ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ IV: ΣΥΘΕΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΔΙΚΑΣΙΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΥΓΡΟΥ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ ΤΡΟΦΙΚΩΝ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΩΣ ΒΙΩΣΙΜΗ ΠΗΓΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΠΛΑΣΤΙΚΩΝ ΑΠΟ ΜΙΚΤΕΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΕΡΓΑΣΙΑ

Μίτιλη Κλεονίκη

ΕπιβλέπωνΚαθηγητής
ΛυμπεράτοςΓεράσιμος,ΚαθηγητήςΣχολήςΧημικώνΜηχανικώνΕΜΠ

Αθήνα,Σεπτέμβριος2024

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία διερευνάται η αξιοποίηση του υγρού κλάσματος από μονάδα διαχείρισης αστικών οργανικών αποβλήτων ως τροφοδοσίας σε μικτή καλλιέργεια μικροοργανισμών προς παραγωγή βιοπλαστικών. Τόσο η αύξηση των υπολειμμάτων τροφών όσο και η ανάγκη για πλαστικά υλικά δημιουργούν την τάση διερεύνησης εναλλακτικών μεθόδων παραγωγήςβιοπλαστικών και αξιοποίησης των αποβλήτων. Με αυτόν τον τρόπο μειώνεται ο όγκος των αποβλήτων και παράλληλα οδηγούμαστε στην χρήση προϊόντων προστιθέμενης αξίας.

Ηδιαδικασία διεξαγωγής των πειραμάτων συμπεριλαμβάνει τον εναλλάξ περιορισμό των θετικών συστατικών άνθρακα και αζώτου σε εγκλιματισμένηκαι εμπλουτισμένη βιομάζα. Αρχικά, η τροφοδοσία άνθρακα αποτελείται εξολοκλήρου από συνθετικό απόβλητο που προσομοιάζει τη σύσταση του συμπυκνώματος, το οποίο λαμβάνεται από τεμαχισμό και ξήρανση τροφικών υπολειμμάτων. Σε δεύτερη φάση το 30% αντικαθίσταται με πραγματικό απόβλητο, ενώ σε τρίτη φάση αντικαθίσταται το 70%. Το τελευταίο στάδιο της διαδικασίας, κατά το οποίο το υπόστρωμα αποτελείται εξ ολοκλήρου από πραγματικό απόβλητο, δεν ολοκληρώθηκε, καθώς η σχολή ήταν κλειστή. Πηγή αζώτου αποτελεί η ουρία. Ο αντιδραστήρας άντλησης-πλήρωσης που χρησιμοποιήθηκε βρισκόταν σε θερμοκρασία25^{o}C, με μαγνητική ανάδευση. Στόχο αποτελεί η κατανάλωση πτητικών λιπαρών οξέων και η συσσώρευση PHAs. Για τον προσδιορισμό του παραγόμενου βιοπλαστικού εφαρμόστηκε η μέθοδος της λυοφιλίωσης. Η ανάκτηση έγινε κατόπιν χώνευσης με χλωροφόρμιο και οξινισμένημεθανόλη.

Η κατανάλωση των πτητικών λιπαρών οξέων πριν την προσθήκη πραγματικού αποβλήτου ήταν 73% και η παραγωγή PHAsήταν 20% σε ξηρή βιομάζα. Στην 1^{η} φάση η κατανάλωση VFAsκαι η συσσώρευση PHAsμειώθηκαν, ωστόσο στην 2^{η} φάση η κατανάλωση του υποστρώματος άνθρακα αυξήθηκε στο 85% και η παραγωγή βιοπλαστικού επέστρεψε στο 20%. Η σύσταση των παραγόμενων PHAsαποτελείται από HVκαι HB. Η αρχική αναλογία στην 1^{η} φάση είναι 44/56. Με την αύξηση του ποσοστού του πραγματικού αποβλήτου η αναλογία γίνεται 40% HVκαι 60% HB. Η αύξηση της παραγωγής HBοφείλεται στις διαφορές στην σύσταση της τροφοδοσίας.

Abstract

The present study investigates the utilisation of the liquid fraction from the urban organic waste management unit as a feedstock in a mixed culture of microorganisms for the production of bioplastics. The concurrent increase in food waste and the necessity for plastic materials has prompted the exploration of alternative methods for the production and utilisation of bioplastics. This approach therefore reduces the amount of waste produced and directs it towards the creation of valuable products.

The experimental procedure entails the alternation of limiting the positive carbon and nitrogen components in the acclimated and enriched biomass. In the initial phase, the carbon feed is composed entirely of synthetic waste, which simulates the composition of the concentrate obtained from the shredding and drying of food residues. In the subsequent phase, 30% is replaced with actual waste, and in the third phase, 70% is replaced. The final stage of the process, in which the substrate is composed entirely of actual waste, was not completed due to the closure of the educational establishment. The nitrogen source is urea. The pumping-filling reactor was maintained at 25 °C with magnetic stirring. The objective is to reduce the consumption of volatile fatty acids and the accumulation of PHAs. The lyophilisation method was employed to determine the produced bioplastic. The recovery was conducted after digestion with chloroform and acidified methanol.

The consumption of volatile fatty acids prior to the addition of real waste was 73%, with a production of PHAs of 20% in dry biomass. In the first phase, there was a decrease in the consumption of volatile fatty acids (VFAs) and the accumulation of polyhydroxyalkanoates (PHAs). However, in Phase 2, the consumption of the carbon substrate increased to 85%, and bioplastic production returned to 20%. The composition of the produced PHAs was found to consist of HV and HB. In phase 1, the initial ratio was determined to be 44/56. With the increase in the percentage of actual waste, the ratio became 40% HV and 60% HB. The observed increase in HB production was attributed to differences in feed composition.

Περιεχόμενα

Περίληψη	3
Abstract	4
Κατάλογος Πινάκων	7
Κατάλογος Σχημάτων	8
Πίνακας Συμβόλων	11
Θεωρητικό Μέρος	13
1. Γενική Εισαγωγή	13
1.1 Ρύπανση από Συμβατικά Πλαστικά	13
1.2 Κυκλική Οικονομία	15
2. Βιοπλαστικά	16
2.1 Πολυυδροξυαλκανοϊκά	18
2.1.1 Δομή Πολύ-υδροξυαλκανοϊκά	19
2.1.2 Ιδιότητες Πολύ-υδροξυαλκανοϊκά	21
2.1.3 Εφαρμογές Πολύ-υδροξυαλκανοϊκά	23
2.1.4 Βιοσύνθεση PHAs	24
2.1.5 Ιστορική Αναδρομή	25
2.2 Παραγωγή - Καλλιέργεια PHAs	25
2.2.1 Αερόβιες και Αναερόβιες Συνθήκες	28
2.2.2 Μεταβολικοί Οδοί	28
2.2.3 Καθαρές Καλλιέργειες	29
2.2.4 Μικτές Καλλιέργειες	30
2.2.5 Παράμετροι Επιρροής της Συσσώρευσης	31
2.3 Συμπαραγωγή	32
2.4 Διαδικασία Διαχωρισμού Βιοπλαστικών από το Σύνολο της Βιομάζας / Ανάκτηση από Κόκκους	33
2.5 Πλεονεκτήματα Βιολαστικών	34
3. Προοπτικές Εξέλιξης σε Βιομηχανική Κλίμακα	35
4. Τροφικά Απόβλητα	37
4.1 Ανάγκη Διαχείρισης	37
4.2 Αξιοποίηση Αποβλήτων Τροφίμων	38
4.3 Προεεξεργασία του Οργανικού Αποβλήτου	39
5. Σκοπός Εργασίας	43
Πειραματικό Μέρος	44
2.1 Καλλιέργεια Μικροοργανισμών	44
2.1.1 Πειραματική Διάταξη	44
2.1.2 Προετοιμασία Τροφοδοσίας	44
2.1.3 Πειραματική Διαδικασία	48
2.1.4 Αναλυτικές Μέθοδοι	48
Αποτελέσματα	61
Μέτρηση pH	61

Μέτρηση οπτικής πυκνότητας	61
Μέτρηση ολικών αιωρούμενων στερεών και πτητικών αιωρούμενων στερεών	63
Χημικά απαιτούμενο οξυγόνο	64
Ολικό άζωτο	67
Απόδοση PHAs	68
Σύσταση επί τοις εκατό σε HBκαι HV	69
Συγκεντρωτικά Χαρακτηρίστηκα των PHAs	70
Συμπεράσματα	72
Προτάσεις	73
Βιβλιογραφία	74

Κατάλογος πινάκων

Πίνακας 2.1	Σύσταση ολικής τροφοδοσίας αντιδραστήρων	43
Πίνακας 2.2	Σύσταση συνθετικής τροφοδοσίας άνθρακα	43
Πίνακας 2.3	Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος	43
Πίνακας 2.4	Σύσταση διαλύματος μετάλλων	43
Πίνακας 2.5	Σύσταση διαλύματος ιχνοστοιχείων	44
Πίνακας 2.6	Σύσταση τροφοδοσίας ανά φάση	47
Πίνακας 2.7	Ημέρες λειτουργίας	48
Πίνακας 3.1	Μετρήσεις pH, OD και στερεών	66
Πίνακας 3.2	Μετρήσεις από τον αντιδραστήρα για αρχή και τέλος κύκλου και οι μειώσεις	68
Πίνακας 3.3	Συγκεντρωτικός Πίνακας για τα PHAs	73

Κατάλογος σχημάτων

Εικόνα 1.1	Προβλεπόμενη αύξηση των πλαστικών αποβλήτων στα επόμενα χρόνια	11
Εικόνα 1.2	Σχηματική απεικόνιση του μοντέλου της κυκλικής οικονομίας	13
Εικόνα 1.3	Ιεράρχηση μεθόδων διαχείρισης των αποβλήτων	14
Εικόνα 1.4	Κατηγοριοποίηση πλαστικών με βάση την προέλευση τους και την βιοαποδομησιμότητα	15
Εικόνα 1.5	Εικόνα PHAs από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο	16
Εικόνα 1.6	Γενικός χημικός τύπος PHAs	17
Εικόνα 1.7	Μηχανισμός παραγωγής PHAs	18
Εικόνα 1.8	Μέθοδοι τροποποίησης PHAs	20
Εικόνα 1.9	Παραγωγή βιοπλαστικών ανά τύπο υλικού παγκοσμίως το 2019	24
Εικόνα 1.10	Βήματα παραλαβείςPHAs	32
Εικόνα 1.11	Σύγκριση βιολαστικών και πέτρο-πλαστικών	33
Εικόνα 1.12	ΠΥΑ ανά εφαρμογή πλαστικού για το 2021 και προβλέψεις για το 2030	35
Εικόνα 1.13	Χαρακτηριστικά condensate	39
Εικόνα 2.1	Πειραματική διάταξη 1η και στην 2η φάση του πειράματος στις αντίστοιχες φάσεις τροφοδοσίας	42
Εικόνα 2.2	Μέτρηση pH με το ηλεκτρονικό πεχάμετρο πάγκου "Sanxin PHS-3D-01 LabpHMeter" και ηλεκτρόδιο "SensoDirectpHelectrodetype 330"	46
Εικόνα 2.3	Ηλεκτρονικόφασματοφωτόμετρο "HachLange (DR2800)"	47
Εικόνα 2.4	Φιαλίδια προς φωτομέτρηση μετά την ολοκλήρωση της οξείδωσης του οργανικού φορτίου	49
Εικόνα 2.5	Φασματόμετρο Hanna Aquaculture Photometer HI83303 και αντιδραστήρια (HI- 93733-01 Ammonia HR kit) για τον προσδιορισμό του αμμωνιακού αζώτου	51
Εικόνα 2.6	Αεριοχρωματογράφος Shimadzu GC-2010 plus με ανιχνευτή φλόγας ιονισμού (FID) για τον προσδιορισμό των Πτητικών Λιπαρών Οξέων (VFAs)	52
Εικόνα 2.7	Διάταξη Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC) Agilent1260 Infnity II	53
Εικόνα 2.8	Βιομάζα μετά την φυγοκέντρηση και την έκπληση	54
Εικόνα 3.1	Διάγραμμα των μετρήσεων του pH του αντιδραστήρα συναρτήσει του χρόνου	58
Εικόνα 3.2	Διάγραμμα των μετρήσεων της οπτικής πυκνότητας του αντιδραστήρα συναρτήσει του χρόνου	59
Εικόνα 3.3	Διάγραμμα των ολικών και πτητικών αιρούμενων στερεών του αντιδραστήρα συναρτήσει του χρόνου	60
Εικόνα 3.4	Διάγραμμα κατανάλωσης του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου του αντιδραστήρα συναρτήσει του χρόνου	62
Εικόνα 3.5	Διαγράμματα κατανάλωσης οργανικού φορτίου στην φάση 1 και 2	68

Εικόνα 3.6	Ολικό άζωτο συναρτήσει του χρόνου	70
Εικόνα 3.7	Συσσώρευση PHAs των μικροοργανισμών του αντιδραστήρα συνάρτηση της κατανάλωσης πτητικών λιπαρών οξέων της κάθε τροφοδοσίας	71
Εικόνα 3.8	Σύσταση PHAs σε κάθε φάση του πειράματος	72

Ευχαριστίες

Η συγκεκριμένη μελέτη διεξήχθη στο Εργαστήριο Οργανικής Χημικής Τεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ, θα ήθελα,επομένως, να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες πρώτα και κύρια στον Καθηγητή κ. Γεράσιμο Λυμπεράτο, ο οποίος μου παρείχε την ευκαιρία να εργαστώ πάνω σε αυτό το επίκαιρο θέμα.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Επίκουρο Καθηγήτρια κ. ΜαμμάΔιόμη και την ερευνητική της ομάδα για την παραχώρηση του freezedryer του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας κατά τη διάρκεια των πειραμάτων ανάκτησης βιοπλαστικών.

Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλους τους συνεργαζόμενους συμφοιτητές και ερευνητές του Εργαστηρίου Οργανικής Χημικής Τεχνολογίας για την εξαιρετική μας συνεργασία.

Κυρίως όμως, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα κ. Φιλίππου Κωνσταντίνα για την πολύτιμη καθοδήγηση, τις γνώσεις και την ανεκτίμητη βοήθειά της τόσο κατά τη διάρκεια των πειραμάτων όσο και κατά τη σύνταξη της εργασίας. Θα ήθελα να τονίσω, πέραν των δυνατοτήτων της, την καλή της διάθεση και κυρίως την προθυμία της να με στηρίξει τόσο για την εκπόνηση της παρούσας μελέτης, όσο και σε γενικότερα θέματα έρευνας.

Τέλος, θέλω να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες προς την οικογένειά μου για τη στήριξή τους και τη συνεχή τους παρουσία σε όλες μου τις προσπάθειες, καθώς και προς τους φίλους μου, οι οποίοι αποτέλεσαν σημαντικό στήριγμα στη φοιτητική μου ζωή.

ΠΙΝΑΚΑΣΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

PE	Πολυαιθυλένιο
PP	Πολυπροπυλένιο
PET	ΤερεφθαλικόΠολυαιθυλένιο
PHA(ΠΥΑ)	Πολύ-υδροξυαλκανοϊκοεστέρας
PBS	Πολυβουτυλένιο
PCL	Πολυκαπρολακτόνη
PS	Πολυστυρένιο
HDPE	Πολυαιθυλένιουψηλήςπυκνότητας
LDPE	Πολυαιθυλένιοχαμηλήςπυκνότητας
PLA	ΠολυγαλακτικόΟξύ
PGA	ΠολυγλυκολικόΟξύ
PVOH/PVA	Πολυβινυλικήαλκοόλη
PVAC	Οξικόςπολυβινυλεστέρας
scl–PHAs	ΠΥΑμικρήςανθρακικήςαλυσίδας
mcl–PHAs	ΠΥΑμεσαίαςανθρακικήςαλυσίδας
P3HB	Πόλυ–3–υδροξυβουτυρικό
P(4HB)	Πόλυ–4–υδροξυβουτυρικό
3HHx	3–υδροξυεξανοϊκόοξύ
4HB	4–υδροξυβουτιρικόοξύ
3HO	3–υδροξυοκτανοϊκόοξύ
3HD	3 –υδροξυδεκανοϊκόοξύ
3HDD	3 –υδροξυδωδεκανοϊκόοξύ
3HB	3 –υδροξυβουτυρικοοξύ
3HV	3 –υδροξυβαλερικόοξύ
HBME	υδροξυβουτυρικόςμεθυλεστέρας
HAME	υδροξυαλκανοϊκόςμεθυλεστέρας
MMK	ΜικτέςΜικροβιακέςΚοινότητες
PAOs	Οργανισμοίπουσυσσωρεύουνπολυφωσφορικάάλατα
GAOs	Οργανισμοίπουσυσσωρεύουνγλυκογόνο
ADF	ΑερόβιαΔυναμικήΣίτιση
OLR	ΡυθμόςΟργανικήςΦόρτωσης
COD	ΧημικάΑπαιτούμενοΟξυγόνο
TOC	ΟλικόςΟργανικόςΆνθρακας
TN	ΟλικόΆζωτο
TSS	ΟλικάΑιωρούμεναΣτερεά
VSS	ΠτητικάΑιωρούμεναΣτερεά

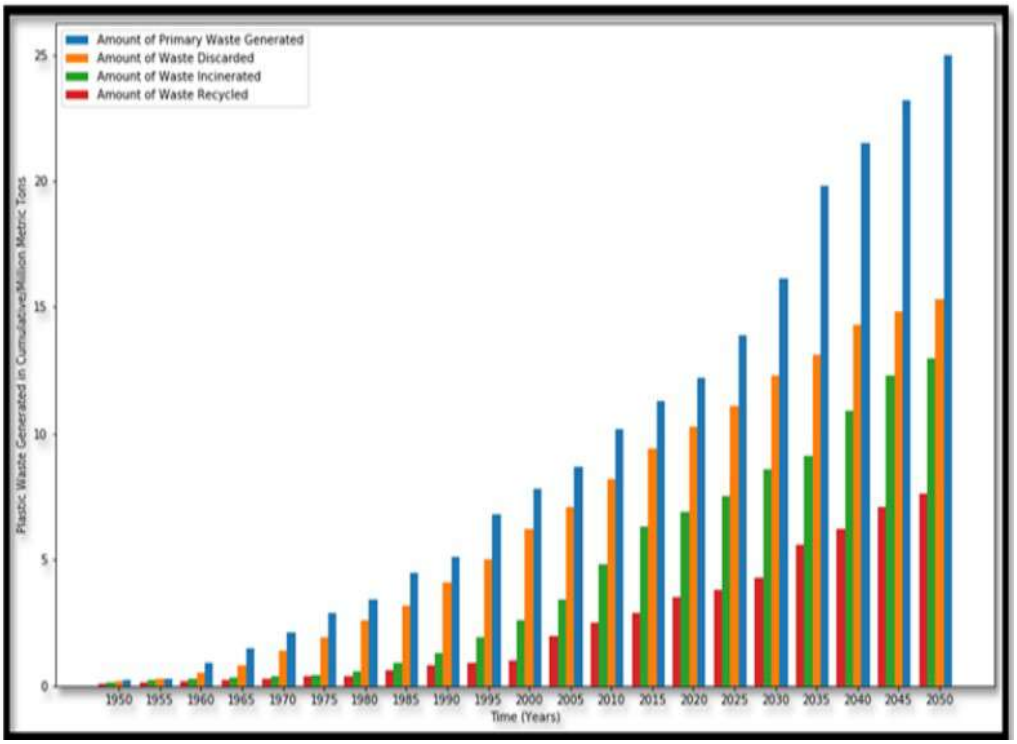
ΧΥΤΑ	ΧώροιΥγειονομικήςΤαφής
VFAs	ΠτητικάΛιπαράΟξέα
HPLC	ΥγρήΧρωματογραφίαΥψηλήςΑπόδοσης
ΑΣΑ	Αστικά στερεά απόβλητα

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΈΡΟΣ

1. ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1ΡΥΠΑΝΣΗ ΑΠΟ ΣΥΜΒΑΤΙΚΑ ΠΛΑΣΤΙΚΑ

Η αύξηση του παγκόσμιου πληθυσμού σε συνδυασμό με την αστικοποίηση συμβάλλουν στην αύξηση της ζήτησης για υλικά όπως το πλαστικό. Συγκεκριμένα τα τελευταία 60 χρόνια ο πληθυσμός έχει μεταβληθεί από 3 δισεκατομμύρια (1960) σε 7 (απογραφή 2011) και αναμένεται να φτάσει τα 9 δισεκατομμύρια μέχρι το 2050 [1].Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τόσο την παραγωγή αποβλήτων και ρύπων από την παραγωγή και διάθεση των υλικών όσο και την υπερβολική κατανάλωση πόρων. Την περίοδο της πανδημίας COVID – 19 σημειώθηκε μεγάλη συσσώρευση πλαστικών, λόγω της μαζικής κατανάλωσης, στον τομέα της ιατρικής και σε είδη εξοπλισμού ατομικής προστασίας μιας χρήσης [2].



Εικόνα1.1Προβλεπόμενη αύξηση των πλαστικών αποβλήτων στα επόμενα χρόνια [3]

Τα συμβατικά πλαστικά είναι προϊόντα πετρελαίου, γεγονός που τα καθιστά ιδιαίτερα επιβαρυντικά για το περιβάλλον, αφού καταναλώνονται ορυκτοί πόροι σε υψηλά μάλιστα ποσοστά που αγγίζουν το 6% της παγκόσμιας κατανάλωσης πετρελαίου. Τα πλαστικά αποτελούν ένα συμπολυμερές, τα μονομερή του οποίου (επαναλαμβανόμενες δομικές μονάδες) είναι υδρογονάνθρακες. Το υδρογόνο και ο άνθρακας που απαιτούνται συναντώνται ελεύθερα στην φύση και εύκολα λαμβάνονται από πετρέλαιο με την δομή του αιθυλενίου ήπροπανίου ή και στυρενίου ή από μεθάνιο, βιομάζα (π.χβιοαιθανόλη) και άλλες πηγές [4].

Ως μία σύντομη ιστορική αναδρομή, αξίζει να αναφερθεί πως η εφεύρεση του πρώτου συνθετικού πολυμερούς έγινε το 1907 από τον LeoBaekeland και άνοιξε τον δρόμο για τη μαζική παραγωγή πλαστικών μετά τον Β' Παγκόσμιο Πόλεμο. Η οικονομική άνθηση και η αύξηση της κατανάλωσης συνέβαλαν σε σημαντική άνοδο της παραγωγής πλαστικών, από 1.5 εκατομμύρια τόνους το 1950 σε 367 εκατομμύρια τόνους το 2020. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η μείωση της παραγωγής για χρονικό διάστημα τριών ετών, λόγω διαφόρων παραγόντων, όπως οι πετρελαϊκές κρίσεις και η οικονομική ύφεση [5].

Η ανάπτυξη του πλαστικού τόσο στη βιομηχανία όσο και η αποδοχή του από το αγοραστικό κοινό οφείλεται στο υψηλό μοριακό του βάρος, στην ανθεκτικότητα, στην αδράνεια στη μικροβιακή δράση, στο χαμηλό κόστος παραγωγής, στη χρήση απλών παραγωγικών διαδικασιών και τη μεγάλη τους ποικιλία [6]. Το πλαστικό είναι διαδεδομένο σε πολλούς τομείς, όπως οι κατασκευές, οι μεταφορές, ο ηλεκτρικός και ηλεκτρονικός εξοπλισμός, η γεωργία, τα είδη οικιακής χρήσης, τα είδη αναψυχής, τα αθλητικά είδη και οι ιατρικές προμήθειες και, κυρίως,η συσκευασία των προϊόντων. Ιδιαίτερα, η συσκευασία τροφίμων αποτελεί το 36% της παγκόσμιας παραγωγής πλαστικών. Εάν αποκλειστούν οι συνθετικές ίνες και ληφθούν υπόψη μόνο οι πολυμερικές ρητίνες, αυτό το ποσοστό ανέρχεται στο 42%. Επιπλέον, περισσότερο από το 90% της συσκευασίας κατασκευάζεται από πολυαιθυλένιο (PE), πολυπροπυλένιο (PP) ή τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο (PET), ενώ σχεδόν όλη η παραγωγή PET χρησιμοποιείται για τη συσκευασία [5].

Πέραν της ρυπογόνου διαδικασίας παραγωγής πλαστικού σημαντική επιβαρυντική δράση έχει η απόρριψή του μετά το τέλος της ζωής του. Σημαντικοί τρόποι εναπόθεσής του είναι η ταφή, η αποτέφρωση και η ανακύκλωση. Οι διαδικασίες αυτές είναι ιδιαίτερα επιβλαβείς για το περιβάλλον, καθώς με την αποτέφρωση απελευθερώνονται αέρια του θερμοκηπίου (CO_2) και ερεθιστικά αέρια (HCl). Όσον αφορά στη μέθοδο της ανακύκλωσης, οι απαιτούμενες μεταφορές, η διαδικασία διαχωρισμού και συλλογή από την πηγήκαι η ανακατασκευή του πλαστικού είναι διαδικασίες που αυξάνουν τόσο το κόστος όσο και το περιβαλλοντικό αποτύπωμα[6], [2]. Από το 1950 έως το 2015, έχουν παραχθεί 8300 εκατομμύρια τόνοι πλαστικών, εκ των οποίων οι 5800 εκατομμύρια τόνοι κατατάσσονται ως απόβλητα. Παρά τις προσπάθειες για αύξηση της ανακύκλωσης, μόνο τα 500 εκατομμύρια τόνοι ανακυκλώνονται, με μόνο το 1% (100 εκατομμύρια τόνοι) να επαναχρησιμοποιείται. Περίπου το 12% από αυτά τα απορρίμματα υφίστανται αποτέφρωση, ενώ το υπόλοιπο 79% καταλήγει στο φυσικό περιβάλλον [7].

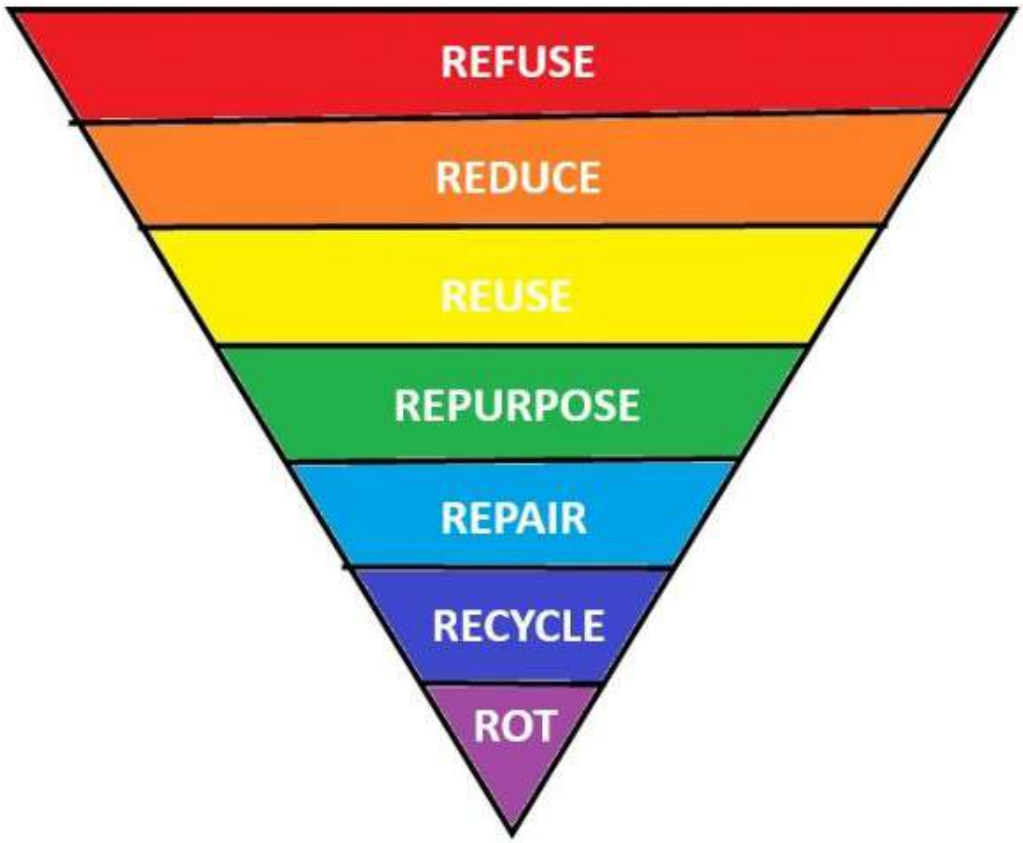
1.2ΚΥΚΛΙΚΗ ΟΙΚΟΝΟΜΙΑ

Η κυκλική οικονομία αντιπροσωπεύει μια αλλαγή προς ένα μοντέλο οικονομικής ανάπτυξης που αντιμετωπίζει την ανάγκη για περιβαλλοντική βιωσιμότητα, βασίζεται στη μείωση της απόδοσης των πόρων, την ανακύκλωση και την επαναχρησιμοποίηση των υλικών, με στόχο τη μείωση των αποβλήτων και την ελαχιστοποίηση της περιβαλλοντικής επιβάρυνσης. Αντί της συνεχούς εξάντλησης των περιορισμένων φυσικών πόρων και της συνακόλουθης παραγωγής αποβλήτων που καταλήγουν στις χωματερές ή στους ωκεανούς, η κυκλική οικονομία προωθεί ένα σύστημα, όπου τα προϊόντα, τα υλικά και οι πόροι διατηρούνται στο φυσικό και οικονομικό σύστημα, όσο το δυνατόν περισσότερο. Αυτό περιλαμβάνει την ανασύνθεση προϊόντων και υλικών στο τέλος του κύκλου της ζωής τους, αντί της απλής απόρριψης [8].

Εικόνα1.2Σχηματική απεικόνιση του μοντέλου της κυκλικής οικονομίας[9]

Στην πράξη, αυτό σημαίνει την αναβάθμιση της σχέσης των προϊόντων με τα υλικά, την εστίαση της προσοχής στην σχεδίαση προϊόντων που είναι εύκολα ανακυκλώσιμα ή επισκευάσιμα, και την επιβεβαίωση ότι τα υλικά παραμένουν σε κύκλο καινοτομίας και χρησιμοποιούνται ξανά και ξανά. Αυτό μπορεί να συμβάλει στη μείωση των αποβλήτων, στην εξοικονόμηση πόρων και στη μείωση της επιβάρυνσης του περιβάλλοντος. Γίνεται δηλαδή λόγος για "recycling" και "up-cycling" έναντι του "down-cycling" όπου η επαναχρησιμοποίηση των υλικών είναι περιορισμένη.

Η κυκλική οικονομία απαιτεί συνεργασία μεταξύ επιχειρήσεων και κυβερνήσεων για την ανάπτυξη νομοθεσιών και πολιτικών που θα προωθήσουν την ανακύκλωση και την επαναχρησιμοποίηση υλικών [10] [8].



Εικόνα1.3Ιεράρχηση μεθόδων διαχείρισης των αποβλήτων [11]

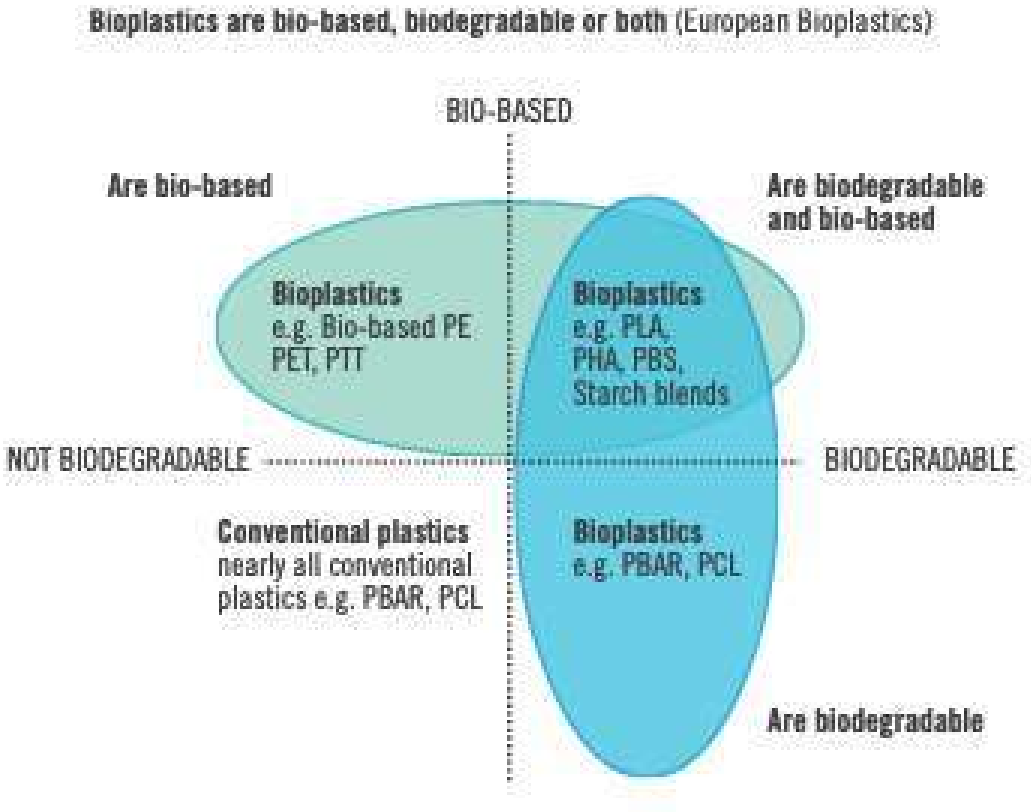
2. ΒΙΟΠΛΑΣΤΙΚΑ

Τα βιοπλαστικά είναι συμπολυμερή, προϊόντα βιολογικής διεργασίας, και αντιπροσωπεύουν επί του παρόντος το 0,5% της παγκόσμιας παραγωγής πλαστικών η οποία

εκτιμάται να αυξηθεί από 2.182kt το 2023 σε 7.432kt έως το 2028, καθώς υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον για τη χρήση της βιομάζας ως πρώτη ύλη [18].

Τα βιοπλαστικά έχουν την ικανότητα αποσύνθεσης από μικροοργανισμούς και χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες [12].

Υπάρχουν πλαστικά που είναι βιολογικής ή μερικώς βιολογικής προέλευσης και δεν βιοαποδομούνται , όπως το πολυαιθυλένιο (Bio-PE) και το τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο (Bio-PET) βιολογικής βάσης. Επιπλέον, υπάρχουν βιοδιασπώμενα πλαστικά, όπως τα πολυγαλακτικά οξέα (PLA), τα πολυυδροξυαλκανοϊκά (PHA) και το πολυβουτυλένιο (PBS), σε αυτή την κατηγορία ανήκουν και τα βιοπλαστικά που θα μελετηθούν σε αυτήν την εργασία. Τέλος, υπάρχουν και πλαστικά από συμβατικούς ορυκτούς πόρους και είναι επίσης βιοδιασπώμενα, όπως η πολυκαπρολακτόνη (PCL) [12]. Στο παρακάτω διάγραμμα φαίνονται οι κατηγορίες σχηματικά.



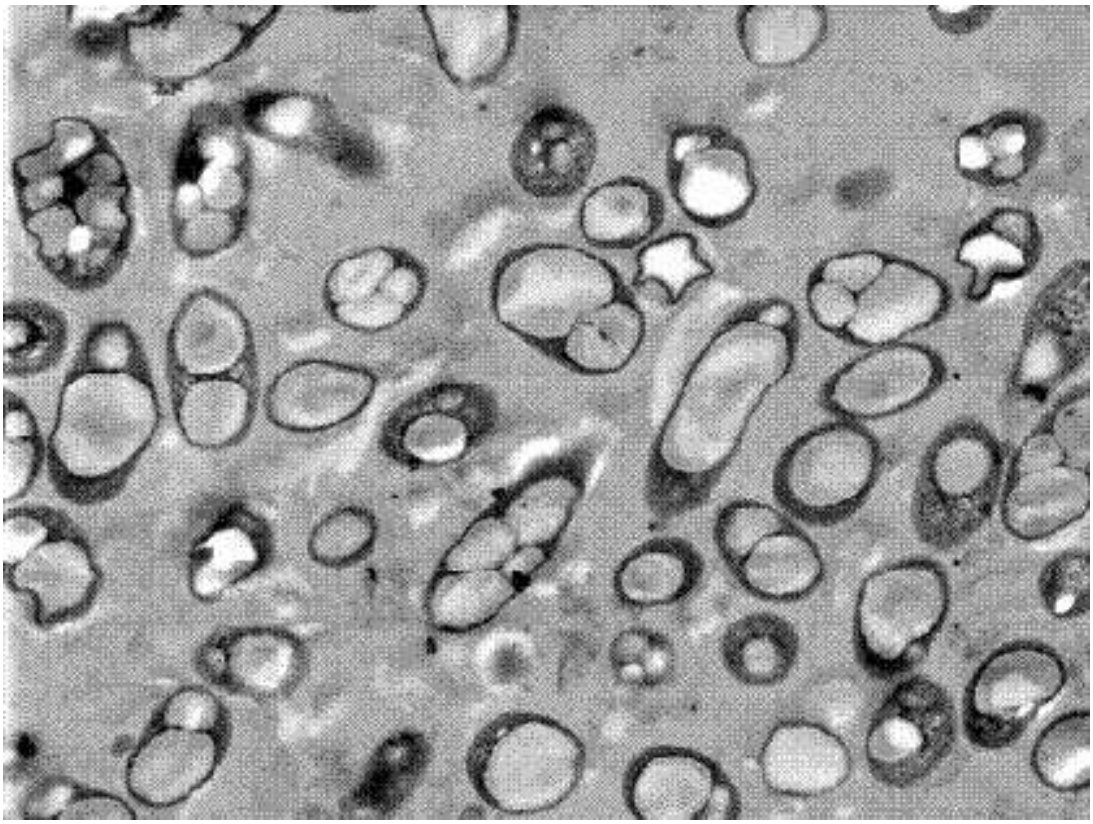
Εικόνα1.4Κατηγοριοποίηση πλαστικών με βάση την προέλευση τους και την βιοαποδομησιμότητα [13]

Ανάλογα με την προέλευσή τους τα βιοπλαστικά μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε εκείνα που προέρχονται απευθείας από βιομάζα, βιοπλαστικά που προέρχονται από φυσικούς ή γενετικά τροποποιημένους μικροοργανισμούς, αυτά που παράγονται από βιο-βασιζόμενα μονομερή ή πετροχημικά προϊόντα και συνδυασμός των παραπάνω [24].

2.1ΠΟΛΥΥΔΡΟΞΥΑΛΚΑΝΟΪΚΑ (Polyhydroxyalkanoates,PHAs)

Τα Πολυυδροξυαλκανοϊκά (Polyhydroxyalkanoates, PHAs) είναι βιοαποδομήσιμοι πολυεστέρες που συντίθενται από μικροοργανισμούς. Οι πολυεστέρες συσσωρεύονται σε μορφή κόκκων μέσα στα κύτταρα. Τα PHAs είναι βιοπλαστικά, εστέρες βιολογικής προέλευσης από φυτά, ζώα και βακτήρια δηλαδή, με φυσικοχημικές ιδιότητες παρόμοιες με αυτές των συμβατικών πλαστικών [16]. Για παράδειγμα, οι βιοπολυεστέρες παρουσιάζουν παρόμοιες ιδιότητες με αυτές των πολυβινυλοχλωριδίων και πολυστυρολίων(pvc και ps) [15].

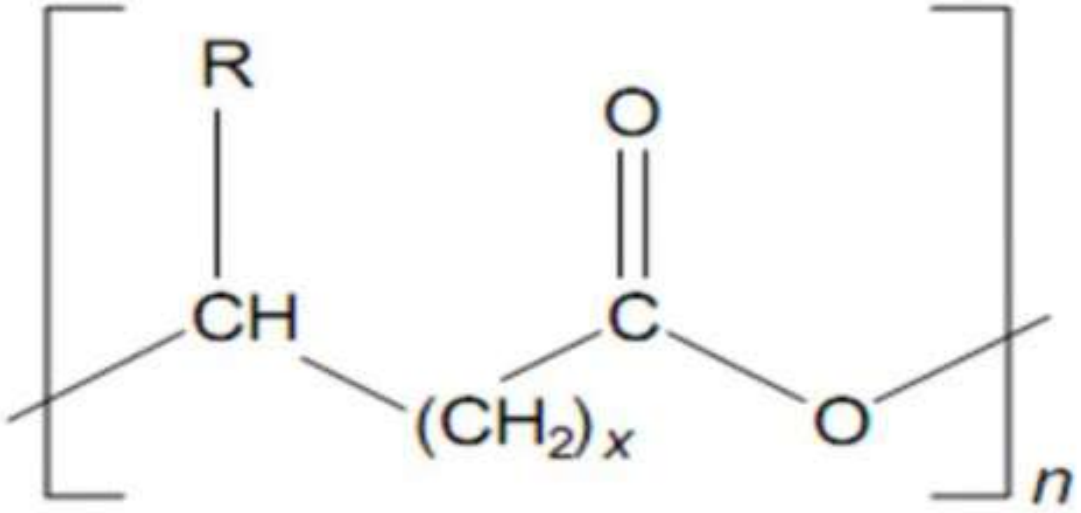
Ανάλογα με την πηγή άνθρακα που καταναλώνουν διακρίνονται σε κατηγορίες οι οποίες, όπως θα αναλυθούν και παρακάτω, ορίζουν τον πολυμερισμό ή συμπολυμερισμό των μονομερών που παράγονται και συνθέτουν το τελικό προϊόν (π.χ. PHB) [15]. Υπάρχουν 250 τύποι φυσικών παραγώγων PHAs [17].Είναι μια καλή εναλλακτική επιλογή έναντι των πετροχημικών υλικών, τα οποία αποτελούν το 50% των πλαστικών που μπορούν να αντικατασταθούν [16].Τα βακτήρια είναι η μόνη πηγή PHAsμε υψηλό μοριακό βάρος που είναι ένδειξη της ποιότητας τους [18]. Η καλλιέργεια της παρούσας εργασίας είναι μικτή, ωστόσο πολλές έρευνες έχουν εστιάσει στην μελέτη καθαρών καλλιεργειών διαφόρων βακτηρίων για την παραγωγή PHAs.



Εικόνα1.5Εικόνα PHAs από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο [19]

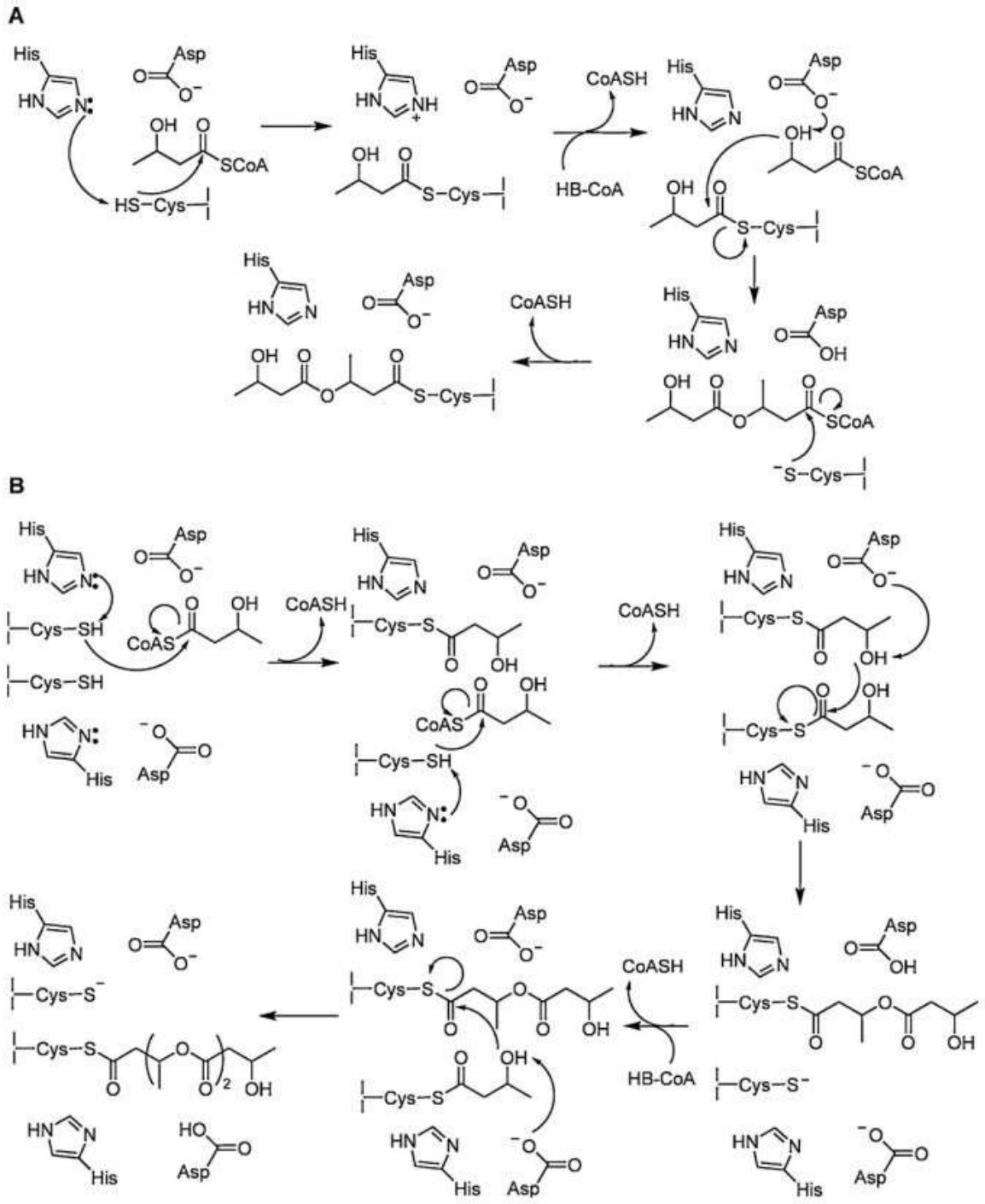
Έρευνα γίνεται σε πολλά στελέχη με διαφορετικές τροφοδοσίες (διαφορετικά σάκχαρα, οξέα, αναλογία C/N στην σύσταση της τροφοδοσίας) ώστε να οριστούν οι ιδανικές συνθήκες για τη μεγαλύτερη απόδοση παραγωγής PHAs. Υπάρχουν πολλές κατηγορίες παραγωγής βιοπλαστικών και συγκεκριμένα PHAs. Για παράδειγμα, καλή κατηγορία βακτηρίων για την παραγωγή βιοπλαστικών είναι τα marinebacteria, αλλά είναι κακή κατηγορία για PHAs [17].

2.1.1 Δομή Πολύ-υδροξυαλκανοϊκών



Εικόνα1.6ΓενικόςχημικόςτύποςPHAs [22]

Τα PHAs αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες μονομερείς δομικές μονάδες οι οποίες συνδέονται με εστερικό δεσμό. Η συνηθέστερη μορφή τους είναι αυτή όπου η υδροξυ-ομάδα βρίσκεται στο τρίτο άτομο άνθρακα, οπότε και προκύπτουν τα 3 – πολύ – υδροξυαλκανοϊκά. Ανάλογα τις πλευρικές αλυσίδες R (δηλαδή διαφορετικές δομικές μονάδες) παράγονται και διαφορετικά PHAs [20]. Η μονάδα έχει μια ομάδα R πλευρικής αλυσίδας, δηλαδή κορεσμένη αλκυλομάδα ή ακόρεστεςαλκυλομάδες, υποκατεστημένες αλκυλομάδες και διακλαδισμένες αλκυλομάδες [21].



Εικόνα1.7 Μηχανισμός παραγωγής PHAs [38]

Τα πολυυδροξυαλκανοϊκά μπορούν να καταταχθούν σε δύο ομάδες, βάσει του αριθμού των ατόμων άνθρακα που έχουν τα μονομερή τους. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει πολυμερή μικρής ανθρακικής αλυσίδας (scl-PHAs), με πλευρικές ομάδες από ένα έως τρία άτομα άνθρακα. Για παράδειγμα: πολυ (3-υδροξυβαλερικό) (PHV),πολυ (3-

υδροξυβουτυρικό) (PHB) παράγονται από το Cupriavidusnecator. Τα PHA μικρού μήκους αλυσίδας είναι πολύ άκαμπτα και εύθραυστα και δεν έχουν τις ανώτερες μηχανικές ιδιότητες που απαιτούνται για εφαρμογές βιοϊατρικής και φιλμ συσκευασίας [23]. Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει πολυμερή μεσαίας αλυσίδας (mcl-PHAs), με πλευρικές ομάδες που έχουν από τρία έως δεκατέσσερα άτομα άνθρακα. Για παράδειγμα: πολύ (3-υδροξυοκτανοϊκό) (PHO) παράγεται από την Pseudomonasmendocina. Τα PHA μεσαίου μήκους αλυσίδας είναι ελαστομερή, αλλά έχουν πολύ χαμηλή μηχανική δύναμη που περιορίζει την εφαρμογή αυτών των PHA [24]. Τέλος, τα μακρού μήκους αλυσίδας PHA περιέχουν μονομερή δομικά στοιχεία με 15 άνθρακες ή περισσότερους από 15 άνθρακες. Για παράδειγμα: το πολυ (3-υδροξυπενταδεκανοϊκό)παράγεται από Pseudomonasaeruginosa. Αυτός ο διαχωρισμός οφείλεται στην εξειδίκευση του ενζύμου PHA-συνθεσάση, το οποίο καταλύει τη βιοσύνθεση των PHAs ενσωματώνοντας υδροξυ-οξέα συγκεκριμένου μήκους άνθρακα στην αλυσίδα του πολυμερούς [20].

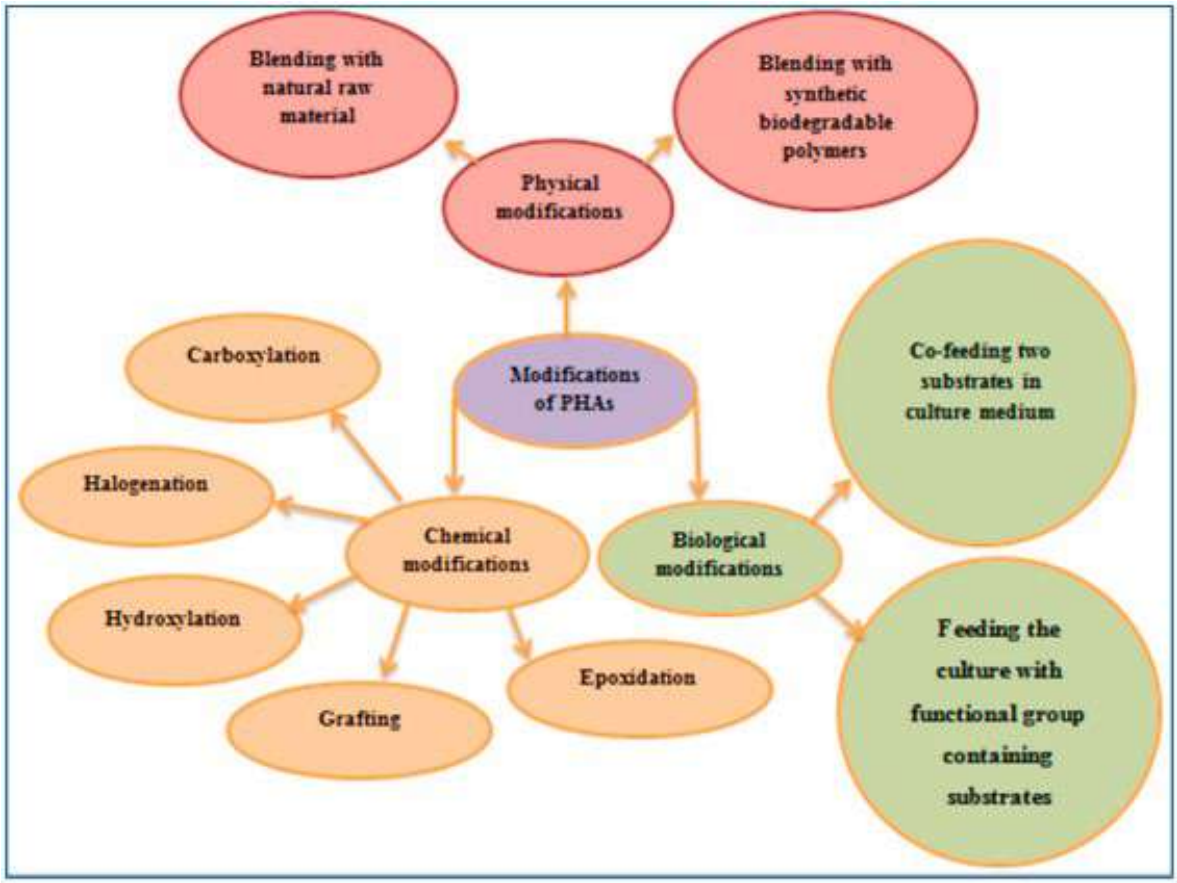
Επιπλέον, τα PHAs μπορούν να διακριθούν ανάλογα με τη σύνθεσή τους σε ομοπολυμερή, που περιέχουν μόνο έναν τύπο μονομερούς υδροξυ-οξέων, και σε συμπολυμερή, που περιέχουν διαφορετικούς τύπους μονομερών υδροξυ-οξέων. Η παραγωγή ομοπολυμερών και συμπολυμερών ΠΥΑ εξαρτάται από το βακτηριακό είδος, τις συνθήκες ανάπτυξης και την πηγή άνθρακα [20].

2.1.2 Ιδιότητες Πολύ-υδροξυαλκανοϊκών

Τα PHAs κερδίζουν όλο και περισσότερο το ενδιαφέρον των ερευνητών, λόγω των ιδιοτήτων τους όπως η βιοδιασπασιμότητα, η βιοσυμβατικότητα, η υδροφοβικότητα και άλλα.Επίσης, γίνεται μεγάλη έρευνα για την βελτίωση τυχόν μειονεκτημάτων τους σε σύγκριση με συνθετικά πολυμερή, ώστε να αυξηθεί η δυνατότητα αξιοποίησής τους σε διάφορες εφαρμογές και τομείς της βιομηχανίας. Αποτελούν πολύτιμα και φιλικά προς το περιβάλλον βιοπολυμερή, γεγονός ιδιαιτέρως σημαντικό καθώς τα πλαστικά έχουν γίνει ένα πολύ σημαντικό μέρος της ανθρώπινης ζωής, λόγω των χρήσιμων ιδιοτήτων τους, όπως αντοχή, ελαφρύ βάρος, ευελιξία κλπ., αλλά οι μη αποικοδομήσιμες και μη αναλώσιμες ιδιότητες του πλαστικού έχουν οδηγήσει σε οικολογικά θέματα, που δημιουργούν προβληματισμούς για την ευρεία χρήση τους. Το πλαστικό διαρκεί στο περιβάλλον με αποτέλεσμα την συσσώρευσή του και επομένως την ρύπανση του φυσικού περιβάλλοντος, αλλά και προβλήματα στην ανθρώπινη υγεία και σε άλλους ζωντανούς οργανισμούς[21].

Τα PHA έγιναν πρόσφατα αντικείμενο προσοχής λόγω των διαφόρων πλεονεκτικών ιδιοτήτων τους όπως η εύκολη επεξεργασία, η καλή αντοχή στις ακτίνες UV, η αδιαλυτότητα στο νερό κλπ. Τα χαρακτηριστικά αυτά τα καθιστούν άξια να αντικαταστήσουν μη-βιοαποδομήσιμα υλικά όπως το τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο. Παρά τις υψηλές δυνατότητές τους για εμπορικές εφαρμογές, τα περισσότερα βιοϋλικά με βάση το PHA αντιμετωπίζουν πολλά ερευνητικά κενά, ειδικά μικρής κρυσταλλικής αλυσίδας PHA με υψηλότερες μονομερείς συνθέσεις 3-υδροξυβουτυρικού οξέος όπως το πολύ (3-υδροξυβουτυρικό)

(PHB).Είναι εξαιρετικά υδρόφοβα, παρουσιάζουν χαμηλή θερμοκρασία παραμόρφωσης και κακές ιδιότητες φραγμού αερίων, με αποτέλεσμα την αργή αποικοδόμηση τους. Για να ξεπεραστούν τέτοια προβλήματα τα βιοπλαστικά τροποποιούνται χημικά ή φυσικά. Για παράδειγμα: χημικά τροποποιημένο PHA με φολικό οξύ θα μπορούσε να λειτουργήσει αποτελεσματικά ως φορέας αντικαρκινικών φαρμάκων. Ορισμένες φυσικές ιδιότητες του PHA περιλαμβάνουν την αδιαλυτότητά τους σε νερό, την καλή αντοχή στις ακτίνες UV, την ακαμψία και τον υψηλό βαθμό πολυμερισμού. Ηβιοδιασπασιμότητα και η θερμοπλαστική είναι όμοιες με αυτές τωνυλικών πετροχημικής προέλευσης [21].



Εικόνα1.8 Μέθοδοι τροποποίησης PHAs [21]

Η δομή ενός PHA μπορεί να αλλοιωθεί φυσικά, χημικά ή βιολογικά για την παραγωγή ενός νέου τροποποιημένου πολυμερούς με προβλέψιμες διακυμάνσεις στις λειτουργίες και το μοριακό του βάρος. Αυτού του είδους οι τροποποιήσεις μπορεί να αλλοιώσουν τις μηχανικές του ιδιότητες, τον αμφίφιλο χαρακτήρα του, την επιφανειακή δομή και το ρυθμό αποικοδόμησής του, για την κάλυψη των απαιτήσεων για τις συγκεκριμένες εφαρμογές του σε πολλούς διαφορετικούς τομείς. Για παράδειγμα: Ο ρυθμός υδρόλυσης του PHA μπορεί να τροποποιηθεί, για να γίνει σχετικά ταχύτερος με

την ενσωμάτωση μιας πιο επιρρεπούς στην υδρόλυση χημικής ουσίας στην πολυμερική ραχοκοκαλιά ρυθμίζοντας έτσι την αντιδραστικότητα του εστερικού δεσμού [21].

2.1.3 Εφαρμογές Πολύ-υδροξυαλκανοϊκών

Η πληθώρα βιοπλαστικών (150 διαφορετικά είδη), καθώς και οι προαναφερθείσες ιδιότητες τους, όπως η βιοαποικοδομήσιμη φύση τους, η σταθερότητα σε υψηλές θερμοκρασίες, ο χαμηλός βαθμός πορώδους επιφάνειας, η ενισχυμένη σκληρότητα,ελαστικότητα και άλλα, συνεπάγονται τη χρήση τους σε διάφορες εφαρμογές [21].

Τα PHAs σε ιατρικές εφαρμογές χρησιμοποιούνται αντί συνθετικών, καθώς έχουν παρόμοιες ιδιότητες, όπως βιοδιασπασιμότητα, βιοσυμβατότητα και μη τοξικότητα. Έτσι τα καθιστούν επιθυμητά υλικά για βιοϊατρικές εφαρμογές. Παραδείγματα εφαρμογών αναγράφονται παρακάτω [21].

Για την χορήγηση φαρμάκων, τα PHAs λόγω της προέλευσής τους από φυσικές πηγές χρησιμοποιούνται ως πρώτη ύλη για την παραγωγή δισκίων, νανοσωματιδίων κλπ. Για παράδειγμα: PHB, PHVB και τα συμπολυμερή τους χρησιμοποιούνται για την παρασκευή αντιβιοτικών [21]. Λόγω της πλευρικής τους αλυσίδας, που καθορίζει τις θερμικές και φυσικές ιδιότητες, η απελευθέρωση του φαρμάκου από το πολυμερικό υλικό συμβαίνει μέσω μηχανισμού ώσμωσης, διάχυσης ή βιοαποδόμησης, όπως και στα φυσικά πολυμερή [25]. Μια επιπλέον σημαντική ιδιότητα των ΠΥΑ είναι η δυνατότητά τους να ενισχύουν τον πολλαπλασιασμό και την προσκόλληση των κυττάρων. Τα αντιφλεγμονώδη φάρμακα, όπως η δικλοφενάκη και η δεξαμεθαζόνη, όταν ενθυλακώνονται στα ΠΥΑ, επιταχύνουν τη διαδικασία επούλωσης των πληγών [25]. Επίσης, χρησιμοποιούνται για την μηχανική παραγωγή ιστών. Το PHA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή ικριωμάτων που προάγουν την ανάπτυξη των κυττάρων που έχουν υψηλότερη μηχανική αντοχή. Είναι διαθέσιμα σε διάφορες μορφές, όπως καρφίτσες, μεμβράνες, ράμματα κ.λπ. Για παράδειγμα, χρησιμοποιούνται τρισδιάστατα ικριώματα που αναπτύχθηκαν με χρήση νανοϊνών PHA για επισκευή χόνδρων. Συχνή είναι επίσης και η χρήση των PHAs για επιδέσμους με την βοήθεια πτητικών διαλυμάτων τους. Αυτά τα υλικά σχηματίζουν μια λεπτή μεμβράνη πάνω από την πληγή για την πρόληψη μόλυνσης. Υπάρχουν πολλές άλλες ιατρικές εφαρμογές αυτών των πολυμερών που περιλαμβάνουν αναγεννήσεις μαλακών ιστών, αποκατάσταση νεύρων, καρδιαγγειακές θεραπείες κ.λπ. [21].

Παραδείγματα εντοπίζονται και σε γεωργικές εφαρμογές. Το PHA βελτιώνει τις θρεπτικές ιδιότητες και τη διάρκεια ζωής των φυτών σε συνθήκες στρες. Μία από τις εξειδικευμένες εφαρμογές του P(3HB) στη γεωργία είναι η ελεγχόμενη απελευθέρωση φυτοφαρμάκων και εντομοκτόνων. Οι πιθανές εφαρμογές του PHA στη γεωργία περιλαμβάνουν: βιοδιασπώμενα πλαστικά φιλμ για φυτοπροστασία, ενθυλάκωση σπόρων, ενθυλάκωση λιπασμάτων κ.λπ. [21].Επίσης, στη θερμοκρασία και

σταθεροποίηση του εδάφους, στη διατήρηση της υγρασίας και στη χρήση καλλιεργητικών μέσων βοηθούν οι σάκοι καλλιέργειας. Η χρήση μη βιοαποδομήσιμων σάκων έχει πλέον απαγορευτεί, με αποτέλεσμα το πολυαιθυλένιο χαμηλής πυκνότητας (LDPE) να αποτελεί μια φιλική προς το περιβάλλον εναλλακτική λύση. Τα ΠΥΑ είναι κατάλληλα για την κατασκευή τέτοιων προϊόντων, καθώς τα ΠΥΑ μεσαίας αλυσίδας παρουσιάζουν χαρακτηριστικά παρόμοια με το LDPE. Άλλη γεωργική εφαρμογή μπορεί να θεωρηθεί η παραγωγή βιολιπασμάτων [25].

Στην αγορά, τα PHAsλόγω των ιδιοτήτων τους έχουν πολλές εφαρμογές. Τα βιοπλαστικά PHA διαθέτουν ιδιότητες που τα καθιστούν κατάλληλα υποκατάστατα για πολλές από τις εφαρμογές που εξυπηρετούνται σήμερα από πλαστικά με πετρέλαιο, παρέχοντας έτσι τεράστιες δυνατότητες στην αγορά. Η ευελιξία των PHA έχει ως αποτέλεσμα τις ευρείες εφαρμογές τους στην αγορά. Οι κύριες χρήσεις του PHA εμφανίζονται στις συσκευασίες και στις υπηρεσίες τροφίμων λόγω της αποικοδομήσιμης φύσης, της μη διαλυτότητας, της μη διαπερατής φύσης και της ευκαμψίας τους. Τα PHA αναπτύσσονται ως μεμβράνες συσκευασίας κυρίως για χρήση ως τσάντες αγορών, χάρτινες επικαλύψεις, κύπελλα, πάνες, μοκέτες κ.λπ. Πολλά προϊόντα είναι πλέον διαθέσιμα με τη μορφή κουτιών με επικάλυψη PHA, χαρτιού, σεντονιών, σανίδων κ.λπ. [21].

Τα πολυυδροξυαλκανοϊκά (ΠΥΑ) μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοκαύσιμα μέσω μιας διαδικασίας μεθυλεστεροποίησης. Οι υδροξυαλκανοϊκοί εστέρες που προκύπτουν είναι παρόμοιοι με τους μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων μακράς αλυσίδας που υπάρχουν στο βιοντίζελ, και έτσι μπορούν να χρησιμεύσουν και ως πρόσθετα καυσίμων. Όταν τα ΠΥΑ μικρής και μεγάλης αλυσίδας εστεροποιούνται με μεθανόλη, παράγονται υδροξυβουτυρικοίμεθυλεστέρες (HBME) και υδροξυαλκανοϊκοίμεθυλεστέρες (HAME) [28]. Η θερμιδική αξία των καυσίμων αξιολογείται με βάση τη θερμότητα καύσης, με το HBME να έχει θερμότητα καύσης 20 kJ/gr, ενώ το HAME φτάνει τα 30 kJ/gr. Επίσης, βρέθηκε ότι όταν το HBME αναμειγνύεται με αιθανόλη, η θερμότητα καύσης της αιθανόλης μπορεί να αυξηθεί έως και 30%. Ωστόσο, η θερμότητα καύσης μειώνεται όταν το HBME αναμειγνύεται με βενζίνη ή ντίζελ. Η παραγωγή βιοκαυσίμων από ΠΥΑ είναι πολλά υποσχόμενη, καθώς δεν απαιτεί τη χρήση ΠΥΑ υψηλής καθαρότητας, γεγονός που μειώνει το κόστος παραγωγής. Επιπλέον, δεδομένου ότι τα ΠΥΑ μπορούν να παραχθούν από αστικά ή βιομηχανικά λύματα, δεν ανταγωνίζονται με τις ανθρώπινες ή ζωικές πηγές τροφίμων, ενώ ταυτόχρονα επιτυγχάνεται τόσο η παραγωγή ενέργειας όσο και η επεξεργασία των λυμάτων [26].

2.1.4Βιοσύνθεση PHAs

Ο καταλυτικός μηχανισμός για την παραγωγή πολυυδροξυαλκανοϊκών (PHA) από μικροοργανισμούς περιλαμβάνει διάφορα μονοπάτια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια αυτών των μικροοργανισμών, όπως η γλυκόλυση και η β-οξείδωση.

Συνολικά, στα βακτήρια, υπάρχουν τρία φυσικά βιοσυνθετικά μονοπάτια για την παραγωγή PHA.

Στο πρώτο μονοπάτι, δύο μόρια ακετυλο-CoA (προερχόμενα από τον κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος) συμπυκνώνονται σε ένα μόριο ακετοακετυλο-CoA με τη βοήθεια του ενζύμου β-κετοθειολάσης. Στη συνέχεια, το ακετοακετυλο-CoA μετατρέπεται σε 3-υδροξυβουτυρικό-CoA από το ένζυμο NADPH-ακετοακετυλο-CoAαναγωγάση. Τέλος, η σύνθεση PHA καταλύει το σχηματισμό εστέρα στο 3-υδροξυβουτυρικό-CoA για την παραγωγή του πολυ(3HB).

Το δεύτερο μονοπάτι χρησιμοποιεί υποστρώματα που προέρχονται από τη β-οξείδωση των λιπαρών οξέων, τα οποία είναι κατάλληλη πηγή άνθρακα για την παραγωγή PHA. Ο μεταβολισμός των λιπαρών οξέων δημιουργεί διάφορα υδροξυαλκανοϊκά μονομερή μέσω της δράσης των ενζύμων (R)-ενοϋλ-CoAυδρτάσης, ακυλο-CoAοξειδάσης και 3-κετοακυλο-CoA αναγωγάσης. Τελικά, η σύνθεση PHA καταλύει τον πολυμερισμό αυτών των υδροξυαλκανοϊκών μονομερών.

Το τρίτο μονοπάτι αξιοποιεί απλές και φθηνές πηγές άνθρακα, όπως γλυκόζη, σακχαρόζη και λακτόζη, που λαμβάνονται από περιβαλλοντικές πηγές όπως λύματα, ενεργοποιημένη ιλύ, ζωικά λίπη και υδρογονάνθρακες. Αυτές οι πηγές μετατρέπονται σε (R)-υδροξυακυλικές ενδιάμεσες μορφές μέσω της ακυλικής πρωτεΐνης φορέα τους και έπειτα σε μορφές Co-A με τη δράση της τρανσακετυλάσηςακυλ-ACP-CoA. Τέλος, τα υδροξυαλκανοϊκά μονομερή πολυμερίζονται με τη δράση της PHA πολυμεράσης [21].

2.1.5Ιστορική αναδρομή

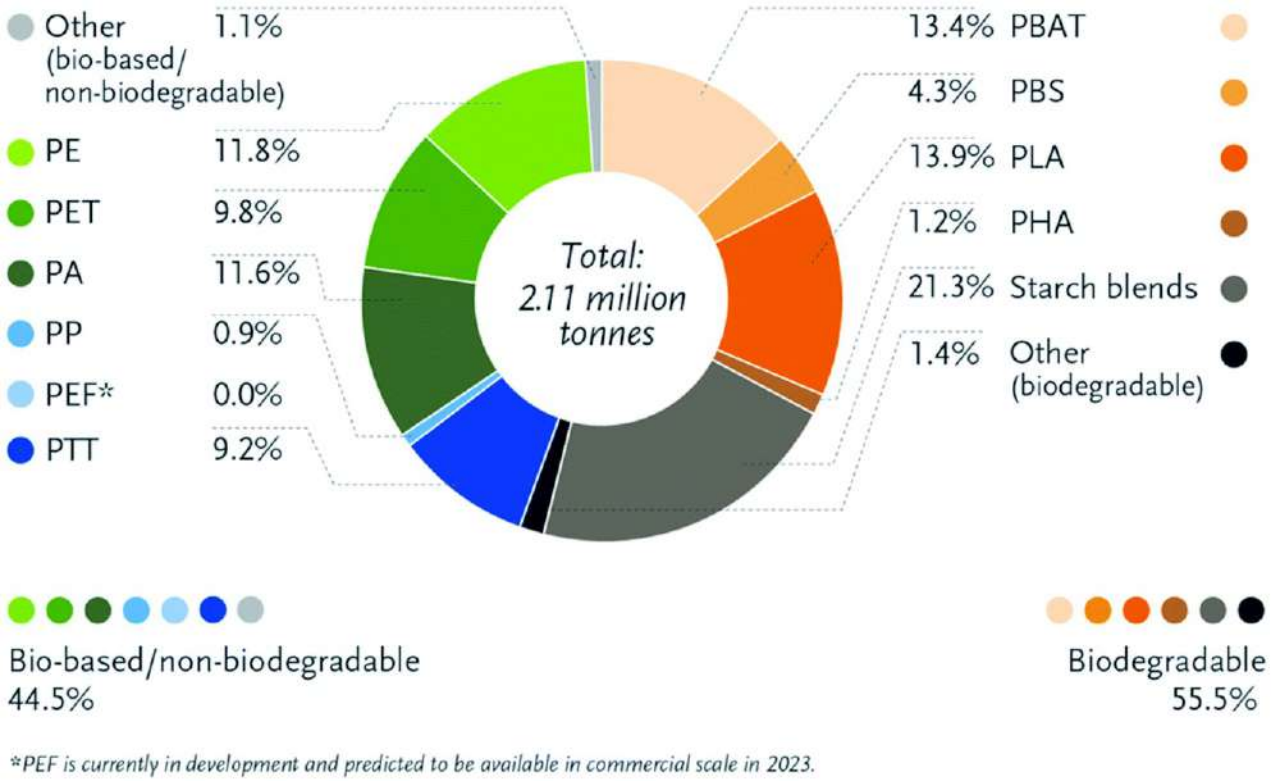
Ιστορικά, η πρώτη παρατήρηση της ανάπτυξης αυτών των κυττάρων έγινε σε απιονισμένο νερό από τον Lemoinge το 1926. Παρατηρήθηκε μια πτώση του δείκτη pH στο μείγμα η οποία οφειλόταν προφανώς στην παραγωγή κάποιου οξέος. Το οξύ που αναγνωρίστηκε ήταν το β – υδροξυβουτυρικό, οξύ που εντοπίζεται σε ούρα διαβητικών ασθενών. Σήμερα το β – υδροξυβουτυρικό αντικαθιστά το πολυπροπυλένιο και το προλυαιθυλένιο [18].

2.2ΠΑΡΑΓΩΓΗ – ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ PHAs

Οι πολυεστέρες συσσωρεύονται ενδοκυτταρικά ως πηγή άνθρακα και ενέργειας. Για την παραγωγή PHAs επιλέγονται για τα βακτήρια συνθήκες στρες από περιορισμό ενός βασικού θρεπτικού συστατικού (π.χ. άζωτο, άνθρακα). Για την ανάπτυξη, αναπαραγωγή και αποθήκευση ενέργειας τα βακτήρια καταναλώνουν θρεπτικά συστατικά (C, N, P, O κλπ.) τα οποία προέρχονται από σάκχαρα (π.χ. γλυκόζη) ή πτητικά λιπαρά οξέα (π.χ. βουτιρικό οξύ, προπανικό οξύ, οξικό οξύ) ή αλκαλικά οξέα με 8-12 άτομα C. Γενικά όσο μεγαλύτερες αλυσίδες λιπαρών οξέων χρησιμοποιούνται τόσο μεγαλύτερη παραγωγή PHAs (π.χ. επταϊκό,

οκταϊκό οξύ). Πέρα από VFAs καταναλώνονται και άλλα υποστρώματα άνθρακα όπως αλκοόλες [16].Τα βακτήρια όταν βρίσκονται σε συνθήκες έλλειψης κάποιου βασικού θρεπτικού συστατικού χρησιμοποιούν έναν εστέρα ώστε να αποθηκεύσουν ενέργεια. Το μονομερές αυτό είναι όμοιο (με κοινές ιδιότητες) με αυτό που δομεί το πολυμερές από το οποίο παράγεται το συμβατικό πλαστικό. Τα PHAs φτάνουν το 80% της μάζας του κυττάρου[15].Η παραγωγή βιοπλαστικώνενισχύεται με εμβόλιο βακτηρίων που εμπλουτίζουν την καλλιέργεια, δηλαδή τροποποίηση της μικτής καλλιέργειας με βακτήρια υψηλής χωρητικότητας αποθήκευσης PHAs.Διαφορετικά στελέχη μικροοργανισμών μετατρέπουν σε PHAs διαφορετικά είδη πηγών άνθρακα.

Τα βακτήρια και η συγκεκριμένη τροφοδοσία επιλέγονται βάσει συγκεκριμένων παραγόντων. Επιλέγονται βακτήρια που συσσωρεύουν PHAs όταν η ανάπτυξη κυττάρων γίνεται με περιορισμό αζώτου και περίσσια άνθρακα. Ουσιαστικά, τα βακτήρια χρησιμοποιούν τα προϊόντα της πέψης τους όταν εξαντλούνται τα θρεπτικά συστατικά του μέσου (υπόστρωμα). Οι αποθήκες άνθρακα χρησιμοποιούνται για την σύνθεση απαραίτητων κυτταρικών συστατικών σε συνθήκες ανάπτυξης.



Εικόνα1.9Παραγωγή βιοπλαστικών ανά τύπο υλικού παγκοσμίως το 2019 [27]

Στην παραγωγή επιλέγονται μικτές καλλιέργειες καθώς είναι οικονομικότερες και έχουν μεγαλύτερες αποδόσεις. Οι μικτές καλλιέργειες έχουν καλύτερη κατανάλωση VFAs. Στις καλλιέργειες χρησιμοποιείται ενεργοποιημένη λάσπη από αερόβια δεξαμενή βιολογικού

καθαρισμού λυμάτων. Η συνθήκες στρες δημιουργούνται με περιορισμό άνθρακα ή αζώτου σε κυκλική διαδικασία. Ο εναλλάξ περιορισμός επιτρέπει την επιβίωση των χρήσιμων βακτηρίων αντί των ετερότροφων ανταγωνιστών μετά από κάποιους κύκλους. Δηλαδή, επιβιώνουν μόνο τα χρήσιμα βακτήρια, ικανά να παράγουν βιοπλαστικά [18].Για την παραγωγή απαιτείται τροφοδοσία με υψηλό οργανικό φορτίο, δηλαδή να περιέχει πρωτεΐνες και λιπίδια με υψηλή αναλογία C/N πολυσακχαρίτες κλπ).Μετά από αναλύσεις διαπιστώθηκε πως η σύσταση της υγρής φάσης των οργανικών αποβλήτων έχει σύνθεση η οποία ικανοποιεί τις απαιτήσεις των βακτηρίων. Έτσι δοκιμάστηκε η παραγωγή βιοπλαστικών με εμβόλιο από λύματα και τροφοδοσία οργανικών αποβλήτων.

Οι παράγωγοι φυσικών βιολαστικών ταξινομούνται σύμφωνα με τον μηχανισμό συσσώρευσης. Απαιτείται περιορισμός θρεπτικών συστατικών (πχ άζωτο, φώσφορο και οξυγόνο) αλλά για την σύνθεση βιοπλαστικών απαιτείται περίσσεια άνθρακα στους μικροοργανισμούς που μελετώνται στην παρούσα εργασία. Οι καθαρές (ανόθευτες) καλλιέργειες χωρίζονται σε δύο κατηγορίες ανάπτυξης. Στον πρώτο κύκλο γίνεται η ανάπτυξη των μικροοργανισμών και δεν απαιτείται περιορισμός θρεπτικών συστατικών. Στον δεύτερο κύκλο γίνεται η συσσώρευση των PHAs και απαιτείται έλλειψη αζώτου (ή άλλου θρεπτικού συστατικού) [17].

Σε συνθήκες απουσίας αζώτου κάθε βαρυτική αύξηση της βιομάζας υποδεικνύει την αύξηση της ενδοκυτταρικής αποθήκευσης του προϊόντος και όχι ανάπτυξη των βακτηρίων [16]. Υπάρχουν πολλοί παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή. Ενδεικτικά αναφέρονται το pH, ο χρόνος κράτησης λάσπης (SRT), ο ρυθμός οργανικής φόρτισης (OLR), η αναλογία C/N, η θερμοκρασία (T), η εναλλαγή αερόβιας και αναερόβιας συνθήκης κλπ. Όσων αφορά το τελευταίο, οι κύκλοι εναλλάσσονται και διαρκούν 23 ώρες συνεχούς αερισμού και 1 ώρα καθίζησης (συμπεριλαμβανομένου του χρόνου απόσυρσης του υπερκείμενου υγρού για αλλαγή τροφοδοσίας). Κάθε τροφοδοσία γίνεται στην έναρξη του κύκλου και η καταλληλότερη διάρκεια κύκλου είναι 72 ώρες. Αναλυτικότερα θα γίνει περιγραφή της διαδικασίας στο πειραματικό μέρος που ακολουθεί.

Παρατηρείται, στα πλαίσια της έρευνας της παραγωγής βιοπλαστικών, πως με την εφαρμογή φυσικού αποβλήτου δίνει ακόμα καλύτερα αποτελέσματα σε σύγκριση με το συνθετικό απόβλητο, που προσομοιάζει την σύσταση του φυσικού, καθώς σε πολλές περιπτώσεις η συσσώρευση αυξήθηκε αλλά παράλληλα βελτιώθηκε και η ποιότητα του βιοπλαστικού (περισσότερα PHB) [28]. Τα συμπολυμερή που βρέθηκαν είχαν δομή κοντινότερη σε αυτή των συμβατικών πλαστικών με αποτέλεσμα οι ιδιότητές τους να είναι παρόμοιες με αυτές των κοινών πλαστικών, γεγονός επιθυμητό, καθώς καθιστά εύκολη την αντικατάστασή τους στην αγορά. Αυτή η παρατήρηση ενδέχεται να εκδηλώνει μια μετατροπή στον μεταβολισμό των βακτηρίων λόγω της αλλαγής της τροφοδοσίας.

Αντιθέτως, η έλλειψη οξυγόνου, για παράδειγμα, αποτελεί αστάθμητο παράγοντα για την παραγωγή PHAs καθώς εξαρτάται από τις συνθήκες και τους πολιτισμούς που συνθέτουν την καλλιέργεια, αν και συνήθως τις επηρεάζει αρνητικά [16],[28]. Σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου οι μικροοργα-νισμοί καταναλώνουν το υπόστρωμα προς παραγωγή ενέργειας

μέσω οξειδωτικής αποδόμησής του, επομένως μέσω άλλης μεταβολικής διαδρομής η οποία δεν ευνοεί την παραγωγή βιοπλαστικών. Σε τέτοιες συνθήκες τα κύτταρα έχουν μεγαλύτερες απαιτήσεις σε άνθρακα και, αν και η συσσώρευση είναι μεγαλύτερη, η συνολική παραγωγή μειώνεται (λίγα βακτήρια επιβιώνουν),ενώ παράλληλα η παραγωγή είναι πιο αργή [18].Έτσι προτιμάται ο περιορισμός μόνο άνθρακα και αζώτου εναλλάξ σε κάθε κύκλο της διαδικασίας, καθώς το ενδεχόμενο ταυτόχρονου περιορισμού αζώτου οξυγόνου για παράδειγμα θα μείωνε τον ρυθμό παραγωγής PHAs [16].

2.2.1 Αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες

Για την παραγωγή PHAs εναλλάσσονται αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες, εμπλέκοντας δύο τύπους μικροοργανισμών που συσσωρεύουν πολυφωσφορικά άλατα και γλυκογόνο (PAOs και GAOs) με τη μορφή ΠΥΑ κατά την αναερόβια φάση [29]. Οι GAOs αξιοποιούν την ενέργεια από πολυφωσφορικά άλατα για να αποθηκεύουν εξωγενή υποστρώματα ως ΠΥΑ, επιτρέποντας έτσι την παραγωγή ενέργειας όταν δεν υπάρχει διαθέσιμος αποδέκτης ηλεκτρονίων, όπως το οξυγόνο ή τα νιτρικά. Αντί να εκκρίνουν τα προϊόντα ζύμωσης, τα αποθηκεύουν μέσα στα κύτταρα τους. Στην αερόβια φάση, οι μικροοργανισμοί καταναλώνουν τα αποθηκευμένα ΠΥΑ, χρησιμοποιώντας το οξυγόνο που είναι διαθέσιμο. Τα ΠΥΑ υδρολύονται και το ακετυλο-CoA που προκύπτει χρησιμοποιείται στον κύκλο TCA για ανάπτυξη και παραγωγή ενέργειας [30]. Αυτό σημαίνει ότι η συσσώρευση γλυκογόνου ή πολυφωσφορικών περιορίζει την ικανότητα παραγωγής ΠΥΑ. Αν και η μέγιστη αναφερθείσα περιεκτικότητα σε ΠΥΑ είναι 20%, πρόσφατες μελέτες επικεντρώνονται στην παραγωγή τους σε εναλλασσόμενες συνθήκες χωρίς την εξάρτηση από γλυκογόνο και φωσφορικά. Μέσω αυτών των πειραμάτων, επιτυγχάνονται ποσοστά ΠΥΑ έως και 60%, αλλά απαιτείται περαιτέρω έρευνα [29].

2.2.2 Μεταβολικοί οδοί

Ανάλογα την πηγή άνθρακα, οι μεταβολικοί οδοί που συμμετέχουν στην βιοσύνθεση των βιοπλαστικών ποικίλουν. Υπάρχουν τρείς μεταβολικοί οδοί προς παραγωγή βιοπλαστικών [31], [32].

Η πρώτη οδός μεταβολίζει σάκχαρα όπως γλυκόζη και παράγονται ομοπολυμερή [31]. Μέσω τριών ενζυμικώνκαταλυόμενων αντιδράσεων προκύπτει η παραγωγή προϊόντων με συνηθέστερο το P(3HB). 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. Το R-3-υδροξυβουτυλο-CoA ενσωματώνεται στη μακριά γραμμική πολυεστερική αλυσίδα του P(3HB) [33].

Στην δεύτερη οδό μεταβολίζονται πτητικά λιπαρά οξέα όπως το προπιονικό οξύ και παράγονται συμπολυμερή. Αυτή η μεταβολική οδός είναι η αποδοτικότερη σε PHAs καθώς

τα πτητικά λιπαρά οξέα αποτελούν το καταλληλότερο υπόστρωμα [32]. Τα λιπαρά οξέα οξειδώνονται σε ενοϋλ- CoA, (S)-3-υδροξυακυλ-CoA και (R)-3-κετοακυλ-CoA, μετατρέπονται σε (R)-3- υδροξυακυλο-CoA, και τέλος καταλύγουν στην αλυσίδα [34].

Η τρίτη μεταβολική οδός, όπως και η πρώτη, μεταβολίζει σάκχαρα, ωστόσο προϊόντα της διαδικασίας είναισυμπολυμερή [31], [32]. Από τα σάκχαρα παράγεται μηλονυλο-ακυλο φορέα πρωτεΐνης. Τα ενδιάμεσα ακυλ-ACP και μηλονυλ-ACP μετασχηματίζονται σε (R)-3-υδροξυακυλ-ACP και σε (R)-3-υδροξυακυλ-CoA, όπου και ενσωματώνονται στην αλυσίδα [34].

Με τον περιορισμό ή την περίσσεια συστατικών οι μεταβολικές οδοί προσαρμόζονται στη συσσώρευσηPHAs ή την ανάπτυξη της καλλιέργειας αντίστοιχα [35]. Κατά τον 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. Ο μεταβολισμός των ΠΥΑ ονομάζεται «κύκλος ΠΥΑ» καθώς αυτές οι δύο διαδικασίες συμβαίνουν ταυτόχρονα [33].

2.2.3 Καθαρές καλλιέργειες

Τα πολυυδροξυαλκανοϊκά (ΠΥΑ) μπορούν να παραχθούν μέσω καθαρών καλλιεργειών. Υπάρχουν δύο κατηγορίες μικροοργανισμών που συσσωρεύουν ΠΥΑ, ανάλογα με τις συνθήκες καλλιέργειας. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει μικροοργανισμούς που απαιτούν την έλλειψη κάποιου θρεπτικού συστατικού, για να συσσωρεύσουν ΠΥΑ, ενώ η δεύτερη δεν απαιτεί τέτοιους περιορισμούς [36]. Στην παρούσα διπλωματική εργασία, μελετώνται οι ΠΥΑ που παράγονται από την πρώτη κατηγορία.

Η πιο απλή μέθοδος παραγωγής περιλαμβάνει δύο στάδια, το πρώτο στάδιο, όπου εισάγεται εμβόλιο βακτηρίων σε στείρο διάλυμα θρεπτικών ιχνοστοιχείων και μετάλλων, με κατάλληλη πηγή άνθρακα και τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά, και πραγματοποιείται η φάση ανάπτυξης και το δεύτερο στάδιο, στο οποίο περιορίζεται ένα θρεπτικό συστατικό, όπως το άζωτο ή ο φωσφόρος ή ο άνθρακας, για να επιτευχθεί η συσσώρευση των ΠΥΑ [29].

Οι διεργασίες με καθαρές καλλιέργειες εφαρμόζονται σε βιομηχανική κλίμακα. Η χρήση υποστρωμάτων υψηλής καθαρότητας είναι απαραίτητη για την επιτυχία των καθαρών καλλιεργειών, κάτι που αποτελεί το μεγαλύτερο μειονέκτημα καθώς αυξάνει σημαντικά το κόστος παραγωγής, το οποίο μπορεί να φτάσει έως και το 45% του συνολικού κόστους. Το τελικό προϊόν εξαρτάται από την πηγή άνθρακα που χρησιμοποιείται και τον μικροοργανισμό που επιλέγεται. Οι μικροοργανισμοί από υπεραλμυρά περιβάλλοντα παρουσιάζουν ιδιαίτερα καλά χαρακτηριστικά, μειώνοντας το κόστος παραγωγής. Επιπλέον, χρησιμοποιούνται τεχνικές μεταβολικής μηχανικής για την ενίσχυση των κλασικών στελεχών [29].

2.2.4 Μικτές καλλιέργειες

Μικτή καλλιέργεια αποτελεί το σύνολο των διαφορετικών μικροοργανισμών που αναπτύσσονται στο ίδιο μέσο καλλιέργειας όπου αναπτύσσονται συμβιωτικές σχέσεις. Στην βιομηχανία η χρήση τους αυξάνεται καθώς κύριο προτέρημα τους αποτελεί η μείωση του κόστους λόγω της απουσίας αποστειρωμένων συνθηκών, οι οποίες είναι κοστοβόρες. Οι καλλιέργειες αυτές έχουν επιπλέον πλεονέκτημα για την βιομηχανία την ικανότητα κατανάλωσης διαφόρων πηγών άνθρακα που επιτρέπει την αξιοποίηση των αποβλήτων για αυτόν τον σκοπό. Ορισμένες φορές απαιτείται, βέβαια, ο εμπλουτισμός της τροφοδοσίας με επιπλέον θρεπτικά συστατικά [29]. Βέβαια, η συσσώρευση των PHAs στις μικτές καλλιέργειες είναι μικρότερη, ενώ παράλληλα, και η πυκνότητα των κυττάρων είναι χαμηλότερησε σύγκριση με τις καθαρές καλλιέργειες. Η παραγωγικότητα όμως είναι όμοια, έως και 1,2 gPHA/L/h, καθώς και οι υψηλές αποδόσεις ΠΥΑ έως και 0,8 molPHA /mol υποστρώματος [37]. Στην περίπτωση των μικτών καλλιεργειώνενθαρρύνεται η παραγωγή συμπολυμερών λόγω των διαφορετικών μονοπατιών που ακολουθεί κάθε μικροοργανισμός για την παραγωγή των PHAs [38].

Στις μικτές καλλιέργειες ένα σύνολο μικροοργανισμών υποβάλλεται σε μία συγκεκριμένη συνθήκη τόσο του περιβάλλοντος, όσο και της τροφής τους. Όπως προαναφέρθηκε, η παραγωγή PHAs αποτελείται από το στάδιο της ανάπτυξης των μικροοργανισμών και το στάδιο συσσώρευσης PHAs με τον περιορισμό κάποιου συγκεκριμένου θρεπτικού συστατικού. Κατά αυτόν τον τρόπο, από το σύνολο των μικροοργανισμών επιβιώνουν μόνο τα χρήσιμα βακτήρια, τα οποία είναι ικανά να προσαρμοστούν στις συνθήκες, αλλάζοντας τον μεταβολισμό τους, και να παράξουν το απαιτούμενο προϊόν. Τα υπόλοιπα απομακρύνονται στο τέλος κάθε κύκλου τροφοδοσίας [39].

Μια σύγχρονη μέθοδο για τις μικτές καλλιέργειες αποτελεί η Αερόβια Δυναμική Σίτιση (ADF) στην οποία εναλλάσσονται κυκλικά συνθήκες επαρκούς και μη επαρκούς παροχής κάποιου θρεπτικού συστατικού (άνθρακα) [29]. Η διαδικασία περιλαμβάνει τρία στάδια. Αρχικά, η παραγωγή πρώτης ύλης εμπλουτισμένης με άμεσα βιοαποδομήσιμες οργανικές ουσίες με μεθόδους προεπεξεργασίας. Η διαδικασία αυτή δεν είναι απαραίτητη σε περίπτωση όπου το απόβλητο ήδη περιέχει τις οργανικές ενώσεις που απαιτούνται. Έπειτα, ακολουθεί ο εμπλουτισμός της ΜΜΚ με στελέχη υψηλής παραγωγικότητας και συσσώρευσης ΠΥΑ. Τελευταίο στάδιο αποτελεί η συσσώρευση των PHAs [39]. Ανάλογα τα λιπαρά πτητικά οξέα που εμπεριέχουν τα απόβλητα της τροφοδοσίας (συνήθως οι μικτές καλλιέργειες καταναλώνουν ευκολότερα οξικό, προπιονικό, βουτυρικό, καπροϊκό και βαλερικό) παράγονται συγκεκριμένα μονομερή όπως το 3-υδροξυβαλερικό (3HV), το 3-υδροξυ-2-μεθυλοβουτυρικό (3H2MB), το 3-υδροξυ- 2-μεθυλοβαλερικό (3H2MV) και το 3-υδροξυεξανοϊκό (3-HHx) [38]. Τα πτητικά λιπαρά οξέα πλεονεκτούν από μεταβολική άποψη συγκριτικά με τη γλυκόζη, καθώς η πλήρης οξείδωσή τους παράγει περισσότερη ισοδύναμη χημική ενέργεια [38]. Επιπλέον, σημαντικό να αναφερθεί είναι και το ότι διαφορετικά είδη

μικροοργανισμών έχουν διαφορετική ικανότητά στο να καταβολίζουν συγκεκριμένα υποστρώματα. Για παράδειγμα το γένος Paracoccus είχε καταβολίσει ευκολότερα μείγματα που περιέχουν σε μεγαλύτερο ποσοστό οξικό ή βουτυρικό οξύ. Ενώ, το γένος Thauerακαταβολίζει ευκολότερα προπιονικό οξύ [39].

2.2.5 Παράμετροι επιρροής της συσσώρευσης

Οι παράγοντές που επηρεάζουν την συσσώρευση PHAs αφορούν τόσο το περιβάλλον ανάπτυξης των μικροοργανισμών, όσο και την πηγή άνθρακα και γενικότερα την σύσταση της τροφοδοσίας των βακτηρίων.

Αρχικά, έχει παρατηρηθεί ότι ο ρυθμός παραγωγής PHB μειώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας και αυτό οφείλεται στην αύξηση του αναβολικού ρυθμού [42]. Όσον αφορά στο pH, για το στάδιο ανάπτυξης οι επιθυμητές τιμές είναι 5,9 έως 9,0 ενώ στην συσσώρευση οι επιθυμητές τιμές κυμαίνονται από7,5 έως 8,5 [39].

Για τον παράγοντα περιορισμού θρεπτικού συστατικού, παρατηρείται πως όσο η συγκέντρωση τους (άζωτο, φώσφορος, κλπ.) είναι επαρκής, επιτυγχάνεται το στάδιο της ανάπτυξης, ενώ κατά τον περιορισμό τους η μεταβολική οδός συνεπάγεται την παραγωγή PHAs σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό. Ο βαθμός περιορισμού του θρεπτικού συστατικού εξαρτάται από το υπόστρωμα και τα βακτήρια που απαρτίζουν την καλλιέργεια, καθώς σε διαφορετικό βαθμό περιορισμού επιτυγχάνει το κάθε στέλεχος την μέγιστη συσσώρευση εντός του μικροοργανισμού. Η συσσώρευση επιτυγχάνεται καθώς με την έλλειψη θρεπτικών συστατικών η ανάπτυξη των κυττάρων είναι αδύνατη ευνοώντας έτσι την παραγωγή PHAs. 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. Σημαντικό ρόλο για την απόδοση παίζει η αναλογία αζώτου και άνθρακα στην τροφοδοσία της καλλιέργειας [39].

Υπάρχουν τρεις μέθοδοι περιορισμού, η ασύζευκτη και η συζευγμένη παροχή C και N και η εκτεταμένη καλλιέργεια. Στην πρώτη περίπτωση ο περιορισμός αζώτου και άνθρακα γίνεται ταυτόχρονα ενώ στην δεύτερη γίνεται εναλλάξ και κυκλικά. Δηλαδή η τροφοδοσία της βιομάζας εναλλάξ παρουσιάζει απουσία άνθρακα και αζώτου. Με την πρώτη μέθοδο η συσσώρευση είναι χαμηλή ενώ με την δεύτερη επιτυγχάνονται υψηλές αποδόσεις συσσώρευσης κατά το στάδιο της απουσίας του άνθρακα λόγω υψηλού ρυθμού οργανικής φόρτωσης. Στην Τρίτη μέθοδο η παροχή άνθρακα και αζώτου γίνεται εναλλάξ με μεγάλη διάρκεια φάσεων. Η παροχή άνθρακα πραγματοποιείται στη φάση της επάρκειας, ενώ η παροχή αζώτου στη φάση του περιορισμού.Κύριο προτέρημα της μεθόδου είναι όχι μόνο η μεγάλη συσσώρευση αλλά και η πυκνή κυτταρική μάζα [40].

Σαν πηγή άνθρακα προτιμώνται τροφοδοσίες που καταναλώνονται εύκολα από τα βακτήρια της καλλιέργειας, με απλή αντί για περίπλοκη δομή [41]. Σημαντικό ρόλο έχει και το σύνολο των ουσιών που εμπεριέχονται στην τροφοδοσία, καθώς με αυτόν τον τρόπο καθορίζονται τα τελικά βιοπλαστικά που παράγονται [42]. Η περιπλοκότητα των δομών

ορίζει και τον απαιτούμενο χρόνο παραμονής της τροφοδοσίας σε συστήματα συνεχούς λειτουργίας, καθώς οι απλές δομές απαιτούν μικρότερο χρόνο παραμονής στον αντιδραστήρα (OLR, ρυθμός οργανικής φόρτωσης). Τέλος, τα στάδια περίσσειας τροφοδοσίας και περιορισμού ορίζονται και από την συγκέντρωση του άνθρακα καθώς σε περίπτωση μεγάλης συγκέντρωσης ο χρόνος κατανάλωσης του υποστρώματος αυξάνεται, περιορίζοντας έτσι τον χρόνο συσσώρευσης του βιοπλαστικού [40].

Έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές προσπάθειες για τη μεγιστοποίηση της παραγωγής ΠΥΑ. Γίνονται δοκιμές γενετικά τροποποιημένων βακτηρίων σε αναζήτηση ευκολότερων μεταβολικών οδών. Σκοπός είναι η βελτιστοποίηση της μορφολογίας των κυττάρων.Παράλληλα, η μεταβολική μηχανική εφαρμόζεται για τη βελτίωση των παραμέτρων καλλιέργειας. Έχει χρησιμοποιηθεί για την βελτίωση της ποιότητας και της ποσότητας των ΠΥΑ. 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 phaZ όπως αναφέρεται παραπάνω [39].

2.3ΣΥΜΠΑΡΑΓΩΓΗ

Συχνά, στα πλαίσια παραγωγής ακόμα περισσότερων προϊόντων προστιθέμενης αξίας επιλέγεται η συμπαραγωγή αγαθών από αξιοποίηση παραπροϊόντων ή αστικών αποβλήτων. Με την παραγωγή, λοιπόν, βιοπλαστικών προτιμάται η παράλληλη παραγωγή άλλων προϊόντων όπως βιοκαυσίμων, ενέργειας κλπ.

Παράδειγμα αποτελεί η συμπαραγωγή βιουδρογόνου και βιοπολυμερών. Σε μια τέτοια διαδικασία, το απόβλητο περνάει από αναερόβιο αντιδραστήρα όπου λαμβάνεται το υδρογόνο (α προϊόν) και ξεχωρίζονται τα πτητικά λιπαρά του αποβλήτου τα οποία χρησιμοποιούνται για την τροφοδοσία αερόβιου αντιδραστήρα όπου γίνεται η παραγωγή PHAs (β προϊόν) με προσφορά και περιορισμό αζώτου (φάση ανάπτυξης και φάση συσσώρευσης) σε κύκλο. Από τα VFAs που παράχθηκαν κυρίως καταναλώθηκε το βουτυρικό οξύ επομένως το πολυυδροξυαλκανοικό που συσσωρεύτηκε ήταν το πολυυδροξυβουτυρικό. Με αυτόν τον τρόπο όχι μόνο επιτυγχάνεται η παραγωγή δυο προϊόντων προστιθέμενης αξίας αλλά παράλληλα μειώνεται ακόμα περισσότερο το οργανικό φορτίο των αποβλήτων που εναποθέτεται τελικά στο περιβάλλον και διευκολύνεται η βιοαποικοδόμησή του μειώνοντας τον όγκο των αποβλήτων. Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα Pseudomonas. Σημαντικό παράγοντα για την συμπαραγωγή αποτελεί η σύσταση και τα χαρακτηριστικά των αποβλήτων [15].Γενικά η συμπαραγωγή υδρογόνου και βιοπλαστικού είναι πολλά υποσχόμενη ιδέα [15].

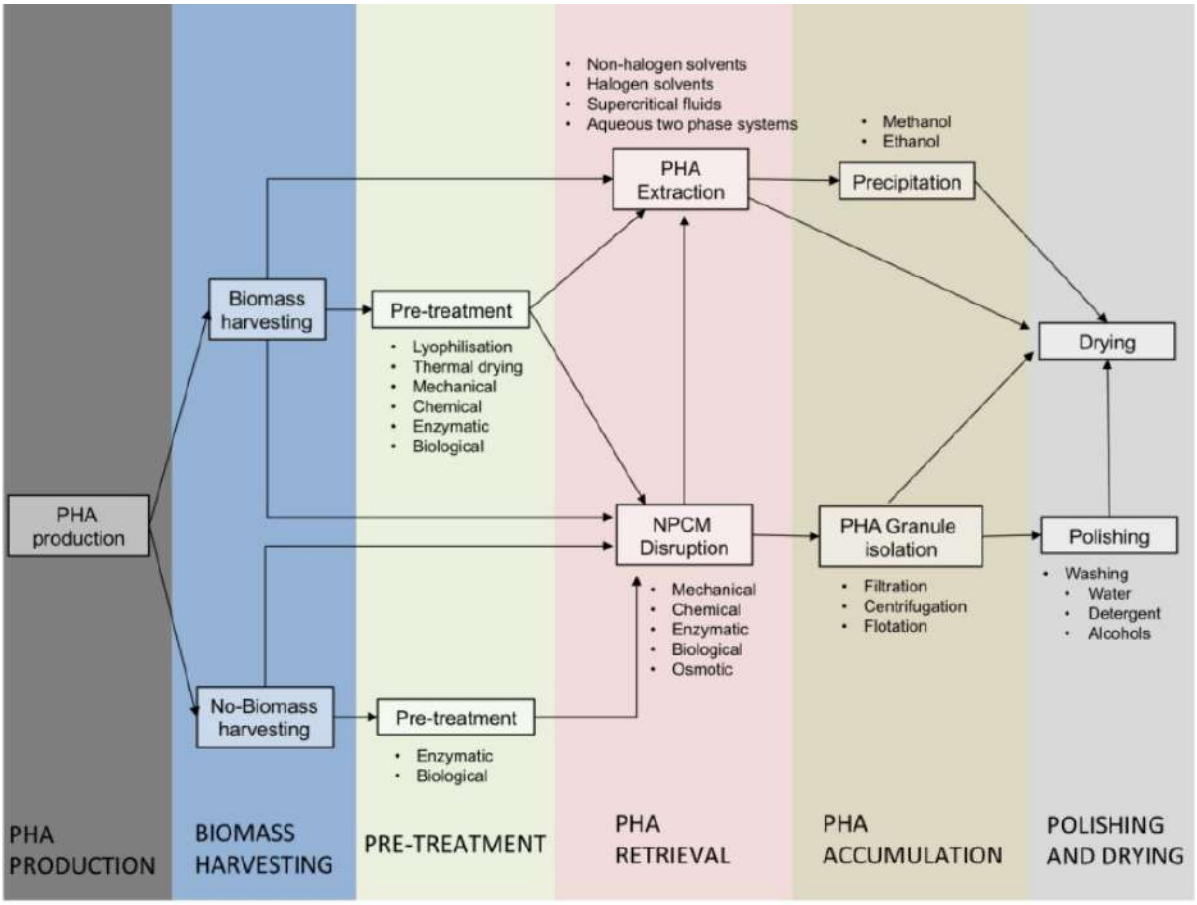
2.4ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ ΒΙΟΠΛΑΣΤΙΚΟΥ ΑΠΟ ΤΟ ΣΥΝΟΛΟ ΤΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ/ ΑΝΑΚΤΗΣΗ ΑΠΟ ΚΟΚΚΟΥΣ

Μετά το τέλος κάθε κύκλου άνθρακα και αζώτου κρατείται δείγμα με σκοπό την μέτρηση του βιοπλαστικού. Σε αυτήν την φάση της διαδικασίας διαχωρίζεται ο εστέρας (έως και το 90% της συνολικής μάζας) από το υπόλοιπο βακτήριο.

Στην παρούσα εργασία επιλέγεται η μέθοδος της λυοφιλίωσης. Τα PHAs εκχυλίστηκαν από ξηρή βιομάζα με ζεστό τριχλωρομεθάνιο (χλωροφόρμιο). Μετά από αυτό το στάδιο πραγματοποιείται η διαδικασία της διήθησης με φίλτρο.Το διήθημα αποτελείται από χλωροφόρμιο και διηθημένο πολυμερές. Το πολυμερές ανακτάται σαν λεπτή μεμβράνη [15].

Υπάρχουν 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 επιλογή τη διαδικασίας εξαρτάται από την ευθραυστότητα των κυτταρικών τοιχωμάτων των βακτηρίων, την ποσότητα του παραγόμενου PHAs καθώς και την εφαρμογή για την οποία προορίζεται το παραγόμενο βιοπλαστικό (λόγω του απαιτούμενου βαθμού καθαρότητας) [37]. Στο παρακάτω σχήμα φαίνονται τα στάδια της διαδικασίας ανάκτησης βιοπλαστικού από κυτταρικούς κόκκους στα οποία συμπεριλαμβάνονται συνοπτικά η συλλογή βιομάζας, η προεπεξεργασία, η ανάκτηση PHAs, ο καθαρισμός και η ξήρανση των PHAs [29].

Η μέθοδος της χώνευσης αποσκοπεί στην απομάκρυνση του περιβάλλοντος των PHAs. Η χημική χώνευση πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας οξειδωτικές ουσίες όπως το υδροξείδιο του νατρίου και το υποχλωριώδες νάτριο ή οξέα όπως το θειικό οξύ. Το περιβάλλον γίνεται υδατοδιαλυτό ενώ το βιοπλασιτκό παραμένει στερεό, ωστόσο σημαντικό είναι να δοθεί προσοχή στην ποσότητα ώστε να μην καταστραφεί το επιθυμητό προϊόν. Η μέθοδος είναι οικονομική και η καθαρότητα του προϊόντος είναι υψηλή, ωστόσο χάνεται σημαντική ποσότητα βιοπλαστικού [37]. Η χώνευση μπορεί να πραγματοποιηθεί και με χρήση ενζύμων. Τα πλεονεκτήματα της ενζυμικής χώνευσης είναι οι χαμηλές ενεργειακές απαιτήσεις, και η ελάχιστη επένδυση κεφαλαίου. Ωστόσο, το κύριο μειονέκτημα για την εμπορική ανάπτυξη είναι το κόστος παραγωγής των ενζύμων [29].



Εικόνα1.10 Βήματα παραλαβείςPHAs [29]

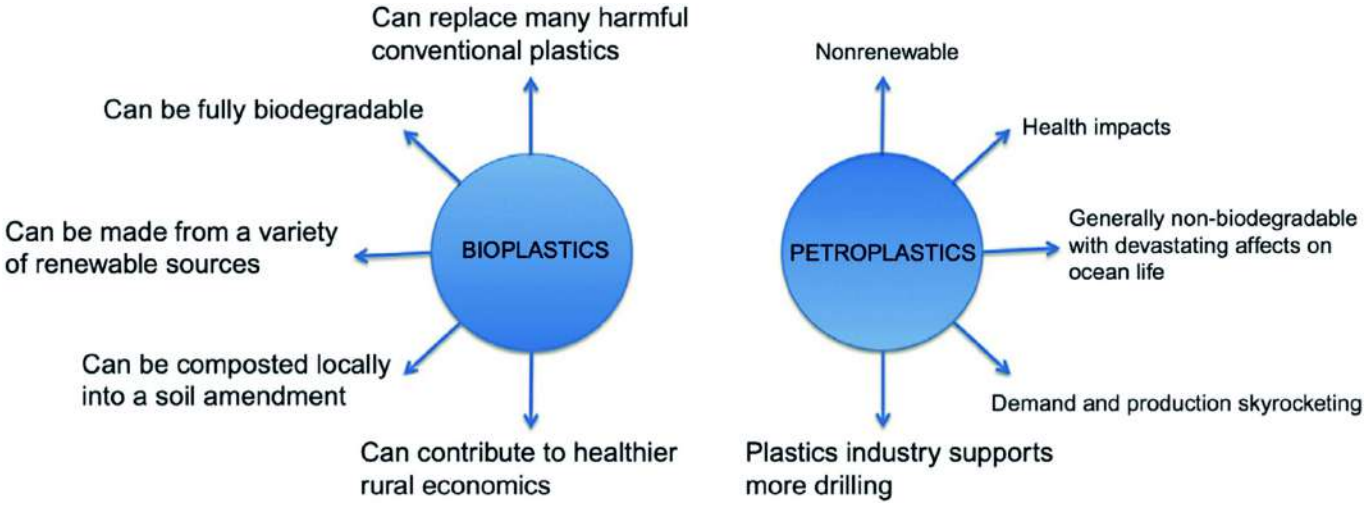
Η μέθοδος της εκχύλισης βασίζεται στην διαλυτότητα των PHAs σε οργανικούς διαλύτες (π.χ. χλωροφόρμιο, το οποίο χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα εργασία) καθώς καθιστούν την μεμβράνη του κυττάρου διαπερατή και συμπαρασύρουν τα PHAs με αποτέλεσμα την εκχύλιση τους. Η μέθοδος είναι αποδοτική με υψηλής καθαρότητας ανάκτηση PHAs [39]. Μειονέκτημα αποτελεί το κόστος της διαδικασίας καθώς τόσο η ενέργεια όσο και το κόστος των διαλυτών είναι υψηλό. Εναλλακτικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί κάποιος πράσινος διαλύτης, για να αποφευχθεί το μεγάλο οικολογικό αποτύπωμα των χλωριωμένων διαλυτών [37].

Η μηχανική διάλυση επιτυγχάνεται μέσω υψηλών πιέσεων και άλεσης. Είναι οι ορθολογικότερες, λόγω της απουσίας χημικής διεργασίας. Η εφαρμογή τους είναι περιορισμένη λόγω του κόστους εγκαταστάσεων [37].

2.5 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΒΙΟΠΛΑΣΤΙΚΩΝ

Η παραγωγή βιοπλαστικών συνεπάγεται πληθώρα πλεονεκτημάτων οικολογικής φύσεως. Τα βιοπλαστικά αντικαθιστούν εφαρμογές συμβατικού πλαστικού, όπως οι συσκευασίες

[18]. Έτσι μειώνεται αισθητά η κατανάλωση ενός μη ανανεώσιμου πόρου. Πέρα από τις παρόμοιες ιδιότητες που έχει το βιοπλαστικό με το συμβατικό πλαστικό παρουσιάζει και άλλα πλεονεκτήματα. 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 (CO_2, H_2O, CH_4) και βιομάζα υπό συνθήκες φυσικού περιβάλλοντος μετά τη χρήση. Τελικά, αυτές οι ουσίες ενσωματώνονται στο φυσικό οικοσύστημα χωρίς οικοτοξική επίδραση [6].



Εικόνα1.11Σύγκριση βιολαστικών και πέτρο-πλαστικών [27]

3. ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ ΕΞΕΛΙΞΗΣ ΣΕ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗ ΚΛΙΜΑΚΑ

Η χρήση των βιοπλαστικών αυξάνεται με την πάροδο των χρόνων. Βασική τροχοπέδη της διαδικασίας αποτελεί το υψηλό κόστος παραγωγής των βιοπλαστικών. Ανάλογα με τον σχεδιασμό της διαδικασίας προκύπτουν κοστοβόρες διεργασίες [16]. Για παράδειγμα, η εκχύλιση των πολυμερών απαιτεί μεγάλες ποσότητες ακριβών διαλυτών [18]. Αντιμετώπιση του προβλήματος αυτού αποτελεί η εφαρμογή μικτής καλλιέργειας με εκμετάλλευση οργανικών αστικών απόβλητων αντί συνθετικής τροφοδοσίας. Αυτές οι συνθήκες παραγωγής μπορούν να ρίξουν έως και 40% το κόστος παραγωγής [16]. Γενικά τα βιοπλαστικά αποτελούν ενδιαφέρουσα λύση για το περιβαλλοντικό πρόβλημα αρκεί να ρυθμιστούν οικονομικά εμπόδια όπως, για παράδειγμα, η μείωση του κόστους των πρώτων υλών με την αξιοποίηση οργανικών αποβλήτων ως υπόστρωμα της διαδικασίας παραγωγής τους [28].

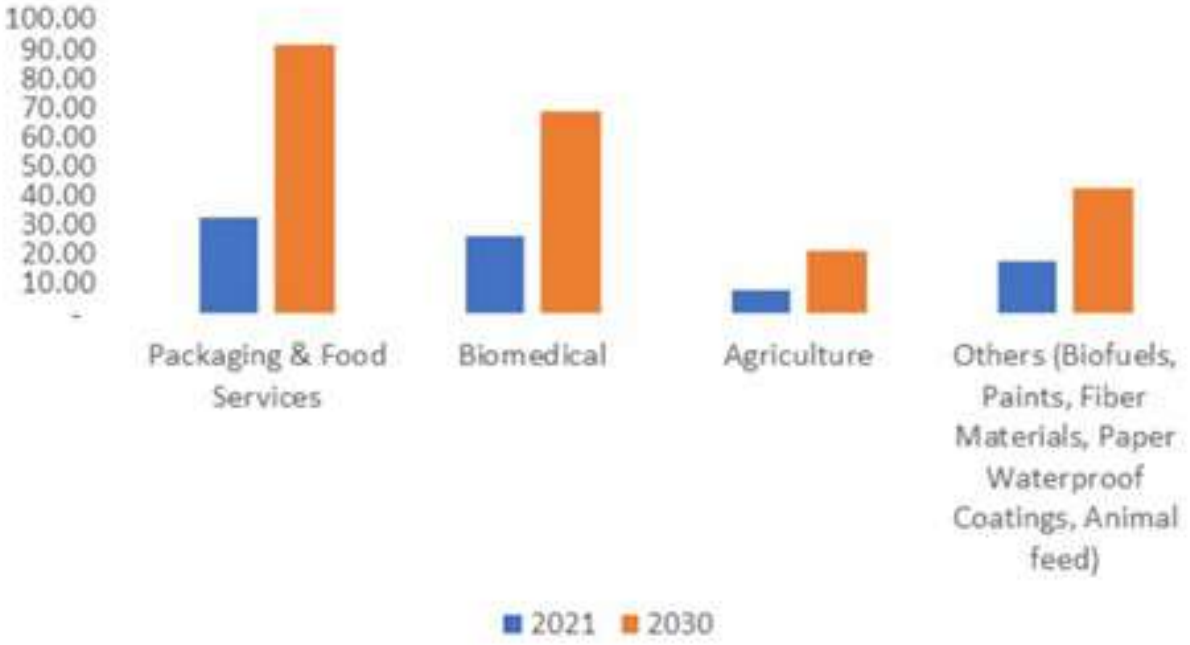
Πολλοί παράγοντες επηρεάζουν την παραγωγή αποβλήτων. Η διανομή, οι συνήθειες της αγοράς, το μοντέλο της παραγωγής είναι μόνο μερικοί από αυτούς. Στις ΗΠΑ απορρίπτεται το 40% των τροφίμων, που μεταφράζεται σε 218 δις$. Αυτή η

σπατάλη μπορεί επίσης να μεταφραστεί σε ενεργειακά σε 456.250 cal/κάτοικο, που αρκούν για να καλύψουν την διατροφή ενός ενήλικα άνδρα για 180 ημέρες. Στην Ευρώπη παράγονται 90εκ. τόνοι FW και το 38% από κλάδους παραγωγής τροφίμων. Η αξιοποίηση των τροφικών αποβλήτων μπορεί να αποτελεί κοστοβόρα διαδικασία ωστόσο η οικονομική αυτή διαφορά καλύπτεται αν αναλογιστεί κανείς τα πολλαπλά οικολογικά οφέλη, την παραγωγή των προϊόντων προστιθέμενης αξίας με ταυτόχρονη μείωση των απορριμμάτων και πρακτικότερα την βαριά φορολογία που επιβάλλεται στα κράτη της Ε.Ε. προς συμμόρφωσή τους για ένα πιο βιώσιμο μέλλον. Στην Γαλλία ήδη εφαρμόζεται ποινή σε αναξιοποίητα τροφικά απόβλητα που εκτιμάται να αποφέρει εξοικονόμηση 88εκ. τόνων FW που μεταφράζονται σε 167 δις €. Η αξιοποίησή τους εστιάζει στην παραγωγή ενέργειας και υλικών [17].

Για την παραγωγή βιοπλαστικών εφαρμόζονται μικτές καλλιέργειες βακτηρίων. Οι φυσικοί παραγωγοί είναι πολλοί αλλά εφαρμογή στο εμπόριο έχουν λίγα σχετικά βακτήρια. Μερικά από αυτά αποτελούν τα Alcaligeneslatus, Bacillusmegaterium, Pseudomonasoleovorans και Cupriavidusnecator. Τα C. necator είναι ευρέως διαδεδομένα στελέχη [17].

Όσον αφορά στην αναερόβια χώνευση, το 2015 μόνο το 5,3% των FW αξιοποιήθηκε κατ' αυτόν τον τρόπο. Τα βιοπλαστικά της διαδικασίας πρέπει βάσει νόμου να τηρούν τις προδιαγραφές διεθνών προτύπων (EN13432, EN14995 και ASTMD6400), ώστε να εξασφαλιστεί η ποιότητά τους και να επεκταθεί η παραγωγή τους. Η αγορά τους στην Γερμανία το 2021 ήταν τρείς φορές μεγαλύτερη από αυτήν του 2014 με συνολικά 5,8δις εσόδων. Τα περιθώρια επέκτασης είναι εκτενή, καθώς το 80% των πλαστικών μπορούν να αντικατασταθούν από βιοπλαστικά. Τα PHAs είναι μια σημαντική κατηγορία βιοπλαστικών καθώς οι ιδιότητες τους προσομοιάζουν ένα βιοδιασπώμενο καουτσούκ και αναμένεται η χρήση τους να τετραπλασιαστεί στα επόμενα 5 χρόνια.

Παρόλο που οι ενεργειακές απαιτήσεις της παραγωγής βιοπλαστικών είναι υψηλές, το περιβαλλοντικό αποτύπωμα είναι μικρότερο από εκείνο της παραγωγής συμβατικού πλαστικού καθώς υπάρχουν εναλλακτικοί τρόποι παραγωγής αυτής της ενέργειας και η συνολική εκπομπή CO2 είναι πολύ μικρότερη. Η αντικατάσταση των πλαστικών με εναλλακτικές λύσεις, θα αυξήσει τον κύκλο ζωής της ενέργειας αυτών των προϊόντων κατά περίπου 57% καθώς το 80% της απαιτούμενης ενέργειας της διαδικασίας παραγωγής πλαστικού που γενικότερα απαιτείται στο στάδιο της παραγωγής του [4]. Εναλλακτικές εφαρμογές των ΠΥΑ φαίνονται και στο παρακάτω ραβδόγραμμα, τόσο για τις μέχρι στιγμής εφαρμογές, όσο και προβλέψεις για τις εφαρμογές έως το 2030 [4].



Εικόνα1.12 ΠΥΑ ανά εφαρμογή πλαστικού για το 2021 και προβλέψεις για το 2030 [43]

4. ΤΡΟΦΙΚΑ ΑΠΟΒΛΗΤΑ

4.1 ΑΝΑΓΚΗ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Η αύξηση του πληθυσμού και η ταυτόχρονη οικονομικοκοινωνική ανάπτυξη συνεπάγονται την αύξηση των αστικών στερεών αποβλήτων (ΑΣΑ).Ο ρυθμός παραγωγής ΑΣΑ ξεπερνά πλέον τον ρυθμό της ίδιας της αστικοποίησης, έτσι είναι προφανής η ανάγκη μελέτης και ανακάλυψης μεθόδων μείωσης και διαχείρισης των αποβλήτων αυτών. Τα οικιακά ζυμώσιμα απόβλητα είναι αυτά που πρόκειται να αξιοποιηθούν στην παρούσα εργασία, αφού θα αποτελέσουν την πηγή άνθρακα για τις καλλιέργειες βακτηρίων που θα μελετηθούν, και αποτελούν το 30-50% των συνολικών ΑΣΑ[1].

Ετησίως χάνονται 1,3 δις. τόνοι τροφίμων παγκοσμίως που αντιστοιχούν στο 1/3 της παραγωγής. Η σπατάλη αυτή συνεπάγεται όχι μόνο την απώλεια πόρων, όπως νερό και εκμεταλλεύσιμο έδαφος, αλλά και ενέργεια και ανθρώπινη εργασία για την άσκοπη παραγωγή των αγαθών και την μεταγενέστερη διαχείρισή τους ως απόβλητα, καθώς ακόμη και τα οργανικά απόβλητα επιβαρύνουν τον πλανήτη με την ακατάλληλη απόρριψη τους. Σε αυτήν την γενική κατηγορία των οργανικών αποβλήτων συμπεριλαμβάνονται οικιακά, εμπορικά, γεωργικά και βιομηχανικά απόβλητα, ωστόσο στην παρούσα εργασία γίνεται μελέτη των αστικών μόνο αποβλήτων[17].

Οι συμβατικές μέθοδοι διαχείρισης των υπολειμμάτων τροφών (FW) περιλαμβάνουν υγειονομική ταφή και αποτέφρωση. Το 95% καταλήγει σε χωματερές αφήνοντας ανεκμετάλλευτο το υψηλό οργανικό φορτίο των FW και επιπλέον, επιβαρύνοντας το περιβάλλον με πληθώρα επιπτώσεων που θα αναλυθούν παρακάτω [1]. Ένας εναλλακτικός και καινοτόμος τρόπος σκέψης καθιστά τα απόβλητα αυτά μια χρήσιμη και αξιοποιήσιμη πρώτη ύλη επιτυγχάνοντας τρεις βασικούς στόχους, την μείωση του όγκου και της έντασης των ρύπων, την εκπομπή ρύπων κατά την διεργασία παραγωγής συμβατικών υλικών και την μείωση χρήσης φυσικών πόρων (ζύμωση, κομποστοποίηση κλπ.).Η Ευρωπαϊκή Ένωση προτείνει την αξιοποίηση των FW για ζωοτροφές ωστόσο μια τέτοια λύση είναι επίφοβη για την εξάπλωση ασθενειών [17].

Η συσσώρευση FW προκαλεί διάφορες περιβαλλοντικές επιπτώσεις. Η ταφή τους ρυπαίνει τον υδροφόρο ορίζοντα από τα στραγγίσματα ενώ παράλληλα εκπέμπονται αέρια του θερμοκηπίου και οσμές [1]. Η αποτέφρωσή τους έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια θρεπτικών συστατικών που εμπεριέχονται στα FW (πλούσια σε C και N, υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, λιπίδια κλπ) και απώλεια ενέργειας από την εξάτμιση του νερού (η υγρασία τους φτάνει το 86%) και την εκπομπή CO_2.

4.2 ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Όταν τα τρόφιμα δεν μπορούν να καταναλωθούν, μπορούν να εφαρμοστούν άλλες μέθοδοι. Προς το παρόν, έχουν υιοθετηθεί τέσσερις κύριες τεχνικές αξιοποίησης των απορριμμάτων τροφίμων [14].

- Παραγωγή σε βιοκαύσιμα
- Ανάκτηση και εξαγωγή ενώσεων προστιθέμενης αξίας
- Παραγωγή βιο-προσροφητικών για την επεξεργασία λυμάτων
- 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 [36], [39]. Μόνο εμπόδιο στην αξιοποίηση σε βιομηχανική κλίμακα των οργανικών αποβλήτων είναι το αυξημένο κόστος αποθήκευσης και μεταφοράς των απορριμμάτων και ορισμένα τεχνικά ζητήματα [36], [39].

Μία μέθοδο αξιοποίησης τροφικών υπολειμμάτων αποτελεί η αναερόβια χώνευση. Η αναερόβια χώνευση (AD) έχει προταθεί ως περιβαλλοντικά φιλική και οικονομικά αποδοτική εναλλακτική λύση για τη θεραπεία και των αστικών λυμάτων και των FW. Είναι μια πολύπλοκη μικροβιακή διαδικασία κατά την οποία ο οργανικός άνθρακας μετατρέπεται στην πιο οξειδωμένη του κατάσταση (διοξείδιο του άνθρακα) και στην πιο ανηγμένη του

μορφή (μεθάνιο) με τη μορφή βιοαερίου. Το βιοαέριο αποτελείται από μεθάνιο (50-70%), διοξείδιο του άνθρακα (30-50%) και μικρές ποσότητες άλλων ενώσεων, όπως άζωτο, οξυγόνο, υδρόθειο, αμμωνία και υδρατμούς. Η θερμιδική αξία του μεθανίου είναι 50,4 MJ/kg. Για βιοαέριο με περιεκτικότητα σε μεθάνιο στην περιοχή από 60–65% η χαμηλότερη θερμιδική αξία, ωστόσο με την απομάκρυνση του διοξειδίου του άνθρακαείναι ικανή η αναβάθμισή του [1].

Εκτός από το βιοαέριο παράγεται και χωνεμένο υπόλειμμα. Το χωνεμένο υπόλειμμα είναι το σταθεροποιημένο απόβλητο πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως κομπόστ μετά την κατάλληλη επεξεργασία. Το υγρό μέρος της διαδικασίας αυτής δεν αξιοποιείται ακόμα σε βιομηχανικό επίπεδο, ωστόσο μελετάται η αξιοποίηση του ως υπόστρωμα λόγω των θρεπτικών συστατικών που περιέχει. Στην παρούσα εργασία το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται είναι προϊόν τέτοιας επεξεργασίας αξιοποίησης τροφικών υπολειμμάτων [1].

4.3 ΠΡΟΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ ΟΡΓΑΝΙΚΟΥ ΑΠΟΒΛΗΤΟΥ

Το απόβλητο της παρούσας εργασίας είναι προϊόν επεξεργασίας αστικών οργανικών απόβλητων. Η προεπεξεργασία των αποβλήτων είναι απαραίτητη για την συνολική διεργασία. Αυτό το στάδιο της παραγωγής είναι ακριβό και απαιτεί περαιτέρω έρευνα [17]. Η πρώτη ύλη είναι απαραίτητο να υποβληθεί σε προεπεξεργασία με στόχο την βελτίωση ή και την τροποποίηση των φυσικών, χημικών και βιολογικών της ιδιοτήτων μέσω, αντίστοιχα, φυσικών, χημικών και βιολογικών διεργασιών αλλά και ενζυμικής υδρόλυσης και συνδυασμό τους. Στόχος είναι η απελευθέρωση μονομερών ώστε να είναι πιο εύκολη η προσβασιμότητα για την μελλοντική διαδικασία [17]. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα τροφικά απόβλητα αποτελούν ιδανική πηγή άνθρακα καθώς είναι πλούσια σε σάκχαρα και πτητικά λιπαρά οξέα που είναι ιδανικό υπόστρωμα για την παραγωγή βιοπλαστικών [29].

Για την βελτιστοποίηση της απόδοσης της παραγωγής απαραίτητη είναι η προεπεξεργασία των FW. Σε άλλες χώρες γίνεται διαχωρισμός αποβλήτων μέσω των διαφορετικών χρωμάτων των κάδων και στις σακούλες διαλογής. Ο διαχωρισμός των οργανικών αποβλήτων αποτελεί το πρώτο βήμα της προεπεξεργασίας. Με ανάλυση του κύκλου ζωής των μεθόδων συλλογής αποβλήτων συμπεραίνεται ότι ο αυτοματοποιημένος διαχωρισμός FW από MSW είναι ο πιο φιλικός προς το περιβάλλον συγκριτικά με συμβατικές μεθόδους (πχ μεταφορά με φορτηγό).

Στόχο της προεπεξεργασίας αποτελεί η μερική ή ολική απελευθέρωση μονομερών από FW (πχ λιγνοκυτταρινικά συστατικά) για την πιο εύκολη πρόσβαση σε πρωτεΐνες, λιπίδια και πολυσακχαρίτες (πχ άμυλο, κυτταρίνη κλπ.) για επακόλουθη υδρόλυση και ζύμωση. Ουσιαστικά η διαδικασία αυτή αποσκοπεί στη μετατροπή των απορριμμάτων σε ένα ζυμώσιμο υπόστρωμα, το οποίο θα επιτρέπει την ανάπτυξη βακτηρίων και κατ’ επέκταση συσσώρευσης βιοπλαστικού. Γενικότερα επιθυμητή είναι

η αύξηση της προσβάσιμης επιφάνειας και η μείωση του ρυθμού πολυμερισμού των συστατικών της τροφοδοσίας [17].

Υπάρχουν πολλές μέθοδοι προεπεξεργασίας ωστόσο τα καλύτερα αποτελέσματα επιτυγχάνονται με συνδυασμό μεθόδων. Πιο συγκεκριμένα, υπάρχει η φυσική μέθοδος επεξεργασίας, μηχανική και θερμική, όπως η αξιοποίηση φούρνων μικροκυμάτων, υπερήχων κλπ., που συνήθως χρησιμοποιείται για την αλλαγή του μεγέθους των σωματιδίων και για καλύτερο διαχωρισμό των υλικών. Δεν εφαρμόζεται μόνη της αλλά σε συνδυασμό με κάποια άλλη μέθοδο. Η χημική μέθοδος μπορεί να περιλαμβάνει κάποια θεραπεία με οξύ που είναι πολύ κοινή για τα τροφικά απορρίμματα. Αυτή η διαδικασία αυξάνει την προσβασιμότητα σε φτηνές και άφθονες τροφοδοσίες για αξιοποίηση χωρίς να παράγει πολλά ανασταλτικά στην κυτταρική ανάπτυξη σε σωστές συνθήκες. Τέτοια ανασταλτικά μπορεί να αποτελούν καρβοξυλικά οξέα, παράγωγα φουρανίου και άλλα.Άλλο παράδειγμα χημικής προεπεξεργασίας αποτελεί η αλκαλική προεπεξεργασία κατά την οποία οι εστερικοί δεσμοί υδρολύονται και εφαρμόζεται συχνά σε τροφοδοσίες με πολλά φυτικά συστατικά. Συχνά χρησιμοποιείται βιολογική προεπεξεργασία η οποία περιλαμβάνει χρήση μυκήτων ή και η ενζυμικήπροεπεξεργασία. Η υδρόλυση είναι ο κύριος μηχανισμός διάσπασης πολυμερών σε μονομερή και ενδιάμεσα. Η ενζυμική υδρόλυση προάγει την υδρολυτική ικανότητα των FW και μειώνει τα πτητικά αιωρούμενα στερεά. Από τα συστατικά της τροφοδοσίας κάποια είναι δύσκολα αποδομήσιμα από μικροοργανισμούς (πχ λιγνίνη). Αυτή η διαδικασία βοηθάει στην διαλυτοποίηση των FW. Μια μίξη ενζύμων βελτιώνουν την βιοδιασπασιμότητα των περισσότερων πηγών άνθρακα (πρωτεΐνες λιπίδια και υδατάνθρακες) και δίνουν καλύτερες αποδόσεις PHAs. Μια τέτοια προεπεξεργασία μπορεί να αντικαταστήσει τις απαιτήσεις σε συμπληρωματικά θρεπτικά συστατικά του εμπορίου [17].

Το υγρό συμπύκνωμα από το τροφικό υπόλειμμα (condensate) που χρησιμοποιείται στην παρούσα εργασία αποτελεί το υγρό κλάσμα από πιλοτική μονάδα επεξεργασίας αστικών τροφικών αποβλήτων του δήμου Χαλανδρίου. Είναι πλούσιο σε πτητικά λιπαρά οξέα, όπως οξικό οξύ, γαλακτικό οξύ, βουτυρικό οξύ) και το pH του είναι 4,0-4,5. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία τα χαρακτηρίστηκα του συμπυκνώματος και η σύσταση του αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα [1].

	Condensate	
Parameter	Average*	St.Dev.
tCOD (g O_2/L)	11.7	3.07
sCOD (g O_2/L)	11.7	0.00
TSS (g/L)	0.05	0.02
VSS (g/L)	-	-
pH	4.45	0.40
Acetate (mg/L)	1340.00	251.40
Propionate (mg/L)	49.08	13.23
Iso-butyrate (mg/L)	53.38	16.26
Butyrate (mg/L)	73.14	40.27
Iso-valerate (mg/L)	14.99	8.35
Valerate (mg/L)	0.00	0.00
Ethanol (mg/L)	3.09	0.85
TKN (mg/L)	10.90	4.44

Εικόνα1.13Χαρακτηριστικά condensate [1]

Το συλλεγμένο FW οδηγήθηκε σε εγκατάσταση ξήρανσης και τεμαχισμού. Η διαδικασία ξήρανσης/τεμαχισμού των απόβλητων τροφίμων καταλήγουν σε ένα ομογενοποιημένο προϊόν στερεάς βιομάζας που ονομάζεταιFORBI (Βιομάζα υπολειμμάτων τροφίμων). Η μέση υγρασία του FORBI είναι 10%, όπως αφαιρείται σχεδόν το 75-80% της αρχικής υγρασίας της πρώτης ύλης.Η υγρασία απομακρύνεται με τη μορφή υδρατμών που συλλέγονται από τον συμπυκνωτή. Το FORBI, πλούσιο σε άνθρακα και άζωτο με βέλτιστη αναλογία C:N είναιένα ιδανικό υπόστρωμα για πολλές βιολογικές διεργασίες, όπως η αναερόβια χώνευση, η σκοτεινή ζύμωση, η κομποστοποίηση και η παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας μέσω μικροβιακών κυψελών καυσίμου. Το παραγόμενο συμπύκνωμα είναιπλούσιο σε οργανικό άνθρακα αλλά φτωχό σε άζωτο [1].

Με τα χαρακτηριστικά του συμπυκνώματος προτείνεται ένα εναλλακτικό σενάριο στο οποίο το συμπύκνωμα μπορεί να συνδυαστεί και να συνδιαχειριστεί με το WAS.Η σύσταση του συμπυκνώματος το οποίο αποτελείται από ένα σύνολο λιπαρών πτητικών

οξέων το καθιστά κατάλληλο υπόστρωμα για την παραγωγή PHAsενώ παράλληλα αξιοποιείται στα πλαίσια της κυκλικής οικονομίας ένας ικανός όγκος οργανικών αποβλήτων. Συγκεκριμένα, το βουτυρικό, το προπιονικό και το οξικό οξύ αποτελούν πτητικά λιπαρά οξέα που καταναλώνονται από την μικτή καλλιέργεια και συσσωρεύουν βιοπλαστικό [1].

5. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη του υγρού συμπυκνώματος που προκύπτει από την ξήρανση και τον τεμαχισμό τροφικών υπολειμμάτων, ως υπόστρωμα άνθρακα για την παραγωγή πολύ-υδροξυαλκανοϊκών (PHAs).Πρόκειται για την αξιοποίηση τροφικών υπολειμμάτων προς παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας.

Συγκριμένα, η παραγωγή PHAs γίνεται σε εγκλιματισμένη και εμπλουτισμένη βιομάζα με συσσωρευτές PHAsκαι μελετάται η σταδιακή υποκατάσταση συνθετικού υποστρώματος που προσομοιάζει σε χαρακτηριστικά το υγρό συμπύκνωμα που προκύπτει από την ξήρανση και τον τεμαχισμό τροφικών υπολειμμάτων (condensate) άνθρακα. Η ουρία χρησιμοποιείται ως πηγή οργανικού αζώτου, ώστε να είναι δυνατή η μελλοντική χρήση αποβλήτων πλούσιο σε αυτό, όπως το στράγγισμα ΧΥΤΑ.

Μελετώνται 2 στάδια υποκατάστασης ως προς την πηγή παροχής οργανικού φορτίου σε σχέση με το συνθετικό υπόστρωμα και συγκεκριμένα, οι αναλογίες 30% - 70% και 70%-30% συνθετικού και πραγματικού υποστρώματος, αντίστοιχα. Δυστυχώς, η μελέτη της υποκατάστασης 100% πραγματικού υποστρώματος δεν έγινε εφικτή, λόγω κλειστής σχολής και αδυναμία συντήρησης της βιομάζας. Ωστόσο, μπορεί να αποτελέσει αντικείμενο μελλοντικής έρευνας.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΜΕΡΟΣ

2.1ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

2.1.1ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΤΑΞΗ

Τα πειράματα για την παραγωγή ΠΥΑ διεξήχθησαν χρησιμοποιώντας αντιδραστήρες Draw and FillReactor (DFR), δηλαδή άντλησης - πλήρωσης. Η πειραματική διάταξη περιλάμβανε μια κωνική φιάλη ενεργού όγκου 1L.Το περιεχόμενο του αντιδραστήρα διατηρούνταν υπό συνεχή και σταθερή ανάδευση στα 250 rpm, ενώ η θερμοκρασία του συστήματος παρέμενε σταθερή στους 27°C μέσα σε επωαστικό θάλαμο. Ο επωαστικός θάλαμος είναι εξοπλισμένος με σύστημα διατήρησης σταθερής θερμοκρασίας. Η κορυφή της φιάλης κλεινόταν με ένα κατάλληλο πώμα, μέσω του οποίου διέρχονταν τρεις σωλήνες. Ένας από αυτούς τους σωλήνες χρησιμοποιείτο ως είσοδος ενυδατωμένου αέρα, δημιουργώντας αερόβιες συνθήκες με τη χρήση αντλίας αέρα. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι ο αέρας πρέπει να είναι ενυδατωμένος για ναπαραμένει ο ενεργός όγκος στο 1L και να μην υπάρχει συμπύκνωση λόγω των 27 ^{o}C. Ο δεύτερος σωλήνας συνδεόταν με έναν σωλήνα σιλικόνης και χρησιμοποιείτο για τη δειγματοληψία μέσω βαθμονομημένης σύριγγας χωρητικότητας 50mL. Ο τρίτος σωλήνας λειτουργούσε ως έξοδος του αέρα και η άκρη του ήταν ελεύθερη στο περιβάλλον. Η ανάδευση του αντιδραστήρα γίνεται με μαγνητικό αναδευτήρα.

Εικόνα2.1Πειραματική διάταξη στην 1η και στην 2η φάση του πειράματος στις αντίστοιχες φάσεις τροφοδοσίας

2.1.2 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΡΟΦΟΔΟΣΙΑΣ

Η συγκεκριμένη μελέτη εστιάζει ιδιαίτερα στην τροφοδοσία, καθώς στόχος είναι η αντικατάσταση του συνθετικού αποβλήτου με πραγματικό. Η τροφοδοσία τόσο για τον άνθρακα, όσο και για το άζωτο παρασκευάζεται με τελικό όγκο 1000mL. Ως πηγή αζώτου χρησιμοποιείται η ουρία, ενώ άνθρακας λαμβάνεται από είτε εξ ολοκλήρου είτε σε συνδυασμό του συνθετικού και του πραγματικού άνθρακα. Ο πραγματικός άνθρακας λαμβάνεται από το υγρό συμπύκνωμα που προκύπτει από την ξήρανση των τροφικών υπολειμμάτων. Ο συνθετικός άνθρακας προσομοιάζει το υγρό κλάσμα της διαδικασίας επεξεργασίας των οργανικών αποβλήτων. Η σύσταση της συνθετικής τροφοδοσίας παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.2με επιπλέον κάποιων mL ρυθμιστικού διαλύματος για την προσαρμογή του pH του σε βαθμό που δεν θα επηρεάσει αρνητικά την επιβίωση των βακτηρίων.

Πίνακας2.1:Σύστασηολικήςτροφοδοσίαςαντιδραστήρων.

Διάλυμα	**Ποσοστό(% κ.ο.)**
Τροφοδοσίαάνθρακαήαζώτου	70
Ρυθμιστικόδιάλυμα	20
Διάλυμαμετάλλων	9
Διάλυμαιχνοστοιχείων	1

Πίνακας 2.2: Σύσταση συνθετικής τροφοδοσίας άνθρακα.

Ουσία	**Ποσοστό(%) επίτουσυνολικούCOD**
Προπιονικόοξύ	6
Οξικόοξύ	27
Βουτυρικόοξύ	27
Αιθανόλη/COD	20
Γλυκόζη/COD	15
Γαλακτικόοξύ/COD	5

Το ρυθμιστικό διάλυμα αποτελούνταν από ένα μείγμα ασθενούς οξέος και της συζυγούς του βάσης και χρησιμοποιήθηκε ως μέσο διατήρησης ουδέτερου pH. Η σύσταση παρουσιάζεται στον πίνακα 2.3.

Πίνακας2.3:Σύστασηρυθμιστικούδιαλύματος.

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

Το Διάλυμα μετάλλων περιελάμβανε τα θρεπτικά συστατικά τα οποία είναι απαραίτητα και χρησιμοποιούνται από τους μικροοργανισμούς για την ανάπτυξη και το μεταβολισμό τους. Η σύσταση παρουσιάζεται στον πίνακα 2.4.

Πίνακας2.4:Σύστασηδιαλύματοςμετάλλων.

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

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

Πίνακας2.5:Σύστασηδιαλύματοςιχνοστοιχείων.

Ουσία	Ποσότητα (g/L)
CuCl2 · 2H2O	0,01
FeCl3 · 6H2O	2
NaMoO4 · 2H2	0,03
NiCl2 · 2H2O	0,02
ZnSO4 · 7H2O	1
CoCl2 · 6H2O	0,2
KI	0,3
H3BO3	0,3
MnCl2 · 4H2O	0,03
EDTA	2,5

Για την τροφοδοσία του αζώτου προστίθενται 0,12 g ουρία και 700mLαπιονισμένου νερού.

Όσον αφορά στην τροφοδοσία άνθρακα αρχικά το 100% της τροφοδοσίας είναι συνθετικό.Στη συνέχεια η αναλογία φυσικού και συνθετικού άνθρακα γίνεται 30-70%και έπειτα 70-30%.

Η σύσταση τροφοδοσίας σε κάθε φάση αναλύεταιστον παρακάτω πίνακα. Σκοπός της μέτρησης των VFAs είναι η ανίχνευση των πτητικών λιπαρών οξέων

(βουτυρικό οξύ, προπιονικό οξύ, οξικό οξύ) ώστε να ελέγχεται η κατανάλωση της τροφοδοσίας από τους μικροοργανισμούς. Ανάλογα με την φάση και τον κύκλο της τροφοδοσίας αναμένονται διαφορετικές ποσότητες οξέων. Δίνεται έτσι η δυνατότητα ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης των συστατικών, μεμονωμένα για κάθε οξύ. Έτσι, μπορούν να ληφθούν συμπεράσματα για την προτίμηση του οξέως που καταναλώνεται πρώτο ή σε μεγαλύτερο ποσοστό ή συνδυαστικά με την απόδοση της διαδικασίας, μελετάται η ποιότητα και ποσότητα βιοπλαστικών αναλόγως του οξέος που καταναλώνεται. Και από την HPLC ανιχνεύονται η γλυκόζη, η αιθανόλη και το γαλακτικό οξύ, δηλαδή οι ουσίες της τροφοδοσίας μεμονωμένα ώστε να ελέγχεται η κατανάλωση από τους μικροοργανισμούς.

Πίνακας 2.6:Σύσταση τροφοδοσίας ανά φάση

	Σύσταση Τροφοδοσίας Συστήματος Κύκλου C		
	Φάση 1	Φάση 2	Condensate
	Περιεκτικότητα σε πραγματικό απόβλητο (30 %COD)	Περιεκτικότητα σε πραγματικό απόβλητο (70% COD)	
pH	3,45	3,47	3,47
COD (mg/L)	4586,80	3866,50	3913
TOC (mg/L)	1434,72	1146,60	1519,20
TN (mg/L)	10,69	8,96	13,89
Οξικό Οξύ (mg/L)	1610,68	1017,66	1216,72
Προπιονικό οξύ (mg/L)	159,92	71,51	51,08
Βουτυρικό Οξύ (mg/L)	463,46	145,16	48,51
Αιθανόλη (mg/L)	366,50	340,80	340,37
Γαλακτικό Οξύ (mg/L)	39,82	98,68	130,38
Γλυκόζη (mg/L)	523,38	239,15	-

Πίνακας 2.7 Ημέρες λειτουργίας

	Φάση 1 30:70 COD	Φάση 2 70:30 COD	Φάση 3 100:0 COD
Ημέρες λειτουργίας	47	36	1 (λόγω κατάληψης)

2.1.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Το πείραμα έγινε με χρήση εγκλιματισμένης βιομάζας, με σκοπό την μελέτη της συμπεριφοράς των μικροοργανισμών με κατανάλωση πραγματικού αποβλήτου. Η λειτουργία του αντιδραστήρα διήρκησε 109 μέρες.

Ο εγκλιματισμός της βιομάζας είναι απαραίτητος για την παραγωγή PHAs. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με χρήση μικτής καλλιέργειας εγκλιματισμένης βιομάζας. Σημειώνεται ότι οι μικροοργανισμοί προήλθαν από το ρεύμα επανακυκλοφορίας 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 ή 71h, 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.

Φάση άνθρακα (συσσώρευση)

Σε αυτή τη φάση η τροφοδοσία ήταν πλούσια σε πηγή άνθρακα, αλλά δεν περιείχεάζωτο. 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.

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

(670mL). Φυσικά, συνυπολογίζονταν οι όγκοι των δειγμάτων που ληφθήκαν στην αρχή,στο τέλος και ένα 24ωρο μετά την αλλαγή της τροφοδοσίας.

Φάση αζώτου

Σε αυτήν τη φάση, η τροφοδοσία περιείχε πηγή αζώτου με 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 αποθηκευμένοβιοπλαστικό αναμένεται να μειωθεί, ωστόσο είναι απαραίτητη για την δημιουργία νέων κυττάρων των βιοσυσσωρευτών. Επίσης ο αερισμός και η ανάδευση ήταν σε λειτουργία. Σε αυτήν την φάση, στην μικτή καλλιέργεια επιβιώνουν μόνο τα βακτήρια που παράγουν βιοπλαστικά, ενώ τα υπόλοιπα κύτταρα απομακρύνονται με την αλλαγή τροφοδοσίας κι έτσι αναμένεται η βιομάζα, μετά την αλλαγή, να είναι αποδοτικότερη.

Φάση καθίζησης/μετάγγισης

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

2.1.4 ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Για την παρούσα έρευνα γίνεται μια σειρά αναλύσεων. Παρακάτω αναφέρονται συγκεκριμένα ποια όργανα και μέθοδοι χρησιμοποιήθηκαν. Οι μετρήσεις πραγματοποιούνταν καθημερινά. ΟιμετρήσειςγίνοντανσύμφωναμετοεγχειρίδιοStandardMethodsfortheExaminationofWater &Wastewater.

Μέτρηση pH

Η μέτρηση πραγματοποιούνταν με την εμβάπτιση ηλεκτροδίου (inoLab WTW seriespH 720)του ηλεκτρικού pH-μέτρου πάγκου ("SensoDirectpHelectrodetype 330") σε κάθε δείγμα που λαμβάνονταν από τον βιοαντιδραστήρα. Αρχικά, το ηλεκτρόδιο απομακρύνεται από το ρυθμιστικό διάλυμα που βρίσκεται, πλένεται με απιονισμένο νερό και στεγνώνεται με απορροφητικό χαρτί και παράλληλα με την εμβάπτιση αναδεύεται το δείγμα ώστε να αποφευχθεί πιθανή μεταβολή της ένδειξης λόγω καθίζησης της βιομάζας.

Για την διασφάλιση της ορθότητας της μέτρησης γίνεται αρχικά η βαθμονόμηση του οργάνου με την χρήση τριών ρυθμιστικών διαλυμάτων. Το πρώτο διάλυμα κιτρικού οξέος / υδροξειδίου του νατρίου / χλωριούχου νατρίου, έχει pH=4,0 όπου το ηλεκτρόδιο

εμβαπτίζεται έως ότου η ένδειξη του οργάνου σταθεροποιηθεί στην τιμή 4. Το δεύτερο διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου / όξινου φωσφορικού νατρίου έχει pH=7,0 και το τρίτο διάλυμα ανθρακικού νατρίου / όξινου ανθρακικού νατρίου έχει pH=10,0 και ακολουθείται η ίδια διαδικασία.

Εικόνα 2.2 Μέτρηση pH με το ηλεκτρονικό πεχάμετρο πάγκου "SanxinPHS-3D-01 LabpH Meter"καιηλεκτρόδιο"SensoDirectpHelectrodetype330"

Μέτρηση οπτικής πυκνότητας (OD)

Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) με τη χρήση του ηλεκτρονικού φωτόμετρου HachLange (DR2800). Αρχικά, για να μειωθεί ο θόρυβος της μέτρησης ορίζεται το τυφλό διάλυμα. Στη συνέχεια λαμβάνονται περίπου 3 mLδείγματος τα οποία εισάγονται σε πλαστική κυψελίδα καιφωτομετρούνται στο ηλεκτρονικό φωτόμετρο σε μήκος κύματος 600 nm.

Εικόνα2.3Ηλεκτρονικόφασματοφωτόμετρο"HachLange(DR2800)"

Ουσιαστικά, μία δέσμη φωτός διαπερνά την κυψελίδα όπου τα στερεά σωματίδια απορροφούν την φωτοβολία και μέσω της διαφοράς της αρχικής τιμής με εκείνη που λαμβάνεται μετά την κυψελίδα ορίζεται με πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης η τιμή της οπτικής πυκνότητας

Μέτρηση χημικά απαιτούμενου οξυγόνου (COD)

Το χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (η συντομογραφία COD προκύπτει από τα αρχικά των λατινικών όρων chemicaloxygendemand) είναι ένας έμμεσος προσδιορισμός του οργανικού φορτίου ενός διαλύματος. Ουσιαστικά, προσδιορίζεται η συνολική ποσότητα οξυγόνου που απαιτείται για να οξειδωθεί όλη η ποσότητα του οργανικού άνθρακα προς σχηματισμό διοξειδίου του άνθρακα (CO_2), αμμωνιακά (NH_3), και νερό (H_2O). Η αντίδραση που πραγματοποιείται είναι η ακόλουθη:

$$C_nH_aO_bN_c + \left(\frac{4n + a + 2b - 3c}{4}\right)O_2 \rightarrow \left(\frac{a - 3c}{2}\right)H_2O + nCO_2 + cNH_3$$

Στην μέτρηση του Χημικά Απαιτούμενου Οξυγόνου πραγματοποιείται αντίδραση οξείδωσης, παρουσία καταλύτη ($AgSO_4$) σε ισχυρά όξινες συνθήκες λόγω του πυκνού

H_2SO_4. Κατά την οξείδωση, το χρώμιο ανάγεται από εξασθενές (Cr^{6+}) σε τρισθενές (Cr^{3+}) και η αντίδραση που διεξάγεται μεταξύ του οργανικού υποστρώματος και του διχρωμικού ιόντος. Η μέτρηση γίνεται με τη χρωματομετρική μέθοδο κλειστής επαναρροής.

$$C_nH_aO_bN_c + dCr_2O^{2-} + (8d + c)H^+ \rightarrow nCO_2 + \left(\frac{a+8d-3c}{2}\right)H_2O + cNH_4^+ + 2dCr^{3+}$$

Όπου d=2n/3+a/6-b/3-c/2

Σε φιαλίδια προστίθενται με σιφώνιο και πουάρ 2.8 mL H_2SO_4, ο καταλύτης, και 1.2 mL $K_2Cr_2O_7$, οξειδωτικό μέσο με πιπέτα ακριβείας. Στη συνέχεια, για να αφαιρεθεί ο θόρυβος μετριέται τυφλό δείγμα μεπροσθήκη 2 mLαπιονισμένο νερό.Στα υπόλοιπα φιαλίδια προστίθενται 2 mL δείγμα, που προκύπτει έπειτα από διήθηση με φίλτρο των 55 nm. Για κάθε δείγμα γίνεται διπλή επανάληψη. 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 HachLange (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. Για την αποφυγή σφαλμάτων, πριν τοποθετηθούν τα φιαλίδια στο φωτόμετρο, καθαρίζονται εξωτερικά με αιθανόλη.

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 mlαπιονισμένου 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 του πρώτου φιαλιδίου αποτελείται μόνο από απιονισμένο νερό (blank).Η καμπύλη βαθμονόμησης είναι αξιόπιστη σε τιμές μεταξύ των 0,020 και 0,450, καθώς σε μεγαλύτερες τιμές χάνεται η γραμμικότητά της και σε μικρότερες ο θόρυβος είναι έντονος.

Εικόνα2.4 Φιαλίδια προς φωτομέτρηση μετά την ολοκλήρωση της οξείδωσης τουοργανικούφορτίου

Μέτρησηολικών αιωρούμενων στερεών

Για τον προσδιορισμό των συνολικών αιωρούμενων στερεών (TSS από τα αρχικά τωντotalsuspendedsolids) το δείγμα που λαμβάνεται από τον βιοαντιδραστήρα διηθείται υπό κενό με φίλτρο πορώδους 0,55μm το οποίο έχει προζυγιστεί. Μετά την διήθηση ορισμένης ποσότητας δείγματος (συνήθως 15mL) το φίλτρο τοποθετείται σε φούρνο 105^{o}C για 24 ώρες, ώστε να απομακρυνθεί η υγρασία, και έπειτα, τοποθετείται σε ξηραντήρα μέχρι να έρθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (25^{o}C). Το φίλτρο με το στερεό υπόλειμμα ζυγίζεται ξανά. Η μάζα των συνολικών αιωρούμενων στερεών υπολογίζεται σύμφωνα με την ακόλουθη σχέση:

$$TSS = \frac{m_{105} - m_{\varphi}}{V_{δείγματος}}$$

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_{φ}: το αρχικό βάρος του φίλτρου [g]
- $V_{δείγματος}$: ο όγκος δείγματος που διηθείται [L]

Μέτρηση πτητικών αιωρούμενων στερεών

Για να προσδιοριστεί η τιμή των πτητικών αιωρούμενων στερεών (VSS από τα αρχικά των VolatileSuspendedSolids) απαιτείται να υπάρχει ήδη η τιμή των TSS. Το ίδιο φίλτρο που συγκρατεί τα ολικά αιωρούμενα στερεά τοποθετείται για 10min σε πυραντήριο στους 550^{o}C και αφήνεται σε ξηραντήρα μέχρι να έρθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Έπειτα ζυγίζεται πάλι. Η μάζα των VSS υπολογίζεται βάση της παρακάτω σχέσης:

$$VSS = \frac{m_{105} - m_{550}}{V_{δείγματος}}$$

Όπου :

- VSS η συγκέντρωση των πτητικών αιωρούμενων στερεών στο δείγμα [g/L]
- m_{105}: το βάρος του φίλτρου έπειτα από 24h στους 105^{o}C [g]
- m_{550}: το βάρος του φίλτρου έπειτα από 10min στους 550^{o}C [g]
- $V_{δείγματος}$: ο όγκος δείγματος που διηθείται [L]

Μέτρηση αμμωνιακών ιόντων (NH_4^+)

Η μέτρηση των αμμωνιακών ιόντων (NH_4^+) γίνεται με τον προσδιορισμό της αμμωνίας με την μέθοδο Nessler. Το αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται είναι το K_2HgI_4, το οποίο αντιδρά με την αμμωνία που υπάρχει στο διήθημα του δείγματος υπό έντονα αλκοολικές συνθήκες και παράγουν ένα προϊόν κίτρινου χρώματος. Η μέτρηση γίνεται με την χρήση φωτόμετρου, καθώς η ένταση του κίτρινου χρώματος είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της αμμωνίας.

Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το φωτόμετρο Aquaculture Photometer HI83303 και το αντίστοιχο kit αντιδραστηρίων (HI-93733-01 Ammonia HR) της εταιρείας HannaInstruments. Η ανίχνευση γίνεται σε συγκεντρώσεις αμμωνιακών έως 100 mg/L. Για την μέτρηση προστίθεται σε ειδικό φιαλίδιο με ένδειξη στα 10mL συγκεκριμένο αντιδραστήριο. Με την χρήση σιφωνίου και πουάρ λαμβάνονται 9mL αντιδραστήριο και με πιπέτα ακριβείας προστίθεται 1mL διηθήματος του αρχικού δείγματος. Ανακινείται προσεκτικά και εισάγεται στο φωτόμετρο, ώστε να οριστεί η μηδενική ένδειξη. Στην συνέχεια, προστίθενται 3-4σταγόνες του δεύτερου αντιδραστηρίου. Μετά από λίγα λεπτά ολοκληρώνεται η μέτρηση.

Εικόνα2.5Φασματόμετρο Hanna Aquaculture Photometer HI83303 και αντιδραστήρια (HI-93733-01AmmoniaHRkit)για τον προσδιορισμό του αμμωνιακού αζώτου.

Μέτρηση ολικού αζώτου (TotalNitrogen, TN)

Ο προσδιορισμός του αζώτου γίνεται με την χρήση ενός αναλυτικού οργάνου SHIMADZUTotalNitrogenMeasuringUnit (TNM-L). Σε κατάλληλο γυάλινο περιέκτη τοποθετούνται 30mL αραιωμένου δείγματος. Προκειμένου να βρεθεί η τιμή εντός των ορίων μέτρησης γίνεται αραίωση του διηθήματος του δείγματος με απιονισμένο νερό σε αναλογία 1/6 και ανακινείται.

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

Μέτρηση Πτητικών Λιπαρών Οξέων (VFAs)

Η ποσότητα των Πτητικών Λιπαρών Οξέων (VFAs) μετράται με τον αεριοχρωματογράφο Shimadzu GC-2010 plus, χρησιμοποιώντας τριχοειδή στήλη διαχωρισμού HewlettPackard FFAP. Η τριχοειδής στήλη έχει μήκος 30mm, εσωτερικής διαμέτρου 0,53mm, φιλμ 1μm, με αυτόματο δειγματολήπτη τύπου SHIMADZU AOC-20s, ανιχνευτή φλόγας ιονισμού (FlameIonizationDetector - FID) και ήλιο υψηλής καθαρότητας ως φέρον αέριο.

Το δείγμα προετοιμάζεται προσθέτοντας 1 mL διηθήματος σε Eppendorf μαζί με 300 μL H2SO4 20% v/v, ανακινώντας το διάλυμα σε Vortex, και διέρχεται μέσω σύριγγας και φίλτρου Whatman πόρων 0,22 μm για απομάκρυνση θειικών ιζημάτων και μικροστερεών. Έπειτα το δείγμα τοποθετείται σε ειδικό φιαλίδιο (septumvial) και εισέρχεται στον αεριοχρωματογράφο.

Η στήλη προγραμματίζεται να ξεκινά από αρχική θερμοκρασία 105°C και να φτάνει στους 160°C με ρυθμό 15°C/min, κατόπιν στους 225°C με ρυθμό 20°C/min και να παραμένει στους 225°C για 3 λεπτά. Η θερμοκρασία λειτουργίας του FID είναι 230°C και η παροχή του ηλίου στη στήλη είναι 30 mL/min. Τα αποτελέσματα προκύπτουν από το χρωματογράφημα του δείγματος και με τη χρήση προτύπων καμπυλών υπολογίζονται οι συγκεντρώσεις των VFAs.

Εικόνα2.6 Αεριοχρωματογράφος ShimadzuGC-2010 plus με ανιχνευτή φλόγας ιονισμού(FID)για τον προσδιορισμότων Πτητικών Λιπαρών Οξέων (VFAs)

Μέτρηση συστατικών δείγματος με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Η μέθοδος της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC) αποτελεί βασικό εργαλείο στην εργασία αυτή για τον προσδιορισμό της ποσότητας της αιθανόλης, του λακτικού οξέος και της γλυκόζης στα δείγματα.

Η συσκευή που χρησιμοποιείται περιλαμβάνει ποικίλα στοιχεία που εξυπηρετούν τη διαδικασία ανάλυσης. Αρχικά, υπάρχει μια ισοκρατική αντλία τύπου "Agilent 1260 Infnity II QuaternaryPump", η οποία είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά του διαλύτη στο σύστημα. Ακολουθεί ο αυτόματος δειγματολήπτης τύπου Agilent 1260 Infnity II PreparativeAutosampler, ο οποίος αναλαμβάνει την εισαγωγή των δειγμάτων στη ροή της ανάλυσης. Στη συνέχεια, η στήλη που χρησιμοποιείται είναι η AgilentHi-Plex H, η οποία έχει διαστάσεις 7,7X300mm και διάμετρο 8μm. Η στήλη αυτή είναι υπεύθυνη για τον διαχωρισμό των ενώσεων που αναλύονται. Κατόπιν, υπάρχουν ο ανιχνευτής σάρωσης υπεριώδους ακτινοβολίας τύπου Agilent1260 Infnity II DiodeArrayDetector και ο ανιχνευτής δείκτη διάθλασης τύπου Agilent1260 Infnity II RefractiveIndexDetector. Αυτοί οι ανιχνευτές χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση των ενώσεων και την καταγραφή των δεδομένων της ανάλυσης.

Εικόνα2.7ΔιάταξηΥγρήςΧρωματογραφίαςΥψηλήςΑπόδοσης(HPLC)Agilent1260InfnityII

Επίσης, υπάρχει ένα σύστημα εισαγωγής δείγματος σταθερού όγκου, το οποίο περιλαμβάνει υποδοχή για τη σύριγγα, βρόχο σταθερού όγκου για τον προσδιορισμό του

όγκου του δείγματος που οδηγείται στη στήλη και διατηρείται σταθερά στα 20μL, είσοδο του διαλύτη και εξόδους προς τη στήλη και το δοχείο αποβλήτων. Η θερμοκρασία λειτουργίας της στήλης κατά τη διάρκεια των αναλύσεων είναι 50°C και η παροχή της κινητής φάσης είναι 0,6mL/min.

Οι ουσίες που αναλύονται από τον ανιχνευτή δείκτη διάθλασης παρουσιάζουν μέγιστη κορυφή στα 210nm, καθώς η ανίχνευση πραγματοποιείται στο υπεριώδες φάσμα του φωτός. Η μέθοδος μέτρησης των ουσιών που αναλύονται βασίζεται στην αλλαγή που παρατηρείται στον δείκτη διάθλασης του διαλύματος κατά την έξοδό του από τη χρωματογραφική στήλη και την κινητή φάση. Αυτό σημαίνει ότι όσο μεγαλύτερη είναι η διαφορά στη διάθλαση μεταξύ του δείγματος και της κινητής φάσης, τόσο μεγαλύτερη είναι η αλλαγή στην τιμή του δείκτη στο τελικό διάλυμα. Ο ανιχνευτής δείκτη διάθλασης αποτελείται από ένα κελί με δύο διαδρομές. Κατά τη διάρκεια της ανάλυσης, μια από τις διαδρομές είναι πάντα γεμάτη με την κινητή φάση, ενώ η άλλη δέχεται συνεχή ροή του διαλύματος του δείγματος. Μια δέσμη φωτός διέρχεται μέσω αυτών των διαδρομών και εκτρέπεται ανάλογα με τη σύνθεση του δείγματος. Η μεταβολή της γωνίας της δέσμης φωτός καταγράφεται από τον ανιχνευτή, ο οποίος επηρεάζεται από τα φωτόνια που προσπίπτουν σε αυτόν.

Για να προσδιοριστούν οι προαναφερθείσες χημικές ενώσεις, με πιπέταακριβείας λαμβάνεται ένα διηθημένο δείγμα όγκου 1mL, το οποίο υφίσταται μικροδιήθηση μέσω φίλτρου Whatman με πόρους 0,2μm, προκειμένου να απομακρυνθούν πιθανά μικροσωματίδια που θα μπορούσαν να προκαλέσουν δυσλειτουργία στην εξοπλισμένη διάταξη HPLC. Στη συνέχεια, το δείγμα τοποθετείται σε κατάλληλο δοχείο και εισέρχεται στην υποδοχή της HPLC για ανάλυση.

Από την συγκεκριμένη μέτρηση ανιχνεύονται η γλυκόζη, η αιθανόλη και το γαλακτικό οξύ, δηλαδήοι ουσίες της τροφοδοσίας μεμονωμένα ώστε να ελέγχεται η κατανάλωση από τους μικροοργανισμούς.Ομοίως με τις μετρήσεις των VFAs.

Ποσοτικοποίηση PHAs

Στο τέλος κάθε κύκλου λαμβανόταν δείγμα βιομάζας, το οποίοφυγοκεντρούνταν στα 4400 rpm για 20min, με σκοπό τον διαχωρισμό των στερεών από το υπερκείμενο. Τελικά, το δείγμα της βιομάζας αποθηκευόταν στη κατάψυξη σε θερμοκρασία −20°C σε φάλκον των 15mL, αφού απομακρύνθηκε το υπερκείμενο υγρό και πλύθηκε η βιομάζα με απιονισμένο νερό.

Εικόνα2.8 Βιομάζα μετά την φυγοκέντρηση και την έκπλυση

Την διεργασία ακολουθεί η ανάκτηση του βιοπλαστικού. Η διαδικασία ανάκτησης του βιοπλαστικού ξεκινά με τη μεταφορά των δειγμάτων βιομάζας σε ψυγεία, όπου διατηρούνται στους -80°C για τουλάχιστον 24 ώρες. Στη συνέχεια, ακολουθεί μια βελτιστοποιημένη διαδικασία λυοφιλίωσης (FreezeDrying), η οποία στοχεύει στην αφαίρεση του νερού από τη βιομάζα για να ληφθεί η ξηρή μορφή της. Αυτή η διαδικασία λυοφιλίωσης γίνεται με χρήση ενός λυοφιλιωτή (ChirstAlpha 1-4), υπό συγκεκριμένες συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης (-50^{o}C και 0,075mbar), συνήθως σε συνδυασμό με ψύχος, για να διατηρηθεί η δομή των κυττάρων της βιομάζας.

Η ξηρή κυτταρική βιομάζα βάρους 20-30mg, μετά τη λυοφιλίωση, τοποθετείται σε φιαλίδια πυρέξ όγκου 10 mL. Στα φιαλίδια προστίθεται χλωροφόρμιο ($CHCl_3$) 2ml και οξινισμένημεθανόλη (MeOH), η οποία περιέχει επίσης θειικό οξύ (H_2SO_4) 3% v/v και βενζοϊκό οξύ ($C_7H_6O_2$) 100mg/L ως εσωτερικό πρότυπο για τη μετέπειτα ποσοτική ανάλυση. Η χώνευση διαρκεί 4 ώρες και γίνεται στους 100^{o}C. Ακολουθεί προσθήκη 1mL H_2O και ανάμιξη στο vortex.

Μετά την ανάμιξη, τα δείγματα αφήνονται να ηρεμήσουν, επιτρέποντας την απόδραση του χλωροφορμίου και την οργάνωση των φάσεων. Στόχος αυτής της διαδικασίας είναι η παραλαβή του βιοπλαστικού στη φάση του χλωροφορμίου, το οποίο θα χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω αναλύσεις. Αυτή η τεχνική επιτρέπει την ανάκτηση και την αξιοποίηση του βιοπλαστικού με αποτελεσματικό και αποδοτικό τρόπο.

Μετά την ανάκτηση των βιοπλαστικών μέσω της χώνευσης, η φάση του χλωροφορμίου απομονώνεται. Το δείγμα διέρχεται μέσω ενός φίλτρου Whatman με πόρους 0,22 μm με τη χρήση σύριγγας, προκειμένου να αφαιρεθούν ιζήματα και μικροστερεά σωματίδια, και στη συνέχεια μεταφέρεται σε ειδικό φιαλίδιο (septumvial). Το ειδικό φιαλίδιο τοποθετείται στον εισαγωγέα δείγματος του χρωματογράφου, ο οποίος λειτουργεί σε θερμοκρασία 250°C.

Οι θερμοκρασίες και ο χρόνος παραμονής του δείγματος στην κάθε θερμοκρασία ποικίλουν προκειμένου να προσδιοριστούν τα PHAs. Η θερμοκρασία του φούρνου αρχικά παραμένει στους 60°C για 1 λεπτό, έπειτα αυξάνεται στους 120°C με ρυθμό 10°C/min και τέλος, φτάνει στους 270°C με ρυθμό 45°C/min, όπου παραμένει σταθερή για 5 λεπτά. Η θερμοκρασία του ανιχνευτή παραμένει σταθερή στους 300°C, ενώ το φέρον αέριο είναι ήλιο υψηλής καθαρότητας, με ποσοστό καθαρότητας 99,999% κατά όγκο, και ροή 1,5 mL/min.

Ως πρότυπα χρησιμοποιήθηκαν το (R)-3-υδροξυβουτυρικό οξύ, το συμπολυμερές (R)-3-υδροξυβουτυρικού και (R)-3-υδροξυβαλερικού οξέος σε αναλογία 8 mol % HV, τα οποία αγοράστηκαν από την εταιρεία SigmaAldrich.

3. Αποτελέσματα

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε αντιδραστήρα τύπου DFR, δηλαδή αντιδραστήρα άντλησης – πλήρωσης. Οι μικροοργανισμοί που αποτέλεσαν την μικτή καλλιέργεια που ερευνήθηκε ήταν ήδη εγκλιματισμένοι. Με εναλλάξ περιορισμό αζώτου και άνθρακα, οι μικροοργανισμοί που επικρατούνείναι οι ικανοί για παραγωγή PHAs. Το άζωτο κατά την διάρκεια των πειραμάτων παρεχόταν με την μορφή ουρίας, ενώ ο άνθρακας, αρχικά, παρεχόταν από συνθετικό απόβλητο που, ωστόσο, σταδιακά, αντικαταστάθηκε με πραγματικό. Η μεταβολή αυτή έγινε σε τρία στάδια. Αρχικά, η τροφοδοσία του άνθρακα ήταν αποκλειστικά συνθετική, ενώ, στη συνέχεια το 30% της τροφοδοσίας αντικαταστάθηκε με πραγματικό απόβλητο. Στο τρίτο στάδιο, το πραγματικό απόβλητο καταλάμβανε το 70% της συνολικής τροφοδοσίας και, τέλος, το σύνολο του άνθρακα ήταν πραγματικό απόβλητο.

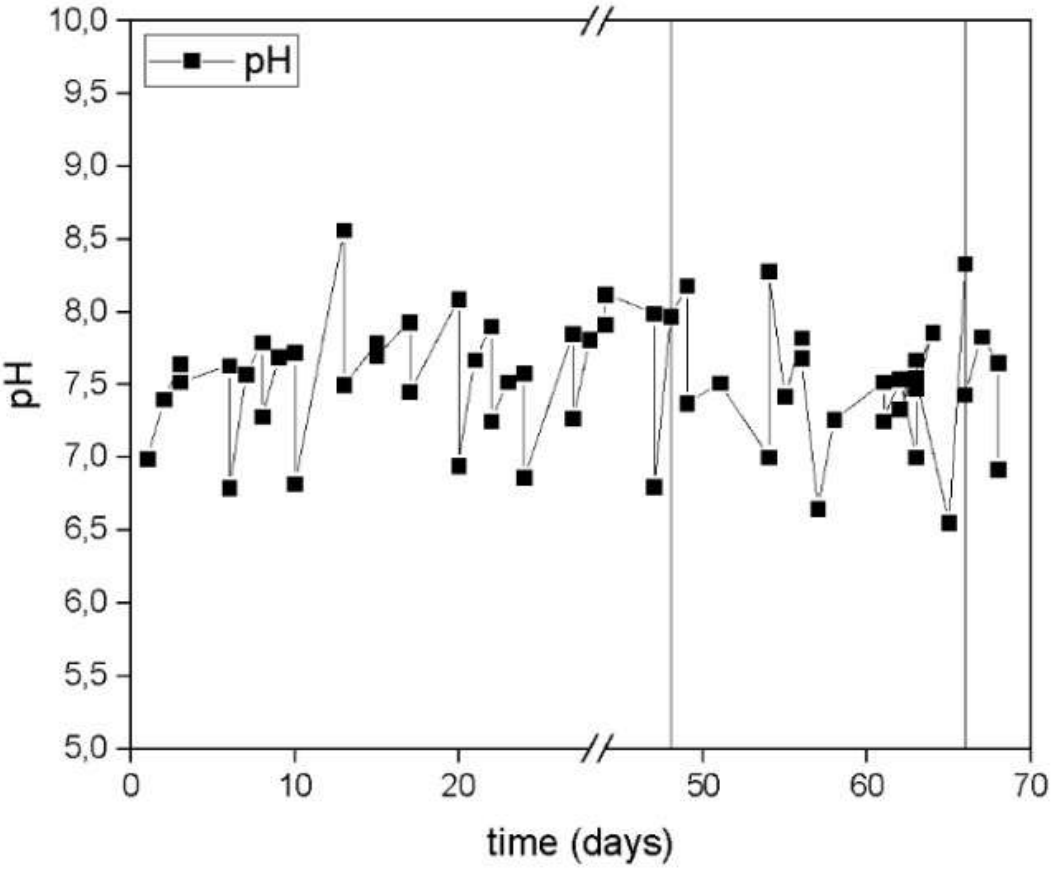
Στην συνέχεια αναλύονται τα διαγράμματα που προέκυψαν από το σύνολο των μετρήσεων κατά την διάρκεια του πειράματος.

Μέτρηση pH

Η συγκεκριμένη μέτρηση επιβεβαιώνει ότι οι συνθήκες είναι κατάλληλες ώστε να επιβιώσουν οι μικροοργανισμοί και αποτελεί ένδειξη των στερεών στον αντιδραστήρα (όσο αυξάνεται η τιμή τόσο πιο πολλά στερεά υπάρχουν στον αντιδραστήρα). Το pH προβλέπεται να μειώνεται μετά την αλλαγή τροφοδοσίας,αφού το απόβλητο είναι όξινο. Στο τέλος του κύκλου το χαμηλό pH υποδεικνύει την αδυναμία των μικροοργανισμών να καταναλώσουν τα οξέα και κάτι τέτοιο είναι μη επιθυμητό. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, το pH των καλλιεργειών σε ποικιλία υποστρωμάτων κυμαίνεται μεταξύ 7,5 και 8 μετά το πέρας του πρώτου 24ώρου και μετά την τροφοδοσία το pH είναι κοντά στο 6,5[47] [1]. Οι κάθετες γραμμές υποδεικνύουν τις αλλαγές στη σύσταση τροφοδοσίας. Στη δεύτερη γραμμή συγκεκριμένα, έγινε υποκατάσταση σε 100% φυσικό απόβλητο, αλλά, δυστυχώς, δεν ήταν εφικτή η περαιτέρω μελέτη της συγκεκριμένης φάσης λόγω κλειστής σχολής.

Το pH κυμαίνεται από 6,5 έως 8,5. Τα όρια αυτά είναι αποδεκτά βάσει της βιβλιογραφίας. Στην αρχή κάθε κύκλου άνθρακα το pH είναι κοντά στο 6,5. Πριν την αλλαγή, η τροφοδοσία με την χρήση ρυθμιστικού διαλύματος ορίζεται σε επίπεδα κοντά στο ουδέτερο, αφού η εξαιρετικά υψηλή οξύτητα του (pH 4.0-4.5) θα οδηγούσε στον θάνατο των μικροοργανισμών λόγω του ακατάλληλου για την επιβίωσή τους περιβάλλοντος. Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν NaOH συγκέντρωσης 5M. Οι μέγιστες τιμές του pH συναντώνται στο τέλος της φάσης

συσσώρευσης, δηλαδή στο τέλος του κύκλου άνθρακα λόγω κατανάλωσης των πτητικών λιπαρών οξέων. Οι χαμηλότερες τιμές εντοπίζονται αμέσως μετά την αλλαγή τροφοδοσίας και στη διάρκεια της φάσης του αζώτου, κάτι που οφείλεται στη μείωση της αλκαλικότητας λόγω κατανάλωσης της ουρίας. Σημαντική παρατήρηση είναι ότι οι υψηλές τιμές του pH διατηρούνται με την σταδιακή προσαρμογή της τροφοδοσίας στο πραγματικό απόβλητο, γεγονός ενθαρρυντικό για την επιθυμητή κατανάλωση των οξέων του πραγματικού αποβλήτου [47] [1].

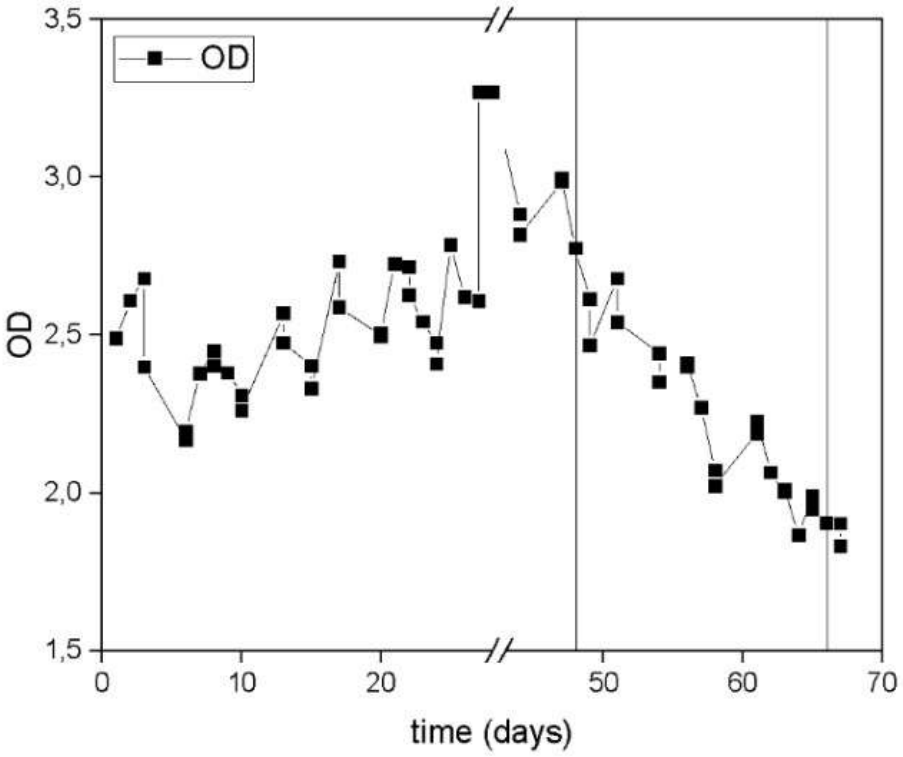


Εικόνα3.1Διάγραμμα των μετρήσεων του pHτου αντιδραστήρα συναρτήσει του χρόνου

Μέτρηση Οπτικής Πυκνότητας

Η μέτρηση αποτελεί ένδειξη της συγκέντρωσης των στερεών στον αντιδραστήρα. Οι παρατηρούμενες τιμές κυμαίνονται στο 1,7 έως 3,3. Οι υψηλές τιμές υποδεικνύουν την επιβίωση πολλών στερεών, άρα και πολλών βακτηρίων, που πρόκειται να παράγουν πληθώρα μονομερών ή συμπολυμερών για την σύνθεση βιοπλαστικου. Προβλέπεται η

πτώση της ένδειξης της μέτρησης μετά την τροφοδοσία. Αυτό είναι λογικό, καθώς μέρος της βιομάζας συμπαρασύρεται με το άδειασμα του υπερκειμένου υγρού μετά το τέλος του κύκλου. Οι κάθετες γραμμές υποδεικνύουν τις αλλαγές στη φάση της τροφοδοσίας. Στη δεύτερη γραμμή έγινε υποκατάσταση σε 100% φυσικό απόβλητο όμως, όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, δεν ήταν δυνατή η ολοκλήρωση των μετρήσεων.



Εικόνα3.2: Διάγραμμα των μετρήσεων της οπτικής πυκνότητας του αντιδραστήρα συναρτήσει του χρόνου

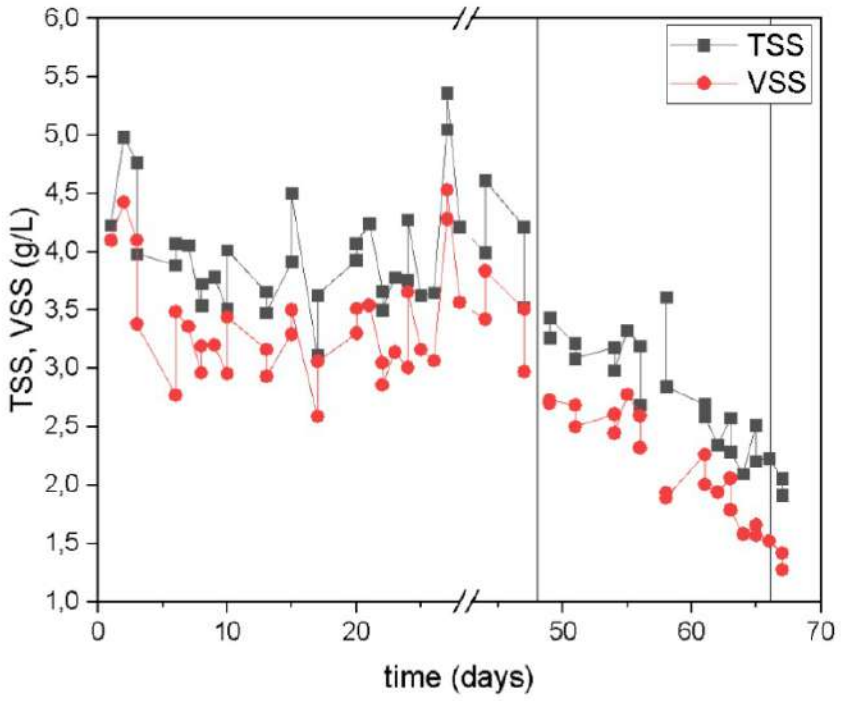
Οι μέγιστες τιμές της οπτικής πυκνότητας παρατηρούνται στο τέλος του κύκλου άνθρακα, όπου οι μικροοργανισμοί έχουν καταναλώσει τον άνθρακα, προκειμένου να συσσωρεύσουν τα PHAs. Παρατηρείται πως με την πάροδο του χρόνου και την αύξηση του πραγματικού αποβλήτου στην τροφοδοσία η οπτική πυκνότητα μειώνεται, επομένως, οι μικροοργανισμοί της βιομάζας, με την αναλογία 70% πραγματικό και 30% συνθετικό απόβλητο, δυσκολεύονται να επιβιώσουν. Η πτώση πιθανώς οφείλεται στο γεγονός ότι το πραγματικό απόβλητο ενδέχεται να εμπεριέχει απρόβλεπτες προσμίξεις που δεν ευνοούν στην επιβίωση των μικροοργανισμών. Ωστόσο, η προσθήκη 30% πραγματικού αποβλήτου δείχνει να ευνοεί στη συσσώρευση PHAs καθώς παρατηρείται σταδιακή αύξηση της τιμής της οπτικής πυκνότητας[48].

Μέτρηση Ολικών Αιωρούμενων Στερεών και Πτητικών Αιωρούμενων Στερεών

Η μέτρηση δείχνει με ακρίβεια την μάζα στερεών στον αντιδραστήρα. Καθώς στόχος είναι η συσσώρευση βιοπλαστικών, όσο πιο πολλά βακτήρια, ικανά να συσσωρεύσουν PHAs, αναπτύσσονται, τόσο καλύτερη απόδοση θα έχει η διαδικασία. Επομένως, οι επιθυμητές τιμές είναι όσο το δυνατόν υψηλότερες.

Οι κάθετες γραμμές υποδεικνύουν τις αλλαγές στη σύσταση τροφοδοσίας ανάλογα με την φάση του πειράματος. Στη δεύτερη γραμμή, συγκεκριμένα, έγινε υποκατάσταση σε 100% φυσικό απόβλητο,αλλά δεν ήταν εφικτή η περαιτέρω μελέτη της συγκεκριμένης φάσης λόγω κλειστής σχολής.

Τα βακτήρια της καλλιέργειας προκύπτουν αν από τα ολικά αιρούμενα στερεά αφαιρεθούν τα ανόργανα στερεά, δηλαδή τα υπολείμματα των στερεών μετά την καύση του δείγματος, ώστε να υπολογιστούν τα ολικά πτητικά στερεά.



Εικόνα3.3Διάγραμμα των ολικών και πτητικών αιρούμενων στερεών του αντιδραστήρα συναρτήσει του χρόνου

Οι καμπύλες των ολικών (TSS) και πτητικών (VSS) αιρούμενων στερεών ως προς τον χρόνο παρουσιάζουν παρόμοια συμπεριφορά,καθώς τα πτητικά αποτελούν μέρος των ολικών αιωρούμενων στερεών.Η μεταβολή των ολικών και των πτητικών

αιρούμενων στερεών ως προς το χρόνο έχουν την ίδια τάση με τη μεταβολή της οπτικής πυκνότητας που αναλύθηκε νωρίτερα. Η παρατήρηση αυτή είναι λογική, καθώς τα στερεά παραμένουν ίδια στο υγρό δείγμα που λαμβάνεται από τον αντιδραστήρα κατά την διάρκεια της μέτρησης της οπτικής πυκνότητας, αλλά και μετά την διαδικασία της διήθησης, όπου απομακρύνεται το υγρό κλάσμα και μένουν μόνο τα στερεά ου προϋπάρχουν στο δείγμα. Η οπτική πυκνότητα είναι μέτρηση ποιοτική για το δείγμα. Όσο περισσότερα στερεά τόσο πιο πυκνό θα είναι το δείγμα. Οι υψηλότερες τιμές είναι στη φάση της συσσώρευσης, δηλαδή στο τέλος του κύκλου άνθρακα, όπου τα βακτήρια είναι πλούσια σε PHAs και, έτσι, αυξάνεται η μάζα τους. Λόγω της διαδικασίας αλλαγής τροφοδοσίας, κατά την οποία τα 2/3 του αντιδραστήρα μετά την καθίζηση απομακρύνονται, μέρος της βιομάζας συμπαρασύρεται, με αποτέλεσμα την πτώση των TSS και VSSστην αρχή κάθε κύκλου τροφοδοσίας. Η μικρή αύξηση στο τέλος του κύκλου αζώτου οφείλεται στο στάδιο της ανάπτυξης της καλλιέργειας των μικροοργανισμών που έχουν επιβιώσει. Σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρείται μικρή πτώση των στερεών, γιατί οι ικανοί συσσωρευτές ΠΥΑ στο στάδιο αζώτου αναπτύσσονται, ενώ όσοι μικροοργανισμοί δεν έχουν την ικανότητα να συσσωρεύουν ΠΥΑ, δεν επιβιώνουν, οδηγώντας σε μικρή μείωση των στερεών.

Στην μικτή καλλιέργεια τα στερεά μετά από 24 ώρες από την αλλαγή τροφοδοσίας είναι περισσότερα, σε σύγκριση με την βιβλιογραφία όπου μετριούνται τα στερεά σε καθαρές καλλιέργειες [18].

Τα ολικά αιωρούμενα στερεά, μέχρι και το 1^{ο} στάδιο της τροφοδοσίας, έχουν εύρος τιμών από 3,5 έως 5 mg/L και τα πτητικά αιωρούμενα στερεά από 2,5 έως 4,5 mg/L. Μετά τη προσθήκη 70% πραγματικού αποβλήτου,οι τιμές των στερεών στο διάλυμα μειώνονται. Όπως προαναφέρθηκε για την ένδειξη της οπτικής πυκνότητας, η νέα τροφοδοσία κατέστησε στα βακτήρια πιο δύσκολη την επιβίωση, με αποτέλεσμα την απομάκρυνση νεκρών μικροοργανισμών με το τέλος των κύκλων της νέας τροφοδοσίας.

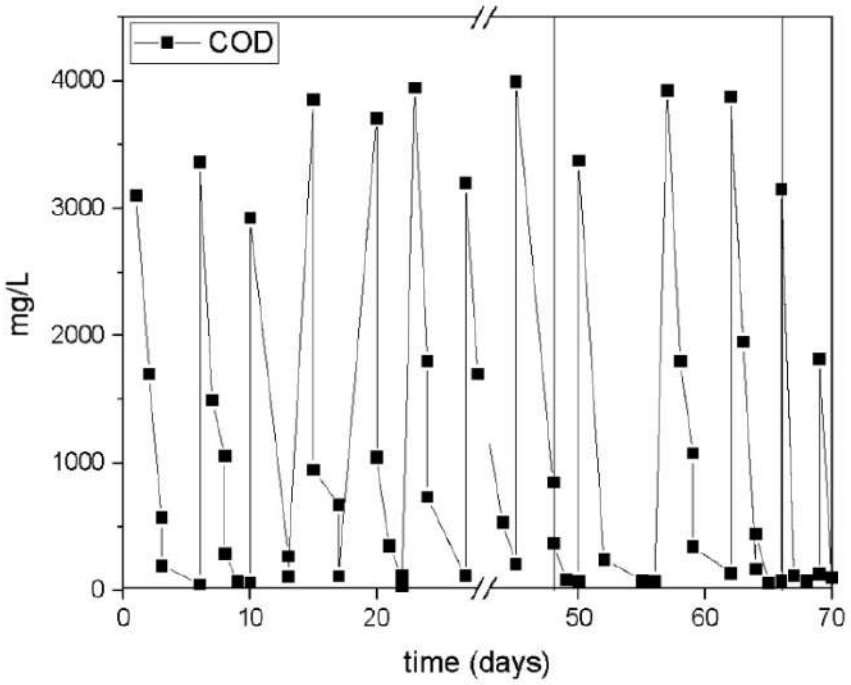
Πίνακας 3.1 Μετρήσεις pH, OD και στερεών

	pH	**OD**	**TSS (g/L)**	**VSS (g/L)**
Φάση 1 30:70 COD	6,5-8,5	2,193-3,271	4,00	3,40
Φάση 2 70:30 COD		1,971-2,995	2,89	2,30
Φάση 3 100:0 COD		1,831	1,91	1,30

Συγκεντρωτικά οι τιμές για τα παραπάνω διαγράμματα παρουσιάζονται στον πίνακα 3.1.

Χημικά Απαιτούμενο Οξυγόνο (COD)

Ουσιαστικά, η ένδειξη αυτή δείχνει την ποσότητα των οργανικών ενώσεων της τροφοδοσίας που έχουν απομείνει. Οι επιθυμητές τιμές είναι χαμηλές,καθώς αυτό επιβεβαιώνει την ομαλή κατανάλωση των αποβλήτων από τα βακτήρια.



Εικόνα3.4 Διάγραμμα κατανάλωσης του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου του αντιδραστήρα συναρτήσει του χρόνου

Η κατανάλωση του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου έχει διττή σημασία, καθώς επιβεβαιώνει την συντήρηση της βιομάζας, αλλά και τη πιθανή συσσώρευση βιοπλαστικούαπό τους μικροοργανισμούς. Στην αρχή κάθε κύκλου άνθρακα εντοπίζονται οι υψηλότερες τιμές καθώς η τροφοδοσία είναι πλούσια σε οργανικές ενώσεις (περίπου 4000 mg/L). Σημαντική παρατήρηση αποτελεί η αμελητέα διακύμανση των τιμών των κορυφών κατά την διάρκεια σταδιακής προσθήκης πραγματικού αποβλήτου. Αυτό δηλώνει την επάρκεια του πραγματικού αποβλήτου σε οργανικές ενώσεις. Η πτώση της τιμής στο τέλος κάθε κύκλου άνθρακα δηλώνει την κατανάλωση των ενώσεων από τους μικροοργανισμούς, απαραίτητο για την ανάπτυξη και, κυρίως, την συσσώρευση βιοπλαστικού στα βακτήρια.Στην τελευταία φάση των αλλαγών τροφοδοσίας άνθρακα παρατηρείται πως ο άνθρακας καταναλώνεται στο πρώτο κιόλας 24ωρο. Αυτό ενδέχεται να υποδηλώνει την προσαρμογή των μεταβολικών οδών των βακτηρίων για τον μεταβολισμό των λιπαρών οξέων που κυριαρχούν στην πραγματική

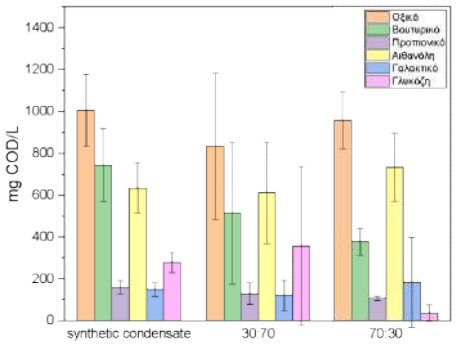
τροφοδοσία[49]. Οι κάθετες γραμμές υποδεικνύουν τις αλλαγές στη σύσταση τροφοδοσίας. Στη δεύτερη γραμμή υποδηλώνεται αλλαγή σε 100% φυσικό απόβλητο,για την οποία δεν ήταν εφικτή η περαιτέρω μελέτη λόγω κλειστής σχολής.

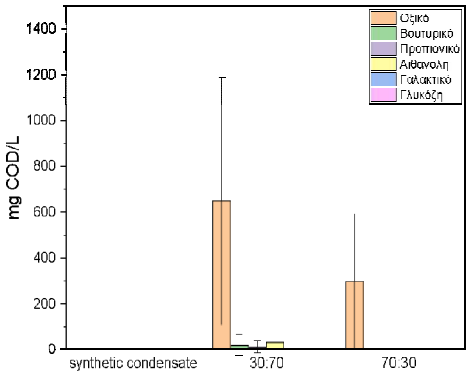
Αναλυτικότερα οι μετρήσεις από τον αντιδραστήρα για αρχή και τέλος κύκλου, καθώς και οι μειώσεις, φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 3.2: Μετρήσεις από τον αντιδραστήρα για αρχή και τέλος κύκλου και οι μειώσεις

	Φάση 1			**Φάση 2**			**Φάση 3**		
	Αρχή κύκλου C	**Τέλος κύκλου C**	**Reduction**	**Αρχή κύκλου C**	**Τέλος κύκλου C**	**Reduction**	**Αρχή κύκλου C**	**Τέλος κύκλου C**	**Reduction**
Οξικό Οξύ (mg/L)	834,72 ± 348,45	651,27 ± 538,22	21,98	958,64 ± 136,49	299,15 ±294,73	68,79	130,08 ±51,76	12,51 ±27,96	100
Προπιονικό Οξύ (mg/L)	130,08 ± 51,76	12,51 ± 27,96	90,39	107,36 ± 9,39	0	100	73,94 ±0	0	100
Βουτυρικό Οξύ (mg/L)	516,51 ± 339,27	21,07 ± 47,12	95,92	378,92 ± 62,36	24,62 ± 49,24	93,50	145,44 ±0	0	100
Αιθανολή (mg/L)	612,68 ± 242,96	36,37 ± 0,03	94,01	734,57 ± 162,39	0	100			
Γαλακτικό Οξύ (mg/L)	120,86 ± 73,04	0	100						
Γλυκόζη (mg/L)	357,70 ± 379,41	0	100						

Εικόνα 3.5 Διαγράμματα κατανάλωσης οργανικού φορτίου στην φάση 1 και 2





Αρχικά, παρατηρείται ότι με την αύξηση του ποσοστού του πραγματικού αποβλήτου, οι ποσότητες της γλυκόζης, της αιθανόλης και του γαλακτικού οξέως εκμηδενίζονται. Επομένως, το condensateείναι πλούσιο σε οξικό οξύ, βουτυρικό οξύ και προπιονικό οξύ.

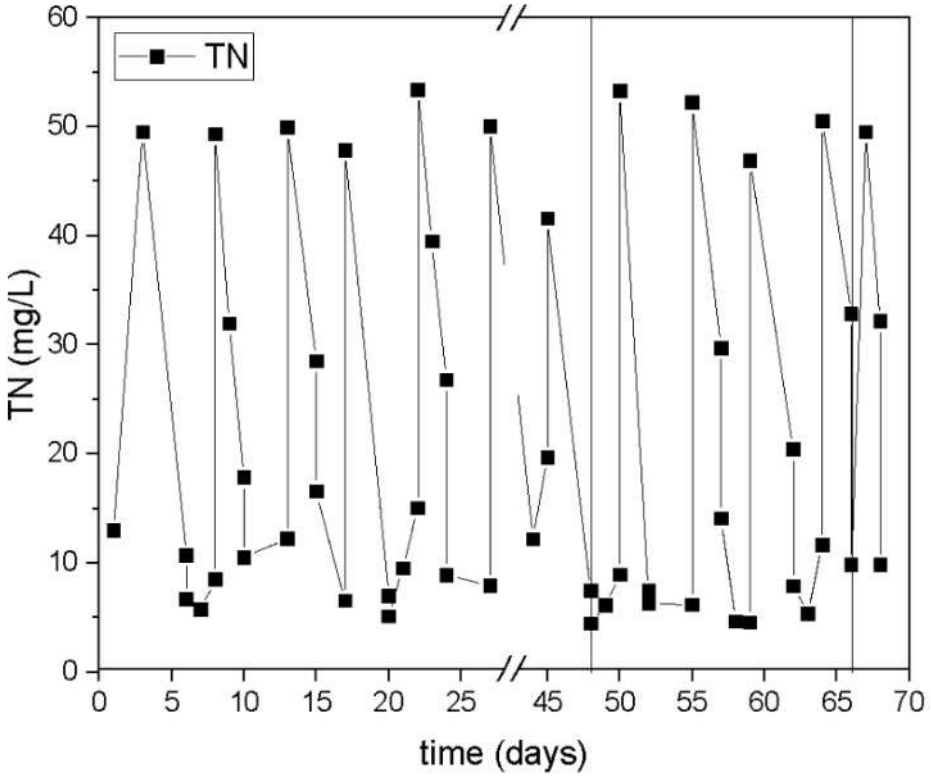
Σχετικά με την κατανάλωση των συστατικών, στην πρώτη φάση το γαλακτικό οξύ και η γλυκόζη καταναλώνονται εξ ολοκλήρου ενώ παράλληλα η μείωση του βουτυρικού οξέος από την αρχή έως το τέλος του κύκλου είναι σημαντική (95,92%). Το οξικό οξύ φαίνεται να έχει μικρή κατανάλωση.

Στην δεύτερη φάση η γλυκόζη και το γαλακτικό οξύ δεν εντοπίζονται στην αρχή του κύκλου. Η κατανάλωση του προπιονικού οξέως αυξάνεται (από 90,39% σε 100%). Κάτι τέτοιο οφείλεται πιθανώς στην αλλαγή της καλλιέργειας, καθώς με τη προσθήκη νέου υποστρώματος οι μικροοργανισμοί που δεν κατάφεραν να προσαρμόσουν τον μεταβολισμό τους στις νέες συνθήκες, δεν επιβιώσαν και απομακρύνθηκαν με την αλλαγή της τροφοδοσίας.

Στην τελευταία φάση, τα τρία πλέον συστατικά που εντοπίζονται στη νέα τροφοδοσία καταναλώνονται εξ ολοκλήρου από τους μικροοργανισμούς.

Ολικό Άζωτο

Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζεται η κατανάλωση ολικού αζώτου συναρτήσει του χρόνου. Το μετρούμενο οργανικό άζωτο παρουσιάζει μέγιστο στην αρχή κάθε κύκλου αζώτου λόγω της ουρίας με τιμές στα 50 mg/L. Η κατανάλωση γίνεται εντός 48 ωρών. Οι μετρήσεις στο τέλος κάθε κύκλου είναι πολύ χαμηλές, γύρω στα 5 mg/L, γεγονός που υποδεικνύει την κατανάλωση του αζώτου από τους μικροοργανισμούς και την ανάπτυξη τους. Οι κάθετες γραμμές υποδεικνύουν τις αλλαγές στη σύσταση τροφοδοσίας. Στη δεύτερη γραμμή έγινε υποκατάσταση σε 100% φυσικό απόβλητο, αλλάδεν ήταν εφικτή η περαιτέρω μελέτη της συγκεκριμένης φάσης λόγω κλειστής σχολής.

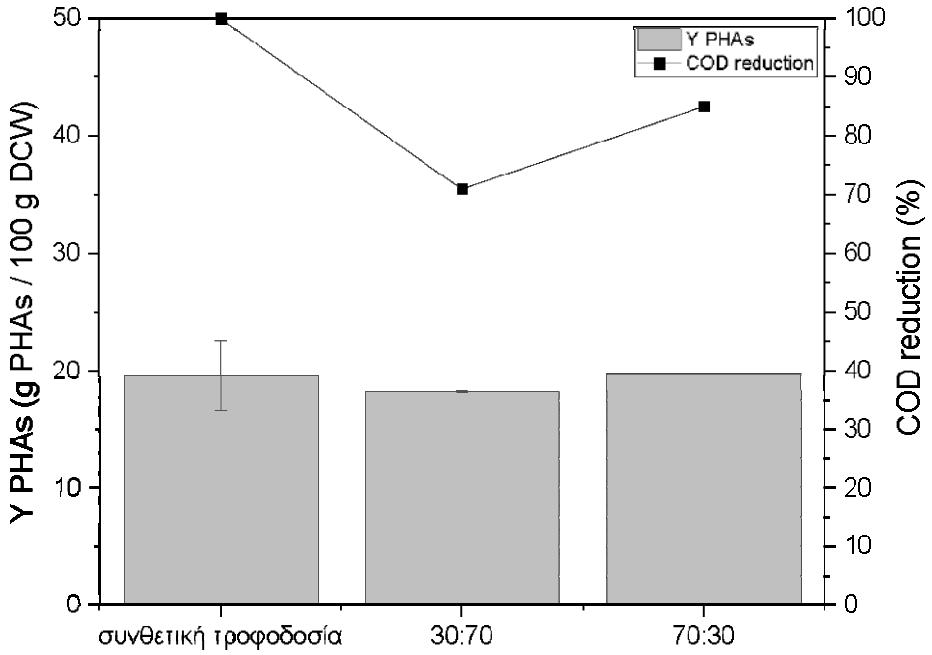


Εικόνα 3.6 Ολικό Άζωτο συναρτήσει του χρόνου

Η κατανάλωση του αζώτου παραμένει σταθερή και μετά τις αλλαγές στην σύσταση της τροφοδοσίας. Μιας και η κατανάλωση του αζώτου γίνεται εντός δύο ημερών, επιτυγχάνεται η πλήρης απουσία του κατά την τροφοδοσία άνθρακα, ώστε να διατηρείται ο περιορισμός ενός θρεπτικού συστατικού για την συσσώρευση PHAs. Οι μικρές ποσότητες αζώτου που παραμένουν πιθανώς οφείλονται σε αδυναμία ορισμένων μικροοργανισμών να επιβιώσουν.

Απόδοση PHAs

Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζεται η συσσώρευση PHAs και η κατανάλωσης του οργανικού φορτίου συναρτήσει του χρόνου. Η μείωση του δείκτη COD αναλογεί στην παραγωγή του βιοπλαστικού. Η τρίτη φάση των πειραμάτων έχει την ίδια απόδοση με την παραγωγή των PHAs στην φάση του συνθετικού αποβλήτου ως αποκλειστική πηγή άνθρακα. Παρά την μείωση των ζωντανών μικροβίων στην καλλιέργεια, όπως διαπιστώθηκε από της παραπάνω ενδείξεις των διαγραμμάτων, η κατανάλωση VFAs και επομένως, συσσώρευση PHAs παραμένει σταθερή. Έτσι τα βακτήρια που επιβιώνουν είναι λιγότερα και αποδοτικότερα σε PHAs [49].



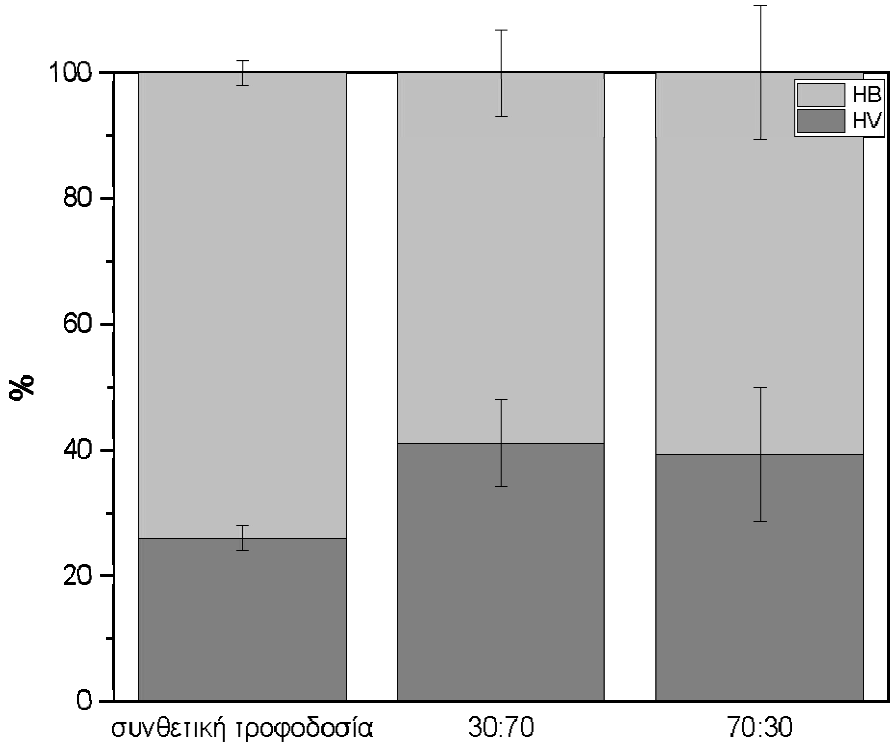
Εικόνα 3.7 Συσσώρευση PHAs των μικροοργανισμών του αντιδραστήρα συναρτήσει της κατανάλωσης πτητικών λιπαρών οξέων της κάθε τροφοδοσίας.

Στην πρώτη φάση το ποσοστό κατανάλωσης των VFAs, βάσει της μέτρησης του COD, είναι 100% και η παραγωγή PHAs είναι 20g/100g DCW. Με την προσθήκη 30% φυσικού αποβλήτου η απόδοση σε PHAs έπεσε στο 17 g/100g DCW, καθώς επίσης και η κατανάλωση των πτητικών λιπαρών οξέων παρουσίασε σημαντική μείωση στο 70%. Στην τρίτη φάση, όπου το πραγματικό απόβλητο αποτελεί το 70% της τροφοδοσίας, η κατανάλωση των VFAs ανέρχεται στο 85% της τροφοδοσίας, υψηλότερα, δηλαδή, από την τροφοδοσία της πρώτης φάσης, και η παραγωγή βιοπλαστικού επανέρχεται στο 20 g/100g DCW.

Σύσταση επί τοις εκατό σε HB/HV

Στο σχήμα 3.8 φαίνεται η σύσταση παραγόμενων πολυμερών σε κάθε φάση της έρευνας. Τα συγκεκριμένα μονομερή μπορεί να ανιχνεύονται είτε σε συμπολυμερισμό

είτε σε ομοιοπολυμερή για το κάθε μονομερές ξεχωριστά. Η παραγωγή υδροξυβουτυτικών και υδροξυβαλερικών είναι σύμφωνη με την βιβλιογραφία, καθώς τέτοια είδη PHAs αναμένονται από την κατανάλωση οξικού οξέος, το βουτυρικού οξέος, γλυκόζης και γαλακτικού οξέος. Τα προαναφερθέντα οξέα παράγουν HB, ωστόσο, σε περίπτωση συμπολυμερισμού, αναμένεται και η ανίχνευση HV. Τα πολυμερή ή συμπολυμερή που μπορεί να προκύψουν είναι P(3HBco3HV) ή μίγμα του P3HB και P3HV [32] [51].



Εικόνα 3.8 Σύσταση PHAs σε κάθε φάση του πειράματος

Παρατηρείται πως κατά την αύξηση της περιεκτικότητας σε πραγματικό απόβλητο το ποσοστό των HV αυξήθηκε, καθώς η σύσταση στην πρώτη φάση είναι 76% HB και 24%HV,ενώ στην τρίτη φάση είναι 60% HB και 40%HV. Η μικρότερη ποσότητα HV είναι σύμφωνη με την βιβλιογραφία, αφού αποτελεί μόνο μέρος συμπλυμερισμού, ενώ το HB μπορεί να υπάρχει στην παραγόμενη ποσότητα βιοπλαστικών και ως ομοιοπολυμερές. Η αύξηση του ποσοστού HV μπορεί να οφείλεται στην αύξηση του οξικού, προπιονικού και βουτυρικού οξέως με την αύξηση του ποσοστού του πραγματικού αποβλήτου και την εκμηδένιση άλλων συστατικών, όπως η αιθανόλη, η γλυκόζη και το γαλακτικό οξύ.

Το συμπολυμερές P(3HBco3HV) βελτιώνει τις ιδιότητες του βιοπλαστικού. Με την αύξηση του HV το προϊόν είναι λιγότερο εύθραυστο και πιο όλκιμο [52].

Συγκεντρωτικά Χαρακτηρίστηκα των PHAs

Στον πίνακα 3.3 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα χαρακτηριστηκά των PHAsγια κάθε φάση του πειράματος. Συνοπτικά, λοιπόν, η παραγωγή PHAs,με την αύξηση του ποσοστού πραγματικού αποβλήτου στην σύσταση της τροφοδοσίας, αυξάνεται από 18,23gPHAs/ 100gDCWσε 19,82gPHAs/ 100g. Η κατανάλωση του οργανικού φορτίου αυξάνεται κατά 13,96%. Τέλος, η σύσταση των βιοπλαστικών στην πρώτη φάση είναι 41,13/58,87 HB/HV αντίστοιχα, ενώ στην δεύτερη φάση είναι 39,31/60,69 HB/HVαντίστοιχα.

Πίνακας 3.3 Συγκεντρωτικός Πίνακας για τα PHAs

	Συνθετικό Απόβλητο	**Φάση 1 (30/70 σύσταση πραγματικού/ συνθετικού αποβλήτου)**	**Φάση 2 (70/30 σύσταση πραγματικού/ συνθετικού αποβλήτου)**
g PHAs/ 100 g DCW	19,83 ± 3	18,23 ± 0,06	19,82 ± 0,05
COD reduction (%)	100	70,98	84,94
HB (%)	74 ± 2	41,13 ± 6,87	58,87 ± 6,87
HV (%)	26 ± 2	39,31 ± 10,66	60,69 ± 10,66

4. Συμπεράσματα

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η παραγωγή PHAs μέσω μικτής εγκλιματισμένης καλλιέργειας, αξιοποιώντας το υγρό συμπύκνωμα διαδικασίας τεμαχισμού και ξήρανσης τροφικών υπολειμμάτων με αντιδραστήρα άντλησης-πλήρωσης 1L. Η σύσταση της τροφοδοσίας μεταβλήθηκε σε τρεις φάσεις. Αρχικά, το υπόστρωμα άνθρακα αποτελούταν αποκλειστικά από συνθετικό απόβλητο. Στην δεύτερη φάση αντικαταστάθηκε το 30% με πραγματικό απόβλητο, ενώ στην τρίτη φάση αντικαταστάθηκε το 70%.

Σύμφωνα με της αναλύσεις, οι τιμές του pHπαρέμεναν σε αποδεκτά, σύμφωνα με την βιβλιογραφία, όρια. Η συγκέντρωση των ολικών και των πτητικών αιωρούμενων στερεών παρουσίασε μείωση με την προσθήκη πραγματικού αποβλήτου. Η μείωση αυτή οφείλεται στην αλλαγή της βακτηριακής καλλιέργειας και την απομάκρυνση των νεκρών κυττάρων, τα οποία δεν κατάφεραν να προσαρμόσουν τον μεταβολισμό τους στις νέες συνθήκες τροφοδοσίας. Τέλος, το άζωτο, που παρεχόταν μέσω της ουρίας, καταναλωνόταν σε ποσοστό περίπου 90%, γεγονός που υποδηλώνει την μικροβιακή ανάπτυξη.

Συγκριτικά με την φάση του εξ ολοκλήρου συνθετικού αποβλήτου, η απόδοση σε βιοπλαστικάήταν ίδια με αυτήν της τρίτης φάσης, που το 70% του αποβλήτου ήταν πραγματικό. Έτσι, η αξιοποίηση των τροφικών υπολειμμάτων δεν φαίνεται να μειώνει την παραγωγή. Και στις δύο περιπτώσεις η απόδοση άγγιξε το 20mgPHAsσε 100 mg ξηρή βιομάζα.

Παράλληλα, η κατανάλωση των πτητικών λιπαρών οξέων αυξήθηκε από 70%, στην πρώτη φάση, σε 85%, στην δεύτερη, με την προσθήκη του πραγματικού αποβλήτου, σύμφωνα με της μετρήσεις COD. Αυτό συνεπάγεται δυνατότητα αξιοποίησης μεγάλου όγκου αστικών οργανικών υπολειμμάτων και, κατ' επέκταση, την μείωση των αποβλήτων και την παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας. Αξιοσημείωτη είναι η πτώση τόσο της απόδοσης όσο και της κατανάλωσης VFAsστην δεύτερη φάση, όπου το 30% της τροφοδοσίας ήταν πραγματικό απόβλητο.

Η σύσταση του παραγόμενου βιοπλαστικού αποτελούταν στην πρώτη φάση από 24%HV και 76% HB. Με την αύξηση του πραγματικού αποβλήτου η ποσότητα του HV αυξήθηκε και στην τρίτη φάση, η σύσταση κατάληξε σε 40% HV και 60%HB. Η μεταβολή οφείλεται σε διαφορές στη σύσταση του πραγματικού με το συνθετικό απόβλητο. Το βιοπλαστικόπαράγεται είτε ωςσυμπολυμερέςP(3HBco3HV) είτε ως μίγμα του με τα ομοπολυμερήP3HB και P3HV. Η αλλαγή αυτή είναι βελτιωτική για το τελικό προϊόν.

5. Προτάσεις

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η αξιοποίηση του υγρού κλάσματος τροφικών υπολειμμάτων ως βιώσιμη πηγή για την παραγωγή βιοπλαστικών από μικτές μικροβιακές καλλιέργειες.

Για την διερεύνηση αποδοτικότερων συστημάτων μπορούν να δοκιμαστούν μεταβολές στην θερμοκρασία, στον τύπο αντιδραστήρα (CSTR), καθώς ίσως και μικρές μεταβολές στο pH. Κατά αυτόν τον τρόπο θα είναι κατανοητές οι βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης των βακτηρίων και συσσώρευσης βιοπλαστικού με χρήση του συγκεκριμένου υποστρώματος.

Για την βελτιστοποίηση της σχέσης απόδοσης PHAsκαι αξιοποίησης των τροφικών υπολειμμάτων προτείνεται η αύξηση του οργανικού φορτίου στο υπόστρωμα, καθώς η κατανάλωση των VFAsαυξήθηκε με την μεταβολή της τροφοδοσίας σε 70% πραγματικό απόβλητο. Παράλληλα, προτείνεται και η χρήση υποστρώματος άνθρακα από εξ ολοκλήρου πραγματικό απόβλητο.

Για την αξιολόγηση των χαρακτηριστικών των παραγόμενων βιοπλαστικών, προτείνεται ο προσδιορισμός των φυσικοχημικών και μηχανικών ιδιοτήτων των PHAs. 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 και η Δυναμική Μηχανική Ανάλυση (DMA) για τη μελέτη της ιξωδοελαστικής συμπεριφοράς των πολυμερών. Τέλος, μπορούν να πραγματοποιηθούν δοκιμές εφελκυσμού (tensiletest) για τον προσδιορισμό του μέτρου ελαστικότητας και της αντοχής διαρροής.

Χρήσιμη είναι και η προσπάθεια κλιμάκωσης της διεργασίας, όσον αφορά στον όγκο, για πιθανή εξυπηρέτηση μεγαλύτερης μονάδας παραγωγής βιοπλαστικών. Κατά την μελέτη αυτή, μπορούν να προσδιοριστούν και οι βέλτιστες συνθήκες για αυτό το σύστημα.

Η διαδικασία παραλαβής των PHAs μπορεί να διερευνηθεί, επιπλέον, με την δοκιμή άλλων μεθόδων- ενδεχομένως, μια οικολογικότερη μέθοδο με την χρήση πράσινων διαλυτών.

Τέλος, ίσως αξίζει να διερευνηθεί η παραγωγή βιοπλαστικών με αυτήν την τροφοδοσία σε διάφορες καθαρές καλλιέργειες βακτηρίων, εντοπίζοντας με αυτόν τον τρόπο αν πρόκειται για αποδοτικότερη καλλιέργεια.

6. Βιβλιογραφία

1. *Lytras, G., Koutroumanou, E., & Lyberatos, G. (2020). Anaerobic co-digestion of condensate produced from drying of household food waste and waste activated sludge. Journal of Environmental Chemical Engineering, 8(6), 104538. https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104538*
2. *Iroegbu, A. O. C., Ray, S. S., Mbarane, V., Bordado, J. C., & Sardinha, J. P. (2021). Plastic pollution: A perspective on matters arising: Challenges and opportunities. ACS Omega, 6(32), 20705-20712. https://doi.org/10.1021/acsomega.1c02760*
3. *Poddar, T., De, N., & Sarkar, S. (2020). Efficient engineering techniques for segregation and management of non-biodegradable wastes: Saving the earth by replenishing its dearth. Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section A: Physical Sciences. https://www.researchgate.net/publication/345427408_Efficient_Engineering_Techniques_for_Segregation_and_Management_of_NonBiodegradable_Wastes_Saving_the_Earth_by_Replenishing_its_Dearth*
4. *British Plastics Federation. (2014). A history of plastics. British Plastics Federation. https://www.bpf.co.uk/press/Oil_Consumption.aspx*
5. *Geyer, R. (2020). A brief history of plastics. In M. Burguera & M. Burguera (Eds.), Mare Plasticum - The Plastic Sea (pp. 9-15). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-38945-1_2*
6. *Shen, M., Ye, S., Zeng, G., Zhang, Y., Xing, L., Tang, W., & Wen, X. (2020). Are biodegradable plastics a promising solution to solve the global plastic pollution? Environmental Pollution, 263, 114469. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114469*
7. *Shanmugam, V., Das, O., Neisiany, R. E., Babu, K., Singh, S., Hedenqvist, M. S., Berto, F., & Ramakrishna, S. (2020). Polymer recycling in additive manufacturing: An opportunity for the circular economy. Materials Circular Economy, 2(1). https://doi.org/10.1007/s42824-020-00007-9*
8. *Silva, F. C., Shibao, F. Y., Kruglianskas, I., & Barbieri, J. C. (2020). Circular economy implementation: A comparative study between SMEs and large companies in Brazil. Journal of Cleaner Production, 280, 124697. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124697*
9. *European Parliament. (2015). Circular economy: Definition, importance and benefits. European Parliament. https://www.europarl.europa.eu/topics/en/article/20151201STO05603/circular-economy-definition-importance-and-benefits*
10. *Circular Economy: A review of challenges, strategies and tools for sustainable supply chain. Holcim. https://www.holcim.com/sustainability/circulareconomy*
11. *Ritchie, R. (2022). Recycling alone won't save the planet – but it does help. Eco Action. https://ecorotheraction.org/news-1/recycling-alone-wont-save-the-planet-but-it-does-help*
12. *European Bioplastics e.V. (2020). Materials. European Bioplastics.*
13. *Chng, J. (2021). PHA: Is it the future of bioplastics? SourceGreen. https://www.sourcegreen.co/plastics/pha-biobased-polymer-packaging*

14. *Jõgi, K., & Bhat, R. (2020). Valorization of food processing wastes and by-products for bioplastic production. Sustainable Chemistry and Pharmacy, 18, 100326. https://doi.org/10.1016/j.scp.2020.100326*
15. *Ntaikou, I., Kourmentza, C., Koutroul, E. C., Stamatelatou, K., Zampraka, A., Kornaros, M., & Lyberatos, G. (2008). Exploitation of olive oil mill wastewater for combined biohydrogen and biopolymers production. Bioresource Technology, 99(13), 5654-5660. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.10.039*
16. *Kourmentza, C., Ntaikou, I., Kornaros, M., & Lyberatos, G. (2014). Polyhydroxyalkanoates from Pseudomonas sp. using synthetic and olive mill wastewater under limiting conditions. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 22, 113-121. https://doi.org/10.1016/j.jiec.2014.06.030*
17. *Tsang, Y. F., Kumar, V., Samadar, P., Yang, Y., Lee, J., Ok, Y. S., Song, H., Kim, K. H., Kwon, E. E., & Jeon, Y. J. (2019). Production of bioplastic through food waste valorization. Environment International, 127, 625-636. https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.04.076*
18. *Kourmentza, C., Ntaikou, I., Kornaros, M., & Lyberatos, G. (2009). Production of PHAs from mixed and pure cultures of Pseudomonas sp. using short-chain fatty acids as carbon source under nitrogen limitation. Desalination, 248(1-3), 101-109. https://doi.org/10.1016/j.desal.2008.05.077*
19. *Koller, M., Salerno, A., & Reiterer, A. (2012). Sugarcane as feedstock for biomediated polymer production. Bioresource Technology, 124, 215-223. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.010*
20. *Anjum, A., Zuber, M., Zia, K. M., Noreen, A., Anjum, M. N., & Tabasum, S. (2016). Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. International Journal of Biological Macromolecules, 89, 161-174. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.069*
21. *Lau, N. S., Foong, C. P., Ong, H. M., & Ong, H. C. (2020). Polyhydroxyalkanoates (PHA): Biodegradable plastics as sustainable solutions for waste management. Bioengineering & Translational Medicine, 5(3), e10147. https://doi.org/10.1002/btm2.10147*
22. *Valappil, S. P., Misra, S. K., Boccaccini, A. R., Keshavarz, T., Bucke, C., & Roy, I. (2007). Large-scale production and efficient recovery of PHB with desirable material properties, from the newly characterised Bacillus cereus SPV. Journal of Biotechnology, 132(3), 251-258. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.03.019*
23. *Sudesh, K., & Iwata, T. (2008). Sustainability of biobased and biodegradable plastics. Clean - Soil, Air, Water, 36(5-6), 433-442. https://doi.org/10.1002/clen.200700183*
24. *van der Walle, G. A., de Koning, G. J., Weusthuis, R. A., & Eggink, G. (2001). Properties, modifications and applications of biopolyesters. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 71, 263-291. https://doi.org/10.1007/3-540-40021-3_11*
25. *Keshavarz, T., & Roy, I. (2010). Polyhydroxyalkanoates: Bioplastics with a green agenda. Current Opinion in Microbiology, 13(3), 321-326. https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.02.006*
26. *Raza, Z. A., Abid, S., & Banat, I. M. (2018). Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. International Biodeterioration & Biodegradation, 126, 45-56. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.10.001*

27. *Freier, T., Kunze, C., Nischan, C., Kramer, S., Sternberg, K., Saß, M., & Schmitz, K. P. (2002). In vitro and in vivo degradation studies for development of a biodegradable patch based on poly(3-hydroxybutyrate). Biomaterials, 23(13), 2649-2657. https://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00400-7*
28. *Peña, C., Castillo, T., García, A., Millán, M., & Segura, D. (2014). Biotechnological strategies to improve production of microbial poly-(3-hydroxybutyrate): A review of recent research work. Microbial Biotechnology, 7(4), 278-293. https://doi.org/10.1111/1751-7915.12162*
29. *Bhuwal, A. K., Singh, G., Aggarwal, N. K., Goyal, V., & Yadav, A. (2013). Isolation and screening of polyhydroxyalkanoates producing bacteria from pulp, paper, and cardboard industry wastes. International Journal of Biomaterials, 2013, 752821. https://doi.org/10.1155/2013/752821*
30. *Sabirova, J. S., Ferrer, M., Regenhardt, D., Timmis, K. N., & Golyshin, P. N. (2006). Proteomic insights into metabolic adaptations in Alcanivorax borkumensis induced by alkane utilization. Journal of Bacteriology, 188(10), 3763-3773. https://doi.org/10.1128/JB.188.10.3763-3773.2006*
31. *Thakur, V. K., Thakur, M. K., Raghavan, P., & Kessler, M. R. (2014). Progress in green polymer composites from lignin for multifunctional applications: A review. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2(5), 1072-1092. https://doi.org/10.1021/sc500087z*
32. *Laycock, B., Halley, P., Pratt, S., Werker, A., & Lant, P. (2013). The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. Progress in Polymer Science, 38(3-4), 536-583. https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2012.06.003*
33. *Philip, S., Keshavarz, T., & Roy, I. (2007). Polyhydroxyalkanoates: Biodegradable polymers with a range of applications. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 82(3), 233-247. https://doi.org/10.1002/jctb.1667*
34. *Khanna, S., & Srivastava, A. K. (2005). Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. Process Biochemistry, 40(2), 607-619. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.01.053*
35. *Rai, R., Keshavarz, T., Roether, J. A., Boccaccini, A. R., & Roy, I. (2011). Medium chain length polyhydroxyalkanoates, promising new biomedical materials for the future. Materials Science and Engineering: R: Reports, 72(3), 29-47. https://doi.org/10.1016/j.mser.2010.11.002*
36. *Bucci, D. Z., Tavares, L. B. B., & Sell, I. (2005). PHB packaging for the storage of food products. Polymer Testing, 24(5), 564-571. https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2005.02.008*
37. *Koller, M., & Braunegg, G. (2015). Polyhydroxyalkanoates: Basics, production, and applications. In Pandey, A., Negi, S., & Soccol, C. R. (Eds.), Current Developments in Biotechnology and Bioengineering (pp. 355-396). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63264-9.00017-6*
38. *Posada, J. A., Naranjo, J. M., López, J. A., Higuita, J. C., & Cardona, C. A. (2011). Design and analysis of poly-3-hydroxybutyrate production processes from crude glycerol. Process Biochemistry, 46(1), 310-317. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.09.003*
39. *Koller, M., Niebelschütz, H., & Braunegg, G. (2013). Strategies for recovery and purification of poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] (PHA) biopolyesters from surrounding*

biomass. Engineering in Life Sciences, 13(6), 549-562. https://doi.org/10.1002/elsc.201300021

40. *Peña, C., Sánchez, A., Prieto, M. A., & Galán, B. (2016). Biotechnological production of polyhydroxyalkanoates in response to the sugar platform from residual lignocellulosic biomass. Applied Microbiology and Biotechnology, 100(20), 9271-9280. https://doi.org/10.1007/s00253-016-7765-9*
41. *Cheng, H., Deng, Y., & He, L. (2021). Production of polyhydroxyalkanoates from carbon sources of different degrees of reduction: A theoretical study and analysis. Bioengineering, 8(4), 57. https://doi.org/10.3390/bioengineering8040057*
42. *Oliveira, F. C., Dias, M. L., Castilho, L. R., & Freire, D. M. G. (2004). Characterization of polyhydroxyalkanoates produced by Pseudomonas aeruginosa from vegetable oils. International Journal of Biological Macromolecules, 30(1), 37-45. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2003.08.001*
43. *Volova, T. G., & Shishatskaya, E. I. (2012). A new aspect of utilization of polyhydroxyalkanoates: Production of biodegradable fibers and films. Bioresource Technology, 114, 294-302. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.004*
44. *Sathian, N., & Jayanth, P. (2015). Sustainable and biodegradable polyhydroxyalkanoates: Production and applications. International Journal of Environmental Technology and Management, 18(3), 193-214. https://doi.org/10.1504/IJETM.2015.071612*
45. *Obruca, S., Sedlacek, P., Koller, M., & Kucera, D. (2020). Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates production: From raw materials to biotechnological applications. Biotechnology Advances, 42, 107582. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107582*
46. *Verlinden, R. A. J., Hill, D. J., Kenward, M. A., Williams, C. D., & Radecka, I. (2007). Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. Journal of Applied Microbiology, 102(6), 1437-1449. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03335.x*
47. *Madison, L. L., & Huisman, G. W. (1999). Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): From DNA to plastic. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 63(1), 21-53. https://doi.org/10.1128/MMBR.63.1.21-53.1999*
48. *Zinn, M., Hany, R., & Schlegel, H. G. (2001). Production of poly(3-hydroxyalkanoates) by bacterial fermentation of renewable carbon sources. Macromolecular Bioscience, 1(2), 53-65. https://doi.org/10.1002/1521-3927(20010201)1:2<53::AID-MABI53>3.0.CO;2-K*
49. *Pillai, A. B., Kumar, A. J., & Mohan, S. V. (2017). Polyhydroxyalkanoates (PHA) production using synthetic and waste feedstock: A futuristic approach. Bioresource Technology, 245, 1601-1609. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.060*
50. *Liu, H., Chen, J., Zhang, X., Wang, Z., & Xie, H. (2020). Fermentation optimization for enhanced polyhydroxyalkanoate production from crude glycerol by Cupriavidus necator. Journal of Bioscience and Bioengineering, 129(1), 79-85. https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.07.014*
51. *Povolo, S., Toffano, P., Basaglia, M., & Casella, S. (2010). Polyhydroxyalkanoates production by Pseudomonas pseudoalcaligenes from waste materials. Bioresource Technology, 101(11), 3410-3416. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.043*
52. *Shrivastav, A., Mishra, S. K., & Mishra, S. (2010). Polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis by Bacillus megaterium using sugar industry waste water. Bioresource Technology, 101(11), 3520-3523. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.084*

53. *Getachew, A., & Woldesenbet, F. (2016). Production of biodegradable plastic by polyhydroxybutyrate (PHB) accumulating bacteria using low-cost agricultural waste material. BMC Research Notes, 9, 509. https://doi.org/10.1186/s13104-016-2310-1*
54. *O'Connor, D., Combie, J., & Smith, Z. (2002). Production of polyhydroxyalkanoates from Ralstonia eutropha in a novel enclosed reactor. Journal of Biotechnology, 96(2), 115-120. https://doi.org/10.1016/S0168-1656(02)00011-7*
55. *Khardenavis, A. A., Sinha, A., & Mudliar, S. N. (2007). Biodegradable plastics production using a biphasic fermentation process. Journal of Environmental Management, 83(2), 199-206. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2006.02.003*