [54].

Στο Σχήμα 1.18 παρουσιάζεται η συγκέντρωση του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου του συμπυκνώματος ανά 1 ώρα ξήρανσης ζυμώσιμων απορριμμάτων. Τα αποτελέσματα της συγκέντρωσης του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου παρουσιάζουν ίδια τάση για όλους τους μήνες. Συγκεκριμένα, το συμπύκνωμα που παράγεται τις πρώτες ώρες ξήρανσης έχει την υψηλότερη συγκέντρωση οργανικής ύλης, η οποία μειώνεται μετά την τρίτη ώρα και στη

συνέχεια αυξάνεται ξανά σε σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με τις πρώτες ώρες ξήρανσης.



Σχήμα 1.18: Διάγραμμα χημικά απαιτούμενο οξυγόνο συμπυκνώματος ανά 1 h ενός κύκλου ξήρανσης ζυμώσιμων απορριμμάτων συλλεγόμενων σε περίοδο 12 μηνών.

Στον Πίνακα 1.7 παρουσιάζεται η μέση τιμή κάθε χημικού χαρακτηριστικού του συμπυκνώματος, καθώς και ελάχιστη και μέγιστη συγκέντρωση. Δεν αποδίδονται συγκεκριμένες τιμές, διότι κανένα δείγμα δεν παρουσιάζει παρόμοια σύσταση.

Πίνακας 1.7: Χημικά χαρακτηριστικά συμπυκνώματος συλλεγόμενο σε διάρκεια 12 μηνών.

Δείκτης	Ελάχιστη Συγκέντρωση (mg/L)	Μέγιστη Συγκέντρωση (mg/L)	Μέση Συγκέντρωση (mg/L)
Διαλυτό Χημικά Απαιτούμενο Οξυγόνο (sCOD)	10000	17200	13200
Ολικός Οργανικός Άνθρακας (TOC)	3440	5460	4344
Ολικό Άζωτο (TN)	4,3	21	12,8
Οξικό Οξύ	646,9	1820,7	1175,3
Γαλακτικό Οξύ	0	95,6	41,9
Αιθανόλη	1225	5818	3328,7
Φαινολικά	3,1	3,2	3,5
Ολικά Αιωρούμενα Στερεά (TSS)	50	150	75
Πτητικά Αιωρούμενα Στερεά (VSS)	50	150	75

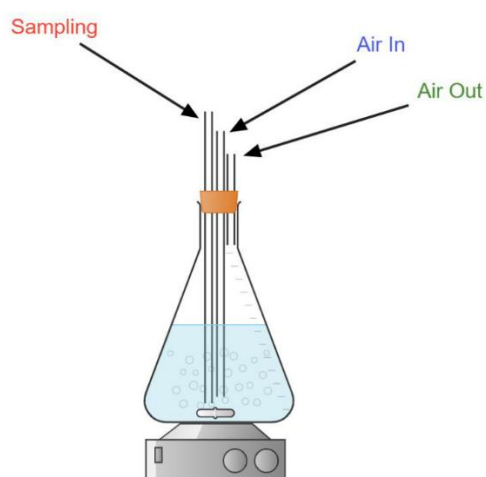
Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η αξιοποίηση των τροφικών υπολειμμάτων για την παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας όπως τα βιοπλαστικά μέσω μικτής καλλιέργειας βακτηρίων με περιορισμό αζώτου. Ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιείται συνθετικό διάλυμα άνθρακα, το οποίο προσμοιάζει το συμπύκνωμα που λαμβάνεται από το πρόγραμμα Waste4think (Horizon2020). Ως πηγή αζώτου χρησιμοποιείται η ουρία με στόχο τον εγκλιματισμό της βιομάζας σε οργανικό άζωτο, ώστε να είναι δυνατή η μελλοντική χρήση αποβλήτων πλούσιων σε αυτό, όπως το στράγγισμα των ΧΥΤΑ. Συγκεκριμένα εξετάζεται η επίδραση του λόγου C/N στην παραγωγή βιοπλαστικού. Τέλος, διερευνάται η απόδοση σε ΠΥΑ διπλασιάζοντας το οργανικό φορτίο υπό σταθερό λόγο C/N.

2. Πειραματικό μέρος

2.1 Πειραματική διάταξη

Τα πειράματα παραγωγής ΠΥΑ διεξήχθησαν σε αντιδραστήρες άντλησης – πλήρωσης (Draw and Fill Reactor, DFR). Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν δύο όμοιες πειραματικές διατάξεις οι οποίες αποτελούνταν από μια κωνική φιάλη με ενεργό όγκο 1L (Σχήμα 2.1). Η σπή της κωνικής φιάλης έκλεινε με κατάλληλο πώμα από το οποίο διέρχονταν τρεις σωλήνες. Ο ένας σωλήνας αποτελούσε την είσοδο του ενυδατωμένου αέρα, ώστε να δημιουργηθούν αερόβιες συνθήκες, με τη χρήση αντλίας αέρα. Σημειώνεται ότι ο αέρας πρέπει να είναι ενυδατωμένος ώστε να αποφευχθεί συμπύκνωση της καλλιέργειας λόγω εξάτμισης του νερού. Ο δεύτερος σωλήνας συνδεόταν με σωλήνα σιλικόνης και χρησιμοποιούταν για την δειγματοληψία μέσω σύριγγας των 50mL. Ο τρίτος σωλήνας χρησιμοποιούταν για να εξέρχεται ο αέρας.

Το περιεχόμενο του αντιδραστήρα βρισκόταν υπό συνεχή και σταθερή ανάδευση στα 250 rpm, ενώ η θερμοκρασία του συστήματος διατηρούταν σταθερή στους 27°C εντός επωαστικού θαλάμου.



Σχήμα 2.1: Πειραματική διάταξη παραγωγής βιοπλαστικών.

2.2 Πειραματική διαδικασία

2.2.1 Κύκλοι πειραμάτων

Πραγματοποιήθηκαν δυο πειράματα για την παραγωγή των ΠΥΑ. Το πρώτο πείραμα διενεργήθηκε στον αντιδραστήρα Draw and Fill Reactor – 1 (DFR-1) με χρήση εγκλιματισμένης βιομάζας, με σκοπό την ανάπτυξη μικροβιακής κοινοπραξίας ικανής να συσσωρεύει ΠΥΑ, και την μελέτη της συμπεριφοράς των μικροοργανισμών. Το δεύτερο πείραμα πραγματοποιήθηκε στον αντιδραστήρα Draw and Fill Reactor – 2 (DFR-2) με στόχο τη μελέτη της συμπεριφοράς του συστήματος διπλασιάζοντας το οργανικό φορτίο. Ο πρώτος αντιδραστήρας (DFR-1) λειτούργησε 291 μέρες ενώ ο δεύτερος αντιδραστήρας (DFR-2) λειτούργησε 167 ημέρες, αποτελώντας συνέχεια του αντιδραστήρα DFR-1. Ο DFR-2 προέκυψε με εμβολιασμό 300mL εγκλιματισμένης βιομάζας από τον DFR-1 σε τέλος κύκλου αζώτου με επακόλουθη τη φάση του άνθρακα. Ο DFR-1 και ο DFR-2 λειτουργούσαν στις ίδιες ακριβώς συνθήκες που αναλυθήκαν στην παραπάνω ενότητα. Επιλέχθηκε λόγος άνθρακα προς άζωτο (C/N) 100: 1, με πηγή αζώτου την ουρία. Κύρια διαφορά των δύο αντιδραστήρων ήταν η συγκέντρωση του άνθρακα και του αζώτου, καθώς στον DFR-1 τροφοδοτήθηκαν 2000 mg O₂/L άνθρακα και 20 mg/L άζωτου, ενώ στον DFR-2 τροφοδοτήθηκε η διπλάσια ποσότητα δηλαδή, 4000 mg O₂/L και 40 mg N/L.

2.2.2 Τροφοδοσία πειραματικών διατάξεων

Οι τροφοδοσίες άνθρακα και αζώτου είχαν την σύσταση που παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.1 με τελικό όγκο 1000 mL. Ως πηγή αζώτου χρησιμοποιήθηκε η ουρία ενώ ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκε συνθετικό διάλυμα άνθρακα που προσομοιάζει σε σύσταση το υγρό συμπύκνωμα που προκύπτει από την ξήρανση των τροφικών υπολειμμάτων όπως περιγράφεται στην ενότητα 1.7.4. Η σύσταση της συνθετικής τροφοδοσίας παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.2.

Πίνακας 2.1: Σύσταση ολικής τροφοδοσίας αντιδραστήρων.

Διάλυμα	Ποσοστό (% κ.ο.)
Συνθετική τροφοδοσία άνθρακα ή τροφοδοσία αζώτου	70
Ρυθμιστικό διάλυμα	20
Διάλυμα μετάλλων	9
Διάλυμα ιχνοστοιχείων	1

Πίνακας 2.2: Σύσταση συνθετικής τροφοδοσίας άνθρακα.

Ουσία	Ποσοστό (%) επί του συνολικού COD
Προπιονικό οξύ	6
Οξικό οξύ	27
Βουτυρικό οξύ	27
Αιθανόλη/COD	20
Γλυκόζη/COD	15
Γαλακτικό οξύ/COD	5

Το ρυθμιστικό διάλυμα αποτελούνταν από ένα μείγμα ασθενούς οξέος και της συζυγούς του βάσης και χρησιμοποιήθηκε ως μέσο διατήρησης ουδέτερου pH.

Πίνακας 2.3: Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος.

Ουσία	Ποσότητα (g/L)
K_2HPO_4	12,5
KH_2PO_4	7,5

Το Διάλυμα μετάλλων περιλάμβανε τα θρεπτικά συστατικά τα οποία είναι απαραίτητα και χρησιμοποιούνται από τους μικροοργανισμούς για την ανάπτυξη και το μεταβολισμό τους.

Πίνακας 2.4: Σύσταση διαλύματος μετάλλων.

Ουσία	Ποσότητα (g/L)
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	12,5
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	7,5

Το Διάλυμα ιχνοστοιχείων αποτελούσε ένα διάλυμα διαφόρων ιχνοστοιχείων τα οποία είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των κυττάρων και την αύξηση της βιομάζας.

Πίνακας 2.5: Σύσταση διαλύματος ιχνοστοιχείων.

Ουσία	Ποσότητα (g/L)
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,01
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	2
$NaMoO_4 \cdot 2H_2O$	0,03
$NiCl_2 \cdot 2H_2O$	0,02
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	1
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,2
KI	0,3
H_3BO_3	0,3
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,03
EDTA	2,5

2.2.3 Εγκλιματισμός βιομάζας για παραγωγή ΠΥΑ

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με χρήση μικτής καλλιέργειας εγκλιματισμένης βιομάζας. Σημειώνεται ότι οι μικροοργανισμοί προήλθαν από το ρεύμα ανακυκλοφορίας της δευτεροβάθμιας καθίζησης του Κέντρου Επεξεργασίας Λυμάτων (Κ.Ε.Λ.) Μεταμόρφωσης.

Η παροχή άνθρακα και αζώτου πραγματοποιήθηκε σε εναλλασσόμενους κύκλους, ώστε να εξασφαλιστεί η επιβολή περιορισμού των θρεπτικών. Κάθε κύκλος διαρκούσε 47h, ενώ ανάμεσα στους κύκλους πραγματοποιούνταν 1h καθίζηση. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιούνταν στην αρχή, στη μέση στο τέλος κάθε φάσης.

Παρακάτω παρουσιάζονται οι φάσεις 1 έως 4 οι οποίες επαναλαμβάνονταν διαδοχικά για το επιθυμητό χρονικό διάστημα.

1. Φάση άνθρακα (συσσώρευση)

Σε αυτή τη φάση η τροφοδοσία ήταν πλούσια σε πηγή άνθρακα αλλά δεν περιείχε πηγή αζώτου. Επιπλέον, η ανάδευση και ο αερισμός ήταν ενεργοί. Οι μικροοργανισμοί σε αυτή τη φάση καταναλώνουν τον άνθρακα τόσο για την ενεργειακή συντήρηση των κυττάρων τους όσο και για ενδοκυτταρική συσσώρευση των ΠΥΑ.

2. Φάση καθίζησης/μετάγγισης

Πριν την αλλαγή κάθε τροφοδοσίας, γινόταν παύση της ανάδευσης και του αερισμού για 1h έτσι ώστε να επιτευχθεί η καθίζηση της βιομάζας. Στη συνέχεια, απομακρυνόταν το υπερκείμενο υγρό ίσο με τα 2/3 του ενεργού όγκου του αντιδραστήρα, και πραγματοποιούνταν η προσθήκη της νέας τροφοδοσίας ίσου όγκου.

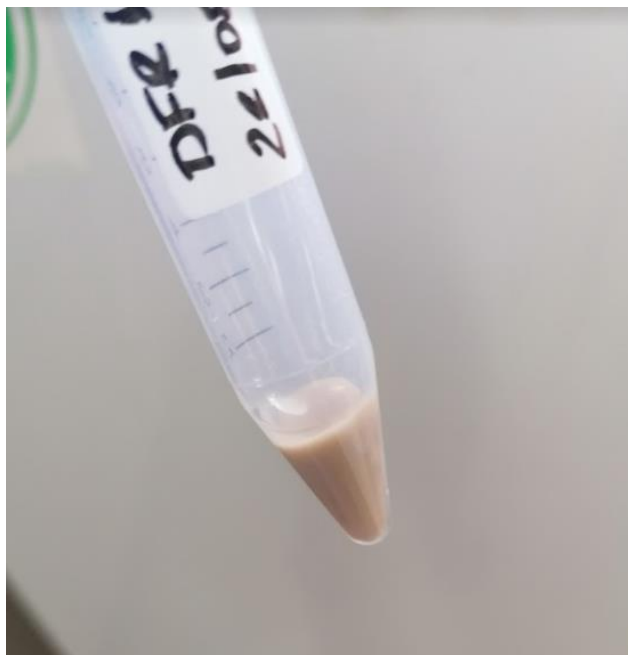
3. Φάση αζώτου

Σε αυτήν τη φάση, η τροφοδοσία περιείχε πηγή αζώτου απουσία πηγής άνθρακα. Οι μικροοργανισμοί που έχουν την ικανότητα να συνθέτουν ΠΥΑ μπορούν να επιβιώσουν αλλάζοντας το μεταβολισμό τους προκειμένου να καταναλώσουν το ήδη συσσωρευμένο ΠΥΑ. Κατά συνέπεια σε αυτήν τη φάση το αποθηκευμένο βιοπλαστικό αναμένεται να μειωθεί, ωστόσο είναι απαραίτητη για την δημιουργία νέων κυττάρων των βιοσυσσωρευτών. Επίσης ο αερισμός και η ανάδευση ήταν σε λειτουργία.

4. Φάση καθίζησης/μετάγγισης

Με την εξάντληση της πηγής αζώτου στο ζυμωτικό υγρό, ακολουθούσαν ξανά η φάση καθίζησης/μετάγγισης για την επόμενη τροφοδοσία.

Στο τέλος κάθε κύκλου λαμβανόταν δείγμα βιομάζας το οποίο φυγοκεντρώνταν στα 4400 rpm με σκοπό τον διαχωρισμό των στερεών από το υπερκείμενο. Τελικά το δείγμα της βιομάζας αποθηκεύονταν στη κατάψυξη σε θερμοκρασία -20°C .



Σχήμα 2.2: Βιομάζα μετά από φυγοκέντρηση.

2.2.4 Ανάκτηση βιοπλαστικού

Τα δείγματα βιομάζας μεταφέρονταν στην κατάψυξη στους -80°C για τουλάχιστον 24 h. Το επόμενο στάδιο είναι η βελτιστοποιημένη διαδικασία της λυοφιλίωσης (Freeze Drying) που στοχεύει στην λήψη ξηρής βιομάζας για την ανάκτηση του τελικού προϊόντος του βιοπλαστικού. Η ξήρανση της βιομάζας έγινε σε λυοφιλιωτή (Christ Alpha 1-4) προκειμένου να μην καταστραφούν τα κύτταρα, σε συνθήκες θερμοκρασίας -50°C και πίεσης 0,078 mbar.

Η ξηρή κυτταρική βιομάζα βάρους 20 – 30 mg τοποθετούνταν σε φιαλίδια πυρέξ όγκου 10 mL. Στην συνέχεια ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

1. Προσθήκη 2 mL χλωροφορμίου (CHCl_3)
2. Προσθήκη μεθανόλης (MeOH), η οποία ήταν οξινισμένη με $3\% \frac{\text{V}}{\text{V}}$ πυκνού θειικού οξέος (H_2SO_4) και 100mg/L βενζοϊκού οξέος ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$) ως εσωτερικό πρότυπο για την μετέπειτα ποσοτική ανάλυση.
3. Χώνευση για 4h στους 100°C
4. Προσθήκη 1 mL H_2O
5. Πολύ καλή ανάμιξη

Μετά την ανάμιξη τα δείγματα αφήνονταν σε ηρεμία για να πραγματοποιηθεί ο διαχωρισμός των φάσεων και στην συνέχεια συλλεγόταν η φάση του χλωροφορμίου. Στόχος αυτής της διαδικασίας αποτελεί η παραλαβή του βιοπλαστικού στη φάση του χλωροφορμίου, η οποία θα χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω αναλύσεις.

2.3 Αναλυτικές μέθοδοι

2.3.1 Μέτρηση PH

Η μέτρηση του pH πραγματοποιείται καθημερινά με την εμβάπτιση του ηλεκτροδίου (inoLab WTW series pH 720) του ηλεκτρονικού pH-μέτρου πάγκου ("SensDirect pH electrode type 330") στα δείγματα που λαμβάνονται από τον αντιδραστήρα. Το Ph-μετρο βαθμονομείται σε καθημερινή βάση, με χρήση τριών εμπορικών πρότυπων ρυθμιστικών διαλυμάτων:

- Διάλυμα κιτρικού οξέος / υδροξειδίου του νατρίου / χλωριούχου νατρίου, pH=4,0.
- Διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου / όξινου φωσφορικού νατρίου, pH=7,0.
- Διάλυμα ανθρακικού νατρίου / όξινου ανθρακικού νατρίου, pH=10,0.



Σχήμα 2.3: Μέτρηση pH με το ηλεκτρονικό πεχάμετρο πάγκου "Sanxin PHS-3D-01 Lab pH Meter" και ηλεκτρόδιο "SensDirect pH electrode type 330"

2.3.2 Μέτρηση οπτικής πυκνότητας (OD)

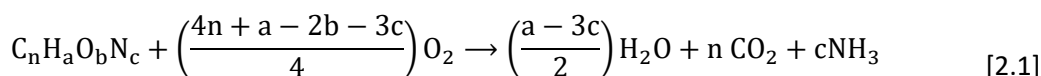
Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) πραγματοποιείται καθημερινά με τη χρήση του ηλεκτρονικού φωτόμετρου Hach Lange (DR2800). Λαμβάνονται περίπου 3 mL τα οποία εισάγονται σε πλαστική κυψελίδα φωτομετρούνται στο ηλεκτρονικό φωτόμετρο Hach Lange (DR2800) σε μήκος κύματος 600 nm.



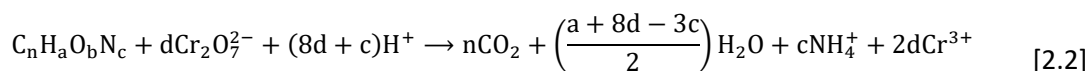
Σχήμα 2.4 : Ηλεκτρονικό φασματοφωτόμετρο "Hach Lange (DR2800)"

2.3.3 Μέτρηση Χημικά Απαιτούμενου Οξυγόνου (COD)

Το χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (Chemical Oxygen Demand, COD) χρησιμοποιείται για τον έμμεσο προσδιορισμό του οργανικού φορτίου ενός διαλύματος και αντιστοιχεί στη συνολική ποσότητα οξυγόνου που καταναλώνεται για την πλήρη οξείδωση του οργανικού άνθρακα σε διοξείδιο του άνθρακα (CO₂), αμμωνία (NH₃) και νερό (H₂O).



Η μέτρηση του Χημικά Απαιτούμενου Οξυγόνου Chemical Oxygen Demand - COD πραγματοποιείται με τη χρωματομετρική μέθοδο κλειστής επαναρροής, όπως περιγράφεται στο εγχειρίδιο Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater [55]. Πιο αναλυτικά πραγματοποιείται αντίδραση οξείδωσης, παρουσία καταλύτη (AgSO₄) σε ισχυρά όξινες συνθήκες λόγω του πυκνού H₂SO₄. Κατά την οξείδωση, το χρώμιο ανάγεται από εξασθενές (Cr⁶⁺) σε τρισθενές (Cr³⁺) και η αντίδραση που διεξάγεται μεταξύ του οργανικού υποστρώματος και του διχρωμικού ιόντος.



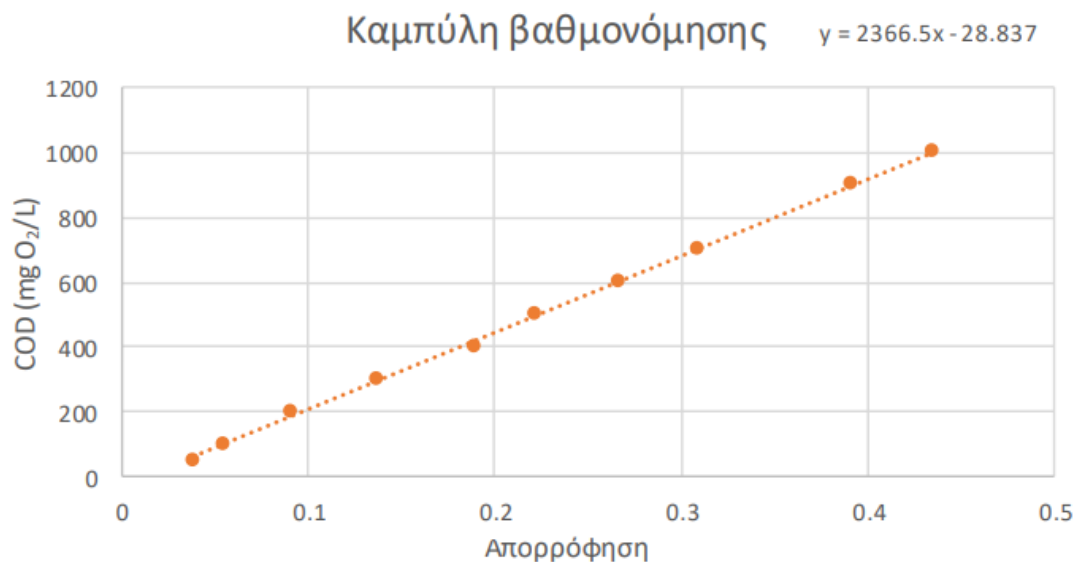
Όπου, $d = 2n/3 + a/6 - b/3 - c/2$

Σε φιαλίδια προστίθενται αρχικά 2.8 mL H₂SO₄ και 1.2 mL K₂Cr₂O₇. Στη συνέχεια, σε ένα φιαλίδιο προστίθεται 2 mL νερό, το οποίο αποτελεί το τυφλό δείγμα (blank), και στα υπόλοιπα 2 mL δείγμα, που προκύπτει έπειτα από διήθηση με φίλτρο των 55 nm. Τα φιαλίδια ανακινούνται προσεκτικά και τοποθετούνται σε φούρνο στους 140°C για 2 ώρες. Έπειτα τα δείγματα φωτομετρούνται σε μήκος κύματος 600 nm στο ηλεκτρονικό φωτόμετρο Hach Lange (DR2800). Σε αυτό το μήκος κύματος το τρισθενές χρώμιο (Cr³⁺) εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση, ενώ το διχρωμικό ελάχιστη. Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των ιόντων (Cr⁶⁺) που ανάγονται, τόσο μεγαλύτερη είναι και η τιμή της απορρόφησης που προκύπτει από τη φωτομέτρηση.



Σχήμα 2.5: Φιαλίδια προς φωτομέτρηση μετά την ολοκλήρωση της οξείδωσης του οργανικού φορτίου

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του COD, κατασκευάζεται καμπύλη βαθμονόμησης, με χρήση πρότυπου διαλύματος όξινου φθαλικού καλίου, KHP. Το πρότυπο διάλυμα παρασκευάζεται με διάλυση 0.085 g KHP, το οποίο έχει προηγουμένως ξηρανθεί για 2 ώρες στους 105°C, σε 100 ml απιονισμένου νερού, καθώς η περιεκτικότητα 850 mg/L αντιστοιχεί σε 1 g COD/L (για την πλήρη οξείδωση 850 mg KHP απαιτείται 1 g O₂). Το διάλυμα αυτό αποτελεί το δείγμα για το τελευταίο σημείο της καμπύλης βαθμονόμησης. Για τα ενδιάμεσα σημεία, το πρότυπο διάλυμα αραιώνεται κατάλληλα, ώστε να μετρηθούν και οι απορροφήσεις που αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις 20, 50, 200, 300, 400, 500, 600, 700 και 900 mg COD/L (Σχήμα 2.6). Επιπλέον, το δείγμα τού πρώτου φιαλιδίου αποτελείται μόνο από απιονισμένο νερό (blank).



Σχήμα 2.6: Καμπύλη βαθμονόμηση χημικά απαιτούμενου οξυγόνου συναρτήσεως απορρόφησης

2.3.4 Μετρήσεις στερεών TSS και VSS

Οι μετρήσεις των ολικών αιωρούμενων στερεών (Total Solids, TSS) και πτητικών αιωρούμενων στερεών (Volatile Suspended Solids, VSS) διεξάγονται σύμφωνα με το εγχειρίδιο Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater [55].

Προσδιορισμός TSS

Λαμβάνεται δείγμα από τον αντιδραστήρα και διηθείται υπό κενό σε προζυγισμένο φίλτρο πόρων 0.55 μm , το οποίο τοποθετείται σε φούρνο στους 105°C για 24 ώρες με σκοπό την αφαίρεση την υγρασίας. Έπειτα, το φίλτρο με το στερεό υπόλειμμα απομακρύνεται από το φούρνο αφήνεται να ψυχθεί σε ξηραντήρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολουθεί ζύγιση του φίλτρου και υπολογισμός των ολικών αιωρούμενων στερεών από τη Σχέση 2.3.

$$TSS = \frac{m_{105} - m_{\text{φίλτρου}}}{V_{\text{Διηθησης}}} \quad [2.3]$$

Όπου, TSS η συγκέντρωση των ολικών αιωρούμενων στερεών στο δείγμα [g/L] m_{105} το βάρος του φίλτρου έπειτα από 24 h στους 105°C [g] $m_{\text{φίλτρου}}$ το αρχικό βάρος του φίλτρου [g] $V_{\text{Διηθησης}}$ ο όγκος δείγματος που διηθείται [L].

Προσδιορισμός VSS

Για τη μέτρηση των πτητικών αιωρούμενων στερεών (VSS) απαιτείται ο υπολογισμός των πτητικών αιωρούμενων στερεών (TSS). Συνεπώς, γίνεται χρήση του φίλτρου που χρησιμοποιήθηκε και για τη μέτρηση των TSS, το οποίο οδηγείται σε πυραντήριο θερμοκρασίας 550°C για 15 min, μετά την παραμονή του στον φούρνο θερμοκρασίας 105°C και την καταγραφή της μάζας. Ακολουθεί ζύγιση του φίλτρου και υπολογισμός των πτητικών αιωρούμενων στερεών από τη Σχέση 2.4.

$$VSS = \frac{m_{105} - m_{550}}{V_{\text{Διηθησης}}} \quad [2.4]$$

Όπου, VSS η συγκέντρωση των πτητικών αιωρούμενων στερεών στο δείγμα [g/L] m_{105} το βάρος του φίλτρου έπειτα από 24 h στους 105°C [g], m_{550} το βάρος του φίλτρου έπειτα από 15 min στους 550°C [g].

2.3.5 Μέτρηση αμμωνιακών ιόντων (NH_4^+)

Η μέτρηση των αμμωνιακών ιόντων (NH_4^+) πραγματοποιείται μέσω προσδιορισμού της αμμωνίας με τη μέθοδο Nessler. Κατά τη συγκεκριμένη μέθοδο, το αντιδραστήριο Nessler (K_2HgI_4) αντιδρά με την αμμωνία που υπάρχει στο δείγμα, υπό έντονα αλκαλικές συνθήκες, παράγοντας ένα κίτρινο προϊόν. Ο προσδιορισμός πραγματοποιείται φωτομετρικά καθώς η ένταση του κίτρινου χρώματος είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση αμμωνίας.



Σχήμα 2.7: Φωτόμετρο Hanna Aquaculture Photometer HI83303 και αντιδραστήρια (HI-93733-01 Ammonia HR kit) για τον προσδιορισμό του αμμωνιακού αζώτου.

Στην παρούσα εργασία, η μέθοδος εφαρμόζεται με χρήση του φωτομέτρου Aquaculture Photometer HI83303 και του αντίστοιχου kit αντιδραστηρίων (HI-93733-01 Ammonia HR) της εταιρείας Hanna Instruments (Σχήμα 2.7). Αξίζει να σημειωθεί ότι μέθοδος είναι ικανή να ανιχνεύσει συγκεντρώσεις αμμωνιακού αζώτου μέχρι 100 mg/L. Για την μέτρηση σε ειδικό φιαλίδιο προστίθενται 9mL του αντιδραστηρίου A και 1mL διηθημένου δείγματος. Το φιαλίδιο εισάγεται στο φωτόμετρο και μηδενίζεται το όργανο. Έπειτα προστίθεται ακόμα στο φιαλίδιο 2 με 3 σταγόνες του αντιδραστηρίου B. Το φιαλίδιο εισάγεται στο φωτόμετρο και πραγματοποιείται η μέτρηση.

2.3.6 Μέτρηση ολικού αζώτου (N)

Για τον προσδιορισμό τού ολικού αζώτου (Total Nitrogen, TN) χρησιμοποιείται διηθημένο δείγμα (30 – 40mL) το οποίο εισάγεται σε κατάλληλο γυάλινο περιέκτη. Ο περιέκτης τοποθετείται στο όργανο όπου γίνεται η ανάλυση του ολικού αζώτου το οποίο είναι το SHIMADZU Total Nitrogen Measuring Unit (TNM-L)

Ο προσδιορισμός του ολικού αζώτου πραγματοποιείται μέσω θερμικής αποσύνθεσης / χημειοφωταύγειας (thermal decomposition / chemiluminescence). Τα δείγματα που περιέχουν ενώσεις αζώτου αποσυντίθενται σε μονοξείδιο του αζώτου (NO) στους 720°C με καύση. Το ψυχρό και απαλλαγμένο από την υγρασία αέριο NO διέρχεται από τον αναλυτή χημειοφωταύγειας, όπου το NO αντιδρά με το όζον και σχηματίζει έναν μείγμα υποξειδίου του αζώτου (NO₂) και διεγερμένου οξειδίου του αζώτου (NO₂*). Καθώς το NO₂* επιστρέφει στην αρχική κατάσταση, εκπέμπει ακτινοβολία, η οποία μετράται φωτοηλεκτρικά. Το σήμα του ανιχνευτή δημιουργεί μια κορυφή που είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση αζώτου στο δείγμα.

2.3.7 Μέτρηση Πτητικών Λιπαρών Οξέων (VFAs)

Η συγκέντρωση των Πτητικών Λιπαρών Οξέων (Volatile Fatty Acids - VFAs) προσδιορίζεται με χρήση του αέριου χρωματογράφου Shimadzu GC-2010 plus (Σχήμα 2.8), με τριχοειδή στήλη διαχωρισμού Hewlett Packard FFAP, μήκους 30 mm, εσωτερικής διαμέτρου 0,53 mm, φιλμ 1 μm, με αυτόματο δειγματολήπτη τύπου SHIMADZU AOC-20s, ανιχνευτή φλόγας ιονισμού (Flame Ionization Detector - FID) και ήλιο υψηλής καθαρότητας ως φέρον αέριο.

Για τη προετοιμασία του δείγματος λαμβάνεται 1 mL διηθήματος και τοποθετείται σε Erpendorf μαζί με 300 μL H₂SO₄ 20% v/v. Το διάλυμα ανακινείται σε Vortex και μέσω σύριγγας, διέρχεται από φίλτρο Whatman πόρων 0,22 μm, ώστε να απομακρυνθούν θειικά ιζήματα και μικροστερέα που μπορεί να έχουν παραμείνει. Έπειτα οδηγείται σε ειδικό φιαλίδιο (septum vial), το οποίο τοποθετείται στον αέριο χρωματογράφο

Η στήλη είναι προγραμματισμένη να ξεκινά από αρχική θερμοκρασία 105°C και να φτάνει στους 160°C με ρυθμό 15°C/min και κατόπιν στους 225°C με ρυθμό 20°C/min, όπου και παραμένει για 3 min. Το ήλιο εισέρχεται στη στήλη με παροχή 30 mL/min και η θερμοκρασία λειτουργίας του FID είναι 230°C. Στο τέλος, προκύπτει το χρωματογράφημα του δείγματος και μέσω προτύπων καμπυλών εξάγονται οι συγκεντρώσεις των VFAs.



Σχήμα 2.8: Αέριος χρωματογράφος Shimadzu GC-2010 plus με ανιχνευτή φλόγας ιονισμού (FID) για τον προσδιορισμό των Πτητικών Λιπαρών Οξέων (VFAs)

2.3.8 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

Η τεχνική διαχωρισμού της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography - HPLC) χρησιμοποιείται στην παρούσα εργασία για τον προσδιορισμό της αιθανόλης του λακτικού οξέος και της γλυκόζης στα δείγματα.

Η πειραματική διάταξη της υγρής χρωματογραφίας (Σχήμα 2.9), αποτελείται από: ισοκρατική αντλία τύπου "Agilent 1260 Infinity II Quaternary Pump", αυτόματο δειγματολήπτη τύπου Agilent 1260 Infinity II Preparative Autosampler και σύστημα εισαγωγής δείγματος σταθερού όγκου, στήλη Agilent Hi-Plex H (διαστάσεων 7,7X300mm και διαμέτρου 8μm), ανιχνευτή σάρωσης υπεριώδους ακτινοβολίας τύπου Agilent1260 Infinity II Diode Array Detector, ανιχνευτή δείκτη διάθλασης τύπου Agilent1260 Infinity II Refractive Index Detector. Το σύστημα για την εισαγωγή του δείγματος περιλαμβάνει την υποδοχή για τη σύριγγα, το βρόχο σταθερού όγκου, ο οποίος καθορίζει τον όγκο του δείγματος που οδηγείται στη στήλη στα 20μL, την είσοδο του διαλύτη και τις εξόδους προς τη στήλη και προς το δοχείο των αποβλήτων. Η θερμοκρασία της στήλης κατά τις αναλύσεις είναι ίση με 50°C και η παροχή της κινητής φάσης ίση με 0,6mL/min. Σημειώνεται ότι οι ουσίες που αναλύονται από τον συγκεκριμένο ανιχνευτή παρουσιάζουν μέγιστη κορυφή στα 210nm, καθώς η ανίχνευση πραγματοποιείται στο υπεριώδες φάσμα του φωτός. Η μέτρηση των προς ανάλυση ουσιών πραγματοποιείται με βάση την αλλαγή στον δείκτη διάθλασης του διαλύματος που εκρέει από τη χρωματογραφική στήλη και της κινητής φάσης. Συγκεκριμένα, όσο μεγαλύτερη η διαφορά μεταξύ του δείκτη διάθλασης του δείγματος και της κινητής φάσης, τόσο μεγαλύτερη η μεταβολή της τιμής του στο τελικό διάλυμα που εκλύεται. Ο ανιχνευτής δείκτη διάθλασης αποτελείται από ένα κελί δύο διαδρομών. Κατά τη διάρκεια της ανάλυσης η μία διαδρομή είναι μόνιμα πληρωμένη με την κινητή φάση, ενώ η άλλη δέχεται συνεχή ροή του διαλύματος του δείγματος. Από τις διαδρομές αυτές διέρχεται μία δέσμη φωτός, η οποία ανάλογα με τη σύνθεση του δείγματος εκτρέπεται από τη πορεία αναφοράς της. Η μεταβολή της γωνίας της δέσμης φωτός στηρίζεται στην αρχή της εκτροπής της διαθλασιμετρίας και καταγράφεται από τον ανιχνευτή, ο οποίος επηρεάζεται από τα προσπίπτοντα σε αυτόν φωτόνια.

Για τον προσδιορισμό των παραπάνω χημικών ενώσεων λαμβάνεται 1mL διηθημένου δείγματος το οποίο υποβάλλεται σε μικροδιήθηση με φίλτρο Whatman πορώδους 0,2μm, για την απομάκρυνση τυχόν μικροστερεών, τα οποία δύνανται να δημιουργήσουν προβλήματα στην ομαλή λειτουργία της διάταξης HPLC. Έπειτα, το δείγμα τοποθετείται σε κατάλληλο φιαλίδιο και οδηγείται στην υποδοχή της HPLC



Σχήμα 2.9: Διάταξη Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC) Agilent1260 Infinity II.

2.3.9 Ποσοτικός προσδιορισμός ανακτημένου βιοπλαστικού

Μετά την ανάκτηση των βιοπλαστικών μέσω της χώνευσης, λαμβάνεται η φάση του χλωροφορμίου. Το δείγμα με χρήση σύριγγας διέρχεται από φίλτρο Whatman πόρων 0.22 μm , ώστε να απομακρυνθούν ιζήματα και μικροστερεά και οδηγείται σε ειδικό φιαλίδιο (septum vial). Έπειτα, το ειδικό φιαλίδιο (septum vial) τοποθετείται στον εισαγωγέα δείγματος του χρωματογράφου σε θερμοκρασία 250°C. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα για τον προσδιορισμό των ΠΥΑ είναι το εξής: η θερμοκρασία του φούρνου παραμένει στους 60°C για 1 min, έπειτα αυξάνεται στους 120°C με ρυθμό 10°C/min και τέλος στους 270 °C με ρυθμό 45 °C/min, όπου παραμένει για 5 min. Η θερμοκρασία του ανιχνευτή παραμένει σταθερή στους 300 °C και το φέρον αέριο είναι ήλιο υψηλής καθαρότητας, 99,999 % κατ' όγκο, με ροή 1,5 mL/min.

Ως πρότυπα χρησιμοποιήθηκαν το (R)-3-υδροξυβουτυρικό οξύ, συμπολυμερές (R)-3-υδροξυβουτυρικού και (R)-3-υδροξυβαλερικού οξέος αναλογίας 8 mol % HV, τα οποία αγοράστηκαν από τη εταιρεία Sigma Aldrich και Methyl 3-hydroxyhexanoate με πυκνότητα $1 \frac{\text{g}}{\text{mL}}$.

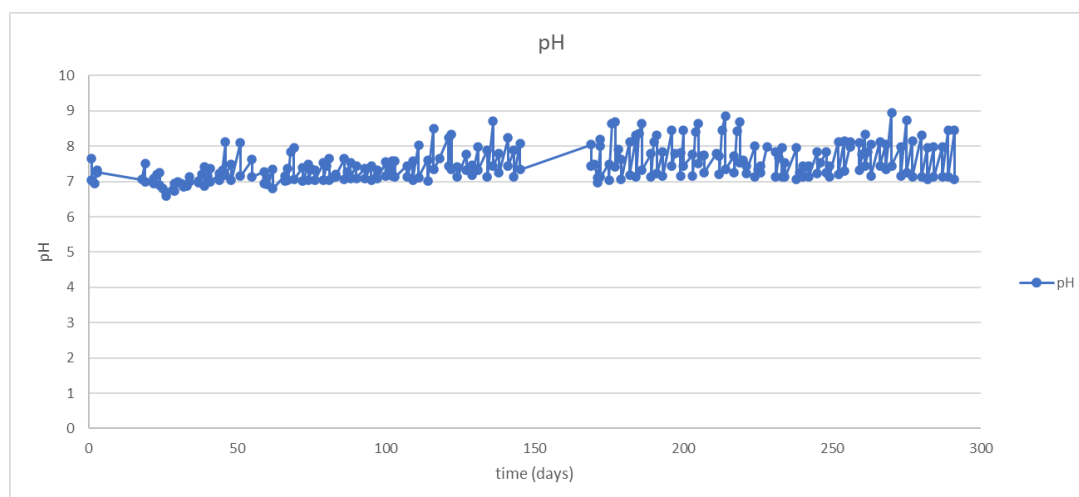
3. Αποτελέσματα και Συζήτηση

3.1 Διεργασία παραγωγής ΠΥΑ σε αντιδραστήρες Άντλησης Πλήρωσης (Draw and Fill).

3.1.1 Αντιδραστήρας άντλησης – πλήρωσης με συγκέντρωση COD 2000 mg O₂/L (Draw and Fill Reactor 1, DFR-1)

Ο αντιδραστήρας που χρησιμοποιήθηκε για τη διεργασία παραγωγής ΠΥΑ ήταν τύπου DFR, δηλαδή αντιδραστήρας άντλησης – πλήρωσης. Οι μικροοργανισμοί που περιέχονται στην μικτή καλλιέργεια ήταν ήδη εγκλιματισμένοι σε περιορισμένες συνθήκες αζώτου. Από την πρώτη ημέρα λειτουργίας του αντιδραστήρα, ξεκίνησε ο περιορισμός άνθρακα – αζώτου. Διαδοχικά παρέχεται στο σύστημα συνθετικό διάλυμα άνθρακα 2000 mg O₂/L, και οργανικό άζωτο συγκέντρωσης 20 mg/L με τη μορφή ουρίας, με σκοπό να δημιουργηθούν συνθήκες τροφικού στρες και να επικρατήσουν οι μικροοργανισμοί που συσσωρεύουν ΠΥΑ.

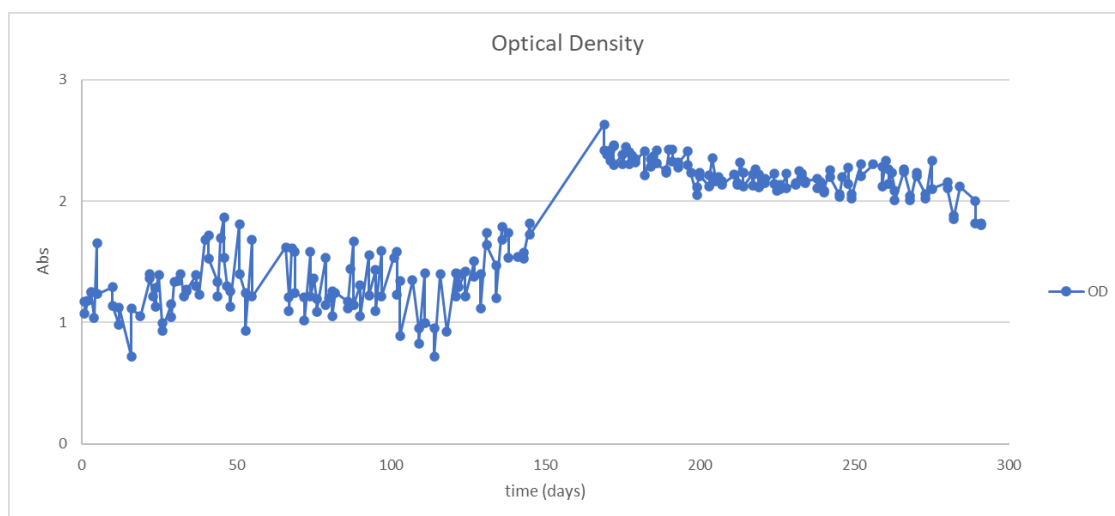
3.1.1.1 pH



Σχήμα 3.1: Διάγραμμα των μετρήσεων του pH συναρτήσει του χρόνου του αντιδραστήρα DFR-1.

Οι τιμές του pH κυμαίνονται στο εύρος 7 έως 9 όπως παρατηρείται στο Σχήμα 3.1. Στην έναρξη κάθε κύκλου άνθρακα το pH είναι ουδέτερο λόγω χρήσης ρυθμιστικού διαλύματος καθώς και γιατί στην τροφοδοσία άνθρακα πραγματοποιείται ρύθμιση με χρήση διαλύματος NaOH 2M. Στη τροφοδοσία του αζώτου το pH αυτορυθμίζεται αντίστοιχα σε ουδέτερη τιμή λόγω της ουρίας και του ρυθμιστικού διαλύματος. Στη διάρκεια της φάσης του αζώτου η μεταβολή στη τιμή του pH είναι μικρή και οφείλεται στη μείωση της αλκαλικότητας λόγω κατανάλωσης της ουρίας. Αντίθετα, οι μέγιστες τιμές του pH συναντώνται στο τέλος της φάσης συσσώρευσης, δηλαδή στο τέλος του κύκλου άνθρακα. Το παραπάνω συμβαίνει λόγω κατανάλωσης των πτητικών λιπαρών οξέων.

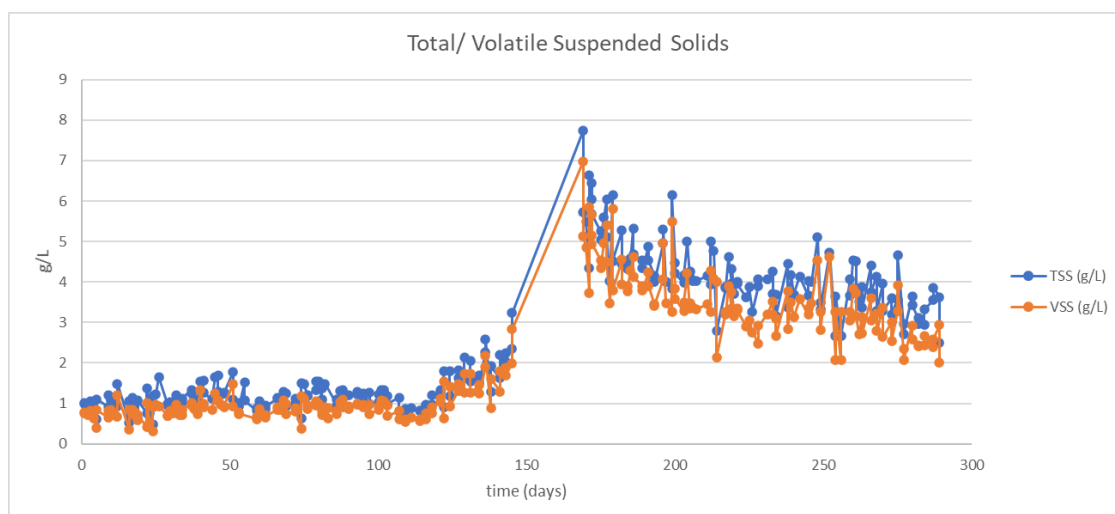
3.1.1.2 Οπτική πυκνότητα (Optical Density, OD)



Σχήμα 3.2: Διάγραμμα των μετρήσεων της οπτικής πυκνότητας συναρτήσει του χρόνου του αντιδραστήρα DFR-1.

Η μεταβολή της οπτικής πυκνότητας σε σχέση με το χρόνο στον αντιδραστήρα DFR-1 (Σχήμα 3.2) κύριο στόχο έχει την ποιοτική αξιολόγηση του συστήματος. Οι τιμές της οπτικής πυκνότητας κυμαίνονται μεταξύ 0,8 και 2,5. Γενικά οι μέγιστες τιμές της οπτικής πυκνότητας παρατηρούνται στο τέλος της φάσης άνθρακα όπου οι μικροοργανισμοί έχουν καταναλώσει τον άνθρακα προκειμένου να βιοσυσσωρεύσουν, ενώ κατά την φάση του αζώτου δεν παρατηρούνται σημαντικές μεταβολές. Την 103^η ημέρα λειτουργίας παρατηρείται πτώση στο διάγραμμα. Το παραπάνω είναι λογικό καθώς εκείνη την ημέρα αφαιρούνται 300 mL από τον αντιδραστήρα προκειμένου να χρησιμοποιηθούν ως εμβόλιο στον δεύτερο αντιδραστήρα άντλησης πλήρωσης (DFR-2), για την εκκίνηση του δεύτερου κύκλου των πειραμάτων. Μετά το πέρας κάποιων κύκλων η οπτική πυκνότητα αρχίζει να αυξάνεται γεγονός που δηλώνει τη αποκατάσταση της ισορροπίας. Τέλος, τη 169^η ημέρα λειτουργίας η οπτική πυκνότητα φαίνεται να έχει αυξηθεί αρκετά. Η αύξηση πιθανόν οφείλεται στο γεγονός ότι το προηγούμενο διάστημα δεν πραγματοποιούνταν καθημερινή δειγματοληψία. Συνεπώς, γίνεται η υπόθεση ότι αφού δεν αφαιρείται ποσότητα από τον ενεργό όγκο του αντιδραστήρα, μεγαλύτερη ποσότητα βιομάζας μπορεί να αναπτύσσεται. Έπειτα, φαίνεται η οπτική πυκνότητα να μειώνεται σταδιακά και σταθεροποιείται από την 200^η ημέρα λειτουργίας σε μια μέση τιμή περίπου $2,2 \pm 0,1$.

3.1.1.3 Ολικά και Πτητικά Αιωρούμενων Στερεών (Total and Volatile Suspended Solids)



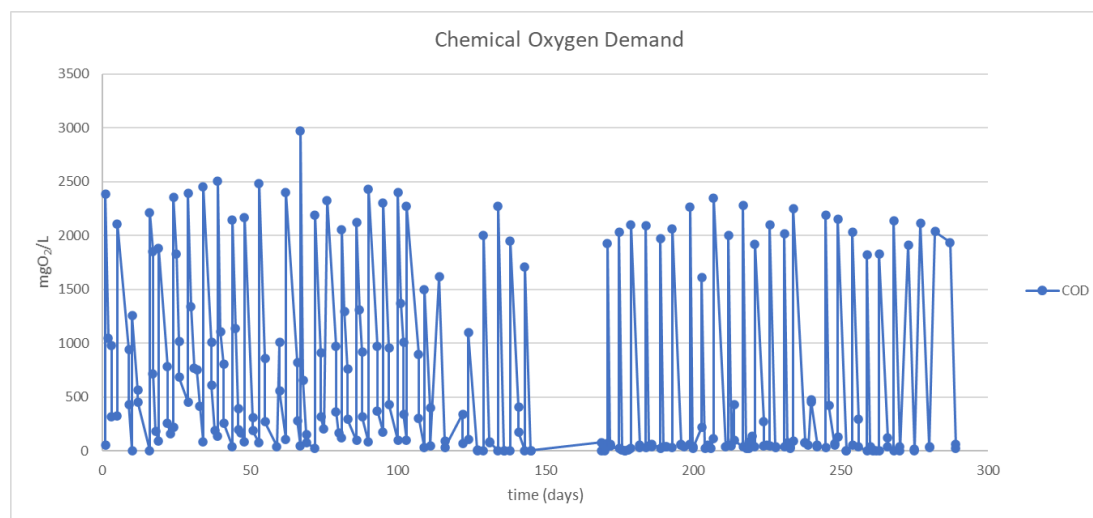
Σχήμα 3.3: Διάγραμμα των ολικών και πτητικών αιρούμενων στερεών συναρτήσει του χρόνου του αντιδραστήρα DFR-1.

Οι καμπύλες των ολικών (TSS) και πτητικών (VSS) αιρούμενων στερεών ως προς τον χρόνο παρουσιάζουν παρόμοια συμπεριφορά, όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 3.3, καθώς τα πτητικά αποτελούν μέρος των ολικών αιωρούμενων στερεών. Επιπλέον, η μεταβολή των ολικών και πτητικών αιρούμενων στερεών ως προς το χρόνο έχουν την ίδια τάση με τη μεταβολή της οπτικής πυκνότητας. Γενικά, παρατηρείται σημαντική αύξηση των στερεών στο τέλος της φάσης άνθρακα, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο άνθρακας αξιοποιείται για ενεργειακή συντήρηση και βιοσυσσώρευση. Ακόμη, παρατηρείται μικρή μείωση των στερεών μεταξύ του τέλους κάθε φάσης και της έναρξης της επόμενης. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι μεσολαβεί η καθίζηση της βιομάζας και η απομάκρυνση των 2/3 του όγκου του αντιδραστήρα για την παροχή της νέας τροφοδοσίας. Στο τέλος της φάσης του αζώτου παρατηρείται μικρή αύξηση των στερεών, η οποία οφείλεται στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών που έχουν επιβιώσει και μπορούν να βιοσυσσωρεύσουν ΠΥΑ, καταναλώνοντας τον άνθρακα που έχουν συσσωρεύσει μαζί με το άζωτο. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρείται μικρή πτώση των στερεών. Το παραπάνω είναι αναμενόμενο γιατί οι συσσωρευτές ΠΥΑ σε αυτό το στάδιο αναπτύσσονται, ενώ όσοι μικροοργανισμοί δεν έχουν την ικανότητα να συσσωρεύουν ΠΥΑ, δεν επιβιώνουν, οδηγώντας σε μικρή μείωση των στερεών.

Ειδικότερα, μέχρι την 103^η ημέρα λειτουργίας τα TSS και VSS εμφανίζουν μέση τιμή της τάξεως $1,10 \pm 0,25$ gr TSS/L και $0,74 \pm 0,25$ gr VSS/L. Μετά την 103^η ημέρα, δηλαδή μετά τη προσθήκη του δεύτερου αντιδραστήρα, πραγματοποιείται μικρή μείωση καθώς αφαιρέθηκαν 300 mL από τον αντιδραστήρα και μετά αύξηση έως $3,20$ gr TSS/L και $2,83$ gr VSS/L. Σημαντική αύξηση της μικροβιακής μάζας παρατηρείται την 169^η ημέρα λειτουργίας, με τα TSS και VSS να λαμβάνουν τιμές $7,75$ gr TSS/L και $6,99$ gr VSS/L. Πιθανή ερμηνεία όπως αναλύθηκε παραπάνω είναι η μη καθημερινή δειγματοληψία που οδήγησε στην ανάπτυξη μικροοργανισμών. Μετά την 169^η ημέρα τα TSS και VSS σταδιακά μειώνονται και σταθεροποιούνται από την 200^η ημέρα λειτουργίας σε μια μέση τιμή $3,81 \pm 0,56$ g TSS/L και $3,15 \pm 0,56$ gr VSS/L. Επιπλέον, υπολογίζεται σε όλη τη διάρκεια

λειτουργίας ο λόγος των πτητικών προς των αιρούμενων στερεών ο οποίος έχει τιμή $0,80 \pm 0,07$ και υποδεικνύει ότι η μικροβιακή βιομάζα που έχει αναπτυχθεί είναι υγιής.

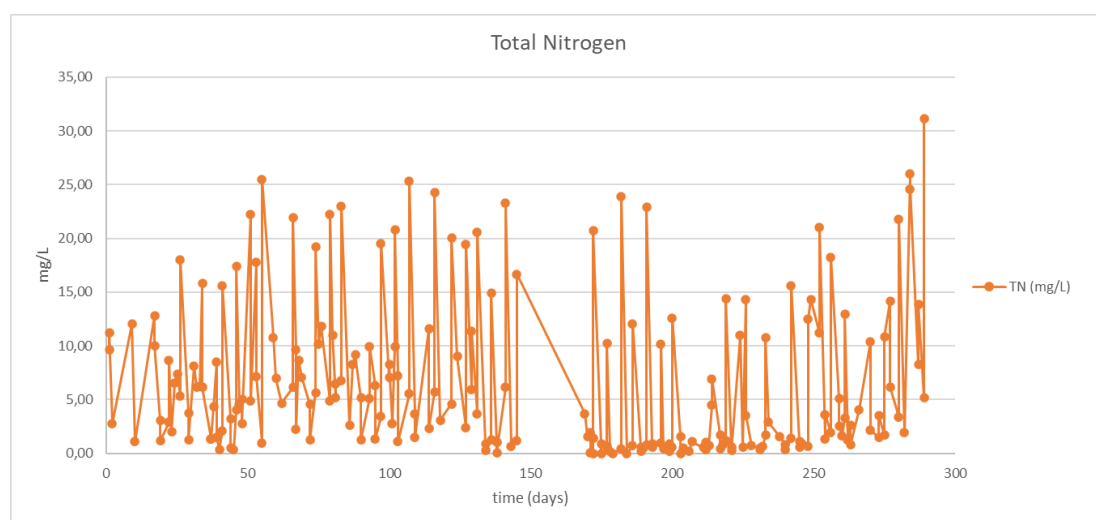
3.1.1.4 Χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (Chemical Oxygen Demand, COD)



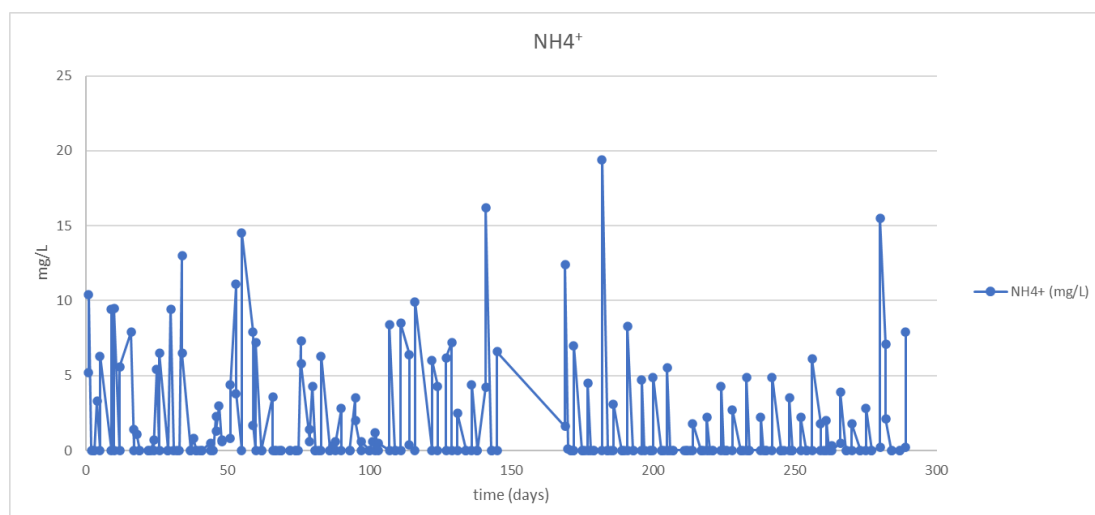
Σχήμα 3.4: Διάγραμμα κατανάλωσης του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου συναρτήσει του χρόνου του αντιδραστήρα DFR-1.

Η κατανάλωση του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου, όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.4, επιβεβαιώνει την συντήρηση της βιομάζας καθώς και τη πιθανή συσσώρευση βιοπλαστικού. Στην αρχή της φάσης άνθρακα το χημικά απαιτούμενο οξυγόνο ισούται με 2025 ± 460 mg O₂/L. Η απόκλιση από την απαιτούμενη ποσότητα (2000 mg O₂/L) οφείλεται σε μικρές διακυμάνσεις της σύστασης του συνθετικού διαλύματος άνθρακα. Στο τέλος κάθε φάσης άνθρακα παρατηρείται σημαντική μείωση, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι μικροοργανισμοί καταναλώνουν τον άνθρακα προκειμένου να συντηρηθούν ενεργειακά και να βιοσυσσωρεύσουν βιοπλαστικό. Ειδικότερα, τις πρώτες 110 ημέρες παρατηρείται 63% κατανάλωση κατά μέσο όρο, ενώ μετά την 116^η ημέρα λειτουργίας η κατανάλωση του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου είναι σχεδόν πλήρης, δηλαδή μεγαλύτερη από 95% κατά μέσο όρο. Ιδιαίτερα μετά την 183^η ημέρα όλη η ποσότητα του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου καταναλώνεται μέσα στις πρώτες 24 h του κύκλου. Οι παραπάνω παρατηρήσεις είναι λογικές καθώς τα παραπάνω χρονικά διαστήματα η μικροβιακή μάζα έχει αυξηθεί άρα αναμένεται η κατανάλωση να είναι μεγαλύτερη. Ωστόσο, η πλήρης κατανάλωση του οργανικού φορτίου πριν το τέλος του κύκλου λειτουργίας άνθρακα ενδέχεται να οδηγήσει σε μείωση του συσσωρευμένου βιοπλαστικού, καθώς καταναλώνεται ως πηγή άνθρακα από τη μικροβιακή βιομάζα με σκοπό τη συντήρηση.

3.1.1.5 Ολικό Άζωτο (Total Nitrogen) και Αμμωνιακά Ιόντα (Ammonium).

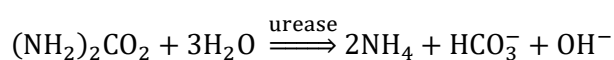


Σχήμα 3.5: Διάγραμμα κατανάλωσης του ολικού αζώτου συναρτήσει του χρόνου για τον αντιδραστήρα DFR-1.



Σχήμα 3.6: Διάγραμμα κατανάλωσης αμμωνιακών ανιόντων (NH_4^+) συναρτήσει του χρόνου για τον αντιδραστήρα DFR-1.

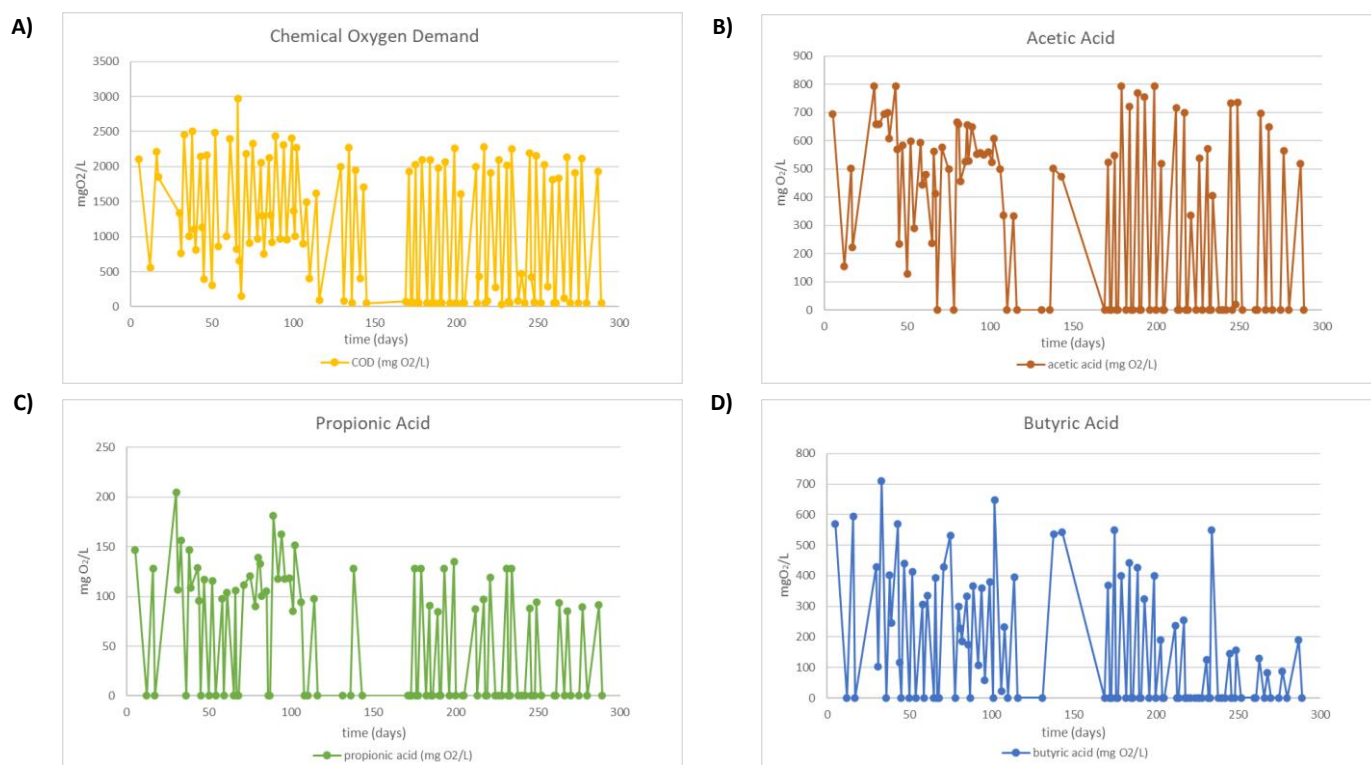
Τα Σχήματα 3.5 και 3.6 παρουσιάζουν τη μεταβολή του ολικού αζώτου και των αμμωνιακών ιόντων συντηρήσει του χρόνου. Το μετρούμενο οργανικό άζωτο, στην αρχή κάθε τροφοδοσίας αζώτου είναι 18 ± 5 mg/L. Ωστόσο η μετρούμενη ποσότητα των αμμωνιακών ιόντων στην αρχή κάθε κύκλου αζώτου παρουσιάζει διακυμάνσεις. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ως πηγή αζώτου χρησιμοποιείται η ουρία, η οποία υδρολύεται μέσω του ενζύμου ουρεάση όπως παρουσιάζεται στην παρακάτω αντίδραση [56]. Συνεπώς δεν είναι σταθερή η ποσότητα η οποία θα έχει υδρολυθεί μέχρι τη παραλαβή του δείγματος.



Στο τέλος του κύκλου αζώτου τα μετρούμενα αμμωνιακά ιόντα είναι είτε μηδενικά είτε η υπολειπόμενη ποσότητα είναι πολύ μικρή, υποδεικνύοντας πλήρη κατανάλωση της ουρίας

στη διάρκεια των 48 h. Ιδιαίτερα, μετά την 130^η ημέρα, η ουρία φαίνεται να καταναλώνεται από το πρώτο 24 h. Η κατανάλωση του αζώτου επιβεβαιώνει την παρουσία ενδοκυτταρικού άνθρακα στα κύτταρα, ο οποίος χρησιμοποιείται για ανάπτυξη μαζί με την ουρία. Κατά την φάση του άνθρακα, η μετρούμενη ποσότητα του αμμωνιακού αζώτου στον αντιδραστήρα είναι μηδενική καθώς είτε έχει προηγηθεί η πλήρης κατανάλωση του, είτε έχει απομακρυνθεί η μη καταναλισκόμενη ποσότητα, με την αλλαγή της τροφοδοσίας. Συνεπώς κρίνεται εφικτός ο περιορισμός αζώτου υποδεικνύοντας ευνοϊκές συνθήκες συσσώρευσης. Μέσω του διαγράμματος του ολικού αζώτου εξάγονται παρόμοια συμπεράσματα. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρείται ύπαρξη αζώτου, ενώ η συγκέντρωση των αμμωνιακών ιόντων είναι μηδενική. Το παραπάνω ενδέχεται να σχετίζεται με τη κυτταρική απόπτωση, καθώς τα οι μικροοργανισμοί που δεν έχουν τη δυνατότητα συσσώρευσης δεν επιβιώνουν και αποσυντίθενται.

3.1.1.6 Πτητικά Λιπαρά Οξέα (Volatile Fatty Acids)



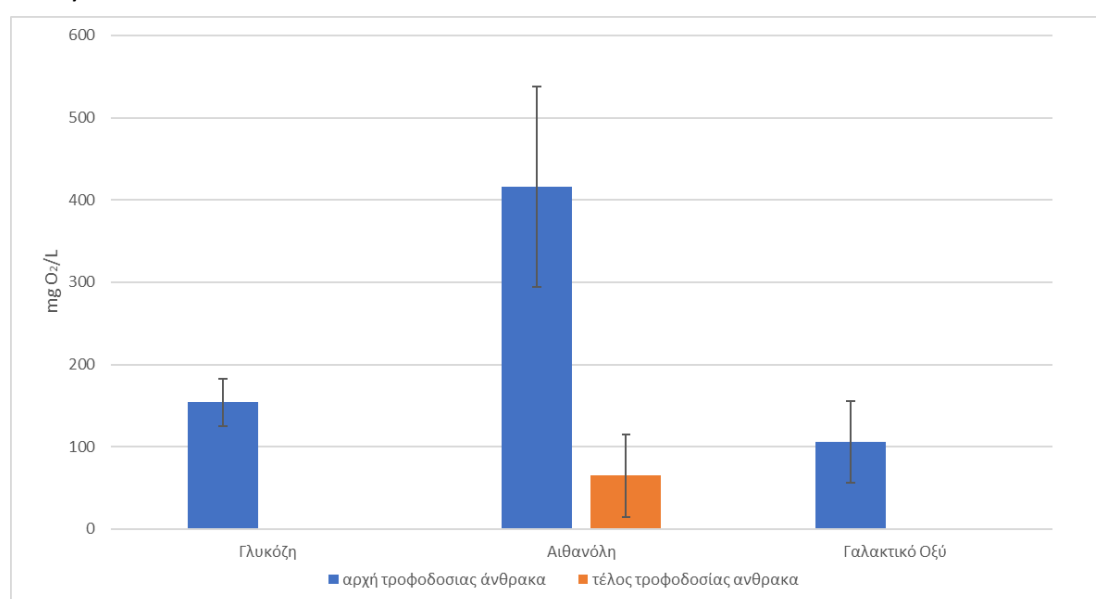
Σχήμα 3.7: Κατανάλωση Α) του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου Β) του οξικού οξέος Γ) του προπιονικού οξέος Δ) του βουτυρικού οξέος συναρτήσεως του χρόνου του κατά τη διάρκεια της φάσης άνθρακα στον αντιδραστήρα DFR-1.

Η κατανάλωση των πτητικών λιπαρών οξέων (βουτυρικό, οξικό και προπιονικό οξύ) απεικονίζεται στο Σχήμα 3.7. Τα διαγράμματα των πτητικών λιπαρών οξέων παρουσιάζουν ίδια συμπεριφορά με το διάγραμμα του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου. Το παραπάνω εξηγείται καθώς τα πτητικά λιπαρά οξέα αποτελούν μέρος του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου.

Ειδικότερα, στην αρχή της φάσης άνθρακα το βουτυρικό οξύ ισούται με 412 ± 118 mg O₂/L το οξικό οξύ ισούται με 578 ± 107 mg O₂/L και το προπιονικό οξύ ισούται με 101 ± 33 mg O₂/L. Οι διακυμάνσεις στην αρχή κάθε κύκλου πιθανόν οφείλονται στο συνθετικό

διάλυμα άνθρακα που χρησιμοποιήθηκε. Παρατηρείται πλήρης κατανάλωση του βουτυρικού οξέος σε όλους τους κύκλους, το οποίο πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι το βουτυρικό οξύ απαιτεί λιγότερα μεταβολικά βήματα για τη σύνθεση των ΠΥΑ [57]. Το οξικό οξύ, μέχρι την 110^η ημέρα λειτουργίας, παρουσιάζει μέση κατανάλωση 41% με σημαντικές διακυμάνσεις. Οι διακυμάνσεις αυτές το οφείλονται στο γεγονός ότι η κατανάλωση σε κάποιους κύκλους είναι μικρότερη από 10%. Μετά την 116^η ημέρα λειτουργίας, δηλαδή μετά την αφαίρεση 300 mL από τον αντιδραστήρα για την εκκίνηση του DFR-2, η κατανάλωση είναι πλήρης. Τέλος, το προπιονικό οξύ, μέχρι την 110^η ημέρα λειτουργίας καταναλώνεται κατά 75%, εμφανίζοντας διακυμάνσεις αναμεσά στους κύκλους ενώ μετά την 116^η ημέρα καταναλώνεται πλήρως.

3.1.1.7 Γλυκόζη (Glucose), Αιθανόλη (Ethanol) και Γαλακτικό οξύ (Lactic Acid)



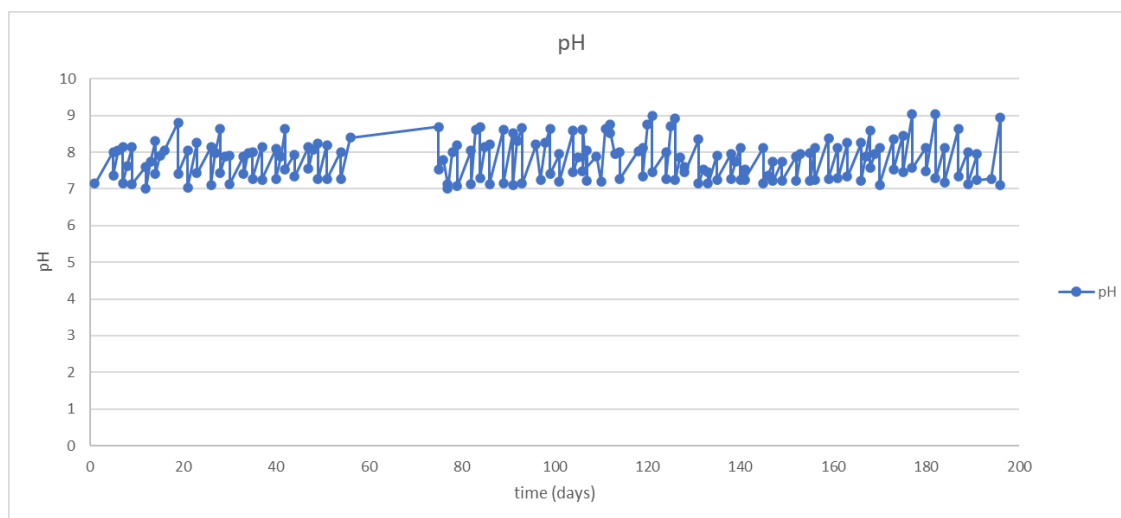
Σχήμα 3.8: Μέση συγκέντρωση γλυκόζης αιθανόλης και γαλακτικού οξέος στην αρχή και στο τέλος της τροφοδοσίας άνθρακα σε όλη την διάρκεια λειτουργίας του αντιδραστήρα DFR-1.

Πραγματοποιούνται ακόμη μετρήσεις των συγκεντρώσεων της γλυκόζης, της αιθανόλης και του γαλακτικού οξέος μέσω υγρής χρωματογραφίας. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.8 στην αρχή της φάσης άνθρακα η γλυκόζη ισούται με 153 ± 29 mg O₂/L, η αιθανόλη ισούται με 400 ± 122 mg O₂/L και το γαλακτικό οξύ ισούται με 106 ± 52 mg O₂/L, με την κατανάλωση του γαλακτικού οξέος και της γλυκόζης είναι πλήρης. Σχετικά με την αιθανόλη, παρατηρείται μια μέση κατανάλωση 82% το οποίο οφείλεται στο γεγονός ότι τις πρώτες περίπου 100 ημέρες λειτουργίας η κατανάλωση δεν ήταν πλήρης.

3.1.2 Αντιδραστήρας άντλησης – πλήρωσης με συγκέντρωση COD 4000mg O₂/L (Draw and Fill Reactor 2, DFR-2)

Για την λειτουργία του αντιδραστήρα DFR-2 πραγματοποιήθηκε μετάγγιση εμβολίου από τον DFR-1 σε καινούργια διάταξη η οποία είχε τις ίδιες συνθήκες λειτουργίας με τον DFR-1, με διαφορά στη συγκέντρωση του άνθρακα 4000 mg O₂/L και του αζώτου 40 mg/L. Με σκοπό να δημιουργηθούν κατάλληλες συνθήκες με σκοπό τη παραγωγή ΠΥΑ, παρέχεται στο σύστημα εναλλάξ συνθετικό διάλυμα άνθρακα, και οργανικό άζωτο με τη μορφή ουρίας.

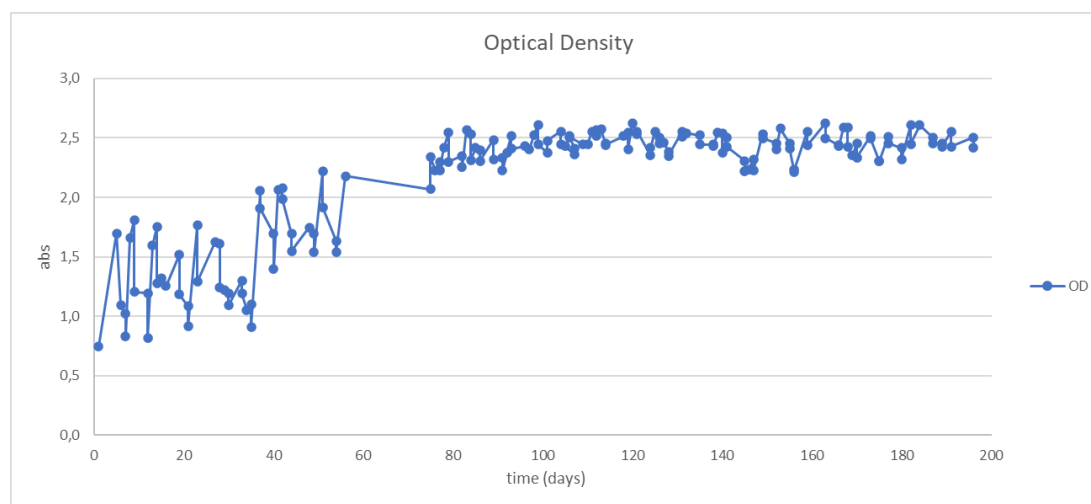
3.1.2.1 pH



Σχήμα 3.9: Διάγραμμα των μετρήσεων του pH συναρτήσει του χρόνου του αντιδραστήρα DFR-2.

Από τις μετρήσεις του pH (Σχήμα 3.9) παρατηρείται ότι οι τιμές κυμαίνονται μεταξύ 7 και 9. Στην αρχή κάθε κύκλου η τιμή του pH είναι ουδέτερη καθώς είτε πραγματοποιείται ρύθμιση με χρήση διαλύματος NaOH 2M είτε αυτορυθμίζεται λόγω της ουρίας και του ρυθμιστικού διαλύματος. Όπως και στον DFR-1 οι μέγιστες τιμές του pH συναντώνται στο τέλος του κύκλου άνθρακα λόγω της κατανάλωσης των λιπαρών οξέων. Επιπλέον, κατά τη διάρκεια της φάσης του αζώτου δεν παρατηρείται σημαντική μεταβολή στη τιμή του pH.

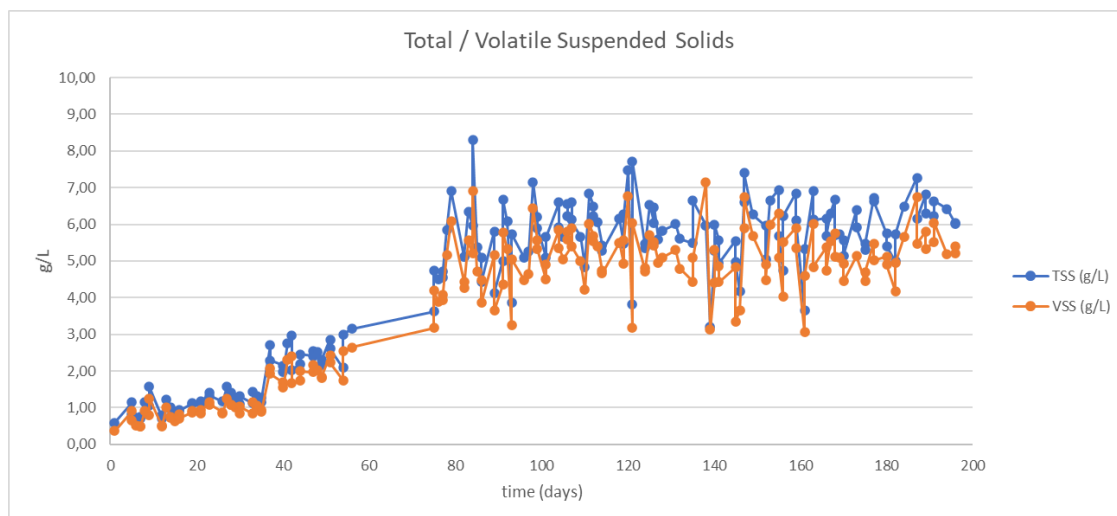
3.1.2.2 Οπτική πυκνότητα (Optical Density, OD)



Σχήμα 3.10: Διάγραμμα των μετρήσεων της οπτικής πυκνότητας συναρτήσει του χρόνου του αντιδραστήρα DFR-2.

Οι τιμές της οπτικής πυκνότητας κυμαίνονται μεταξύ 0,8 και 2,6, όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 3.10. Μέχρι την 60^η ημέρα παρατηρείται σημαντική διακύμανση μεταξύ των τροφοδοσιών άνθρακα και αζώτου, με τις τιμές κατά τη διάρκεια του κύκλου του αζώτου να είναι πιο μικρές. Το παραπάνω πιθανόν να οφείλεται στη κυτταρική απόπτωση των μικροοργανισμών που δεν συσσωρεύουν ΠΥΑ. Πιο αναλυτικά, όταν εξαντλείται η πηγή άνθρακα, τα βακτήρια που προηγουμένως έχουν αποθηκεύσει κάποιο μέρος της πηγής άνθρακα σε ΠΥΑ, έχουν την ικανότητα να συνεχίσουν την ανάπτυξη τους καταναλώνοντας την υπολειπόμενη πηγή αζώτου, ενώ τα βακτήρια που δεν έχουν την ικανότητα να συσσωρεύουν ΠΥΑ δεν επιβιώνουν, οδηγώντας σε μείωση της οπτικής πυκνότητας. Επιπλέον, αυτή η διακύμανση ενδέχεται να οφείλεται στο γεγονός ότι η μικροβιακή βιομάζα δεν έχει εγκλιματιστεί στις νέες συνθήκες λειτουργίας. Ωστόσο, συνολικά παρατηρείται μια σταδιακή αύξηση από την αρχή, δηλαδή φαίνεται ότι κατά την εκκίνηση της καλλιέργειας τα μικροβιακά κύτταρα είχαν αποθηκευμένο απόθεμα ενδοκυτταρικού άνθρακα. Τελικά, παρατηρείται σταθεροποίηση μέχρι μια μέση τιμή $2,5 \pm 0,1$.

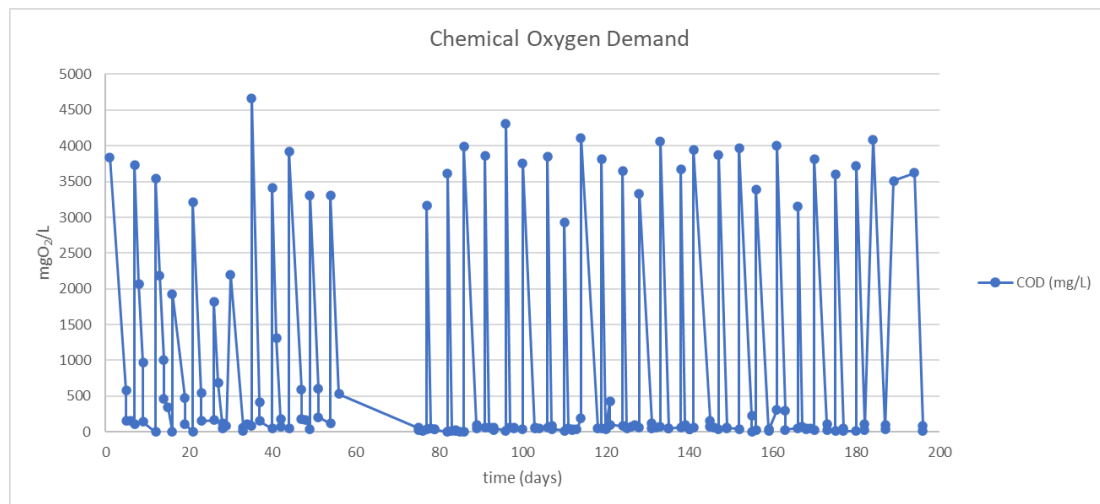
3.1.2.3 Ολικά και Πτητικά Αιωρούμενων Στερεών (Total and Volatile Suspended Solids)



Σχήμα 3.11: Διάγραμμα των ολικών και πτητικών αιωρούμενων στερεών συναρτήσει του χρόνου του αντιδραστήρα DFR-2.

Το Σχήμα 3.11 απεικονίζει τη μεταβολή των ολικών (TSS) και πτητικών (VSS) αιωρούμενων στερεών ως προς τον χρόνο και όπως είναι αναμενόμενο οι δύο καμπύλες έχουν παρόμοια συμπεριφορά. Συνολικά, σημειώνεται μια αυξητική πορεία από την έναρξη λειτουργίας, γεγονός που επιβεβαιώνει την παρουσία ενδοκυτταρικού άνθρακα στα κύτταρα. Γενικά, παρατηρείται σημαντική αύξηση των στερεών στο τέλος της φάσης άνθρακα. Στο τέλος της φάσης αζώτου παρατηρείται μικρή αύξηση, που οφείλεται στην ανάπτυξη των συσσωρευτών ΠΥΑ, καταναλώνοντας τον ενδοκυτταρικό άνθρακα και την ουρία. Ενώ, σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρείται μικρή μείωση στο τέλος της φάσης του αζώτου, γεγονός που θα μπορούσε να αποδοθεί στη κυτταρική απόπτωση των μικροοργανισμών που δεν μπορούν να συσσωρεύουν ΠΥΑ. Επιπλέον, παρατηρείται μια μικρή μείωση των στερεών μεταξύ του τέλους κάθε φάσης και της έναρξης της επόμενης, γεγονός που οφείλεται στην απομάκρυνση των 2/3 του όγκου του αντιδραστήρα για την παροχή της νέας τροφοδοσίας. Γενικά σημειώνεται μια σταθερά αυξητική πορεία των στερεών μέχρι τα $6,06 \pm 0,54$ gr TSS/L και $5,22 \pm 0,51$ gr VSS/L. Επιπλέον, τα πτητικά στερεά αποτελούν κατά μέσο όρο το $84 \pm 6\%$ των αιωρούμενων στερεών υποδεικνύοντας υγιή μικροβιακή βιομάζα.

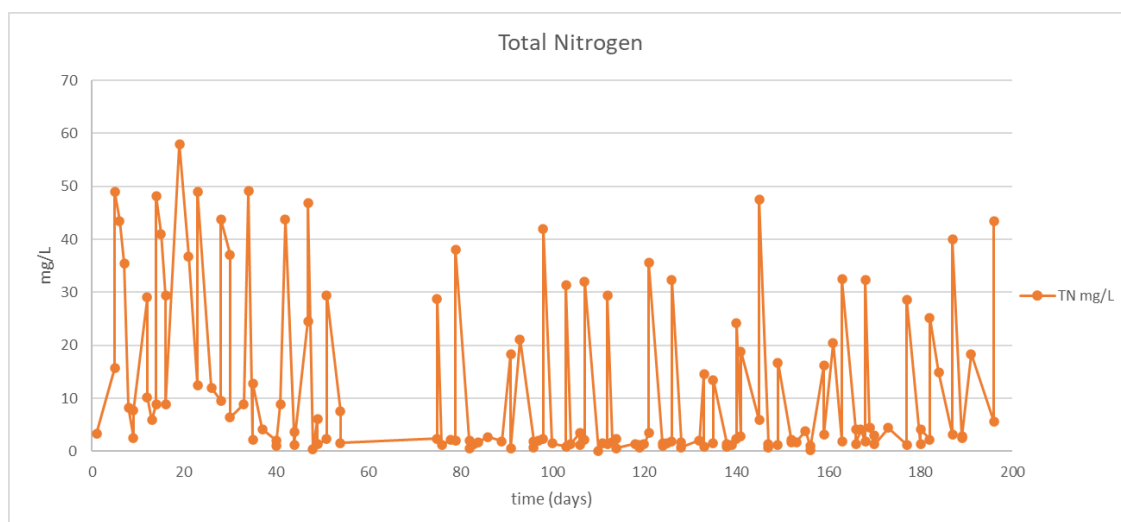
3.1.2.4 Χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (Chemical Oxygen Demand, COD)



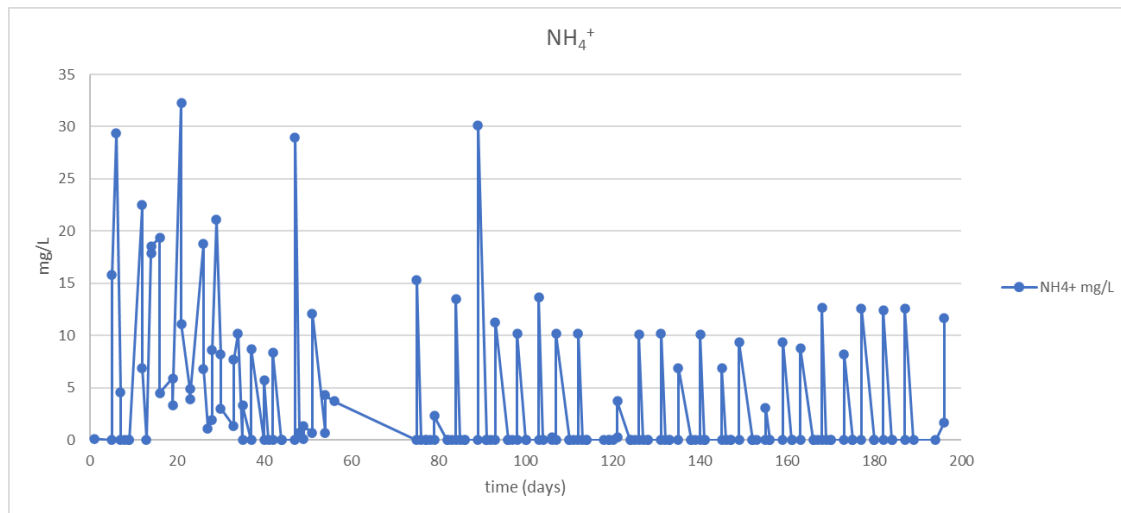
Σχήμα 3.12: Διάγραμμα κατανάλωσης του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου συναρτήσει του χρόνου του αντιδραστήρα DFR-2.

Στην αρχή της φάσης άνθρακα το χημικά απαιτούμενο οξυγόνο ισούται περίπου με 3571 ± 523 mg O₂/L όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.12. Παρατηρείται σημαντική μείωση του οργανικού φορτίου σε κάθε κύκλο γεγονός που επιβεβαιώνει τη συντήρηση της μικροβιακής βιομάζας και τη πιθανή συσσώρευση ενδοκυτταρικού άνθρακα. Ειδικότερα, μέχρι την 56^η ημέρα παρατηρείται μέση κατανάλωση 85%, ενώ από αυτό το σημείο και μετά η κατανάλωση είναι πλήρης. Ιδιαίτερα, μετά την 80^η ημέρα όλο το φορτίο καταναλώνεται μέσα στις πρώτες 24 h. Το παραπάνω ενδέχεται να οδηγήσει σε μείωση του συσσωρευμένου άνθρακα, καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί από την μικροβιακή βιομάζα με σκοπό την επιβίωση, αφού δεν υπάρχει εξωτερική πηγή άνθρακα προς κατανάλωση.

3.1.2.5 Ολικό Άζωτο (Total Nitrogen) και Αμμωνιακά Ιόντα (Ammonium).



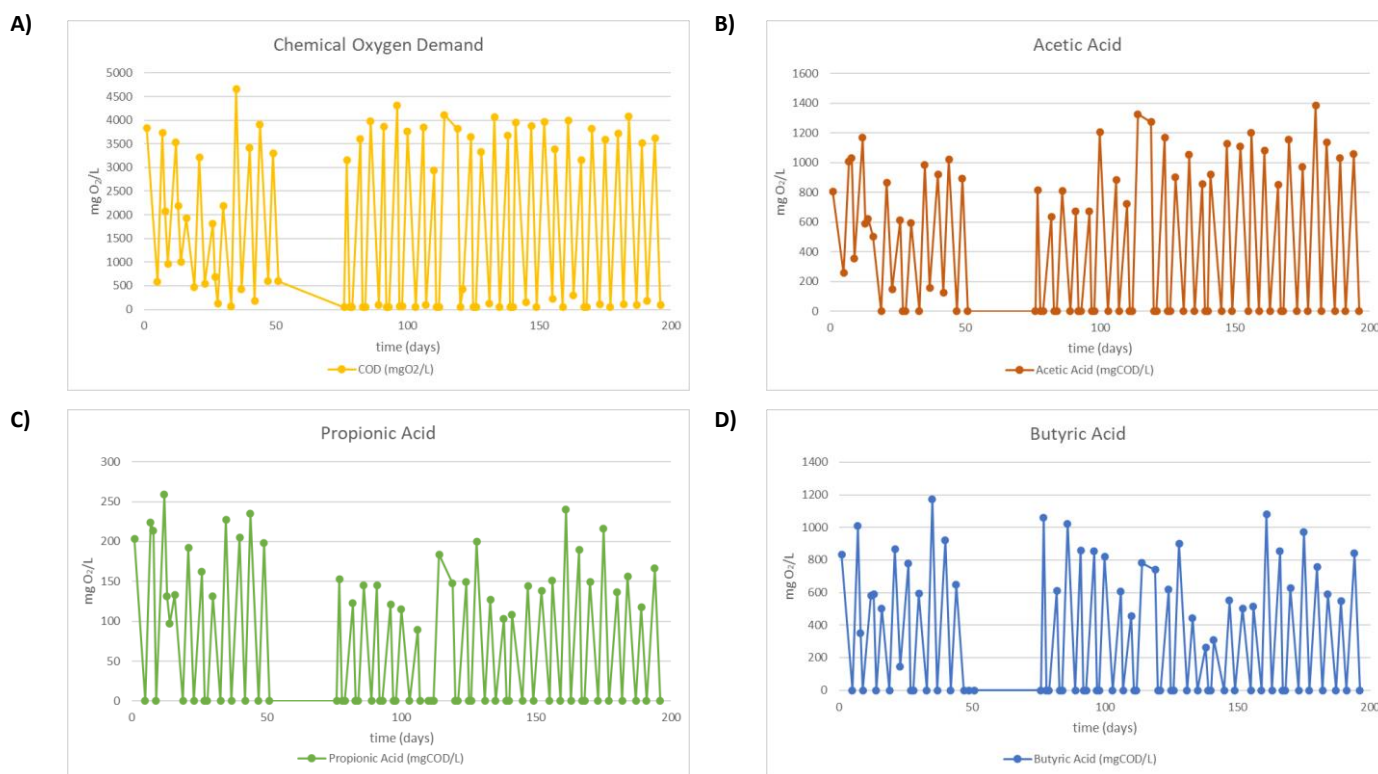
Σχήμα 3.13: Διάγραμμα κατανάλωσης του ολικού αζώτου συναρτήσει του χρόνου για τον αντιδραστήρα DFR-2.



Σχήμα 3.14: Διάγραμμα κατανάλωσης αμμωνιακών ανιόντων (NH_4^+) συναρτήσει του χρόνου για τον αντιδραστήρα DFR-2.

Οι μεταβολές του ολικού και του αμμωνιακών ιόντων παρουσιάζονται στα Σχήματα 3.13 και 3.14. Η συγκέντρωση του ολικού αζώτου στην αρχή κάθε κύκλου άζωτου είναι 34 ± 10 mg/L. Παρατηρείται μη ολική κατανάλωση της ουρίας κατά τη διάρκεια των 48h στη φάση του αζώτου τις πρώτες 30 ημέρες. Το παραπάνω μπορεί να οφείλεται σε δύο παράγοντες. Κατά πρώτον, ενδέχεται η μικροβιακή βιομάζα να μην έχει εγκλιματιστεί στις νέες συνθήκες λειτουργίας. Κατά δεύτερον, είναι πιθανό κατά την εκκίνηση της καλλιέργειας τα μικροβιακά κύτταρα να μην είχαν αποθηκευμένο σημαντικό απόθεμα ενδοκυτταρικού άνθρακα, συνεπώς να περιορίστηκε η απορρόφηση αζώτου από τους μικροοργανισμούς. Επιπλέον, μέχρι την 35^η ημέρα δεν απομακρύνεται πλήρως κατά την αλλαγή τροφοδοσίας σε άνθρακα. Συνεπώς, στην έναρξη του κύκλου του άνθρακα παραμένει υπολειμματική ποσότητα αζώτου, η οποία όμως καταναλώνεται στη διάρκεια των 48 h, γεγονός που πιθανόν να επηρεάσει τη συσσώρευση βιοπλαστικού. Μετά το διάστημα των 35 ημερών το άζωτο καταναλώνεται πλήρως, ενώ μετά την 75^η ημέρα η κατανάλωση του πραγματοποιείται μέσα σε 24h, υποδεικνύοντας την ύπαρξη ενδοκυτταρικού άνθρακα. Επιπλέον, κατά την έναρξη της φάσης του άνθρακα η ποσότητα αζώτου είναι μηδενική υποδεικνύοντας καλές συνθήκες συσσώρευσης. Μέσω του διαγράμματος του ολικού αζώτου εξάγονται παρόμοια συμπεράσματα. Ωστόσο μπορούν επιπλέον να εξαχθούν, πληροφορίες σχετικά με τους μικροοργανισμούς που δεν επιβίωσαν, καθώς όταν δεν υπάρχει εξωτερική πηγή αζώτου αλλά η μετρούμενη τιμή ολικού αζώτου είναι θετική, τότε ενδέχεται αυτή τιμή να οφείλεται σε κυτταρική απόπτωση.

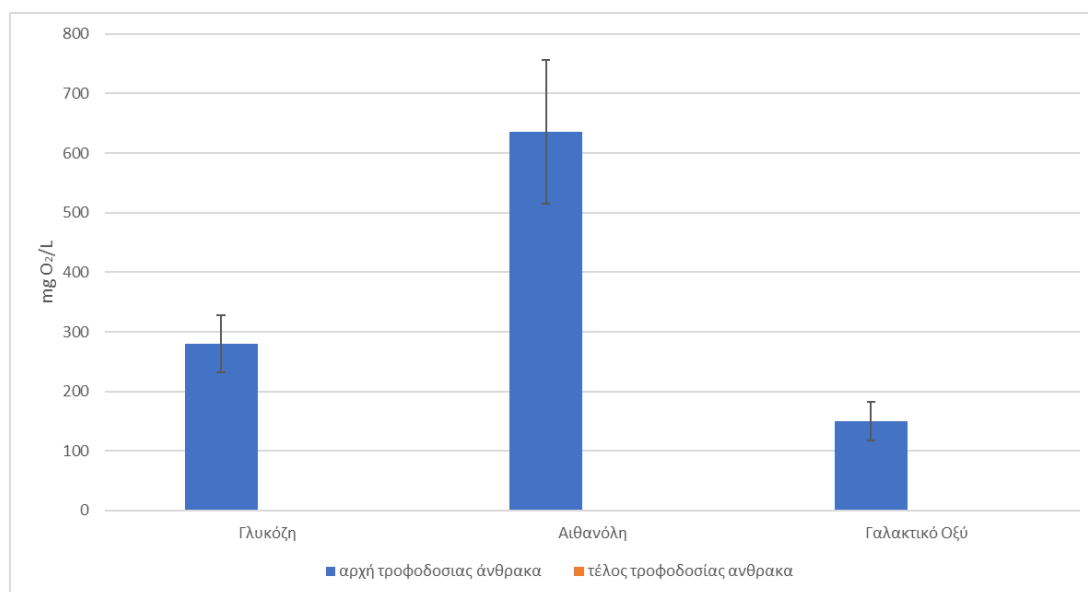
3.1.2.6 Πτητικά Λιπαρά Οξέα (Volatile Fatty Acids)



Σχήμα 3.15: Κατανάλωση Α) του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου Β) του οξικού οξέος C) του προπιονικού οξέος D) του βουτυρικού οξέος συναρτήσεως του χρόνου του κατά τη διάρκεια της φάσης άνθρακα στον αντιδραστήρα DFR-2.

Όπως είναι αναμενόμενο, τα διαγράμματα των πτητικών λιπαρών οξέων (Σχήμα 3.15) ακολουθούν ίδια τάση με το διάγραμμα του συνολικού χημικά απαιτούμενου οξυγόνου. Ειδικότερα, στην αρχή της φάσης άνθρακα το βουτυρικό οξύ ισούται με 745 ± 175 mg O₂/L και καταναλώνεται πλήρως από τη πρώτη μέρα λειτουργίας πιθανόν λόγω απαίτησης λιγότερων μεταβολικών μονοπατιών [57]. Το οξικό οξύ στην αρχή κάθε κύκλου ισούται με 1007 ± 171 mg O₂/L. Μέχρι την 50^η ημέρα λειτουργίας παρατηρείται μέση κατανάλωση 79%, ενώ μετά από αυτή τη μέρα η κατανάλωση είναι πλήρης. Τέλος το προπιονικό οξύ στη αρχή του κύκλου άνθρακα ισούται με 160 ± 33 mg O₂/L, ενώ φαίνεται να καταναλώνεται πλήρως σε κάθε κύκλο άνθρακα.

3.1.2.7 Γλυκόζη (Glucose), Αιθανόλη (Ethanol) και Γαλακτικό οξύ (Lactic Acid)



Σχήμα 3.16: Μέση συγκέντρωση γλυκόζης αιθανόλης και γαλακτικού οξέος στην αρχή και στο τέλος της τροφοδοσίας άνθρακα σε όλη την διάρκεια λειτουργίας του αντιδραστήρια DFR-2.

Πραγματοποιούνται ακόμη μετρήσεις των συγκεντρώσεων της γλυκόζης, της αιθανόλης και του γαλακτικού οξέος. Στην αρχή της φάσης άνθρακα η γλυκόζη ισούται με $280 \pm 48 \text{ mg O}_2/\text{L}$, η αιθανόλη ισούται με $636 \pm 121 \text{ mg O}_2/\text{L}$ και το γαλακτικό οξύ ισούται με $150 \pm 32 \text{ mg O}_2/\text{L}$ (Σχήμα 3.16). Επιπλέον, προκύπτει πως η κατανάλωση του γαλακτικού οξέος της γλυκόζης και της αιθανόλης είναι πλήρης σε όλη τη διάρκεια λειτουργίας του DFR-2.

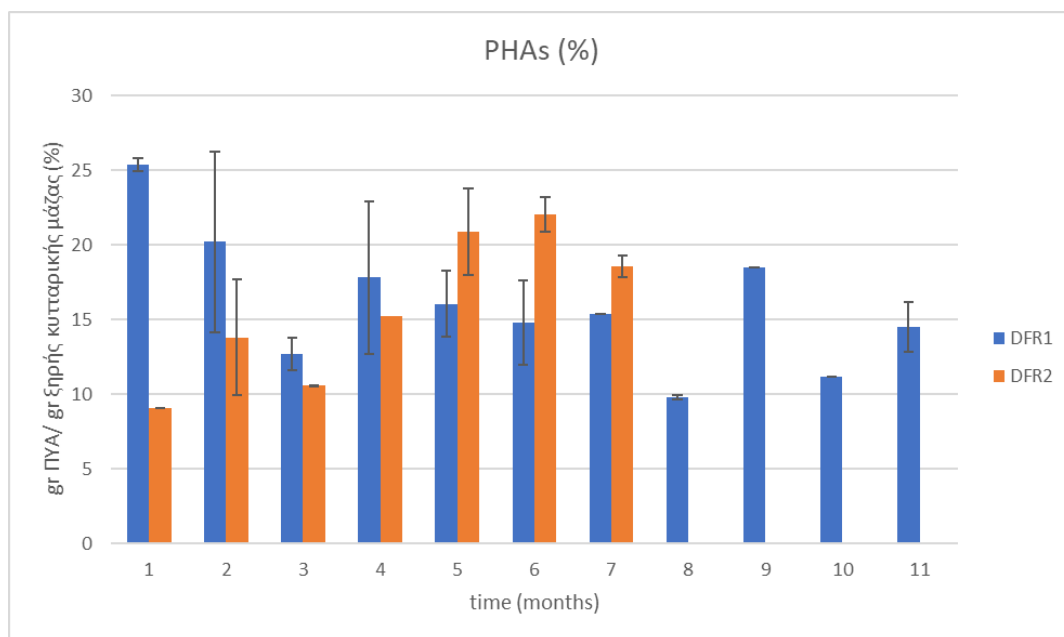
3.2 Συγκριτικά αποτελέσματα βιοσυσσώρευσης ΠΥΑ στους δύο αντιδραστήρες

Στο τέλος κάθε κύκλου τροφοδοσίας πραγματοποιείται συλλογή επαρκούς ποσότητας μικροβιακής βιομάζας με σκοπό να αξιολογηθεί η ικανότητα παραγωγής ΠΥΑ. Σε αυτή την ενότητα λοιπόν, προσδιορίζονται οι αποδόσεις και η σύσταση των ΠΥΑ. Οι αποδόσεις των ΠΥΑ εκφράζονται ως ποσοστό ενδοκυτταρικής συσώρευσης στο τέλος της φάσης άνθρακα και υπολογίζονται ως τον λόγο του αθροίσματος των βαρών των μονομερών μονάδων που προσδιορίζονται χρωματογραφικά προς τη ξηρή κυτταρική μάζα των κυττάρων που χρησιμοποιήθηκε όπως φαίνεται στη Σχέση 3.1.

$$\text{ΠΥΑ}(\%) = \frac{\text{ΠΥΑ (g)}}{\xi. \beta. \text{κυτ. (g)}} \cdot 100 \quad [3.1]$$

Από τα αποτελέσματα που λαμβάνονται διαπιστώνεται πως η ενδοκυτταρική συσώρευση σε ΠΥΑ μεταβάλλεται ανάλογα τη χρονική στιγμή της δειγματοληψίας. Συγκεκριμένα, μετά την 183^η ημέρα λειτουργίας για τον DFR-1 και μετά την 80^η για τον DFR2, όπου η κατανάλωση του οργανικού φορτίου πραγματοποιείται μέσα στις πρώτες 24h, λαμβάνονται ενδεικτικά επιπλέον δείγματα βιομάζας στη μέση του κύκλου. Από τα παραπάνω παρατηρείται ότι η απόδοση ήταν μεγαλύτερη στη μέση του κύκλου άνθρακα, από ότι στο τέλος. Τα παραπάνω αποτελέσματα είναι λογικά και οφείλονται στην δράση της ΠΥΑ – αποπολυμεράσης. Συγκεκριμένα οι πηγές αναφέρουν ότι η ΠΥΑ – αποπολυμεράση σε συνθήκες που ευνοείται η συσώρευση, δηλαδή σε συνθήκες περίσσειας άνθρακα, είναι ενεργή μόνο σε κάποιο βαθμό. Ενώ, όταν ο άνθρακας εξαντλείται, η ΠΥΑ – αποπολυμεράση υδρολύει τους κόκκους ΠΥΑ αποδίδοντας μονομερή ως τελικό προϊόν, με σκοπό την κατανάλωση τους για την επιβίωση της κυτταρικής βιομάζας [43]. Συνεπώς, όταν υπήρχε ακόμα διαθέσιμη πηγή σε άνθρακα, μέρος της πηγαίνει σε παραγωγή βιοπολυμερούς, αφού δεν έχει ξεκινήσει να επικρατεί η κατανάλωσή του, με αποτέλεσμα την καλύτερη απόδοση.

Τα πειραματικά αποτελέσματα των δύο αντιδραστήρων παρουσιάζονται ανά μήνα λειτουργίας και σε αυτά συμπεριλαμβάνονται οι αποδόσεις στο τέλος του κύκλου άνθρακα.



Σχήμα 3.17: Διάγραμμα απόδοσης ΠΥΑ ανά ξηρό βάρος βιομάζας στο τέλος της φάσης άνθρακα (συσσώρευση) για κάθε μήνα λειτουργίας στον DFR-1 και στον DFR2.

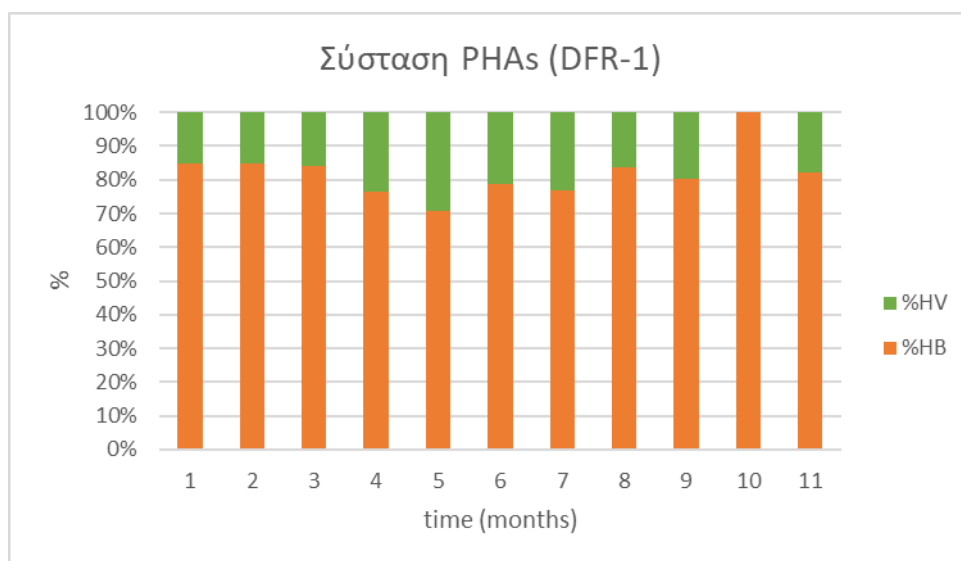
Στο Σχήμα 3.17 απεικονίζεται η ποσοστιαία απόδοση των ΠΥΑ ανά ξηρό βάρος βιομάζας στο τέλος της φάσης συσσώρευσης για τους δυο κύκλους πειραμάτων, δηλαδή για οργανική φόρτιση $2025 \pm 460 \text{ mg O}_2/\text{L}$ (DFR-1) και $3571 \pm 523 \text{ mg O}_2\text{COD}/\text{L}$ (DFR-2) με λόγο $C/N = 100$. Αρχικά, συμπεραίνεται ότι και οι δύο ΜΜΚ που έχουν αναπτυχθεί απαρτίζονται από βακτήρια ικανά να συσσωρεύουν ΠΥΑ καθώς στον αντιδραστήρα DFR-1 επιτυγχάνεται μέση συσσώρευση $16 \pm 4\%$ και στον αντιδραστήρα DFR-2 $16 \pm 5\%$.

Η μέση τιμή του ενδοκυτταρικού άνθρακα στον DFR-1 τους πρώτους μήνες λειτουργίας παρουσιάζει σταδιακή μείωση. Επιπλέον, η παραλαβή 300 mL τον 5^ο μήνα λειτουργίας από τον αντιδραστήρα για την εκκίνηση του δεύτερου κύκλου πειραμάτων φαίνεται να μην επηρεάζει τη σημαντικά τη συσσώρευσή. Απότομη μείωση του ενδοκυτταρικού άνθρακα σε 9% παρατηρείται κατά τον 7^ο και 8^ο μήνα λειτουργίας. Το παραπάνω ενδέχεται να οφείλεται στη κατανάλωση του ενδοκυτταρικού άνθρακα, κατά τη διάρκεια του κύκλου συσσώρευσης, καθώς τότε η κατανάλωση του οργανικού φορτίου πραγματοποιείται τις πρώτες 24h. Αντίστοιχα, οι διακυμάνσεις στο ποσοστό συσσώρευσης που εμφανίζονται μετά τον 8^ο μήνα λειτουργίας, αποδίδονται στον ίδιο λόγο. Αναλυτικότερα, από τη στιγμή που ο ενδοκυτταρικός άνθρακας καταναλώνεται στη φάση συσσώρευσης, το μετρούμενο ποσοστό σε ΠΥΑ στο τέλος του κύκλου άνθρακα δεν είναι το μέγιστο. Επιπλέον, δεν είναι γνωστό το ποσοστό του ενδοκυτταρικού άνθρακα που καταναλώνεται συνεπώς, ενδέχεται να διαφέρει μεταξύ των κύκλων οδηγώντας σε διακυμάνσεις του ποσοστού συσσώρευσης.

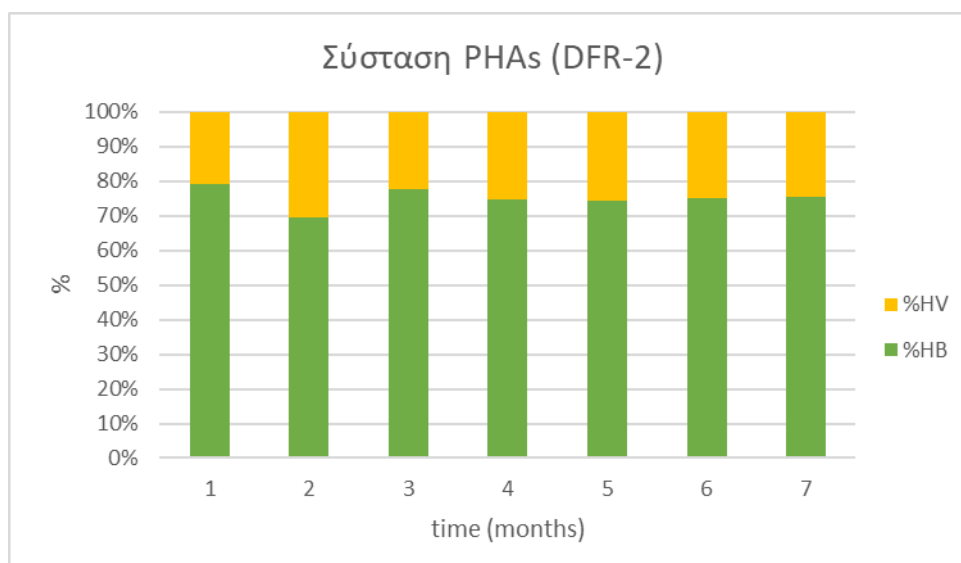
Σχετικά με τον DFR-2 επιβεβαιώνεται η υπόθεση ότι στην αρχή λειτουργίας το απόθεμα σε ενδοκυτταρικό άνθρακα είναι μικρό, καθώς παρατηρείται ότι κατά τον 1^ο μήνα λειτουργίας η συσσώρευση είναι 9%. Ωστόσο, ο περιεχόμενος ενδοκυτταρικός άνθρακας φαίνεται να αυξάνεται σταθερά. Συνδυαστικά με τα δεδομένα που λαμβάνονται από τις μετρήσεις πτητικών και ολικών αιωρούμενων στερεών καθώς και από τις καταναλώσεις του οργανικού φορτίου και του αζώτου, φαίνεται ότι το σύστημα, από τον 5^ο μήνα λειτουργίας, δεν

παρουσιάζει σημαντικές μεταβολές. Το παραπάνω επιβεβαιώνεται και από τη συσσώρευση του ενδοκυτταρικού άνθρακα καθώς από τον 5^ο μηνά λειτουργίας η μέση συσσώρευση είναι $21 \pm 1\%$. Τέλος, η μείωση που εμφανίζεται στον 4^ο και 7^ο μήνα, πιθανόν οφείλεται σε κατανάλωση ενδοκυτταρικού άνθρακα στη φάση συσσώρευσης, καθώς τότε η κατανάλωση του οργανικού φορτίου πραγματοποιείται τις πρώτες 24h, δηλαδή στη μέση του κύκλου συσσώρευσης.

Συγκρίνοντας τους δύο αντιδραστήρες παρατηρείται λίγο μεγαλύτερο ποσοστό συσσώρευσης στον DFR-2 το οποίο είναι αμελητέο. Το παραπάνω αναμένεται καθώς εφαρμόζεται ο ίδιος λόγος άνθρακα προς άζωτο C/N. Η σημαντικότερη διαφορά εντοπίζεται στην κατά μέσο όρο συγκέντρωση των ολικών και πτητικών αιωρούμενων στερεών, με τα στερεά στον DFR-2 να είναι 40% περισσότερα.



Σχήμα 3.18: Σύσταση πολυμερών ΠΥΑ για κάθε μήνα λειτουργίας στον DFR-1.



Σχήμα 3.19: Σύσταση πολυμερών ΠΥΑ για κάθε μήνα λειτουργίας στον DFR-2.

Στα Σχήματα 3.18 και 3.19 απεικονίζεται η σύσταση των παραγόμενων πολυμερών για κάθε μήνα λειτουργίας. Τα μονομερή που ανιχνεύονται σε όλα τα πειράματα, είναι το 3HB και το 3HV, συνεπώς γίνεται αντιληπτό ότι παράγεται είτε συμπολυμερές P(3HBco3HV), είτε μίγμα του με τα ομοπολυμερή P3HB και P3HV. Συγκεκριμένα, τα ΠΥΑ που παράγονται στον DFR-1 έχουν μέση περιεκτικότητα $18 \pm 7\%$ σε μονομερές HV, και στον DFR-2 $25 \pm 3\%$ σε μονομερές HV. Τα αποτελέσματα ως προς το είδος παραγόμενων ΠΥΑ είναι αναμενόμενα καθώς στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι το οξικό οξύ, το βουτυρικό οξύ η γλυκόζη και η γαλακτικό οξύ μεταβολίζονται αποκλειστικά σε P3HB. Σε περίπτωση ωστόσο που χρησιμοποιούνται οι πιο πάνω πηγές άνθρακα μαζί με βαλερικό οξύ ή με προπιονικό οξύ, όπως στην παρούσα εργασία, το αποτέλεσμα είναι συμπαραγωγή 3HV, προς το συμπολυμερές τύπου P(3HBco3HV) [42, 57]. Σχετικά με τη περιεκτικότητα στο μονομερές HV, συγκρίνοντας τους δύο αντιδραστήρες παρατηρείται μεγαλύτερη ποσοστιαία αναλογία σε HV, στον DFR-2 το οποίο μπορεί να αποδοθεί στην διπλάσια ποσότητα διαθέσιμου προπιονικού οξέος σε αυτόν τον αντιδραστήρα.

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται η μέση τιμή του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου, της συγκέντρωσης αζώτου, των συγκεντρώσεων ολικών και πτητικών αιωρούμενων στερεών, της απόδοσης και της σύστασής σε ΠΥΑ για τους δύο αντιδραστήρες σε όλη τη διάρκεια λειτουργίας.

Πίνακας 3.1: Αποτελέσματα των βασικότερων χαρακτηριστικών των αντιδραστήρων DFR-1 και DFR-2.

Παράμετρος	DFR-1	DFR-2
COD (mg O₂/L)	2025 ± 460	3571 ± 523
TN (mg/L)	18 ± 6	36 ± 9
TSS (mg/L)	2,60 ± 1,77	4,45 ± 2,14
VSS (mg/L)	2,13 ± 1,49	3,82 ± 1,94
ΠΥΑ (g)/ξ. β. κυτ. (g) (%)	16 ± 4	16 ± 5
HV: HB	(18 ± 7): (82 ± 7)	(25 ± 3): (75 ± 3)

4. Συμπεράσματα και Προτάσεις

4.1 Συμπεράσματα

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η παραγωγή ΠΥΑ μέσω μικτών εγκλιματισμένων καλλιεργειών, σε δύο όμοιους αντιδραστήρες άντλησης – πλήρωσης (Draw-Fill) όγκου 1L. Ο λόγος άνθρακα προς άζωτο (C/N) στους δύο αντιδραστήρες DFR-1 και DFR-2 ήταν 100:1. Στον DFR-1 τροφοδοτήθηκαν 2025 ± 460 mg O₂/L άνθρακα και 18 ± 6 mg/L αζώτου, ενώ στον DFR-2 οι παραπάνω συγκεντρώσεις ήταν διπλάσιες (3571 ± 523 mg O₂/L, 36 ± 9 mg/L).

Συγκεκριμένα, στον DFR-1 κατά τη φάση του άνθρακα παρατηρείται 63% κατά μέσο όρο κατανάλωση του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου τους πρώτους τρεις μήνες λειτουργίας, ενώ τους υπόλοιπους μήνες η κατανάλωση είναι μεγαλύτερη από 95% κατά μέσο όρο. Επιπλέον, κατά τη φάση του αζώτου, η κατανάλωση της ουρίας ήταν πλήρης. Αντίστοιχα στον DFR-2, μέχρι την 56^η ημέρα παρατηρείται μέση κατανάλωση 85% του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου ενώ μετά η κατανάλωση είναι πλήρης. Ωστόσο, σημειώνεται μη ολική κατανάλωση της ουρίας στη φάση του αζώτου τις πρώτες 35 ημέρες, γεγονός που οφείλεται σε χαμηλό ποσοστό συσσωρευμένου βιοπλαστικού. Μετά από αυτή το άζωτο καταναλώνεται πλήρως. Συνεπώς, επιτυγχάνονται και στους δύο αντιδραστήρες καλές συνθήκες συσσώρευσης καθώς κρίνεται εφικτός ο περιορισμός αζώτου στη φάση του άνθρακα, αφού η ποσότητα αζώτου στον αντιδραστήρα είναι μηδενική. Επιπλέον, οι τιμές του pH κυμαίνονται μεταξύ 7 και 9, οι οποίες βιβλιογραφικά θεωρούνται βέλτιστες για τη συσσώρευση.

Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ικανοποιητική αύξηση της βιομάζας και στις δύο περιπτώσεις. Συγκριμένα, στον DFR-1 η αρχική τιμή των ολικών και πτητικών στερεών ήταν $1,00 \pm 0,25$ gr TSS/L και $0,74 \pm 0,25$ gr VSS/L, και η τελική τιμή κατόπιν διακυμάνσεων ήταν $3,81 \pm 0,56$ gr TSS/L και $3,15 \pm 0,56$ gr VSS/L. Στον DFR-2 σημειώθηκε μια συνεχώς αυξητική πορεία από $1,07 \pm 0,26$ gr TSS/L και $0,84 \pm 0,23$ gr VSS/L μέχρι τα $6,06 \pm 0,54$ gr TSS/L και $5,22 \pm 0,51$ gr VSS/L. Επιπλέον, ο λόγος των πτητικών προς τα ολικά στερεά είναι $0,80 \pm 0,07$ για τον DFR-1 και $0,84 \pm 0,06$ σε όλη τη διάρκεια λειτουργίας, υποδεικνύοντας ότι οι βιομάζες που έχουν αναπτυχθεί είναι υγιείς. Συνολικά συμπεραίνεται ότι η συγκέντρωση των ολικών και των πτητικών στερεών αυξάνεται με την αύξηση του οργανικού φορτίου και του αζώτου, συγκεκριμένα στον DFR-1 λαμβάνεται μια μέση τιμή ολικών και πτητικών στερεών $2,60 \pm 1,77$ gr TSS /L και $2,13 \pm 1,49$ gr VSS/L αντίστοιχα, ενώ στον DFR-2 $4,45 \pm 2,14$ gr TSS/L και $3,82 \pm 1,94$ gr VSS/L αντίστοιχα.

Συμπεραίνεται ότι η συσσώρευση ΠΥΑ είναι επιτυχής, καθώς παράγεται είτε το συμπολυμερές P(3HBco3HV), είτε μίγμα του με τα ομοπολυμερή P3HB και P3HV και στους δύο κύκλους πειραμάτων. Η απόδοση υπολογίστηκε ως ο λόγος του αθροίσματος των βαρών των μονομερών μονάδων προς τη ξηρή μάζα των κυττάρων και δεν παρουσιάζει σημαντική διαφορά στους δύο αντιδραστήρες. Συγκεκριμένα, στον DFR-1 επιτυγχάνεται μέση συσσώρευση $16 \pm 4\%$ και στον αντιδραστήρα DFR-2 μέση συσσώρευση $16 \pm 5\%$.

Σχετικά με τη σύσταση των ΠΥΑ συμπεραίνεται ότι η αύξηση του οργανικού φορτίου, δεδομένου ότι η σύσταση του συνθετικού μέσου είναι ίδια, οδηγεί σε βιοπλαστικά με

μεγαλύτερή μέση περιεκτικότητα στο μονομερές HV. Συγκεκριμένα, στον DFR-1 παράχθηκαν ΠΥΑ με αναλογία HV:HB (18 ± 7): (82 ± 7), ενώ στον DFR-2 αναλογία (25 ± 3): (75 ± 3).

4.2 Προτάσεις

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, μελετήθηκε η παραγωγή βιοπλαστικών μέσω μικτών καλλιιεργειών σε αντιδραστήρα DFR. Για τη βαθύτερη κατανόηση της συμπεριφοράς των μικτών καλλιιεργειών μπορούν να διεξαχθούν πειράματα διαλείποντος έργου με συχνή δειγματοληψία στη διάρκεια ενός κύκλου. Στόχος αυτών των πειραμάτων είναι η δημιουργία των προφίλ της κατανάλωσης αζώτου και του οργανικού φορτίου, της συγκέντρωσης της μικροβιακής βιομάζας, της συγκέντρωσης και της σύστασης του συσσωρευμένου βιοπλαστικού και του pH. Μέσω των παραπάνω δεδομένων μελετάται η ικανότητα αφομοίωσης των διαφορετικών πηγών άνθρακα και αζώτου για ανάπτυξη και βιοσυσσώρευση. Επιπλέον, προσδιορίζονται οι χρόνοι κατανάλωσης καθώς και η προτίμηση της μικτής καλλιέργειας σε συγκεκριμένα υποστρώματα συνδυαστικά με τη μεταβολή του ενδοκυτταρικού άνθρακα στη διάρκεια των φάσεων. Τα παραπάνω στοιχεία θα επιτρέψουν βελτιστοποιήσεις με στόχο τη μεγιστοποίηση του συσσωρευμένου βιοπλαστικού.

Για τη μεγιστοποίηση του περιεχόμενου βιοπλαστικού στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν παραπάνω προτείνεται η μείωση του χρόνου συσσώρευσης καθώς παρατηρήθηκε ότι μετά την πλήρη κατανάλωση του εξωκυτταρικού άνθρακα μειώνεται το ποσοστό του βιοπλαστικού.

Για την ολοκληρωμένη αξιολόγηση της μελέτης, ώστε να προσδιοριστεί εάν παράγονται συμπολυμερή, προτείνεται ο προσδιορισμός των φυσικοχημικών και μηχανικών ιδιοτήτων των παραγόμενων βιοπλαστικών. Οι μέθοδοι και οι τεχνικές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι η Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους (SEC) για τη μελέτη του μοριακού βάρους (Mw), η Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (DSC) για τον προσδιορισμό της θερμοκρασίας υαλώδους μετάβασης (Tg) και της θερμοκρασίας τήξης (Tm), η Θερμοσταθμική ανάλυση (TGA) για τη μέτρηση της θερμικής σταθερότητας, η Δυναμική Μηχανική Ανάλυση (DMA) για τη μελέτη της εξωδοελαστικής συμπεριφοράς των πολυμερών. Τέλος, μπορούν να πραγματοποιηθούν δοκιμές εφελκυσμού (tensile test) για το προσδιορισμό του μέτρου ελαστικότητας και της αντοχής διαρροής.

Ως συνέχεια της έρευνας, θα ήταν χρήσιμη η κλιμάκωση του μεγέθους του αντιδραστήρα, ώστε να διερευνηθούν οι παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν την αποδοτικότητα της διεργασίας κατά την αύξηση του ενεργού όγκου του. Επιπλέον, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας είναι ενθαρρυντικά για τη μετάβαση από συνθετική τροφοδοσία άνθρακα σε χρήση πραγματικού αποβλήτου τροφίμων. Ενώ μελλοντικά θα μπορούσε να εξεταστεί και η συνεπεξεργασία αποβλήτου τροφίμων και πραγματικού αποβλήτου πλουσίου σε οργανικό άζωτο, όπως το στράγγισμα που λαμβάνεται από τα ΧΥΤΑ.

Τέλος, σχετικά με την παραλαβή του ενδοκυτταρικού άνθρακα, η χρήση χλωροφόρμιου είναι αποτελεσματική, ωστόσο αποτελεί μια μη φιλική προς το περιβάλλον μέθοδο. Συνεπώς, η κλιμάκωση μεγέθους με χρήση τέτοιου διαλύτη κρίνεται ακατάλληλη. Για αυτό το λόγο προτείνεται ο σχεδιασμός πειραμάτων με χρήση πράσινων διαλυτών με σκοπό τη μέγιστη ανάκτηση.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. "A History of Plastics", *British Plastic Federation*, 2014. https://www.bpf.co.uk/press/Oil_Consumption.aspx (accessed Dec. 30, 2022).
2. R. Geyer, "A Brief History of Plastics," in *Mare Plasticum - The Plastic Sea*, 2020. doi: 10.1007/978-3-030-38945-1_2.
3. "Global plastics production", *Our World in Data* https://ourworldindata.org/grapher/global-plastics-production?fbclid=IwAR3MkkwjQ0cSvx1mtu1x9AFqAihyeDZZ5eT8__unSt-pik3cj-KwysLfJTw (accessed Dec. 30, 2022).
4. M. Shen et al., "Are biodegradable plastics a promising solution to solve the global plastic pollution?", *Environmental Pollution*, vol. 263. 2020. doi: 10.1016/j.envpol.2020.114469
5. V. Shanmugam, O. Das, R. E. Neisiany, K. Babu, S. Singh, M. S. Hedenqvist, F. Berto, and S. Ramakrishna, "Polymer recycling in Additive Manufacturing: An opportunity for the circular economy", *Materials Circular Economy*, vol. 2, no. 1, 2020.
6. "Plastic pollution | Definition, Sources, Effects, Solutions, & Facts", *Encyclopedia Britannica*. <https://www.britannica.com/science/plastic-pollution> (accessed Dec. 30, 2022).
7. J. R. Jambeck *et al.*, "Plastic waste inputs from land into the ocean," *Science (1979)*, vol. 347, no. 6223, 2015, doi: 10.1126/science.1260352.
8. S. B. Borrelle *et al.*, "Predicted growth in plastic waste exceeds efforts to mitigate plastic pollution", *Science (1979)*, vol. 369, no. 6509, 2020, doi: 10.1126/SCIENCE.ABA3656.
9. A. O. C. Iroegbu, S. S. Ray, V. Mbarane, J. C. Bordado, and J. P. Sardinha, "Plastic Pollution: A Perspective on Matters Arising: Challenges and Opportunities", *ACS Omega*, vol. 6, no. 30. 2021. doi: 10.1021/acsomega.1c02760.
10. Y. Loganathan and M. P. J. Kizhakedathil, "A review on microplastics – an indelible ubiquitous pollutant", *Biointerface Research in Applied Chemistry*, vol. 13, no. 2, p. 126, 2022.
11. "Άρθρο 04 – Μείωση της κατανάλωσης (άρθρο 4 της Οδηγίας 2019/904/ΕΕ)" *Υπουργείο Περιβάλλοντος και Ενέργειας*, 2020. <http://www.opengov.gr/minenv/?p=11144&fbclid=IwAR337IWuXwYxBRkQEbn4JvUImJvAKULOYy8iRWkvXwqjOZlqTkZcJBU6m84> (Accessed Dec,30, 2022)
12. European Bioplastics e.V., 'Materials – European Bioplastics e.V.', 2020. <https://www.european-bioplastics.org/bioplastics/>(accessed Dec. 30, 2022).
13. K. Laird, "Global bioplastics production forecast to more than triple over next 5 years," *Sustainable Plastics*, Available: <https://www.sustainableplastics.com/news/global-bioplastics-production-forecast-more-triple-over-next-5-years>. (Accessed Dec. 30, 2022)

14. K. Jögi and R. Bhat, "Valorization of food processing wastes and by-products for bioplastic production", *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, vol. 18. 2020. doi: 10.1016/j.scp.2020.100326.
15. S. Sid, R. S. Mor, A. Kishore, and V. S. Sharanagat, "Bio-sourced polymers as alternatives to conventional food packaging materials: A review", *Trends in Food Science and Technology*, vol. 115. 2021. doi: 10.1016/j.tifs.2021.06.026.
16. T. C. Guimarães, E. S. Araújo, M. L. Hernández-Macedo, and J. A. López, "Polyhydroxyalkanoates: Biosynthesis from Alternative Carbon Sources and Analytic Methods: A Short Review", *Journal of Polymers and the Environment*, vol. 30, no. 7. 2022. doi: 10.1007/s10924-022-02403-7.
17. European Bioplastics e.V., 'Materials – European Bioplastics e.V.', 2020. <https://www.european-bioplastics.org/market/#> (accessed Dec. 30, 2022).
18. D. Plackett and I. Siró, "Polyhydroxyalkanoates (PHAs) for food packaging", in *Multifunctional and Nanoreinforced Polymers for Food Packaging*, 2011. doi: 10.1533/9780857092786.4.498.
19. V. Sharma, R. Sehgal, and R. Gupta, "Polyhydroxyalkanoate (PHA): Properties and Modifications", *Polymer (Guildf)*, vol. 212, 2021, doi: 10.1016/j.polymer.2020.123161.
20. A. Anjum, M. Zuber, K. M. Zia, A. Noreen, M. N. Anjum, and S. Tabasum, "Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements", *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 89. 2016. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.04.069.
21. P. K. Sharma *et al.*, "Synthesis and physical properties of polyhydroxyalkanoate polymers with different monomer compositions by recombinant *Pseudomonas putida* LS46 expressing a novel PHA SYNTHASE (PhaC116) enzyme", *Applied Sciences (Switzerland)*, vol. 7, no. 3, 2017, doi: 10.3390/app7030242.
22. T. v. Ojumu, J. Yu, and B. O. Solomon, "Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer", *African Journal of Biotechnology*, vol. 3, no. 1. 2004. doi: 10.5897/AJB2004.000-2004.
23. E. Bugnicourt, P. Cinelli, A. Lazzeri, and V. Alvarez, "Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging", *Express Polym Lett*, vol. 8, no. 11, 2014, doi: 10.3144/expresspolymlett.2014.82.
24. J. Mozejko-Ciesielska, K. Szacherska, and P. Marciniak, "Pseudomonas Species as Producers of Eco-friendly Polyhydroxyalkanoates", *Journal of Polymers and the Environment*. 2019. doi: 10.1007/s10924-019-01422-1
25. C. Sabapathy *et al.*, "Recent developments in Polyhydroxyalkanoates (PHAs) production – A review", *Bioresource Technology*, vol. 306. 2020. doi: 10.1016/j.biortech.2020.12313.
26. A. T. Adeleye *et al.*, "Sustainable synthesis and applications of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from biomass", *Process Biochemistry*, vol. 96. 2020. doi: 10.1016/j.procbio.2020.05.032.

27. Ian Tiseo and N. 23, "PHA global market value 2025", Statista, 2021. [<https://www.statista.com/statistics/1010383/global-polyhydroxyalkanoate-market-size/?fbclid=IwAR3JTRSyrh7DGYpF7OvRDD3dbp47UFZ90Yxi8t2q9rvmD9Zt8TENbqkyYVU>] (accessed Dec. 30, 2022).
28. K. Ahuja and T. Malkani, "Polyhydroxyalkanoate Market Size: Industry Report, 2022-2030," Global Market Insights Inc., 2022. https://www.gminsights.com/industry-analysis/polyhydroxyalkanoate-market?fbclid=IwAR3JnKFP8lcoGa7j6mcU-0XWxYlWYy6pwSh38RmllsRbW_FhA-xsn1z0PFQ (accessed Dec. 30, 2022).
29. A. Pandey, N. Adama, K. Adjallé, and J.-F. Blais, "Sustainable applications of polyhydroxyalkanoates in various fields: A critical review", *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 221, pp. 1184–1201, Nov. 2022.
30. J. Medeiros Garcia Alcântara, F. Distanto, G. Storti, D. Moscatelli, M. Morbidelli, and M. Sponchioni, "Current trends in the production of biodegradable bioplastics: The case of polyhydroxyalkanoates", *Biotechnology Advances*, vol. 42. 2020. doi: 10.1016/j.biotechadv.2020.107582.
31. E. Gabirondo, A. Sangroniz, A. Etxeberria, S. Torres-Giner, and H. Sardon, "Poly(hydroxy acids) derived from the self-condensation of hydroxy acids: From polymerization to end-of-life options", *Polym Chem*, vol. 11, no. 30, 2020, doi: 10.1039/d0py00088d.
32. B. Laycock, P. Halley, S. Pratt, A. Werker, and P. Lant, "The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates", *Progress in Polymer Science*, vol. 39, no. 2. 2014. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2013.06.008.
33. C. Kourmentza *et al.*, "Recent advances and challenges towards sustainable polyhydroxyalkanoate (PHA) production", *Bioengineering*, vol. 4, no. 2. 2017. doi: 10.3390/bioengineering4020055.
34. G. Mannina, D. Presti, G. Montiel-Jarillo, J. Carrera, and M. E. Suárez-Ojeda, "Recovery of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from wastewater: A review", *Bioresource Technology*, vol. 297. 2020. doi: 10.1016/j.biortech.2019.122478.
35. M. A. M. Reis, L. S. Serafim, P. C. Lemos, A. M. Ramos, F. R. Aguiar, and M. C. M. van Loosdrecht, "Production of polyhydroxyalkanoates by mixed microbial cultures", *Bioprocess Biosyst Eng*, vol. 25, no. 6, 2003, doi: 10.1007/s00449-003-0322-4.
36. K. Khatami, M. Perez-Zabaleta, I. Owusu-Agyeman, and Z. Cetecioglu, "Waste to bioplastics: How close are we to sustainable polyhydroxyalkanoates production?", *Waste Management*, vol. 119. 2021. doi: 10.1016/j.wasman.2020.10.008.
37. T. Nguyenhuynh, L. W. Yoon, Y. H. Chow, and A. S. M. Chua, "An insight into enrichment strategies for mixed culture in polyhydroxyalkanoate production: feedstocks, operating conditions and inherent challenges", *Chemical Engineering Journal*, vol. 420. 2021. doi: 10.1016/j.cej.2021.130488.

38. K. Szacherska, P. Oleskowicz-Popiel, S. Ciesielski, and J. Mozejko-Ciesielska, "Volatile fatty acids as carbon sources for polyhydroxyalkanoates production", *Polymers*, vol. 13, no. 3. 2021. doi: 10.3390/polym13030321.
39. Y. Lü, "Advance on the production of polyhydroxyalkanoates by mixed cultures", *Frontiers of Biology in China*, vol. 2, no. 1. 2007. doi: 10.1007/s11515-007-0003-9.
40. L. Huang, Z. Chen, Q. Wen, and D. J. Lee, "Enhanced polyhydroxyalkanoate production by mixed microbial culture with extended cultivation strategy", *Bioresour Technol*, vol. 241, 2017, doi: 10.1016/j.biortech.2017.05.192.
41. S. Pradhan, P. K. Dikshit, and V. S. Moholkar, "Production, Characterization, and Applications of Biodegradable Polymer: Polyhydroxyalkanoates", 2020. doi: 10.1007/978-981-15-1251-3_4.
42. S. Mohapatra et al., "Bacillus and biopolymer: Prospects and challenges", *Biochemistry and Biophysics Reports*, vol. 12. 2017. doi: 10.1016/j.bbrep.2017.10.001.
43. S. Obruca et al., "Novel unexpected functions of PHA granules", *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 104, no. 11. 2020. doi: 10.1007/s00253-020-10568-1.
44. "Circular economy: Definition, importance and benefits: News: European parliament," <https://www.europarl.europa.eu/news/en/headlines/economy/20151201STO05603/circular-economy-definition-importance-and-benefits> (accessed Dec. 30, 2022).
45. A. Talan, S. Pokhrel, R. D. Tyagi, and P. Drogui, "Biorefinery strategies for microbial bioplastics production: Sustainable pathway towards Circular Bioeconomy", *Bioresour Technol*, vol. 17. 2022. doi: 10.1016/j.biteb.2021.100875.
46. S. V. Withanage, G. M. Dias, and K. Habib, "Review of household food waste quantification methods: Focus on composition analysis", *Journal of Cleaner Production*, vol. 279. 2021. doi: 10.1016/j.jclepro.2020.123722.
47. Sanchez Lopez, Javier & Caldeira, Carla & De Laurentiis, Valeria & Sala, Serenella & Avraamides, Marios "Brief on food waste in the European Union". 2020.
48. EPA, "Food Recovery Hierarchy _ Sustainable Management of Food _ US EPA", EPA, 2020. <https://www.epa.gov/sustainable-management-food/food-recovery-hierarchy> (accessed Dec. 30, 2022).
49. Α. Ανδρεαδάκης, Μ. Πανταζίδου, Α. Σταθόπουλος, "Περιβαλλοντική Τεχνολογία", *Συμμετρία*, 2008.
50. "Η διαχείριση των αποβλήτων στις χώρες της ΕΕ (γράφημα): επικαιρότητα: Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο," *Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο*, 2018. <https://www.europarl.europa.eu/news/el/headlines/society/20180328STO00751/i-diacheirisi-ton-apovliton-stis-chores-tis-ee-grafima?fbclid=IwAR2yQ9-6M6Kj3rS7GbQf-BTCONzMQ-wdqnNLEty6X3W-8FVz5Gnn0joO4VM>. (Accessed Jan. 4, 2023)

51. Ι. Φραντζής και Συνεργάτες Ε.Π.Ε., BlackForest Solutions GmbH, "Οδηγός για τη χωριστή συλλογή αστικών αποβλήτων στην Ελλάδα", *Υπουργείο Περιβάλλοντος και Ενέργειας*, 2020
52. Y. F. Tsang *et al.*, "Production of bioplastic through food waste valorization", *Environment International*, vol. 127. 2019. doi: 10.1016/j.envint.2019.03.076.
53. Carlsson, A. Lagerkvist, and F. Morgan-Sagastume, "The effects of substrate pre-treatment on anaerobic digestion systems: A review", *Waste Management*, vol. 32, no. 9, 2012, doi: 10.1016/j.wasman.2012.04.016
54. G. Lytras, E. Koutroumanou, and G. Lyberatos, "Anaerobic co-digestion of condensate produced from drying of Household Food Waste and Waste Activated Sludge", *J Environ Chem Eng*, vol. 8, no. 4, 2020, doi: 10.1016/j.jece.2020.103947.
55. APHA, "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, Washington DC.", *Standard Methods*, 1990.
56. R. Parwez, A. Nabi, M. Mukarram, T. Aftab, M. M. Khan, and M. Naeem, "Role of nickel in regulation of nitrogen metabolism in legume–rhizobium symbiosis under critical conditions", *Frontiers in Plant-Soil Interaction*, pp. 495–522, 2021.
57. Wang, Jin, *et al.* "Kinetic Analysis on the Production of Polyhydroxyalkanoates from Volatile Fatty Acids by *Cupriavidus Necator* with a Consideration of Substrate Inhibition, Cell Growth, Maintenance, and Product Formation." *Biochemical Engineering Journal*, vol. 49, no. 3, 2010, pp. 422–428., <https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.02.005>.