

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ



Διπλωματική Εργασία

**«Βιοαποικοδόμηση απόβλητων τυροκομείου από το
βακτήριο *Pseudomonas* sp. pHDV1»**

Παππά Ευγενία

Υπεύθυνος καθηγητής: Τσιώτης Γεώργιος

Ηράκλειο 2024

UNIVERSITY OF CRETE
DEPARTMENT OF CHEMISTRY
DIVISION OF BIOCHEMISTRY



Bachelor's Thesis

**«Biodegradation of dairy waste by the bacteria
Pseudomonas sp. phDV1»**

Pappa Evgenia

Supervisor: Tsiotis Georgios

Heraklion 2024

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στον τομέα Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης. Ολοκληρώνοντας τις προπτυχιακές μου σπουδές θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους ανθρώπους με τους οποίους συνεργάστηκα το τελευταίο διάστημα.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης για τις σπουδές υψηλού επιπέδου αλλά και για την υλικοτεχνική υποδομή που μου προσέφερε ώστε να μπορέσω να διεκπεραιώσω την διπλωματική μου εργασία.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, Γεώργιο Τσιώτη, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, καθώς μου έδωσε την δυνατότητα να εργαστώ στο εργαστήριό του για να εκπονήσω την παρούσα εργασία και ήταν πάντα διαθέσιμος να προσφέρει καθοδήγηση και βοήθεια. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον δεύτερο αξιολογητή της πτυχιακής μου, Δημήτριο Γανωτάκη, για την προσοχή και τον χρόνο που διέθεσε για την ανάγνωση και την αξιολόγηση της εργασίας μου.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω τον υποψήφιο διδακτορικό φοιτητή του εργαστηρίου, Αλέξανδρο Λυρατζάκη, ο οποίος ήταν ανά πάσα στιγμή διαθέσιμος να παρέχει οποιαδήποτε βοήθεια. Οι συμβουλές και οι συζητήσεις που προσέφερε ήταν ιδιαίτερα σημαντικές και καταλυτικές για την πραγματοποίηση της συγκεκριμένης εργασίας. Ένα εγκάρδιο ευχαριστώ θα ήθελα να δώσω και στα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, με τα οποία συνεργαστήκαμε εξαιρετικά σε ένα πολύ ευχάριστο περιβάλλον.

Θα ήθελα να εκφράσω ακόμα τις ευχαριστίες μου στα μέλη των εργαστηρίων του κυρίου Γανωτάκη και του κυρίου Παυλίδη, για την βοήθεια και την συνεργασία που παρείχαν. Πιο συγκεκριμένα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδακτορικό φοιτητή Ναπολέον Στρατηγάκη, για τις γνώσεις και τις συμβουλές που μου προσέφερε απλόχερα πάνω στο αντικείμενο μελέτης της εργασίας μου.

Τέλος, θα ήθελα να πω ένα τεράστιο ευχαριστώ στους κοντινούς μου ανθρώπους, στους φίλους μου, στο αγόρι μου και στην οικογένειά μου, που ήταν εκεί για μένα, στηρίζοντάς με και δίνοντας μου δύναμη να συνεχίσω και να εκπληρώσω τους στόχους μου.

Εξεταστική επιτροπή:

Γεώργιος Τσιώτης (επιβλέπων καθηγητής)

Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Δημήτριος Γανωτάκης

Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Περίληψη

Τα πλαστικά συνιστούν σήμερα ένα κρίσιμο πρόβλημα για την ανθρώπινη κοινωνία, αφού μακροχρόνια χαρακτηρίζονται ως ιδιαίτερα επιβλαβή για το φυσικό περιβάλλον και μέχρι σήμερα δεν εντοπίζεται κάποιος εύκολος τρόπος για να επιτευχθεί η διαχείρισή τους. Ένας τρόπος που φαίνεται να είναι πιο αποτελεσματικός σε σχέση με την ανακύκλωση και την αποτέφρωση είναι η σταδιακή αντικατάσταση των βασιζόμενων σε προϊόντα του πετρελαίου πλαστικών από βιοπλαστικά, τα οποία είναι πολύ πιο φιλικά προς το περιβάλλον, λόγω της δυνατότητάς τους να μπορούν να συντεθούν από μικροοργανισμούς καθώς και εξαιτίας της σημαντικής βιοαποικοδομησιμότητάς τους. Ένα τέτοιο είδος βιοπολυμερών είναι και τα πολύ-υδρόξυαλκανοϊκά (PHAs), τα οποία φέρουν ένα εύρος απαιτούμενων χαρακτηριστικών που τα καθιστούν ιδανικές εναλλακτικές για τον συγκεκριμένο ρόλο. Το πολύ-υδρόξυβουτυρικό οξύ (PHB) συνιστά το απλούστερο και το πιο ευρέως μελετημένο PHA μέχρι σήμερα. Το βακτήριο *Pseudomonas* sp. rhDV1 είναι ένα αρνητικό κατά Gram βακτήριο το οποίο είναι γνωστό ότι μπορεί να αξιοποιήσει ρύπους οι οποίοι είναι τοξικοί, τόσο για το φυσικό περιβάλλον όσο και για τον άνθρωπο, για την ανάπτυξή του. Ένα σημαντικό ρυπογόνο απόβλητο συνιστά και το τυρόγαλα, που είναι ένα πλούσιο σε οργανικά συστατικά μείγμα του οποίου όμως η απόρριψη στην φύση είναι απαγορευτική. Συγχρόνως, ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός έχει την δυνατότητα όταν βρεθεί υπό συνθήκες καταπόνησης έχει την ικανότητα να συνθέσει PHB. Τα PHBs στο συγκεκριμένο βακτήριο παράγονται ενδοκυτταρικά και οργανώνονται σε σφαιρικές δομές, τα καρβωσώματα. Αυτές οι δομές εμφανίζουν στην επιφάνειά τους πρωτεΐνες οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη δομή (φασίνες), τη ρύθμιση (ρυθμιστικοί παράγοντες, PhaR), την παραγωγή (συνθάσες, PhaC) και την αποικοδόμηση (αποπολυμεράσες, PhaZ) των PHB. Η παρούσα εργασία εστιάζει στην αξιοποίηση του τυρογάλακτος ως βασικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη του *Pseudomonas* sp. rhDV1 σε διαφορετικές συνθήκες, καθώς και στην ανίχνευση παραγωγής PHB σε κάθε διαφορετική συνθήκη που μελετάται. Ακόμη, μελετάται κατά πόσο η ανάπτυξη του βακτηρίου στο συγκεκριμένο απόβλητο μειώνει το συνολικό του ρυπογόνο φορτίο.

Λέξεις κλειδιά: *Pseudomonas* sp. rhDV1, PHB, Τυρόγαλα, Βιοπλαστικά

Abstract

Plastics are today a critical problem for human society, as they are characterized as particularly harmful to the natural environment in the long term and to date, no easy way to achieve their management has been found. One way that appears to be more effective than recycling and discarding is to gradually replace petroleum-based plastics with bioplastics, which are much more environmentally friendly due to their ability not to be synthesized from microorganisms, as well as due to their significant biodegradability. One such type of biopolymers are polyhydroxyalkanoates (PHAs), which carry a range of desirable characteristics that make them ideal alternatives for this role. Polyhydroxybutyric acid (PHB) is the simplest and most widely studied PHA to date. The bacterium *Pseudomonas* sp. phDV1 is a Gram-negative bacterium known to be able to utilize waste that is toxic to both nature and humans for its growth. Cheese whey is also an important polluting waste, which is rich in organic components, but its disposal in nature is prohibited. At the same time, it is known that the specific microorganism can produce PHB when under stress conditions. The PHBs in this specific bacterium are produced intracellularly and are organized into granules, known as carbosomes. These structures display on their surface proteins responsible for the structure (phasins), regulation (regulatory factors, PhaR), production (synthases, PhaC) and degradation (depolymerases, PhaZ) of PHBs. The present work focuses on the utilization of cheese whey as a basic substrate for the growth of the wild type of *Pseudomonas* sp. phDV1 in different conditions each time, as well as detecting PHB in each different condition studied. Furthermore, it is being studied whether the growth of this bacterium in the specific waste, can reduce the total pollutant load of the cheese whey, making it safer for the environment.

Key words: *Pseudomonas* sp. phDV1, PHB, Cheese whey, Bioplastics

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή	9
1.1. Γενικά περί πλαστικών.....	9
1.2. Βιομηχανικά απόβλητα.....	10
1.3. Πολύ-υδροξυαλκανοϊκά (PHAs).....	11
1.3.1. Γενικά χαρακτηριστικά.....	11
1.3.2. Ιδιότητες.....	13
1.3.3. Εφαρμογές.....	13
1.3.4. Πρωτεΐνες που σχετίζονται με την επιφάνεια των σφαιριδίων PHA (Granule Associated Proteins, GAPS).....	14
1.3.5. Γονίδια δημιουργίας PHA.....	15
1.3.6. Βιοσυνθετικά μονοπάτια	17
1.3.7. Βιοαποικοδόμηση	18
1.4. Πολύ-υδροξυ-βουτυρικό οξύ (PHB).....	19
1.4.1. Γενικά χαρακτηριστικά.....	19
1.4.2. Ιδιότητες.....	20
1.4.3. Σύσταση των σφαιριδίων πολύ-3υδροξυ-βουτυρικού οξέος.....	20
1.5. Το βακτηριακό στέλεχος <i>Pseudomonas</i> sp. pHDV1.....	21
1.6. Σκοπός της εργασίας.....	22
2. Υλικά και Μέθοδοι	22
2.1. Επεξεργασία τυρογάλακτος.....	22
2.1.1. Αποστείρωση τυρογάλακτος.....	22
2.1.2. Υδρόλυση τυρογάλακτος.....	22
2.2. Καλλιέργεια του wild type στελέχους του βακτηρίου <i>Pseudomonas</i> sp. pHDV1.....	23
2.2.1. Στερεή καλλιέργεια.....	26
2.2.2. Προκαλλιέργεια.....	26
2.2.3. Υγρή καλλιέργεια.....	26
2.3. Καμπύλες ανάπτυξης του του βακτηρίου <i>Pseudomonas</i> sp. pHDV1 σε διαφορετικές συνθήκες.....	26
2.4. Παρατήρηση κυττάρων με Nile red σε μικροσκόπιο φθορισμού.....	27
2.5. Ποσοτικός προσδιορισμός PHB με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC).....	28
2.6. Καμπύλες κατανάλωσης γλυκόζης καλλιέργειών με υδrolυμένο τυρόγαλα και γλυκόζη.....	28
2.7. Προσδιορισμός ολικών σακχάρων με την μέθοδο θυμόλης – θεικού.....	29
2.8. Προσδιορισμός ολικών φωσφορικών με την μέθοδο μπλε του μολυβδαινίου.....	29
2.9. Προσδιορισμός συνολικής πρωτεΐνης με την μέθοδο Bradford.....	30

2.10.	Προσδιορισμός συνολικής πρωτεΐνης με την μέθοδο BCA.....	31
2.11.	Χαρακτηρισμός εξωκυτταρικής σύστασης με Φασματοσκοπία Μαγνητικού Συντονισμού (NMR).....	32
3.	Αποτελέσματα και συζήτηση	32
3.1.	Μελέτη της ανάπτυξης του στελέχους σε διαφορετικές συνθήκες.....	32
3.2.	Παρατήρηση των κυττάρων σε οπτικό μικροσκόπιο με χρώση Nile red.....	37
3.3.	Ποσοτικοποίηση του PHB με HPLC.....	41
3.4.	Κατανάλωση γλυκόζης σε καλλιέργειες με υδρολυμένο τυρόγαλα και γλυκόζη.....	42
3.5.	Βιοχημικός χαρακτηρισμός αποβλήτων τυροκομείου.....	43
3.6.	Προσδιορισμός ολικών σακχάρων με την μέθοδο θυμόλης – θεικού.....	45
3.7.	Προσδιορισμός ολικών φωσφορικών με την μέθοδο μπλε του μολυβδαινίου.....	46
3.8.	Προσδιορισμός συνολικής πρωτεΐνης με την μέθοδο Bradford.....	47
3.9.	Προσδιορισμός συνολικής πρωτεΐνης με την μέθοδο BCA.....	48
3.10.	Χαρακτηρισμός εξωκυτταρικής σύστασης με Φασματοσκοπία Μαγνητικού Συντονισμού (NMR).....	50
4.	Συμπεράσματα και προοπτικές.....	52
4.1.	Συμπεράσματα.....	52
4.2.	Μελλοντικοί στόχοι.....	54
5.	Βιβλιογραφία.....	55

1. Εισαγωγή

1.1. Γενικά περί πλαστικών

Τα πλαστικά υλικά που παράγονται από το πετρέλαιο συνιστούν ένα απαραίτητο κομμάτι της σύγχρονης καθημερινότητας, εξαιτίας των ιδιαίτερα χρήσιμων ιδιοτήτων τους. Η ευρεία τους εφαρμογή, η οποία οφείλεται στο μικρό τους βάρος, την ανθεκτικότητά τους καθώς και την μηχανική τους αντοχή τα καθιστούν ένα ευέλικτο υλικό για εφαρμογές ευρείας χρήσης. Ωστόσο, η τόσο συχνή χρήση πλαστικών υλικών προκαλεί μια πληθώρα αρνητικών συνεπειών στο φυσικό περιβάλλον, καθώς οδηγεί σε σημαντική περιβαλλοντική μόλυνση αλλά και υπερκατανάλωση των φυσικών ορυκτών πόρων. Η ετήσια παραγωγή αποβλήτων πλαστικού φτάνει τους τριακόσια εκατομμύρια τόνους και υπολογίζεται πως θα τετραπλασιαστεί μέχρι το 2050 (Mong et al., 2024).

Η τρέχουσα προσέγγιση στη διαχείριση πλαστικών απορριμμάτων βασίζεται σε μεγάλο βαθμό στην ευκολία και όχι στη βιωσιμότητα και στην κυκλική οικονομία, γεγονός που αποδεικνύεται από τη δημοτικότητα των χωματερών και των αποτεφρωτηρίων (Xayachak et al., 2022). Η αποτέφρωση, αν και συνιστά έναν από τους βασικότερους τρόπους διαχείρισης των πλαστικών αποβλήτων, δεν ενδείκνυται εξαιτίας του υψηλού κόστους και της απελευθέρωσης τοξικών ενώσεων στην ατμόσφαιρα κατά την διαδικασία της καύσης (Anjum et al., 2016). Η μηχανική ανακύκλωση συνιστά μια εναλλακτική τεχνική διαχείρισης, η οποία όμως απαιτεί λεπτομερή διαλογή καθώς δεν μπορεί να επεξεργαστεί επιμολυσμένα πλαστικά, με αποτέλεσμα μια σημαντική ποσότητα αποβλήτων να απορρίπτεται, μειώνοντας σημαντικά την αποτελεσματικότητα της τεχνικής (Solis and Silveira, 2020). Ταυτόχρονα, η διαδικασία της χημικής ανακύκλωσης συνιστά μια επιπλέον εναλλακτική, που ωστόσο δεν συνιστάται εξαιτίας του αυξημένου κόστους που παρουσιάζει κατά την χρήση της για ανακύκλωση αποβλήτων σε μεγάλη κλίμακα (Bucknall, 2020).

Μια πιθανή απάντηση στα προβλήματα που προκύπτουν κατά την διαχείριση των πλαστικών αφού εκείνα έχουν χρησιμοποιηθεί είναι τα βιοπολυμερή ή αλλιώς βιοπλαστικά. Τα βιοπλαστικά συνιστούν μια ιδιαίτερα ενθαρρυντική λύση έναντι στην χρήση των παραδοσιακών πλαστικών, καθώς είναι βιοαποικοδομήσιμα, προέρχονται από ανανεώσιμες πηγές, φέρουν χαμηλότερο αποτύπωμα άνθρακα και έχουν χαμηλότερο ενεργειακό κόστος κατά την παραγωγή (Thomas et al., 2023). Ιδιαίτερη σημασία παρουσιάζουν τα βιοπλαστικά που παράγονται από μικροοργανισμούς, καθώς μπορούν να προκύψουν από μια σειρά αυτών κάτω από διάφορες συνθήκες ανάπτυξης, αποθηκεύονται ενδοκυτταρικά και επιτρέπουν την επιβίωση του μικροοργανισμού σε καταστάσεις στρες. Η σύσταση των μονομερών, η μακρομοριακή δομή και οι φυσικοχημικές ιδιότητες του βιοπολυμερούς διαφοροποιούνται ανάλογα με τον οργανισμό που τα παράγει (Luengo et al., 2003).

1.2. Βιομηχανικά απόβλητα

Η εκμετάλλευση του φυσικού περιβάλλοντος συνιστά ένα αδιαμφισβήτητο γεγονός στην σύγχρονη καθημερινότητα, κατάσταση που οφείλεται στον ραγδαία αύξηση του πληθυσμού καθώς και την κυριαρχία του βιομηχανικού τομέα στην κοινωνία. Ταυτόχρονα, η χωρίς όρια εκμετάλλευση των μη ανανεώσιμων φυσικών πόρων για παραγωγή ενέργειας, έχουν καταστήσει απαραίτητη την αναζήτηση εναλλακτικών τρόπων για την επίτευξη του συγκεκριμένου σκοπού. Για τους παραπάνω λόγους, κρίνεται απαραίτητη η σωστή επεξεργασία και διαχείριση των βιομηχανικών αποβλήτων πριν την απόρριψή τους, έτσι ώστε να αποφευχθεί όσο το δυνατόν η ρύπανση των εδαφών και των υδάτινων πόρων.

Η βιομηχανίες της τυροκομίας και του γάλακτος αποτελούν από τις σημαντικότερους ρυπογόνους παράγοντες, εξαιτίας των υγρών αποβλήτων που παράγουν. Η βιομηχανία της τυροκομίας σε παγκόσμιο επίπεδο, παράγει ετησίως 145 εκατομμύρια τόνους τυρόγαλα, εκ των οποίων μόνο οι 79 εκατομμύρια τόνοι επαναχρησιμοποιούνται στον τομέα των τροφίμων, ενώ περίπου 6 εκατομμύρια τόνοι διατίθενται σε μη εδώδιμες χρήσεις και 60 εκατομμύρια τόνοι χρησιμοποιούνται ως τροφές ζώων, λιπάσματα ή καταλήγουν ως απόβλητα (Ganju and Gogate, 2017). Το τυρόγαλα τυπικά αποτελείται από 93.0-93.7% νερό, 4.4-5.2% λακτόζη, μέχρι 0.8% γαλακτικό οξύ, 0.6-1% πρωτεΐνες και 0.5%-0.8% μεταλλικά στοιχεία, ενώ χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερη υψηλή συγκέντρωση χημικά απαιτούμενου οξυγόνου (Chemical Oxygen Demand, COD) (50,000-80,000 mg/L) και βιοχημικά απαιτούμενου οξυγόνου (Biochemical Oxygen Demand, BOD) (40,000-60,000 mg/L), γεγονός που το καθιστά εξαιρετικά ρυπογόνο για το περιβάλλον (Beccalli and Lavelli, 2022).

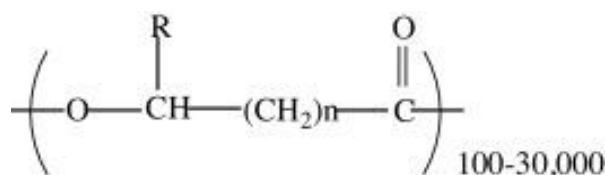
Ένας υποσχόμενος τρόπος διαχείρισης του συγκεκριμένου αποβλήτου είναι η χρήση του ως υπόστρωμα για την ανάπτυξη μικροοργανισμών, με σκοπό την παραγωγή προϊόντων ενδιαφέροντος με μειωμένο κόστος και ταυτόχρονα την δημιουργία αποβλήτων χαμηλού φορτίου άνθρακα (Colombo et al., 2016). Πιο συγκεκριμένα, τα συστατικά από τα οποία αποτελείται το τυρόγαλα (π.χ. σάκχαρα, πρωτεΐνες, λίπη) μπορούν να αξιοποιηθούν ως πηγή άνθρακα για την καλλιέργεια μικροοργανισμών με απώτερο σκοπό την παραγωγή βιοπολυμερών, υλικών που συνιστούν μια βιώσιμη εναλλακτική λύση έναντι των συμβατικών πολυμερών. Τέτοια βιοπολυμερή μικροβιακής προέλευσης είναι τα πολυυδροξυαλκανοϊκά (PHAs), τα οποία μπορούν να παραχθούν από ποικιλία μικροοργανισμών και είναι πλήρως βιοαποικοδομήσιμα τόσο στο έδαφος όσο και στο θαλάσσιο περιβάλλον (Zytner et al., 2023).

1.3. Πολύ-υδροξυαλκανοϊκά (PHAs)

1.3.1. Γενικά χαρακτηριστικά

Τα πολύ-υδροξυαλκανοϊκά συνιστούν μια κατηγορία βιοπλαστικών στην μελέτη των οποίων έχει δοθεί ιδιαίτερη έμφαση τα τελευταία χρόνια. Αποτελούν μια κατηγορία βιοδιασπώμενων πολυμερών που εμφανίζουν σημαντική βιοσυμβατότητα και μπορούν να παραχθούν από 90 διαφορετικά γένη μικροοργανισμών (Zinn et al., 2001). Είναι θερμοπλαστικοί πολυεστέρες R-υδροκυαλκανοϊκών οξέων οι οποίοι παράγονται ως μέσα αποθήκευσης ενέργειας και αποθεμάτων άνθρακα σε καταστάσεις όπου υπάρχει περίσσεια άνθρακα αλλά έλλειψη άλλων βασικών θρεπτικών συστατικών, όπως οξυγόνο, άζωτο ή φώσφορος, στο περιβάλλον ανάπτυξης του μικροοργανισμού. Τα PHAs μπορούν επίσης να παραχθούν και υπό καθορισμένες συνθήκες pH. Όταν ένας μικροοργανισμός βρεθεί σε περιβάλλον ανάπτυξης από το οποίο θα απουσιάζει κάποιο θρεπτικό συστατικό, τα PHAs, τα οποία θα διασπαστούν και θα χρησιμοποιηθούν ως πηγή άνθρακα για να συνεχιστεί η ανάπτυξη του. Τα PHAs μπορούν να παραχθούν από ένα τεράστιο εύρος υποστρωμάτων, στα οποία περιλαμβάνονται βιομηχανικά, γεωργικά και οικιακά απόβλητα, σάκχαρα, γλυκερόλη, λίπη και έλαια, μελάσα, τυρόγαλα, λιγνοκυτταρική βιομάζα, διοξείδιο και μονοξείδιο του άνθρακα, καθώς και μεθάνιο (Anjum et al., 2016, Jo et al., 2021). Οι φυσικοχημικές και μηχανικές ιδιότητες που χαρακτηρίζουν τα PHAs, τα καθιστούν κατάλληλα να αντικαταστήσουν τα παραδοσιακά πολυμερή σε πληθώρα τομέων. Εντούτοις, το κόστος παραγωγής τους είναι ακόμα και σήμερα ιδιαίτερα αυξημένο, γεγονός που απαιτεί επιπλέον ερευνητική δραστηριότητα πάνω στο αντικείμενο.

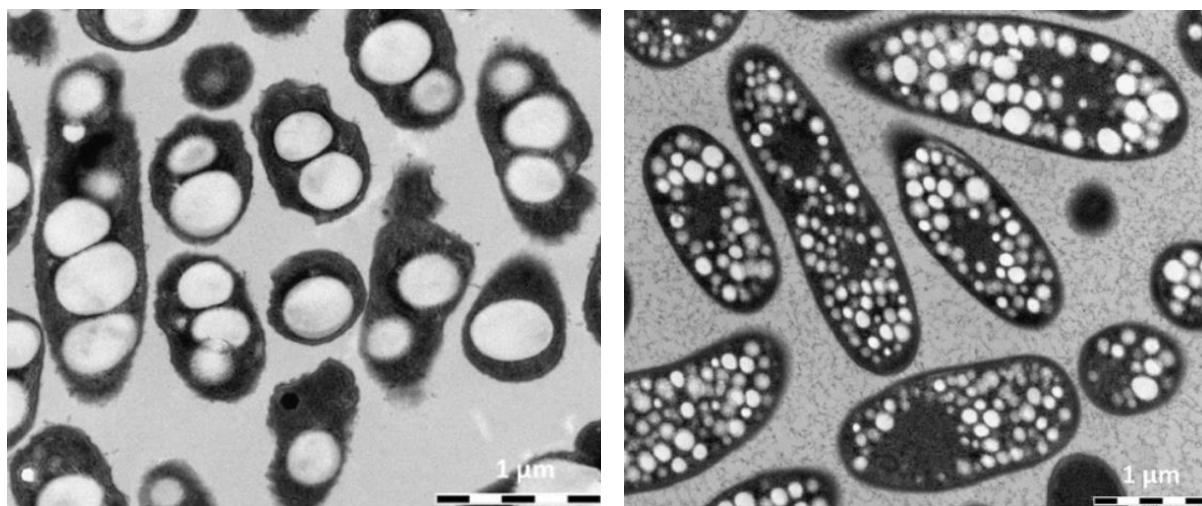
Τα PHAs έχουν την γενική δομή που παρουσιάζεται στην Εικόνα 1 και διακρίνονται ανάλογα με το μέγεθος της πλευρικής τους αλυσίδας R στις κατηγορίες: short-chain length (scl) PHAs (3 – 5 άτομα άνθρακα), medium-chain length (mcl) PHAs (6 – 14 ή περισσότερα άτομα άνθρακα), ενώ έχει παρατηρηθεί και η κατηγορία των υβριδικών PHAs, πολυμερή που προκύπτουν από συνδυασμό μονομερών με short-chain και medium-chain length πλευρικές ομάδες R (Anjum et al., 2016). Τα PHAs συσσωρεύονται εντός των κυττάρων των οργανισμών από τους οποίους παράγονται, με την μορφή σφαιριδίων στην περιοχή του κυτταροπλάσματος, ο αριθμός και το μέγεθος των οποίων εξαρτάται από το είδος του οργανισμού (Εικόνα 2). Το μοριακό βάρος των σφαιριδίων κυμαίνεται από $2 \times 10^5 - 3 \times 10^6$ Da, ανάλογα την συνθήκη ανάπτυξης (pH, συνθήκες ζύμωσης, τύπος και συγκέντρωση πηγής άνθρακα) αλλά και τον ίδιο τον οργανισμό (Anjum et al., 2016, Ojumu et al., 2004).



Εικόνα 1: Ο γενικός συστατικός τύπος των PHAs (Anjum et al., 2016).

Πίνακας 1: Ο αριθμός των ομάδων (CH₂), οι πλευρικές ομάδες R των PHAs (Εικόνα 1) και η ονομασία του αντίστοιχου βιοπολυμερούς (Ojumu et al., 2004).

n	Πλευρική ομάδα R	Ονομασία
1	-H	πολυ(3-υδροξυπροπανικό)
	-CH ₃	πολυ(3-υδροξυβουτυρικό)
	-CH ₂ CH ₃	πολυ(3-υδροξυβαλερικό)
	-CH ₂ CH ₂ CH ₃	πολυ(3-υδροξυεξανοϊκό)
	-(CH ₂) ₄ CH ₃	πολυ(3-υδροξυοκτανοϊκό)
	-(CH ₂) ₈ CH ₃	πολυ(3-υδροξυδωδεκανοϊκό)
2	-H	πολυ(4-υδροξυβουτυρικό)
	-CH ₃	πολυ(4-υδροξυβαλερικό)
3	-H	πολυ(5-υδροξυβαλερικό)
	-CH ₃	πολυ(5-υδροξυεξανοϊκό)
4	-(CH ₂) ₅ CH ₃	πολυ(6-υδροξυδωδεκανοϊκό)



Εικόνα 2: Σφαιρίδια PHAs στα κύτταρα του μικροοργανισμού *Cupriavidus necator* H16 (αριστερά) και του *Halomonas hydrothermalis* (δεξιά) (Obruca et al., 2020)

1.3.2. Ιδιότητες

Τα PHAs εμφανίζουν ένα εύρος φυσικοχημικών ιδιοτήτων, ανάλογα από το μονομερές ή τα μονομερή που τα αποτελούν. Σε γενικές γραμμές, τα PHAs παρουσιάζουν παρόμοιες ιδιότητες με τα παραδοσιακά πολυμερή που βασίζονται στο πετρέλαιο. Ορισμένες τέτοιες ιδιότητες είναι αδιαλυτότητα στο νερό, αντοχή σε ακτίνες υπεριώδους ακτινοβολίας, ακαμψία, υψηλό βαθμό πολυμερισμού, βιοαποικοδομησιμότητα και θερμοπλαστικότητα (Sharma et al., 2021). Η μεταβολή στην σύσταση των μονομερών που αποτελούν τα PHAs μπορεί να επηρεάσει ιδιότητες όπως την υδροφοβικότητα, την θερμοκρασία μετάπτωσης υάλου, το σημείο τήξης και την κρυσταλλικότητα. Για παράδειγμα, τα scl-PHAs είναι άκαμπτα, εύθραυστα και διαθέτουν υψηλό βαθμό κρυσταλλικότητα (που κυμαίνεται από 60-80%), σε αντίθεση με τα mcl-PHAs, τα οποία είναι εύκαμπτα και ελαστικά, με βαθμό κρυσταλλικότητας στο 25% (Anjum et al., 2016).

1.3.3. Εφαρμογές

Εξαιτίας των ιδιαίτερων φυσικοχημικών ιδιοτήτων που διαθέτουν, η χρήση των PHAs έχει εδραιωθεί σε μια πληθώρα τομέων όπως οι βιοϊατρικές επιστήμες, η γεωργία, τα βιοκαύσιμα καθώς και στην παραγωγή αναλώσιμων προϊόντων καθημερινής χρήσης.

Όσον αφορά την εφαρμογή τους στον βιοϊατρικό τομέα, τα PHAs δύναται να χρησιμοποιηθούν ως εμφυτεύματα, καθώς δεν προκαλούν ανοσολογική απόκριση στους οργανισμούς-ξενιστές και παρουσιάζουν συνεπώς βιοσυμβατότητα με πλήθος οργανισμών-ξενιστών, συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπων. Επιπλέον, τα PHAs μπορούν να αξιοποιηθούν στον τομέα μηχανικής ιστών καθώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν, σε συνδυασμό με άλλα σύνθετα υλικά, για τον σχεδιασμό και την κατασκευή ικριωμάτων. Τα ικριώματα αυτά χαρακτηρίζονται από όλες τις επιθυμητές μηχανικές ιδιότητες και είναι σε θέση να επιτρέπουν την ανάπτυξη των κυττάρων, διατηρώντας την κατάλληλη παροχή θρεπτικών συστατικών, και να αποικοδομούνται μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα, μετά τον σχηματισμό του ιστού (Masood et al., 2014). Ταυτόχρονα, τα PHAs χρησιμοποιούνται για την δημιουργία μικροσφαιριδίων, μικροκάψουλων, μεμβρανών, καθώς και ως θεραπευτικοί φορείς για πλήθος ασθενειών, με σημαντική επιτυχία, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου (Papaneophytou et al., 2019).

Οι εφαρμογές των PHAs είναι σημαντικές και στον τομέα της γεωργίας. Τα PHAs μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή βιοδιασπώμενου γεωργικού διχτυού, το οποίο είναι δυνατόν να κομποστοποιηθεί μαζί με άλλα γεωργικά και κτηνοτροφικά απόβλητα. Είναι ακόμη χρήσιμο για την παραγωγή βιοδιασπώμενων σάκων φύτευσης, οι οποίοι δεν απελευθερώνουν κανένα οπτικά διακριτό ή τοξικό υπόλειμμα όταν ανακυκλώνονται ή αποτεφρώνονται (Amelia et al., 2019). Τα PHAs είναι δυνατό να αξιοποιηθούν για την δημιουργία βιώσιμων λιπασμάτων και φυτοφαρμάκων, αφού είναι η δυνατή η σύνθεση μέσων από αυτά, που να επιτρέπουν την ελεγχόμενη απελευθέρωση αυτών των ουσιών στο έδαφος (Kiselev et al, 2021).

Αξίζει να σημειωθεί, πως μέχρι σήμερα έχουν δημιουργηθεί δύο διαφορετικά είδη βιοκαυσίμων, τα οποία παράγονται από την μεθυλεστεροποίηση των PHAs, παρουσία καταλύτη, οι 3-υδροξυαλκανοϊκοί μεθυλεστερές (3HAME) και οι 3-υδροξυβουτυρικοί μεθυλεστερές (3HBME). Τα συγκεκριμένα είδη βιοκαυσίμων σχετίζονται σημαντικά με το βιοντίζελ, καθώς η διαδικασία παραγωγής, η χημική δομή και ο ρόλος τους ως φορέας ενέργειας είναι κατ'αντιστοιχία συγκρίσιμα. Αν και τα 3HAME και 3HBME παρουσιάζουν ιδιαίτερα χαμηλούς αριθμούς οκτανίων και κετανίων, η χρήση εστέρων που προέρχονται από scl- και mcl-PHAs αναμένεται να βελτιώνει τις τιμές των παραπάνω παραμέτρων (Akinwumi et al., 2021).

Τέλος, τα PHAs έχουν ευρεία εφαρμογή και σε αναλώσιμα προϊόντα καθημερινής χρήσης όπως μπουκάλια, είδη μιας χρήσης (όπως ποτήρια, μαχαιροπίρουνα, ξυράφια κ.α.), προϊόντα υγιεινής, υλικά συσκευασίας, ακόμα και σε πρόσθετα τροφίμων (Anjum et al., 2016).

1.3.4. Πρωτεΐνες που σχετίζονται με την επιφάνεια των σφαιριδίων PHA (Granule Associated Proteins, GAPs)

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, τα PHAs βρίσκονται οργανωμένα σε σφαιρικές δομές εντός των κυττάρων που τα παράγουν, οι οποίες ονομάζονται καρβονοσώματα. Οι δομές αυτές αποτελούνται από το πολυμερές, το οποίο περιβάλλεται πιθανώς από φωσφολιπίδια, καθώς και συγκεκριμένες πρωτεΐνες που εντοπίζονται πάντα στην επιφάνεια των σφαιριδίων. Αυτές οι σχετιζόμενες με την επιφάνεια των σφαιριδίων πρωτεΐνες διακρίνονται σε τέσσερις διαφορετικές κατηγορίες, με βάση την δομή και την λειτουργία τους. Η πρώτη κατηγορία, γνωστή ως class I, εμπεριέχει τις συνθάσες PHA, οι οποίες καταλύουν την δημιουργία εστερικών δεσμών μεταξύ μονομερών. Η δεύτερη κατηγορία, ή αλλιώς class II, περιλαμβάνει τις αποπολυμεράσες PHA, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την ενδοκυτταρική αποικοδόμηση των PHAs. Η τρίτη κατηγορία (class III) αναφέρεται στις φασίνες, οι οποίες αφενός, αποτρέπουν την δημιουργία συσσωματωμάτων από σφαιρίδια PHAs και αφετέρου αποτρέπουν την μη ειδική δέσμευση στα σφαιρίδια. Η τέταρτη και τελευταία κατηγορία (class IV), αναφέρεται σε όλες τις υπόλοιπες πρωτεΐνες που υπάρχουν στην επιφάνεια των σφαιριδίων αλλά δεν ανήκουν σε κάποια από τις άλλες κατηγορίες (Steinbuechel et al., 1995).

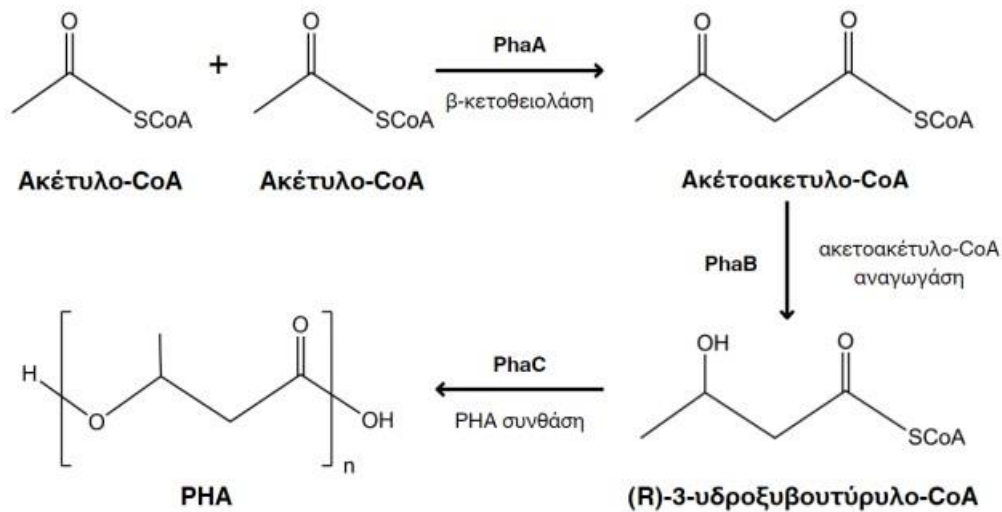
Οι συνθάσες PHA, οι οποίες ανήκουν στην πρώτη κατηγορία, συνιστούν τα βασικά ένζυμα της βιοσύνθεσης των PHAs, μιας και μετατρέπουν (R)-3-υδροξυακυλο-CoA θειοεστερές σε PHA, με ταυτόχρονη απελευθέρωση συνένζυμου A (Rehm & Steinbuechel, 1999). Οι συνθάσες PHA διακρίνονται σε τέσσερις επιμέρους υποκατηγορίες, με βάση τον αριθμό υπομονάδων τους και την ειδικότητα των υποστρωμάτων τους. Οι συνθάσες υποκατηγορίας I και II (class I και class II) αποτελούνται από μία υπομονάδα και παράγουν scl-PHAs και mcl-PHAs αντίστοιχα. Οι συνθάσες υποκατηγορίας III αποτελούνται από δύο υπομονάδες, τις PhaC και PhaE, ενώ οι συνθάσες υποκατηγορίας IV αποτελούνται από δύο υπομονάδες, τις PhaC και PhaR. Όλες οι συνθάσες μοιράζονται μια συντηρημένη κυστεΐνη, η οποία λειτουργεί ως καταλυτικό ενεργό κέντρο, στο οποίο προσδένεται η αναπτυσσόμενη αλυσίδα PHA (Jendrossek, 2009).

Η δεύτερη κατηγορία πρωτεϊνών, οι αποπολυμεράσες PHAs, διακρίνονται σε ενδοκυτταρικές και εξωκυτταρικές. Οι ενδοκυτταρικές αποπολυμεράσες, οι οποίες συμβολίζονται ως PhaZ, βρίσκονται στην επιφάνεια των σφαιριδίων και αποκοδομούν το άμορφο PHA που υπάρχει εντός των σφαιριδίων, ενώ οι εξωκυτταρικές αποπολυμεράσες εκκρίνονται από τους περισσότερους οργανισμούς για να χρησιμοποιήσουν μετουσιωμένο PHA που υπάρχει στο περιβάλλον από, για παράδειγμα, άλλα μη ζωντανά κύτταρα. Αν και οι ενδοκυτταρικές αποπολυμεράσες έχουν μελετηθεί πολύ περισσότερο από τις εξωκυτταρικές, ο μηχανισμός δράσης τους δεν είναι ακόμα κατανοητός. Ωστόσο, είναι γνωστό ότι οι PhaZ είναι απαραίτητες για την ενεργοποίηση των PHAs ως πηγή ενέργειας (Grage et al., 2009).

Στην τρίτη κατηγορία ανήκουν οι φασίνες, οι οποίες είναι οι πιο άφθονες πρωτεΐνες στην επιφάνεια των καρβονοσωμάτων (περίπου 5% των συνολικών κυτταρικών πρωτεϊνών). Είναι μη καταλυτικές πρωτεΐνες, μικρού μοριακού βάρους, οι οποίες αποτελούνται από ένα υδρόφοβο τμήμα που συνδέονται με την επιφάνεια των σφαιριδίων PHA, και ένα υδρόφιλο τμήμα το οποίο είναι επικοινωνεί με το κυτταρόπλασμα. Η αμφιφιλική φύση των φασινών σταθεροποιεί τα σφαιρίδια και δεν επιτρέπει την συσσωμάτωσή τους. Ακόμη, έχει παρατηρηθεί ότι δεν υπάρχει φυλογενετική ομολογία αλληλουχίας μεταξύ των διάφορων φασινών. Οι φασίνες δεν είναι απαραίτητες για τη συσσώρευση PHA, αλλά η σύνθεση και η αφθονία τους συσχετίζονται στενά με τα επίπεδα PHA. Η φασίνη που έχει μελετηθεί εκτενέστερα είναι η PhaP1, η οποία έχει προσδιοριστεί ως ένα επίπεδο τριγωνικό τριμερές (Grage et al., 2009).

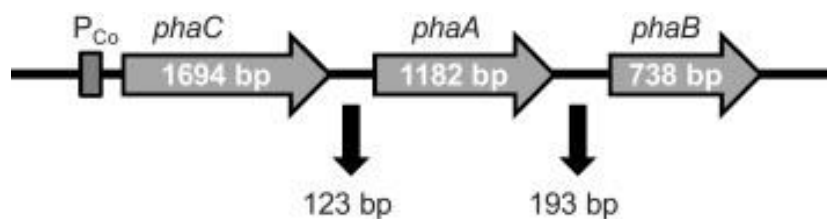
1.3.5. Γονίδια δημιουργίας PHA

Η βακτηριακή παραγωγή των PHAs ακολουθεί τρία διαδοχικά στάδια, καθένα από τα οποία καταλύεται από συγκεκριμένο ένζυμο, κωδικοποιούμενο από συγκεκριμένο γονίδιο. Βασικό ρόλο στην διαδικασία της σύνθεσης του βιοπολυμερούς διαδραματίζει το ένζυμο ακετυλοτρανσφεράση ακετύλο-CoA, ή β-κετοθειολάση, αφού καταλύει την ένωση δύο μορίων ακετύλο-CoA προς ακετοακετύλο-CoA. Το συγκεκριμένο ένζυμο κωδικοποιείται από το γονίδιο phaA. Στην συνέχεια, το ακετοακετύλο-CoA ανάγεται προς (R)- 3-υδροξυβουτύρυλο-CoA από την ακετοακετυλο-CoA αναγωγή, η οποία εκφράζεται από το γονίδιο phaB. Τέλος, η PHA συνθάση καταλύει τον πολυμερισμό του (R)-3-υδροξυβουτυρυλο-CoA, δημιουργώντας τους κατάλληλους εστερικούς δεσμούς προς σχηματισμό του τελικού PHA. Σε αυτή την περίπτωση, το ένζυμο κωδικοποιείται από το γονίδιο phaC (Yee et al., 2012).



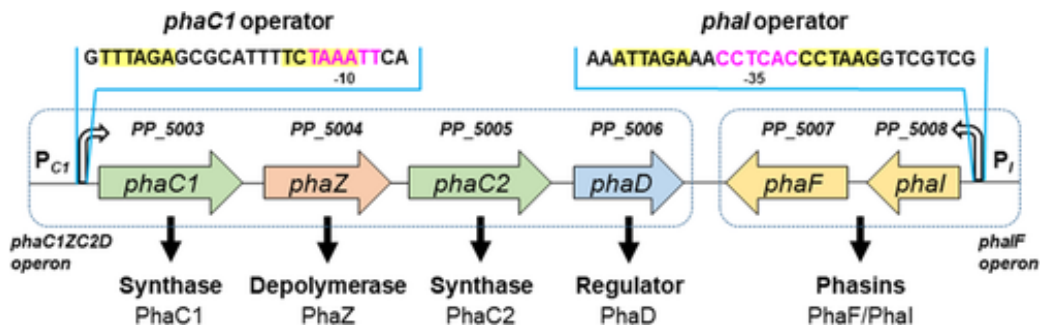
Εικόνα 3: Τα βασικά στάδια σύνθεσης των PHAs (Geladas, 2023)

Έχει παρατηρηθεί πως σε κάποιους οργανισμούς τα παραπάνω γονίδια είναι οργανωμένα σε δομή οπερονίου, με κοινό υποκινητή. Το συγκεκριμένο οπερόνιο ονομάζεται *phaCAB* οπερόνιο και μια περίπτωση οργανισμού στον οποίο εντοπίζεται είναι το στέλεχος *Comamonas* sp. EB172.



Εικόνα 4: Η δομή του οπερονίου *phaCAB_{Co}*. Κατά σειρά από τα αριστερά προς τα δεξιά τα γονίδια του υποκινητή (P_{Co}), της συνθάσης του PHA ($phaC_{Co}$), της ακετυλοτρανσφεράσης του 37 ακέτυλο-CoA ($phaA_{Co}$) και της αναγωγής του ακετοακέτυλο-CoA ($phaB_{Co}$), στο στέλεχος *Comamonas* sp. EB172 (Yee et al., 2012).

Ωστόσο, η παραπάνω οργάνωση των γονιδίων δεν παρατηρείται σε όλους τους οργανισμούς που συνθέτουν PHAs. Για παράδειγμα, στην περίπτωση της *Pseudomonas putida* KT2440, τα γονίδια οργανώνονται όπως φαίνονται στην Εικόνα 5. Παρατηρείται ένα οπερόνιο, στο οποίο οργανώνονται τα γονίδια *phaC1*, *phaC2*, *phaZ* και *phaD*, τα οποία κωδικοποιούν αντίστοιχα δύο διαφορετικές συνθάσες, μια ενδοκυτταρική αποπολυμεράση και έναν μεταγραφικό ρυθμιστή. Ταυτόχρονα, εντοπίζεται ένα δεύτερο οπερόνιο, στο οποίο οργανώνονται τα γονίδια *phaF* και *phaI*, τα οποία κωδικοποιούν φασίνες (Tarazona et al., 2020).



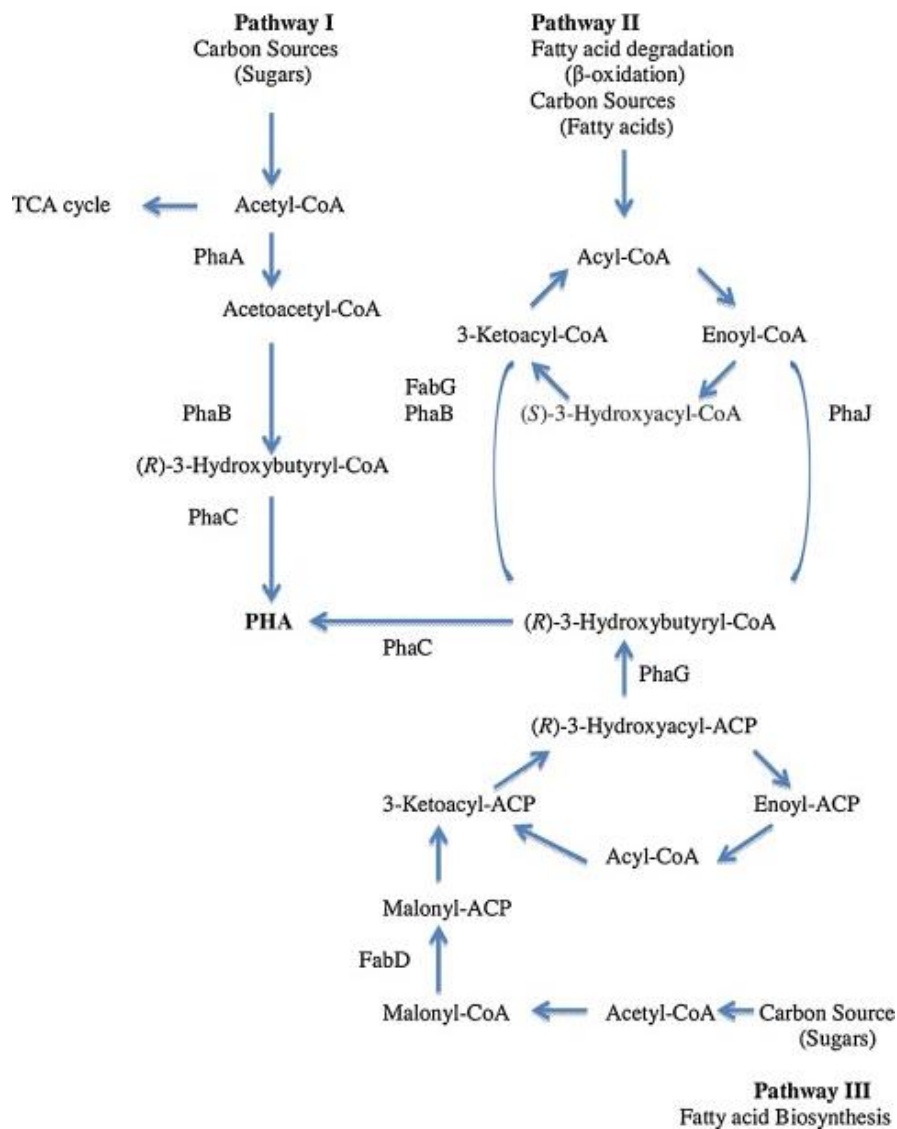
Εικόνα 5: Η διάταξη των οπερονίων που σχετίζονται με την οργάνωση των γονιδίων στην *Pseudomonas putida* KT2440. Παρατηρούνται δύο οπερόνια, το *phaC1ZC2D* (αριστερά) και το *phaIF* (δεξιά), τα οποία ελέγχονται από τον ρυθμιστή *phaD*, καθώς είναι υπεύθυνος για την ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων. Κάθε οπερόνιο έχει τον δικό του υποκινητή, για το οπερόνιο *phaC1ZC2D* είναι ο P_{C1} , ενώ για το οπερόνιο *phaIF* είναι ο P_I (Tarazona et al., 2020).

1.3.6. Βιοσυνθετικά μονοπάτια

Η βιοσύνθεση των PHAs μπορεί να επιτευχθεί μέσα από τρεις διαφορετικές μεταβολικές διόδους, ανάλογα με την διαθέσιμη πηγή άνθρακα (Anjum et. al., 2016). Στην περίπτωση του μεταβολικού μονοπατιού I, όπως προαναφέρθηκε και στην ενότητα 1.4.5., η ακετυλοτρανσφεράση του ακετύλο-CoA δημιουργεί ένα μόριο ακετοακέτυλο-CoA από την συμπύκνωση δύο μορίων ακετύλο-CoA, τα οποία προέρχονται από τον κύκλο του κιτρικού οξέος. Το ακετοακέτυλο-CoA που προκύπτει ανάγεται από την αναγωγή του ακετύλο-CoA, δημιουργώντας ένα μόριο (R)-3-υδροξυβουτυρυλο-CoA, το οποίο στο τελικό στάδιο του μονοπατιού εστεροποιείται προς PHA από την συνθάση PHA. Η ποσότητα του PHA που παράγεται εξαρτάται άμεσα από τα επίπεδα των NADH και NAD⁺, τα οποία ρυθμίζουν την είσοδο του ακετύλο-CoA στον κύκλο του Krebs, καθώς και από το συνένζυμο NADPH, από το οποίο ελέγχεται η δράση της αναγωγής του ακετύλο-CoA (Anjum et. al., 2016, Samrot et al., 2021).

Για την παραγωγή mcl-PHAS, ακολουθείται το βιοσυνθετικό μονοπάτι II, στο οποίο χρησιμοποιούνται παράγωγα της β-οξειδωσης των λιπαρών οξέων. Σε αυτή την περίπτωση, καθοριστικό ρόλο παίζει η υδρατάση του ενούλο-CoA (PhaJ), η οποία μετατρέπει αναστρέψιμα το S-(+)-3- υδρόξυ- βουτυρικό-CoA στο R ισομερές του, κατά την διαδικασία της β-οξειδωσης, δημιουργώντας το κατάλληλο υπόστρωμα για την δράση της συνθάσης PHA (Liu et al., 2016, Samrot et al., 2021).

Το μεταβολικό μονοπάτι III παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς δίνει την δυνατότητα παραγωγής PHA από απλές, φτηνές πηγές άνθρακα που δεν σχετίζονται δομικά με τα μονομερή που παράγονται, όπως είναι η γλυκόζη, η φρουκτόζη και η σακχαρόζη. Τα (R)-3-υδροξυάκυλο ενδιάμεσα που προκύπτουν κατά την β-οξείδωση, από την μορφή τους όπου είναι συνδεδεμένα στην ακυλοφόρο πρωτεΐνη παίρνουν την μορφή στην οποία είναι συνδεδεμένα με το συνένζυμο A, μέσω της δράσης της τρανσφεράσης του CoA (Samrot et al., 2021).



Εικόνα 6: Τα τρία μεταβολικά μονοπάτια βιοσύνθεσης των PHA (Anjum et al., 2016)

1.3.7. Βιοαποικοδόμηση

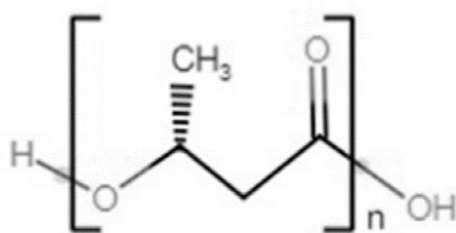
Η βιοαποικοδομησιμότητα είναι ένα από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά των PHAs. Είναι δυνατόν να αποικοδομηθούν από διάφορους μικροοργανισμούς πλήρως προς νερό και διοξείδιο του άνθρακα υπό αερόβιες συνθήκες, ενώ στην περίπτωση αναερόβιας

αποκοδόμησης προς μεθάνιο και διοξείδιο του άνθρακα. Η μικροβιακή αποικοδόμηση επιτυγχάνεται τόσο εξωκυτταρικά όσο και ενδοκυτταρικά. Στην πρώτη περίπτωση, η αποικοδόμηση πραγματοποιείται από αποπολυμεράσες PHA, οι οποίες παράγονται από τους ίδιους τους μικροοργανισμούς και έχουν την δυνατότητα να διασπών τα βιοπολυμερή προς ολιγομερή ή ακόμα και μονομερή, με σκοπό την χρήση τους ως πηγή άνθρακα από τους μικροοργανισμούς (Anjum et al., 2016). Στην περίπτωση της ενδοκυτταρικής αποκοδόμησης, η οποία συμβαίνει μόνο σε συνθήκες απουσίας πηγής άνθρακα, τα σφαιρίδια PHA υδρολύονται προς 3-υδρόξυαλκανοϊκό οξύ από την αποπολυμεράση των PHA και μια υδρολάση ολιγομερών. Το 3-υδρόξυαλκανοϊκό οξύ που προκύπτει μετατρέπεται σε ακετοακέτυλο-CoA από κάποια αφυδρογονάση και στην συνέχεια σε ακέτυλο-CoA από την β-κετοθειολάση, με σκοπό την εισαγωγή στον κύκλο του κιτρικού οξέος. Σε κάθε περίπτωση, τα προϊόντα αποικοδόμησης των PHAs είναι βιοποικοδομήσιμα και μη τοξικά (Ong et al., 2017). Αξίζει να σημειωθεί, ότι υπάρχουν μικροοργανισμοί οι οποίοι αν και δεν έχουν την δυνατότητα να συνθέσουν οι ίδιοι PHAs, μπορούν να παράγουν εξωκυτταρικές αποπολύμεράσες οι οποίες διασπών τα PHAs που παράγουν άλλοι μικροοργανισμοί (Kumar et al., 2020).

1.4. Πολύ-υδροξυβουτυρικό οξύ (PHB)

1.4.1. Γενικά χαρακτηριστικά

Το πολύ-3υδροξυβουτυρικό οξύ (P(3HB)), ή αλλιώς PHB, είναι το πρώτο πολυυδροξυαλκανοϊκό οξύ που απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε στο βακτήριο *Bacillus megaterium* (Lemoigne, 1926). Το PHB είναι το απλούστερο δομικά πολυυδροξυαλκανοϊκό οξύ, και παρατηρήθηκε ότι παράγεται στα κύτταρα των μικροοργανισμών σε συνθήκες θρεπτικού στρες ή σε περιβάλλοντα όπου παρατηρείται περίσσεια πηγής άνθρακα αλλά περιορισμένα θρεπτικά συστατικά. Η συσσώρευση των PHB χρησιμοποιείται από τους μικροοργανισμούς ως αποθήκη ενέργειας, στην περίπτωση εξάντλησης των βασικών αποθεμάτων των θρεπτικών στοιχείων. Η δομή του παρατηρείται στην Εικόνα 6 και είναι γνωστό ότι το συγκεκριμένο βιοπολυμερές μπορεί να παραχθεί από πλήθος Gram-αρνητικών και θετικών οργανισμών με χαρακτηριστικά παραδείγματα τα *Alcaligenes* sp., *Azotobacter* sp., *Bacillus* sp., *Nocardia* sp., *Pseudomonas* sp., *Rhizobium* sp., και τον *Ralstonia eutropha*, με τον τελευταίο να είναι ο πιο εκτεταμένα μελετημένος (McAdam et al., 2020).



Εικόνα 7: Ο συντακτικός τύπος του PHB (McAdam et al., 2020).

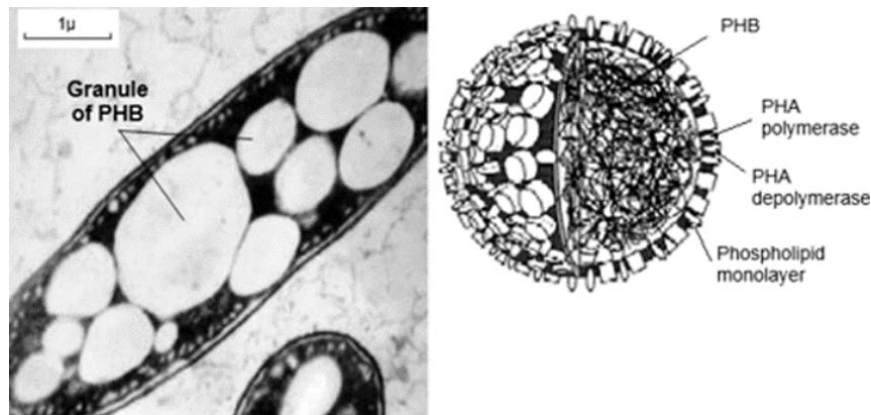
1.4.2. Ιδιότητες

Τα PHB, όντας PHAs, διαθέτουν όλες τις γενικές ιδιότητες που χαρακτηρίζουν τα PHAs. Είναι βιοαποικοδομήσιμο, βιοσυμβατό, μη τοξικό και συντίθεται από ανανεώσιμες πηγές ενέργειας. Τα PHB αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες αλυσίδες 3-υδροξυβουτυρικού οξέος, οι οποίες διαμορφώνουν πολυμερή εύρους μοριακού βάρους από 200 έως 3000 kDa, ανάλογα με το είδος του μικροοργανισμού και τις συνθήκες ανάπτυξης (Roohi et al., 2017). Είναι αδιάλυτο στο νερό, εμφανίζει σχετική ανθεκτικότητα στην υδρολυτική απεικοδόμηση (Anjum et al., 2016) και παρατηρείται να εμφανίζουν ιδιότητες παρόμοιες με το πολυπροπυλένιο, όσον αφορά την υψηλή θερμοκρασία τήξης και εφελκυστικής αντοχής του, ενώ οι ιδιότητες φραγμού αερίων που παρουσιάζει ξεπερνούν εκείνες του πολυπροπυλενίου, καθιστώντας το ιδιαίτερα υποσχόμενο υλικό στον τομέα συσκευασίας τροφίμων (Turco et al., 2020). Η πυκνότητα του κρυσταλλικού PHB είναι 1.26 g/cm^3 , ενώ αντίστοιχα του άμορφου μειώνεται ελαφρώς σε 1.18 g/cm^3 (Anjum et al., 2016). Η βιοσύνθεση του επιτυγχάνεται ακολουθώντας κάποιο από τα μεταβολικά μονοπάτια που αναφέρονται στην Ενότητα 1.3.6.

1.4.3. Σύσταση των σφαιριδίων πολύ-3υδροξυβουτυρικού οξέος

Τα PHB οργανώνονται σε σφαιρίδια ενδοκυτταρικά, και εντοπίζονται συγκεκριμένα στο κυτταρόπλασμα των βακτηρίων. Τα σφαιρίδια αυτά χρησιμοποιούνται από τους μικροοργανισμούς που τα παράγουν ως αποθήκες ενέργειας σε περιπτώσεις μη ισορροπημένης παροχής θρεπτικών συστατικών. Οι κόκκοι PHB αποτελούνται από έναν πυρήνα άμορφου πολυμερούς, το οποίο καλύπτεται από ένα πυκνό στρώμα με προσδεσμένες ή ενσωματωμένες πρωτεΐνες, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται η συνθάση PHB, φασίνες, αποπολυμεράσες του PHB κ.ά. (Uchino et al., 2007). Ακόμη, υπάρχουν in vitro στοιχεία που υποστηρίζουν την ύπαρξη φωσφολιπιδίων στο περίβλημα του πυρήνα πολυμερούς (Griebel et al., 1968), τα οποία ωστόσο δεν επιβεβαιώνονται in vivo (Beeby et al., 2012). Τα σφαιρίδια PHB είναι ευαίσθητα σε διαδικασίες μετουσίωσης όταν βρίσκονται στην native μορφή τους, ενώ έχει παρατηρηθεί ακόμη πως μόνο στην συγκεκριμένη μορφή το πολυμερές μπορεί να επεξεργαστεί από τις συνθάσες και αποπολυμεράσες PHB. Από την στιγμή που τα σφαιρίδια εκτεθούν σε φυσικές, χημικές ή βιοχημικές καταπονήσεις, τα σφαιρίδια μετουσιώνονται γρήγορα και πλέον γίνονται ανθεκτικά στην αποικοδόμηση από τις αποπολυμεράσες PHB. Στην περίπτωση των native σφαιριδίων PHB, το πολυμερές

βρίσκεται σε άμορφη κατάσταση, ενώ στην περίπτωση των μετουσιωμένων σφαιριδίων το PHB είναι κρυσταλλικό (Merrick et al., 1965, Griebel & Merrick, 1971).



Εικόνα 8: Συσσωρευμένα σφαιρίδια PHB στο κυτταρόπλασμα του *Azobacter chroococcum* (αριστερά) και πιθανή τρισδιάστατη δομή των σφαιριδίων PHB (αριστερά) (Santos et al., 2017).

1.5. Το βακτηριακό στέλεχος *Pseudomonas* sp. phDV1

Τα βακτήρια που έχουν την δυνατότητα να παράγουν PHAs μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες, με κριτήριο της συνθήκες παραγωγής αυτών των βιοπολυμερών. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν τα βακτήρια, τα οποία απαιτούν έλλειψη κάποιου βασικού θρεπτικού συστατικού (όπως οξυγόνο, άζωτο, φώσφορο, θείο και μαγνήσιο) και περίσσεια άνθρακα στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξής τους, προκειμένου να επιτευχθεί η σύνθεση PHAs. Αντίθετα, στην δεύτερη κατηγορία ανήκουν τα βακτήρια, που έχουν την δυνατότητα να συνθέσουν PHAs, χωρίς να χρειάζεται η ανάπτυξή τους να πραγματοποιείται σε ιδιαίτερες συνθήκες καταπόνησης. Στην πρώτη περίπτωση ανήκει και το βακτηριακό στέλεχος *Pseudomonas* sp. phDV1. Το συγκεκριμένο βακτήριο απομονώθηκε πρώτη φορά στην Δανία, σε έδαφος μολυσμένο από απόβλητα δυλιστηρίων (Polymenakou & Stephanou, 2005), και χαρακτηρίζεται ως ένα αρνητικό κατά Gram, αερόβιο βακτήριο, το οποίο έχει την ικανότητα να αποικοδομεί αρωματικούς υδρογονάνθρακες (Tsirogianni et al., 2004). Το γενετικό του υλικού αποτελείται από ένα κυκλικό χρωμόσωμα μήκους 4,727,628 bps, με το περιεχόμενο G+C να είναι 62.3%, ενώ μέσω φυλογενετικής ανάλυσης και ανάλυσης του γονιδιώματος, έχει βρεθεί πως κατηγοριοποιήθηκε στην οικογένεια *Pseudomonadaceae* και παρουσιάζει ομοιότητα της τάξεως 99.93% και 99.41% με το γενετικό υλικό των *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 και *Pseudomonas mendocina* NK-01 αντίστοιχα (Xie et al., 2019). Από τα παραπάνω προέκυψε πως το *Pseudomonas* sp. phDV1 θα πρέπει να ταξινομηθεί ως στέλεχος phDV1 στο γένος *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (Polymenakou & Stephanou, 2005, Xie et al., 2019). Επιπλέον, είναι γνωστό πως το συγκεκριμένο βακτήριο έχει την δυνατότητα να παράγει ένα σημαντικό αριθμό ενζύμων που διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην παραγωγή PHAs, όταν αναπτύσσεται παρουσία ρύπων, όπου υπάρχει περίσσεια άνθρακα (Lyrtzakakis et al., 2021).

1.6. Σκοπός της εργασίας

Από προηγούμενες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στο εργαστήριο είναι γνωστό πως το βακτήριο *Pseudomonas* sp. pHDV1 έχει την δυνατότητα να χρησιμοποιήσει έναν ρυπογόνο παράγοντα, όπως είναι η φαινόλη, ως υπόστρωμα για την ανάπτυξη του. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η χρήση ενός βιομηχανικού ρύπου, του τυρογάλακτος, ως βασικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη του wild type του συγκεκριμένου μικροοργανισμού, όταν αυτό έχει αναπτυχθεί σε διαφορετικές συνθήκες, και η παράλληλη ανίχνευση παραγωγής σφαιριδίων PHB σε κάθε περίπτωση. Ακόμη, καθώς είναι γνωστό πόσο επιβλαβές για το φυσικό περιβάλλον είναι το υπό μελέτη απόβλητο, κρίθηκε απαραίτητο να προσδιοριστεί και κατά πόσο μειώνεται το συνολικό ρυπογόνο φορτίο του τυρογάλακτος, μετά από την ανάπτυξη του βακτηρίου σε αυτό.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1. Επεξεργασία τυρογάλακτος

2.1.1. Αποστείρωση τυρογάλακτος

Σε πρώτη φάση γίνεται απόψυξη του δείγματος τυρογάλακτος, σε περίπτωση που εκείνο φυλάσσεται σε συνθήκες κατάψυξης. Το τυρόγαλα μοιράζεται σε κωνικές φιάλες (περίπου 150 ml σε κάθε κωνική) και γίνεται ρύθμιση του pH σε τιμή 7.4 ± 2 με NaOH (κατάλληλη τιμή pH ανάπτυξης του βακτηρίου). Ακολουθεί αποστείρωση για 20 λεπτά στους 100°C και μετά το πέρας της, το τυρόγαλα τοποθετείται σε tubes φυγοκέντρωσης (τα οποία έχουν προηγουμένως αποστειρωθεί με αιθανόλη 70%) και ακολουθεί ζυγοστάθμιση. Η φυγοκέντρωση πραγματοποιείται διότι μετά την αποστείρωση παρατηρούνται συσσωματώματα, τα οποία οφείλονται στην μετουσίωση των πρωτεϊνών του γάλακτος. Το δείγμα τυρογάλακτος φυγοκεντρείται στα 5000 g για 10 λεπτά στους 10°C , και συλλέγεται το υπερκείμενο σε αποστειρωμένες κωνικές φιάλες.

2.1.2. Υδρόλυση τυρογάλακτος

Για την υδρόλυση του δείγματος τυρογάλακτος ακολουθείται η ίδια διαδικασία με παραπάνω μέχρι το στάδιο της συλλογής του υπερκειμένου. Το υπερκείμενο ρυθμίζεται σε pH 4.5 με οξικό οξύ και προστίθεται εμπορικά διαθέσιμη λακτάση (σκεύασμα Lamberts Lactase Complex 350mg 9000FCC) σε συγκέντρωση 36 mg/100 mL, ποσότητα που αντιστοιχεί σε ενεργότητα ενζύμου 10 U/mL. Οι κωνικές φιάλες επωάζονται σε θερμοκρασία 55°C σε κωνικές φιάλες χωρητικότητας 250 mL, με όγκο δείγματος 100 mL σε incubator σταθερής θερμοκρασίας υπό οριζόντια ανάδευση στα 80 rpm για χρονικό διάστημα 4 ωρών. Κάθε 1

ώρα, μετράται η τιμή της γλυκόζης του δείγματος με ταινίες μέτρησης γλυκόζης αίματος (Microlife GlucoTeq) σε δείγμα 1 ml με αραιώση με nanopure νερό σε αναλογία 1/10. Η αντίδραση έχει ολοκληρωθεί όταν η τιμή της γλυκόζης που μετράται έχει σταθεροποιηθεί σχεδόν. Μετά το τέλος της υδρόλυσης, το pH ρυθμίζεται σε τιμή 7.4 ± 2 με NaOH και ακολουθεί ξανά αποστείρωση στους $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, με στόχο τόσο την αποστείρωση του δείγματος αλλά και την αδρανοποίηση της λακτάσης.

2.2. Καλλιέργεια του βακτηρίου *Pseudomonas* sp. pHDV1

Πίνακας 2: Θρεπτικό υλικό *Lysogeny Broth* (LB) ρυθμισμένο σε pH = 7.4 με NaOH.

Peptone	5 g/L
NaCl	5 g/L
Yeast extract	2.5 g/L

Πίνακας 3: Θεϊκά άλατα (R-salts).

MgSO ₄ ·7H ₂ O	10% w/v
FeSO ₄ ·7H ₂ O	1% w/v

Πίνακας 4: Διάλυμα αλάτων 5x M9.

Na ₂ HPO ₄	37.6 g/L
KH ₂ PO ₄	15 g/L
NaCl	2.5 g/L
NH ₄ Cl	5 g/L

Προκαλλιέργεια:

- 30 – 50 ml θρεπτικού υλικού LB
- Μονήρης αποικία από τρυβλίο με στερεό LB στο οποίο έχει αναπτυχθεί το wild type στέλεχος του βακτηρίου

Πραγματοποιήθηκαν υγρές καλλιέργειες του wild type στελέχους του βακτηρίου στις παρακάτω συνθήκες:

Πίνακας 5: Υγρή καλλιέργεια σε κανονικές συνθήκες (control).

5x M9	200 mL/L
R-salts	7 mL/L
MgSO ₄ (1 M)	2 mL/L
CaCl (1 M)	0.1 mL/L
H ₂ O	750 mL/L
Ηλεκτρικό οξύ (0.5 M)	21 mL/L
Προκαλλιέργεια	20 mL/L

Πίνακας 6: Υγρή καλλιέργεια με προσθήκη 1 M NaCl, 1.5 M NaCl και 2 M NaCl.

	1M NaCl	1.5 M NaCl.	2 M NaCl.
5x M9	200 mL/L	200 mL/L	200 mL/L
R-salts	7 mL/L	7 mL/L	7 mL/L
MgSO ₄ (1M)	2 mL/L	2 mL/L	2 mL/L
CaCl (1 M)	0.1 mL/L	0.1 mL/L	0.1 mL/L
H ₂ O	770 mL/L	770 mL/L	770 mL/L
Ηλεκτρικό οξύ (0.5 M)	21 mL	21 mL	21 mL
Προκαλλιέργεια	20 mL/L	20 mL/L	20 mL/L
NaCl (1M)	58.44 g/L	87.66 g/L	116.88 g/L

Πίνακας 7: Υγρή καλλιέργεια με υδατάνθρακες ως πηγή άνθρακα.

	Γλυκόζη 7% w/v	Γαλακτόζη 3.5% w/v
5x M9	200 mL/L	200 mL/L
R-salts	7 mL/L	7 mL/L
MgSO ₄ (1M)	2 mL/L	2 mL/L
CaCl (1 M)	0.1 mL/L	0.1 mL/L
H ₂ O	770 mL/L	770 mL/L
Γλυκόζη 7% w/v	70 g/L	-
Γαλακτόζη 3.5% w/v	-	35 g/L
Προκαλλιέργεια	20 mL/L	20 mL/L

Πίνακας 8: Υγρή καλλιέργεια σε τυρόγαλα και σε υδρολυμένο τυρόγαλα.

	Τυρόγαλα	Υδρολυμένο τυρόγαλα
Δείγμα τυρογάλατος (Δ14) μετά από επεξεργασία	960 mL/L	-
Δείγμα υδρολυμένου τυρογάλατος (Δ14) μετά από επεξεργασία	-	960 mL/L
Προκαλλιέργεια	20 mL/l	20 mL/l

Πίνακας 9: Υγρή καλλιέργεια με πηγή άνθρακα τυρόγαλα και υδρολυμένο τυρόγαλα.

	Τυρόγαλα	Υδρολυμένο τυρόγαλα
5x M9	200 mL/L	200 mL/L
R-salts	7 mL/L	7 mL/L
MgSO ₄ (1M)	2 mL/L	2 mL/L
CaCl (1 M)	0.1 mL/L	0.1 mL/L
H ₂ O	756 mL/L	756 mL/L
Δείγμα τυρογάλατος (Δ14) μετά από επεξεργασία	40 mL/L	-
Δείγμα υδρολυμένου τυρογάλατος (Δ14) μετά από επεξεργασία	-	40 mL/L
Προκαλλιέργεια	20 mL/L	20 mL/L

Πίνακας 10: Υγρή καλλιέργεια με τυρόγαλα και υδρολυμένο τυρόγαλα αντί για νερό.

	Τυρόγαλα	Υδρολυμένο τυρόγαλα
5x M9	200 mL/L	200 mL/L
R-salts	7 mL/L	7 mL/L
MgSO ₄ (1M)	2 mL/L	2 mL/L
CaCl (1 M)	0.1 mL/L	0.1 mL/L
Δείγμα τυρογάλατος (Δ14) μετά από επεξεργασία	760 mL/L	-
Δείγμα υδρολυμένου τυρογάλατος (Δ14) μετά από επεξεργασία	-	760 mL/L
Προκαλλιέργεια	20 mL/L	20 mL/L

Όλα τα θρεπτικά υλικά και σκεύη που χρησιμοποιούνται πρέπει να είναι αποστειρωμένα.

2.2.1. Στερεή καλλιέργεια

Το πρώτο βήμα για την καλλιέργεια του βακτηρίου είναι η ανάπτυξη του βακτηρίου από στοκ γλυκερόλης σε τρυβλίο με θρεπτικό υλικό LB και άγαρ 1.5% (στερεή καλλιέργεια). Το τρυβλίο επωάζεται στους 32°C για περίπου 24 ώρες.

2.2.2. Προκαλλιέργεια

Μετά την ανάπτυξη του βακτηρίου σε τρυβλίο, μία μονήρης αποικία εμβολιάζεται σε υγρό θρεπτικό υλικό LB και η προκαλλιέργεια επωάζεται για 16-18 ώρες στους 32°C υπό συνεχή ανάδευση. Μετά την ολοκλήρωση της επώασης, μετράται η οπτική πυκνότητα της προκαλλιέργειας στα 600 nm (OD_{600}), η τιμή της οποίας πρέπει να κυμαίνεται από 1.6 – 2.2. Η μέτρηση του OD_{600} πραγματοποιείται σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης Perkin Elmer Lambda 20.

2.2.3. Υγρή καλλιέργεια

Η υγρή καλλιέργεια του βακτηρίου πραγματοποιείται σε θρεπτικό υλικό αλάτων M9R, στο οποίο έχει εμβολιαστεί κατάλληλη ποσότητα προκαλλιέργειας (η επιθυμητή τιμή OD_{600} για την έναρξη της καλλιέργειας είναι 0.1-0.2). Στα πλαίσια της συγκεκριμένης εργασίας ελέγχθηκαν 9 διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης του βακτηρίου σε διαφορετικές πηγές άνθρακα (ηλεκτρικό οξύ, γλυκόζη, γαλακτόζη, τυρόγαλα, υδρολυμένο τυρόγαλα) αλλά και παρουσία υψηλής συγκέντρωσης NaCl. Επομένως, σε κάθε διαφορετική συνθήκη ανάπτυξης διαφοροποιείται η πηγή άνθρακα, η ύπαρξη επιπλέον NaCl καθώς και θρεπτικού υλικού αλάτων M9R. Η επώαση των υγρών καλλιέργειών γίνεται στους 32°C υπό συνεχή ανάδευση για τα εξής χρονικά διαστήματα για κάθε καλλιέργεια:

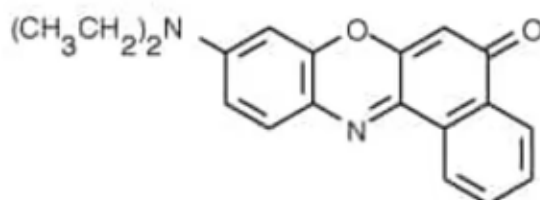
- Για καλλιέργεια σε κανονικές συνθήκες : 72 ώρες
- Για καλλιέργεια με πηγή άνθρακα γλυκόζη ή γαλακτόζη: 74 ώρες
- Για καλλιέργεια σε συγκεντρώσεις άλατος NaCl 1 M, 1.5 M και 2 M και πηγή άνθρακα ηλεκτρικό οξύ: 216 ώρες
- Για καλλιέργεια μόνο σε τυρόγαλα: 118 ώρες
- Για καλλιέργεια μόνο σε υδρολυμένο τυρόγαλα: 147 ώρες
- Για καλλιέργεια με πηγή άνθρακα τυρόγαλα ή υδρολυμένο τυρόγαλα: 74 ώρες
- Για καλλιέργεια με αντικατάσταση του νερού από τυρόγαλα ή υδρολυμένο τυρόγαλα: 74 ώρες

2.3. Καμπύλες ανάπτυξης του βακτηρίου *Pseudomonas* sp. pHDV1 σε διαφορετικές συνθήκες

Προκειμένου να κατασκευαστούν οι καμπύλες ανάπτυξης του στελέχους σε κάθε διαφορετική υπό μελέτη συνθήκη, κατά το χρονικό διάστημα ανάπτυξης των καλλιιεργειών, πραγματοποιείται δειγματοληψία ανάλογα με τις απαιτήσεις του πειράματος κάθε φορά, και μετράται το OD₆₀₀ σε plate reader (Multiskan SkyHigh Microplate Spectrophotometer, ThermoFischer Scientific).

2.4. Παρατήρηση κυττάρων με Nile red σε μικροσκόπιο φθορισμού

Η Nile red ή 9-διαιλυλαμινο-5H-βενζο[α]+φαινοξαζιν-5-όνη ή Nile blue oxazone είναι μια φθορίζουσα χρωστική η οποία χρησιμοποιείται για την παρατήρηση υδροφοβών δομών όπως κυτταρικές μεμβράνες, τριακυλογλυκερόλες, PHAs κ.ά. Η παρατήρηση προκύπτει εξαιτίας της σημαντικής υδροφοβικότητας της χρωστικής, γεγονός που καθιστά επιτρεπτή την έντονη αλληλεπίδραση με υδροφοβα μόρια, με αποτέλεσμα την απεικόνιση των επιθυμητών μορίων όταν εκείνη φθορίζει. Το μήκος κύματος εκπομπής και διέγερσής της χρωστικής διαφέρει ανάλογα από την πολικότητα του διαλύτη, ενώ το χρώμα του φθορισμού μπορεί να ποικίλει από χρυσο-κίτρινο έως βαθύ κόκκινο (Rumin et al., 2015). Η χρωστική είναι σχεδόν μη φθορίζουσα στο νερό και άλλους πολικούς διαλύτες αλλά μπορεί να είναι έντονα φθορίζουσα σε λιπόφιλα περιβάλλοντα. Η δομή της φαίνεται στην Εικόνα _ και η σύνθεση της προκύπτει από όξινη υδρόλυση διαλύματος Nile Blue με θειικό οξύ και κατόπιν εκχύλιση σε κάποιον οργανικό διαλύτη (Greenspan et al., 1985).



Εικόνα 9: Η δομή της χρωστικής Nile red (Thermofisher).

Τα δείγματα που συλλέχθηκαν για την κατασκευή καμπυλών ανάπτυξης του βακτηρίου σε κάθε διαφορετική συνθήκη που μελετήθηκε χρησιμοποιήθηκαν για την παρατήρηση των κυττάρων σε κάθε δείγμα σε οπτικό μικροσκόπιο και με την χρήση της φθορίζουσας χρωστικής Nile red έγινε δυνατός και ο προσδιορισμός της παρουσίας PHB σε κάθε συνθήκη. Κάθε δείγμα όγκου 1 mL που έχει ληφθεί από την κύρια υγρή καλλιέργεια στο επιθυμητό χρονικό σημείο, φυγοκεντρείται στα 13000 g για 1 λεπτό, και συμπυκνώνεται έτσι σε τελικό όγκο 30-50 μ L. Από το κάθε συμπυκνωμένο δείγμα λαμβάνονται 3 μ L τα οποία αναμιγνύονται με 1 μ L χρώσης Nile red και τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Πάνω από το μίγμα κυττάρων-χρώσης, προστίθενται 30 μ L υγρής αгарόζης 1% w/v σε θερμοκρασία 60°C. Μετά από διάστημα λίγων δευτερολέπτων, τοποθετείται η καλυπτρίδα και αφήνεται μέχρι να σταθεροποιηθεί η αгарόζη. Τα δείγματα παρατηρούνται σε οπτικό μικροσκόπιο (Nikon Eclipse E800, Jenoptik ProgRes CF CCD 1.4 M.P. Microscope Camera,

Nikon Super High Pressure Mercury Lamp Power Supply) στην περιοχή του πράσινου (Διέγερση: 562/40 nm, Εκπομπή: 594 nm) και οι εικόνες που λαμβάνονται επεξεργάζονται με το λογισμικό ImageJ.

2.5. Ποσοτικός προσδιορισμός PHB με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

Η ποσοτικοποίηση του PHB πραγματοποιείται με την μέτρηση απορρόφησης του κροτονικού οξέος στα 215 nm μετά από Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC). Συλλέγονται 20 mL από την υγρή καλλιέργεια που έχει πραγματοποιηθεί σε κάθε διαφορετική συνθήκη και φυγοκεντρώνονται στα 15.137 g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 4 °C. Ακολουθεί συλλογή του ιζήματος και έκπλυσή του δύο φορές με διάλυμα ίσων όγκων ακετόνης και αιθανόλης. Το ίζημα στην συνέχεια μετατρέπεται σε κροτονικό οξύ, με πέψη του σε 1 mL πυκνό θειικό οξύ για 30 λεπτά στους 105 °C. Μετά το πέρας της πέψης, τα δείγματα αραιώνονται σε πενταπλάσιο όγκο με nanopure νερό και φιλτράρονται με την χρήση φίλτρων PTFE 0.22 μm. Η χρωματογραφία υψηλής απόδοσης πραγματοποιήθηκε στο σύστημα Agilent 1260 Infinity II LC, με τα δείγματα να φορτώνονται σε στήλη αντίστροφης φάσης InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 (4 μm μέγεθος πόρων, 4,6×150 mm) και να εκλούνται με 0.5 mL/min, διάλυμα φωσφορικού οξέος 85% (0,1 M) 53 και ακετονιτρίλιο 15% (v/v), στους 30°C. Για την ανίχνευση του κροτονικού οξέος σε κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής συστοιχίας διόδων στα 235 nm και ο ποσοτικός προσδιορισμός του πραγματοποιήθηκε με χρήση πρότυπης καμπύλης.

2.6. Καμπύλες κατανάλωσης γλυκόζης του βακτηρίου *Pseudomonas sp. pHDV1* σε καλλιέργειες με υδρολυμένο τυρόγαλα και γλυκόζη

Μέτρηση της κατανάλωσης της γλυκόζης γίνεται στα χρονικά διαστήματα 0 h, 24 h, 48 h και 72 h για όλες τις καλλιέργειες που περιέχουν τυρόγαλα και υδρολυμένο τυρόγαλα, καθώς και στην περίπτωση ανάπτυξης του βακτηρίου με γλυκόζη ως πηγή άνθρακα. Οι συνθήκες στις οποίες κατασκευάζονται καμπύλες κατανάλωσης είναι:

- Καλλιέργεια μόνο σε υδρολυμένο τυρόγαλα
- Καλλιέργεια με πηγή άνθρακα γλυκόζη
- Καλλιέργεια με πηγή άνθρακα υδρολυμένο τυρόγαλα
- Καλλιέργεια με αντικατάσταση του νερού από υδρολυμένο τυρόγαλα

Λαμβάνονται δείγματα όγκου 1 mL σε κάθε συνθήκη ανάπτυξης του βακτηρίου στα επιθυμητά χρονικά διαστήματα τα οποία φυγοκεντρώνονται στα 1000 rpm για 5 min, με σκοπό την καθίζηση των κυττάρων και την συλλογή των υπερκειμένων. Γίνεται αραιώση των υπερκειμένων σε αναλογία 1/10 με nanopure νερό και μετράται η τιμή της γλυκόζης κάθε δείγματος με ταινίες μέτρησης γλυκόζης αίματος (Microlife GlucoTeq). Η τιμές γλυκόζης

που προκύπτουν είναι ποσοτικοποιημένες, όπως προκύπτουν από την εσωτερική ρύθμιση του οργάνου από τον κατασκευαστή.

2.7. Προσδιορισμός ολικών σακχάρων με την μέθοδο θυμόλης-θεικού

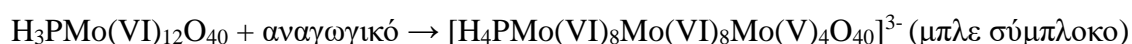
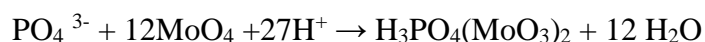
Προκείμενου να προσδιοριστεί η κατανάλωση των ολικών σακχάρων από το βακτήριο κατά την διάρκεια ανάπτυξής του, χρησιμοποιείται η μέθοδος θυμόλης-θεικού (Groger, 1961). Οι συνθήκες στις οποίες μελετάται η κατανάλωση των ολικών σακχάρων είναι:

- Καλλιέργεια μόνο σε τυρόγαλα ή υδρολυμένο τυρόγαλα
- Καλλιέργεια με πηγή άνθρακα τυρόγαλα ή υδρολυμένο τυρόγαλα
- Καλλιέργεια με αντικατάσταση του νερού από τυρόγαλα ή υδρολυμένο τυρόγαλα

Λαμβάνονται δείγματα όγκου 1 mL σε κάθε συνθήκη ανάπτυξης του βακτηρίου στα χρονικά διαστήματα 0h, 24h, 48h, 72h, τα οποία φυγοκεντρώνται στα 1000 rpm για 5 min, με σκοπό την καθίζηση των κυττάρων και την συλλογή των υπερκειμένων. Σε erpendorf προστίθενται 100 μL δείγματος με 100 μL διαλύματος HCl 4 N, αναμεγνύονται με την βοήθεια vortex, και επωάζονται στους 110 °C για 2 ώρες. Στην συνέχεια, τα δείγματα ψύχονται σε θερμοκρασία δωματίου και προστίθεται στο καθένα 300 μL αντιδραστηρίου θυμόλης (1 mg/mL θυμόλη σε διάλυμα πυκνού H₂SO₄). Τα δείγματα επωάζονται ξανά στους 110 °C για 30 λεπτά και μετά το πέρας του συγκεκριμένου χρονικού διαστήματος, τα δείγματα ψύχονται ξανά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί αραίωση των δειγμάτων σε αναλογία 1/10 με νερό nanopure σε plate και μετράται η απορρόφηση στα 509 nm (Multiskan SkyHigh Microplate Spectrophotometer, ThermoFischer Scientific). Ως blank χρησιμοποιείται nanopure νερό με 300 μL αντιδραστηρίου θυμόλης, του οποίου η τιμή αφαιρείται από την τιμή απορρόφησης κάθε δείγματος.

2.8. Προσδιορισμός ολικών φωσφορικών στα υπερκείμενα δειγμάτων από καλλιέργειες με τυρόγαλα με την μέθοδο μπλε του μολυβδαινίου

Για τον προσδιορισμό της κατανάλωσης των ανόργανων ολικών φωσφορικών ιόντων από το βακτήριο χρησιμοποιείται η δοκιμασία μπλε του μολυβδαινίου. Η δοκιμασία περιλαμβάνει τον σχηματισμό ενός ετεροπολυζέος το οποίο δημιουργείται από ορθοφωσφορικό και μολυβδαινικό υπό όξινες συνθήκες. Η παραγόμενη ένωση, στη συνέχεια, ανάγεται για να σχηματίσει ένα έντονα χρωματισμένο μπλε φωσφομολυβδαινικό σύμπλοκο, σύμφωνα με τις παρακάτω αντιδράσεις:



Πίνακας 11: Συστατικά mastermix αντίδρασης.

Διάλυμα H ₂ SO ₄ (2.5 N)
Διάλυμα [NH ₄] ₂ MoO ₄ (4.8 mM)
Διάλυμα ασκορβικού οξέος (30 mM)
Διάλυμα K ₂ Sb ₂ (C ₄ H ₂ O ₆) ₂ (0.205 mM)

Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει το σχηματισμό ενός ιόντος Keggin γύρω από το ανιόν της αναλυόμενης ουσίας, δηλαδή του φωσφορικού ιόντος, και το δεύτερο στάδιο συνεπάγεται την αναγωγή αυτού του ετεροπολυοξέος για να σχηματιστεί ένα προϊόν βαθύ μπλε χρώματος. Για την πραγματοποίηση της δοκιμασίας, λαμβάνονται δείγματα όγκου 1 mL σε κάθε συνθήκη ανάπτυξης του βακτηρίου που χρησιμοποιήθηκε τυρόγαλα και υδρολυμένο τυρόγαλα στα χρονικά διαστήματα 0h, 24h, 48h, 72h, τα οποία φυγοκεντρώνται στα 1000 rpm για 5 min, με σκοπό την καθίζηση των κυττάρων και την συλλογή των υπερκείμενων. Σε plate 96 θέσεων μεταφέρονται 100 µL από κάθε υπερκείμενο και προστίθενται 16 µL αντιδραστηρίου mastermix. Τα δείγματα επωάζονται για 15 λεπτά υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου, έως ότου παρατηρηθεί το μπλε χρώμα του συμπλόκου αντίδρασης. Λαμβάνεται φάσμα στα 300-900 nm (Multiskan SkyHigh Microplate Spectrophotometer, ThermoFischer Scientific), με την μέγιστη απορρόφηση να παρατηρείται στα 832 nm. Ως blank χρησιμοποιείται ποσότητα 100 µL nanopure νερό με 16 µL αντιδραστηρίου mastermix, του οποίου η τιμή αφαιρείται από την μέγιστη τιμή απορρόφησης κάθε δείγματος.

2.9. Προσδιορισμός συνολικής πρωτεΐνης με την μέθοδο Bradford

Στην μέθοδο Bradford, μετράται το μέγιστο απορρόφησης της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue, το οποίο μετατοπίζεται από τα 465 nm στα 595 nm όταν αυτή συνδέεται με πρωτεΐνη/ες σε όξινες συνθήκες. Η πρωτεϊνική συγκέντρωση είναι ανάλογη της απορρόφησης στα 595 nm, όπου εντοπίζεται έντονο μπλε χρώμα προερχόμενο από το σύμπλοκο πρωτεΐνη-χρώση, λόγω ιονικών και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων που σταθεροποιούν την ανιονική μορφή της χρώσης, σε αντίθεση με το καφέ χρώμα που έχει η χρώση από μόνη της. Για τον ακριβή προσδιορισμό της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης απαιτείται μία πρότυπη καμπύλη, η οποία κατασκευάζεται με γνώστες συγκεντρώσεις αλβουμίνης από ορό βοδιού (BSA). Για την πραγματοποίηση των μετρήσεων, λαμβάνονται δείγματα όγκου 1 mL σε κάθε συνθήκη ανάπτυξης του βακτηρίου που χρησιμοποιήθηκε τυρόγαλα και υδρολυμένο τυρόγαλα στα χρονικά διαστήματα 0h, 24h, 48h, 72h, τα οποία φυγοκεντρώνται στα 1000 rpm για 5 min, με σκοπό την καθίζηση των κυττάρων και την συλλογή των υπερκείμενων. Σε plate 96 θέσεων προστίθενται 10 µL δείγματος και 100 µL χρώσης και ακολουθεί επώαση για 5 λεπτά. Μετράται η απορρόφηση στα 595 nm (Multiskan SkyHigh Microplate Spectrophotometer, ThermoFischer Scientific) και στην συνέχεια

αφαιρείται η τιμή του blank από κάθε μέτρηση, το οποίο αποτελείται από 10 μL nanopure νερό και 100 μL χρώσης Bradford.

Πίνακας 12: Συστατικά χρώσης Bradford.

Απόλυτη αιθανόλη	50 mL/L
Διάλυμα H_3PO_4 (85%)	100 mL/L
Coomassie Blue G250	100 mg/L
Nanopure H_2O	850 mL/L

2.10. Προσδιορισμός συνολικής πρωτεΐνης με την μέθοδο BCA

Η μέθοδος BCA βασίζεται στην αναγωγή του Cu^{2+} σε Cu^+ σε αλκαλικό διάλυμα (αντίδραση διουρίας) από τις πρωτεΐνες, καταλήγοντας στην δημιουργία προϊόντος ιώδους χρώματος. Η αναγωγή του χαλκού προκαλείται κυρίως από τέσσερα αμινοξέα (κυστεΐνη, κυστίνη, τυροσίνη, τρυπτοφάνη), ενώ το έγχρωμο προϊόν προκύπτει από την δημιουργία χηλικής ένωσης που αποτελείται από δύο μόρια δικινχονικού οξέος και ένα ιόν Cu^+ . Στο ιώδες χρώμα της αντίδρασης συμβάλλει επίσης ο πεπτιδικός σκελετός κάθε πρωτεΐνης (δηλαδή η επαναλαμβανόμενη δομή αμινομάδα - α άνθρακας - καρβοξυλομάδα), γεγονός που καθιστά την δοκιμασία περισσότερο αντικειμενική, μιας και ελαχιστοποιείται η μεταβλητότητα του έγχρωμου προϊόντος, η οποία μπορεί να προκληθεί από διαφορές στην σύνθεση των πρωτεϊνών. Για τον ακριβή προσδιορισμό της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης απαιτείται μία πρότυπη καμπύλη, η οποία κατασκευάζεται με γνώστες συγκεντρώσεις αλβουμίνης από ορό βοδιού (BSA). Για την πραγματοποίηση της δοκιμασίας, λαμβάνονται δείγματα όγκου 1 mL σε κάθε συνθήκη ανάπτυξης του βακτηρίου που χρησιμοποιήθηκε τυρόγαλα και υδρολυμένο τυρόγαλα στα χρονικά διαστήματα 0h, 24h, 48h, 72h, τα οποία φυγοκεντρούνται στα 1000 rpm για 5 min, με σκοπό την καθίζηση των κυττάρων και την συλλογή των υπερκειμένων. Σε plate 96 θέσεων προστίθενται 10 μL δείγματος και 100 μL αντιδραστήριου BCA (Cu buffer και BCA buffer σε αναλογία 1/50) και ακολουθεί επώαση για 30 λεπτά στους 37°C. Μετράται η απορρόφηση στα 562 nm (Multiskan SkyHigh Microplate Spectrophotometer, ThermoFischer Scientific) και στην συνέχεια αφαιρείται η τιμή του blank από κάθε μέτρηση, το οποίο αποτελείται από 10 μL nanopure νερό και 100 μL αντιδραστήριου BCA.

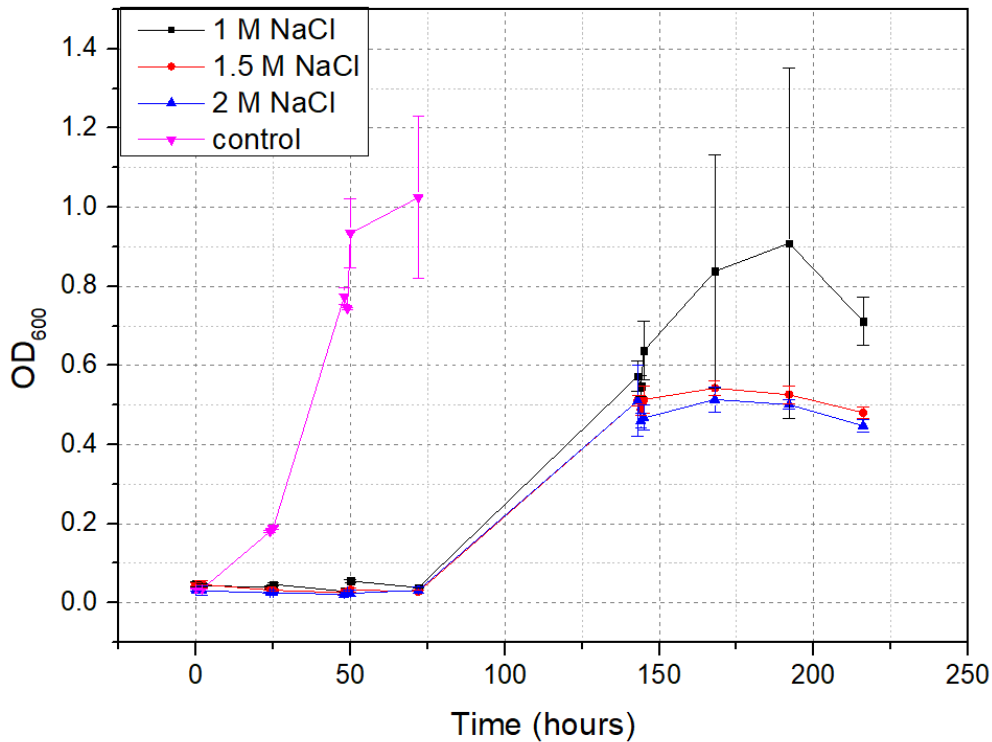
2.11. Χαρακτηρισμός εξωκυτταρικής σύστασης με Φασματοσκοπία Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Για τον χαρακτηρισμό της σύστασης των υπερκειμένων των καλλιεργειών του βακτηρίου μόνο σε τυρόγαλα και υδρολυμένο τυρόγαλα, λαμβάνονται δείγματα όγκου 1 mL σε κάθε συνθήκη ανάπτυξης του βακτηρίου στα χρονικά διαστήματα 0h, 24h, 48h, 72h, τα οποία φυγοκεντρώνται στα 1000 rpm για 5 min, με σκοπό την καθίζηση των κυττάρων και την συλλογή των υπερκειμένων. Ακόμη, λαμβάνονται τυφλά δείγματα σε κάθε χρονικό διάστημα σε κάθε συνθήκη ανάπτυξης. Γίνεται ανάμειξη 500 μL κάθε δείγματος με 100 μL εσωτερικού προτύπου d_2O με TMSF, ακολουθεί μεταφορά σε σωλήνα NMR 5 mm και λαμβάνονται φάσματα σε φασματομέτρο Bruker DPX-500 σε θερμοκρασία 298 K με τη χρήση πρότυπων προγραμμάτων παλμών από βιβλιοθήκες της Bruker. Κάθε φάσμα αποτελείται από 128 scans ενώ η επεξεργασία όλων των φασμάτων (phase correction, baseline correction, peak fitting) έγινε με το λογισμικό chenomix.

3. Αποτελέσματα και συζήτηση

3.1. Μελέτη της ανάπτυξης του βακτηρίου σε διαφορετικές συνθήκες

Βασικός στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της ανάπτυξης του βακτηρίου *Pseudomonas* sp. pHDV1 σε διάφορες συνθήκες με υπόστρωμα το τυρόγαλα. Ωστόσο, επειδή το τυρόγαλα αποτελεί ένα ιδιαίτερα πολύπλοκο βιολογικό δείγμα και καθώς ήταν η πρώτη φορά που χρησιμοποιήθηκε ο συγκεκριμένος ρύπος ως πηγή άνθρακα για την ανάπτυξη του βακτηρίου, δοκιμάστηκαν πρώτα οι παρακάτω συνθήκες ανάπτυξης. Κάθε καμπύλη ανάπτυξης δημιουργήθηκε μετά από τρεις βιολογικές επαναλήψεις κάθε διαφορετικής συνθήκης καλλιέργειας. Σε πρώτο στάδιο, μελετήθηκε η ανάπτυξη του βακτηρίου στην συνθήκη control, παρουσία δηλαδή όλων των απαραίτητων θρεπτικών συστατικών και ηλεκτρικού οξέος ως πηγή άνθρακα. Στην συνέχεια, μελετήθηκε η ανάπτυξη του στελέχους παρουσία θρεπτικών συστατικών με την ίδια πηγή άνθρακα, αλλά σε συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης NaCl, μιας και το αλάτι συνιστά βασικό συστατικό του τυρογάλακτος. Οι συγκεντρώσεις NaCl που μελετήθηκαν (1 M, 1.5 M και 2 M) ήταν αρκετά υψηλές για τα δεδομένα περιεκτικότητας αλατιού των περισσότερων ειδών τυρογάλακτος, αλλά η ανάπτυξη ή μη στις συγκεκριμένες συνθήκες θα έδινε ένα εμφανές όριο στο στρες κάτω από το οποίο μπορεί να αναπτυχθεί το βακτήριο.

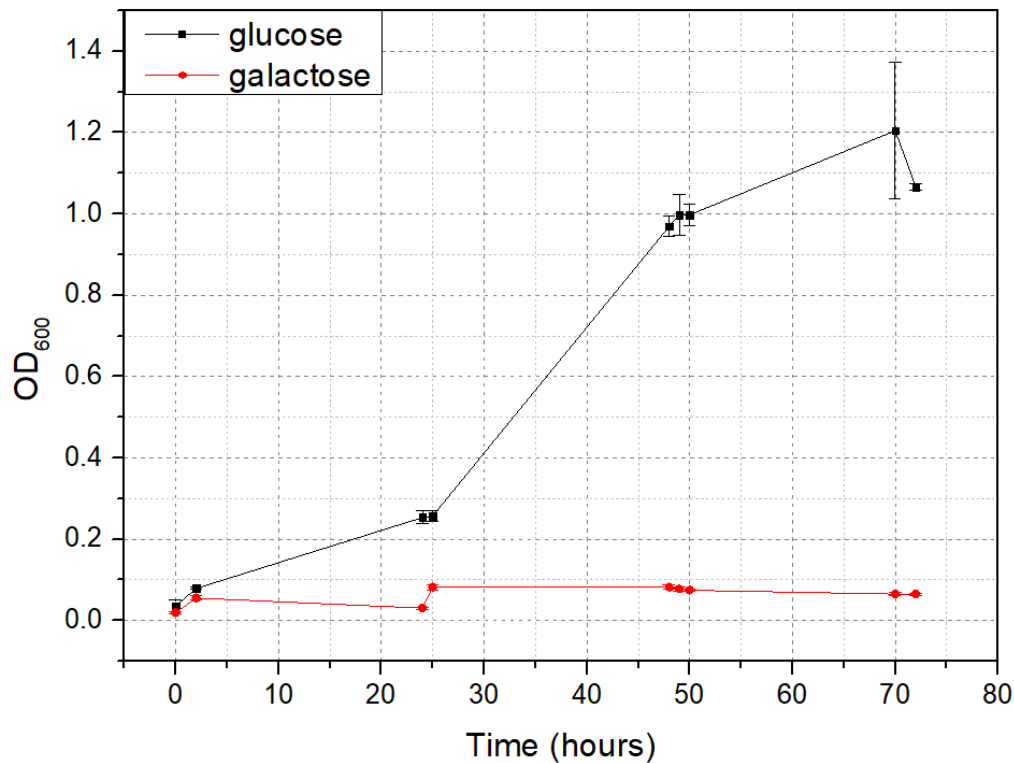


Εικόνα 10: Καμπύλες ανάπτυξης του βακτηρίου σε συνθήκες control και σε συγκεντρώσεις 1 M, 1.5 M και 2 M NaCl.

Όπως παρατηρείται παραπάνω, το βακτήριο αναπτύσσεται πλήρως και στις τρεις συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης NaCl, όμως με πολύ πιο αργό ρυθμό. Σε συνθήκες control, το WT της *Pseudomonas* sp. rhDV1 βρίσκεται προς το τέλος της στατικής φάσης στις 72 ώρες της καλλιέργειας. Στις παραπάνω τρεις συνθήκες ανάπτυξης η οπτική πυκνότητα των καλλιεργειών παρατηρείται να είναι κοντά στο μηδέν μέχρι το χρονικό σημείο των 72 ωρών, ενώ η εκθετική φάση της ανάπτυξης παρατηρείται να διαρκεί γύρω στις 48 ώρες. Η καλλιέργεια σε κάθε συνθήκη παρατηρείται να φτάνει σε φάση θανάτου στις 216 ώρες. Ακόμη παρατηρείται διαφοροποίηση στην μέγιστη οπτική πυκνότητα κάθε συνθήκης ανάπτυξης, με την μέγιστη να είναι 0.9 στην καλλιέργεια του βακτηρίου σε συγκέντρωση 1 M NaCl, ενώ στις συγκεντρώσεις 1.5 M NaCl και 2 M NaCl, η μέγιστη οπτική πυκνότητα μειώνεται σε 0.55 και 0.5 αντίστοιχα. Τα παραπάνω δεδομένα είναι λογικά, μιας και όσο αυξάνεται η συγκέντρωση NaCl σε κάθε καλλιέργεια, τόσο μεγαλύτερο είναι το στρες στο οποίο υπόκειται ο πληθυσμός των βακτηρίων, γεγονός που επηρεάζει τόσο τον ρυθμό ανάπτυξης, όσο και την οπτική πυκνότητα του βακτηριακού πληθυσμού.

Εφόσον επιβεβαιώθηκε η δυνατότητα του στελέχους να αναπτύσσεται σε υψηλές συγκεντρώσεις NaCl, το επόμενο βήμα ήταν η καλλιέργεια του βακτηρίου σε διαφορετικές πηγές άνθρακα. Ο υδατάνθρακας που κυριαρχεί στο τυρόγαλα είναι η λακτόζη, η οποία στο υπό μελέτη δείγμα τυρογάλακτος βρίσκεται σε συγκέντρωση 7% w/v. Καθώς η λακτόζη συνιστά ένα δισακχαρίτη, επιλέχθηκε η ανάπτυξη του στελέχους στους υδατάνθρακες που το αποτελούν, δηλαδή σε γλυκόζη και γαλακτόζη. Οι συγκεντρώσεις που επιλέχθηκαν ήταν 7%

w/v γλυκόζη και 3.5 % w/v για την γαλακτόζη. Η συγκεκριμένη συγκέντρωση γλυκόζης επιλέχθηκε ώστε να αντιπροσωπεύει την συγκέντρωση της λακτόζης που εντοπίζεται στο τυρόγαλα, ενώ η συγκέντρωση γαλακτόζης επιλέχθηκε να είναι η μισή, καθώς είναι γνωστό από την βιβλιογραφία ότι το συγκεκριμένο είδος βακτηρίου δεν μεταβολίζει την γαλακτόζη (Zhou et al., 2022).

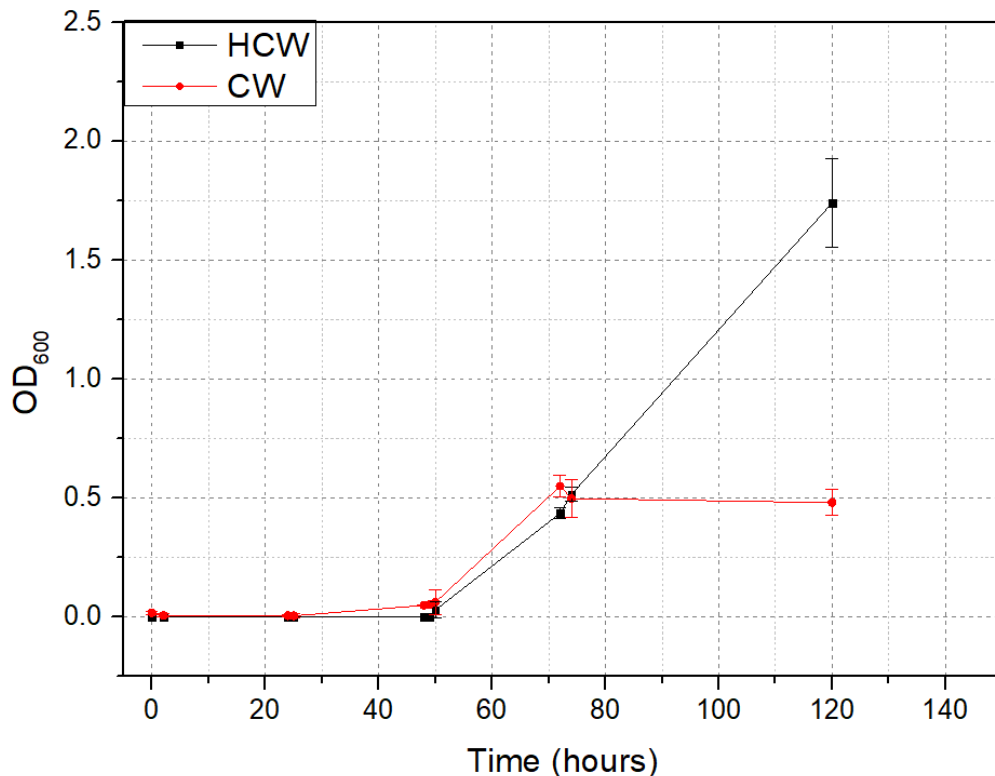


Εικόνα 11: Καμπύλη ανάπτυξης του WT του βακτηρίου σε γλυκόζη 7% w/v και γαλακτόζη 3.5% w/v.

Οι παραπάνω καμπύλες ανάπτυξης δείχνουν πως δεν πραγματοποιείται ανάπτυξη του βακτηρίου σε πηγή άνθρακα γαλακτόζη 3.5% w/v, ενώ σε συνθήκες καλλιέργειας με πηγή άνθρακα γλυκόζη 7% w/v η ανάπτυξη του βακτηρίου είναι επιτυχής, σε συμφωνία με την βιβλιογραφία (Papasotiriou et al., 2008, Nikolaki et al., 2014). Στην περίπτωση της γαλακτόζης, παρατηρείται πως σε διάστημα 74 ωρών η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας παραμένει περίπου σταθερή, γεγονός που αποδεικνύει την μη ανάπτυξη του βακτηρίου. Αντίθετα, στην περίπτωση της γλυκόζης ως πηγή άνθρακα, η ανάπτυξη του βακτηρίου είναι παρόμοια με την συνθήκη control, όσον αφορά τον ρυθμό ανάπτυξης και την διάρκεια της καλλιέργειας. Η μέγιστη οπτική πυκνότητα του βακτηρίου που παρατηρείται στην συγκεκριμένη συνθήκη είναι 1.2 .

Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες του βακτηρίου σε διαφορετικές συνθήκες, με τυρόγαλα. Επειδή παρατηρήθηκε ότι το βακτήριο δεν έχει την δυνατότητα ανάπτυξης σε γαλακτόζη, πέρα από την ανάπτυξη σε κανονικό τυρόγαλα το οποίο περιείχε λακτόζη, επιχειρήθηκε και η ανάπτυξη σε τυρόγαλα στο οποίο έχει πραγματοποιηθεί υδρόλυση της λακτόζης σε γλυκόζη και γαλακτόζη, με σκοπό την κατανάλωση τουλάχιστον του ενός μονοσακχαρίτη από το βακτήριο. Ελέγχθηκαν οι συνθήκες ανάπτυξης του βακτηρίου μόνο

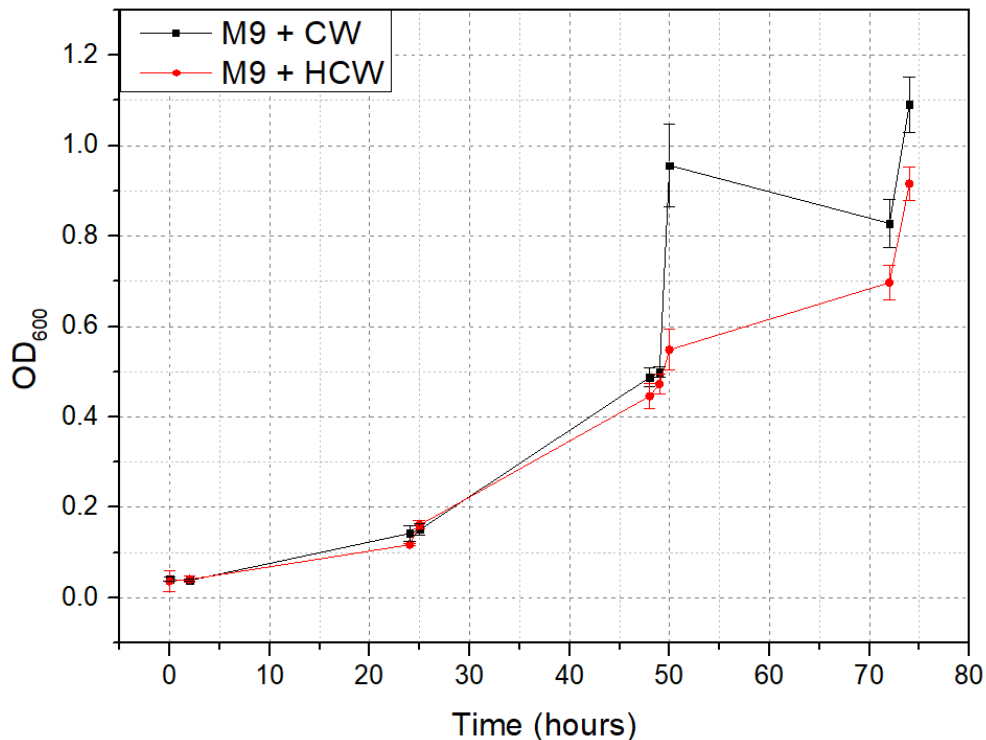
σε τυρόγαλα ή σε υδρολυμένο τυρόγαλα αντίστοιχα χωρίς κανένα θρεπτικό συστατικό (Εικόνα 12), σε συνθήκες ανάπτυξης με όλα τα θρεπτικά συστατικά του βακτηρίου και τυρόγαλα ή υδρολυμένο τυρόγαλα αντίστοιχα ως πηγή άνθρακα (Εικόνα 13), και σε συνθήκες ανάπτυξης με όλα τα θρεπτικά συστατικά του βακτηρίου και τυρόγαλα ή υδρολυμένο τυρόγαλα αντίστοιχα, αντί για νερό (Εικόνα 14). Στην τελευταία περίπτωση, το τυρόγαλα ή το υδρολυμένο τυρόγαλα αντικαθιστούσε τόσο την ποσότητα του απαιτούμενου νερού όσο και την πηγή άνθρακα της κάθε καλλιέργειας.



Εικόνα 12: Καμπύλες ανάπτυξης του βακτηρίου σε τυρόγαλα (*cheese whey*, CW) και σε υδρολυμένο τυρόγαλα (*hydrolysed cheese whey*, HCW) χωρίς κανένα θρεπτικό συστατικό.

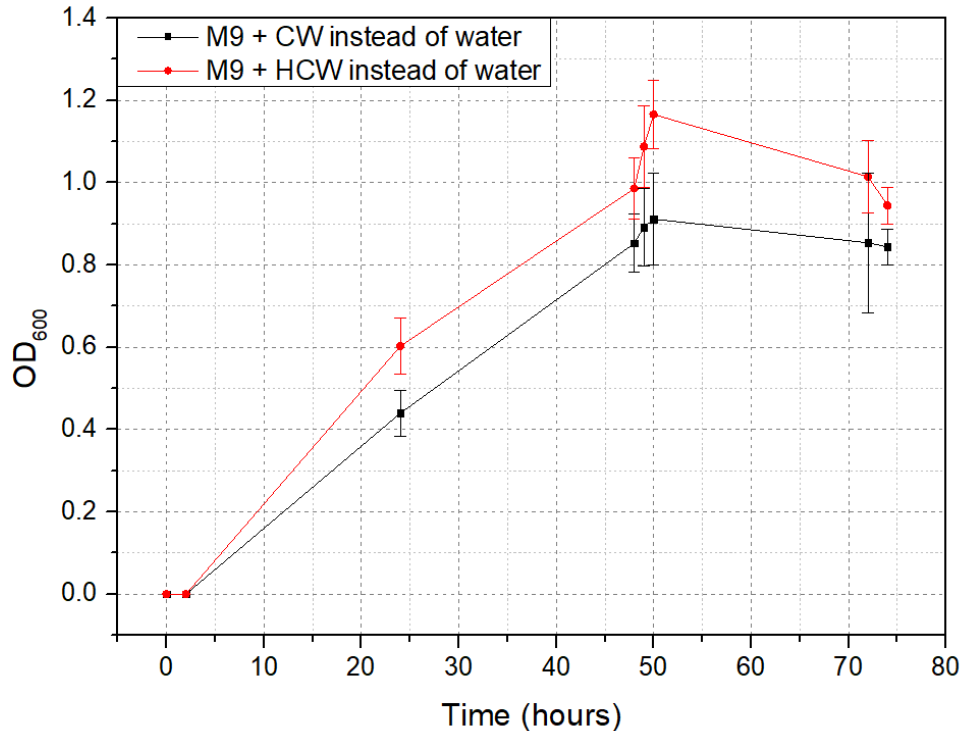
Οι καμπύλες ανάπτυξης δείχνουν πως η ανάπτυξη του βακτηρίου μόνο σε τυρόγαλα ή μόνο σε υδρολυμένο τυρόγαλα είναι επιτυχής (Εικόνα 12). Ο ρυθμός ανάπτυξης είναι ιδιαίτερα χαμηλός σε σχέση με την συνθήκη control, καθώς στην περίπτωση του τυρογάλακτος η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας είναι χαμηλή μέχρι τις 48 ώρες, ενώ στην περίπτωση του υδρολυμένου τυρογάλακτος η οπτική πυκνότητα είναι ιδιαίτερα χαμηλή μέχρι το χρονικό σημείο των 50 ωρών. Η ανάπτυξη του βακτηρίου αυξάνεται εκθετικά από τις 48 μέχρι τις 72 ώρες στην πρώτη περίπτωση, ενώ στην δεύτερη η εκθετική φάση παρατηρείται από τις 50 h μέχρι και τις 72 ώρες. Λόγω της καθυστέρησης της ανάπτυξης του βακτηρίου σε αυτές τις δύο συγκεκριμένες συνθήκες, η διάρκεια της καλλιέργειας ήταν πολύ μεγαλύτερη (120-150 ώρες). Η μέγιστη οπτική πυκνότητα στην περίπτωση της καλλιέργειας σε τυρόγαλα ήταν

0.55, ενώ στην περίπτωση της καλλιέργειας σε υδρολυμένο τυρόγαλα ήταν 1.75, σαφώς πολύ υψηλότερη .



Εικόνα 13: Καμπύλες ανάπτυξης του βακτηρίου με όλα τα θρεπτικά συστατικά και τυρόγαλα (*cheese whey, CW*) και υδρολυμένο τυρόγαλα (*hydrolysed cheese whey, HCW*) ως πηγή άνθρακα .

Οι επόμενες συνθήκες που ελέγχθηκαν ήταν η ανάπτυξη του βακτηρίου παρουσία όλων των απαραίτητων θρεπτικών συστατικών και τυρόγαλα ή υδρολυμένο τυρόγαλα αντίστοιχα, ως πηγή άνθρακα (Εικόνα 13). Η ανάπτυξη σε αυτές τις περιπτώσεις δεν παρουσίαζε ιδιαίτερες διαφορές με την ανάπτυξη σε συνθήκη control, όσον αφορά τον ρυθμό ανάπτυξης και την διάρκεια τις καλλιέργειας. Στις 50 ώρες στην περίπτωση του τυρογάλακτος ως πηγή άνθρακα, παρατηρείται μια σημαντική αύξηση τις οπτικής πυκνότητας σε σχέση με την οπτική πυκνότητα τις καλλιέργειας με υδρολυμένο τυρόγαλα ως πηγή άνθρακα στο ίδιο χρονικό σημείο, ενώ η ανάπτυξη του βακτηρίου και τις δύο περιπτώσεις ακολουθεί την ίδια τάση μέχρι το πέρας τις καλλιέργειας. Η μέγιστη οπτική πυκνότητα στην πρώτη συνθήκη ανάπτυξης του βακτηρίου είναι 1.1, ενώ στην δεύτερη περίπτωση φτάνει το 0.9 .



Εικόνα 14: Καμπύλες ανάπτυξης του βακτηρίου με όλα τα θρεπτικά συστατικά και τυρόγαλα (*cheese whey, CW*) και υδρολυμένο τυρόγαλα (*hydrolysed cheese whey, HCW*) αντί για νερό.

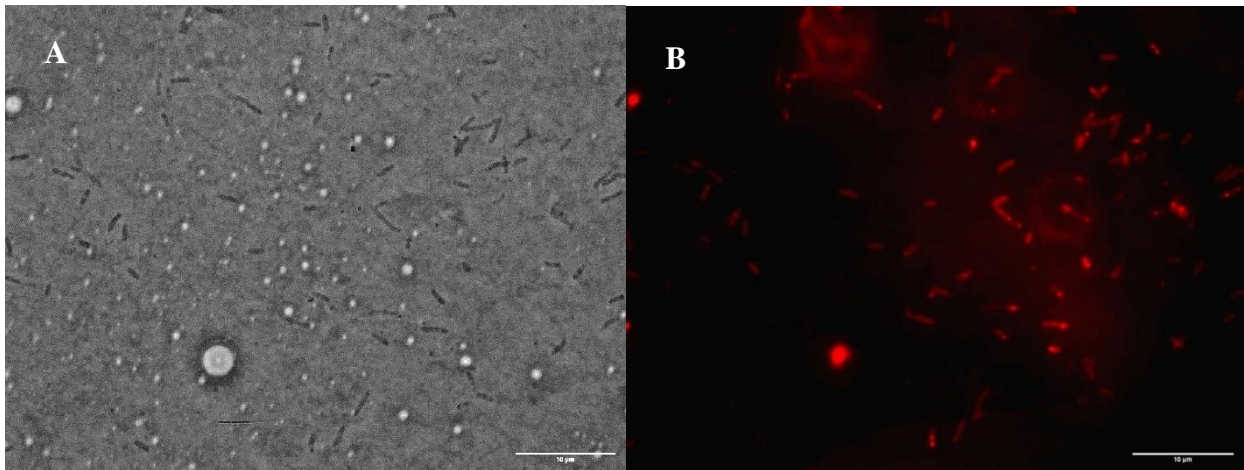
Οι τελευταίες συνθήκες που μελετήθηκαν ήταν η ανάπτυξη του βακτηρίου σε καλλιέργειες με όλα τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά και τυρόγαλα ή υδρολυμένο τυρόγαλα αντί για την ποσότητα νερού που απαιτεί το βακτήριο για να αναπτυχθεί (Εικόνα 14). Ο λόγος που επιλέχθηκαν οι συγκεκριμένες συνθήκες ανάπτυξης για μελέτη ήταν πως κρίθηκε σημαντικό να ερευνηθεί αν μεγαλύτερη ποσότητα τυρογάλακτος παρουσία των θρεπτικών συστατικών του βακτηρίου θα προκαλέσει αξιοσημείωτη καταπόνηση. Και τις δύο περιπτώσεις παρατηρείται πολύ μικρή λανθάνουσα φάση, ενώ τόσο ο ρυθμός ανάπτυξης όσο και ο χρόνος διάρκειας τις κάθε καλλιέργειας είναι όμοια με την συνθήκη control. Η μέγιστη οπτική πυκνότητα στην περίπτωση τις καλλιέργειας όπου το νερό αντικαθίσταται από τυρόγαλα είναι 0.9 ενώ στην περίπτωση τις καλλιέργειας όπου το νερό αντικαθίσταται από υδρολυμένο τυρόγαλα φτάνει το 1.1 αλλά παρατηρείται και μικρότερος χρόνος ανάπτυξης.

3.2. Παρατήρηση των κυττάρων σε οπτικό μικροσκόπιο με χρώση Nile red

Από τις καλλιέργειες του βακτηρίου που πραγματοποιήθηκαν στις παραπάνω συνθήκες λήφθηκαν δείγματα στο χρονικό σημείο των 72 ωρών, με σκοπό την πιθανή παρατήρηση τις παραγωγής σφαιριδίων PHB. Το συγκεκριμένο χρονικό σημείο επιλέχθηκε καθώς θεωρητικά το βακτήριο βρίσκεται στην στατική φάση, και εφόσον έχει αναπτυχθεί υπό συνθήκες καταπόνησης, θα έχει πραγματοποιηθεί η σύνθεση PHB από τον μικροοργανισμό, ώστε το βακτήριο να επιβιώσει. Λήφθηκαν εικόνες τόσο σε οπτικό μικροσκόπιο όσο και σε μικροσκόπιο φθορισμού με την βοήθεια τις χρωστικής Nile red, με σκοπό την παρατήρηση

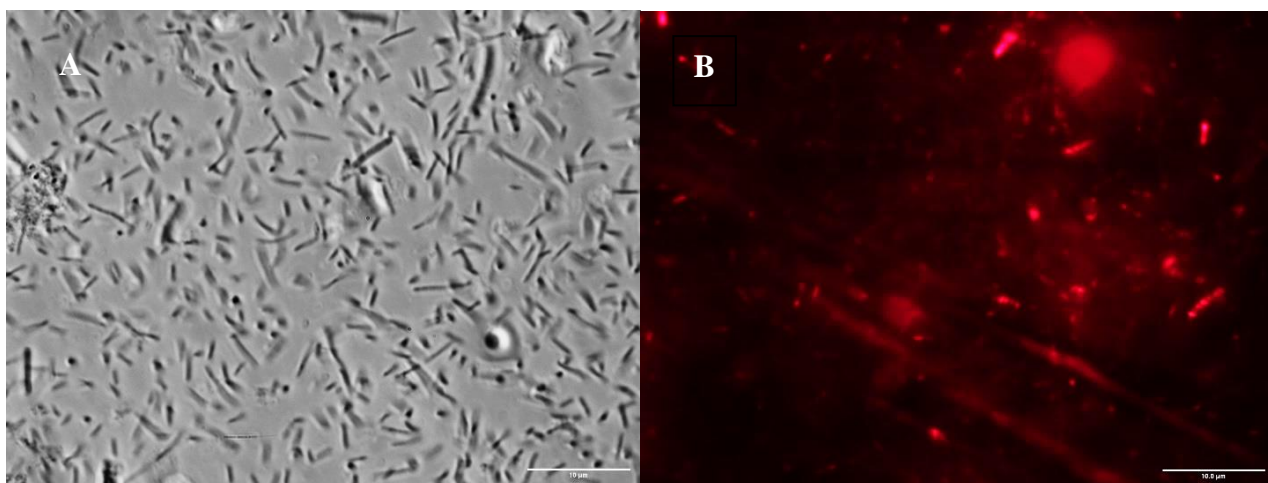
του πληθυσμού των κυττάρων καθώς και των υδρόφοβων σφαιριδίων PHB αντίστοιχα, αν και επιτρέπεται μόνο ο ποιοτικός προσδιορισμός τις με την συγκεκριμένη μέθοδο. Ελέγχθηκε η ανάπτυξη του βακτηρίου σε τις τις συνθήκες, εκτός από την ανάπτυξη σε υψηλές συγκεντρώσεις NaCl και σε όλα τα θρεπτικά συστατικά με αντικατάσταση του νερού από τυρόγαλα και υδρολυμένο τυρόγαλα αντίστοιχα, λόγω τεχνικών προβλημάτων του οργάνου.

Αρχικά, λήφθηκαν εικόνες σε οπτικό μικροσκόπιο και σε μικροσκόπιο φθορισμού σε συνθήκες control, ώστε να υπάρχει μέτρο σύγκρισης όσον αφορά τον πληθυσμό των βακτηρίων, καθώς και την παραγωγή σφαιριδίων PHB (Εικόνα 15A, B). Οι συγκεκριμένες συνθήκες δεν προκαλούν καταπόνηση στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού, ωστόσο στις 72 ώρες όπου λήφθηκαν οι εικόνες, τα θρεπτικά μέσα τις καλλιέργειας έχουν εξαντληθεί και γι' αυτόν τον λόγο παρατηρείται μικρή παραγωγή σφαιριδίων PHB. Τα κύτταρα τις παρακάτω εικόνες δεν παρουσιάζουν σημαντική κινητικότητα, και έτσι ήταν δυνατή η λήψη παράλληλων εικόνων σε οπτικό μικροσκόπιο και σε μικροσκόπιο φθορισμού.



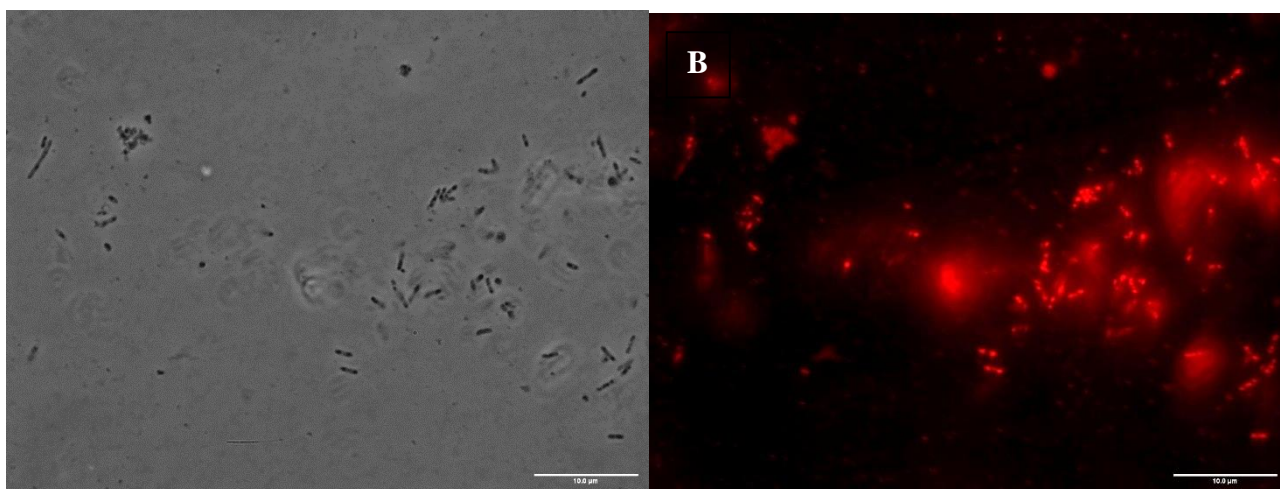
Εικόνα 15: (A) Πληθυσμός βακτηρίων σε οπτικό μικροσκόπιο σε συνθήκες control. (B) Πληθυσμός βακτηρίων σε μικροσκόπιο φθορισμού όπου απεικονίζονται και τα σφαιρίδια PHB που έχουν παραχθεί σε συνθήκες control.

Όσον αφορά την ανάπτυξη του βακτηρίου με πηγή άνθρακα γαλακτόζη σε συγκέντρωση 3.5% w/v, επιβεβαιώνονται τα δεδομένα που λαμβάνονται από την καμπύλη ανάπτυξης, δηλαδή η μη ανάπτυξη του βακτηρίου. Στην συνθήκη καλλιέργειας με εναλλακτική πηγή άνθρακα γλυκόζη σε συγκέντρωση 7% w/v, παρατηρείται έντονα τόσο ο πληθυσμός των κυττάρων όσο και η παραγωγή PHB. Οι εικόνες που λήφθηκαν στην συγκεκριμένη περίπτωση δεν παρουσιάζουν μεγάλη ευκρίνεια και δεν είναι παράλληλες, καθώς τα κύτταρα δεν παρέμεναν σταθερά (Εικόνα 16 A, B).

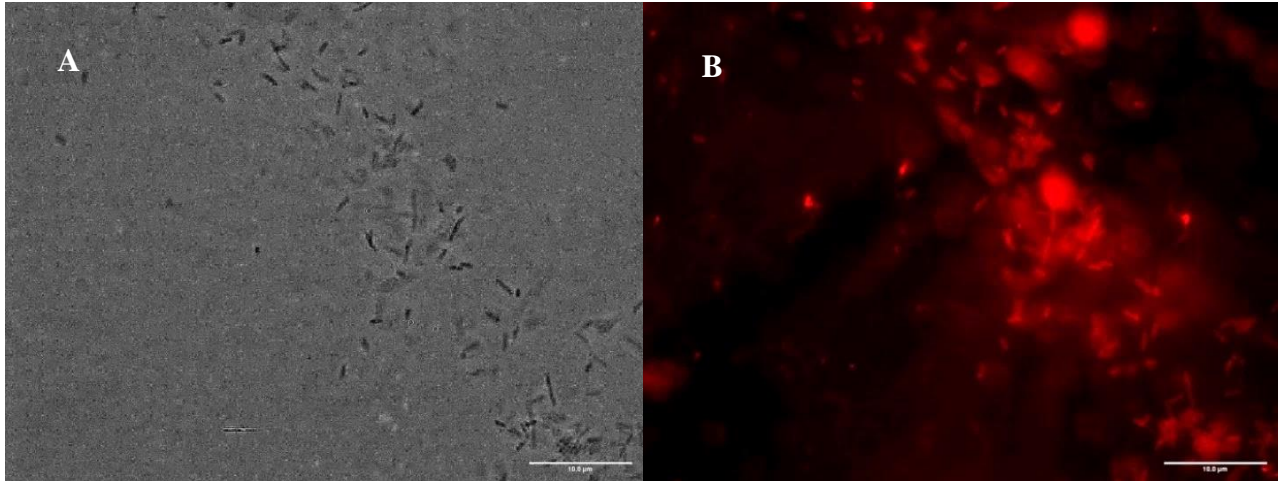


Εικόνα 16: (A) Πληθυσμός βακτηρίων σε οπτικό μικροσκόπιο σε συνθήκες ανάπτυξης με πηγή άνθρακα γλυκόζη 7% w/v. (B) Πληθυσμός βακτηρίων σε μικροσκόπιο φθορισμού όπου απεικονίζονται και τα σφαιρίδια PHB που έχουν παραχθεί σε συνθήκες ανάπτυξης με πηγή άνθρακα γλυκόζη 7% w/v .

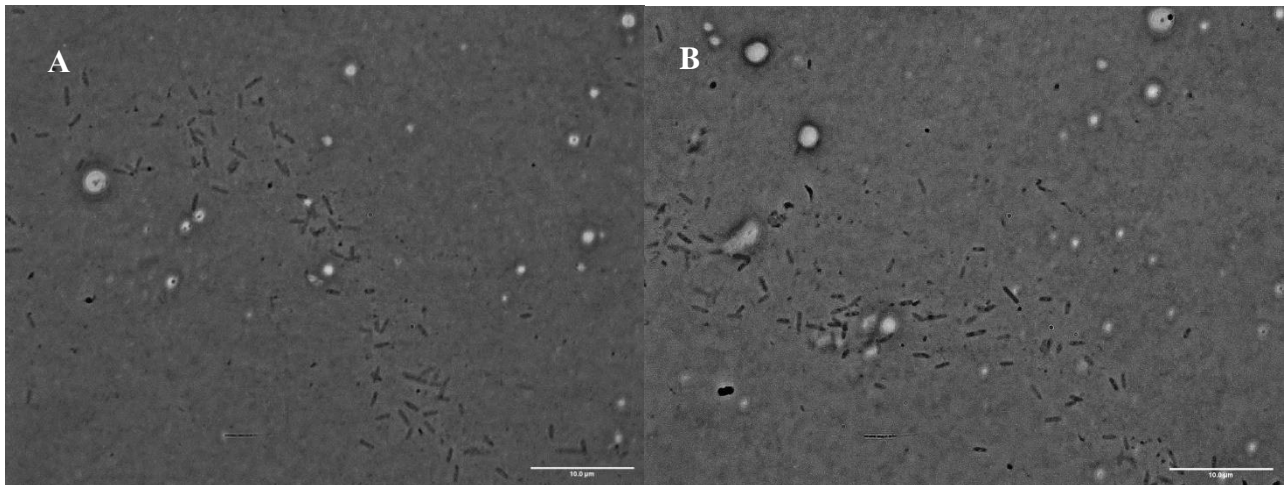
Οι επόμενες συνθήκες τις οποίες λήφθηκαν εικόνες οπτικού μικροσκοπίου καθώς και εικόνες φθορισμού, αφορούν την ανάπτυξη του βακτηρίου μόνο σε τυρόγαλα, μόνο σε υδρολυμένο τυρόγαλα, παρουσία όλων των θρεπτικών συστατικών με τυρόγαλα ως πηγή άνθρακα και παρουσία όλων των θρεπτικών συστατικών με υδρολυμένο τυρόγαλα ως πηγή άνθρακα. Τις παραπάνω συνθήκες δοκιμάστηκε η ακινητοποίηση των κυττάρων σε διάλυμα αγαρόζης 1% w/v. Ωστόσο, αυτό δημιούργησε προβλήματα σε κάποιες από τις εικόνες φθορισμού, καθώς τα δίκτυα αγαρόζης που προέκυψαν δεν επέτρεπαν την διάκριση των κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, λήφθηκαν ευκρινείς εικόνες οπτικού μικροσκοπίου και φθορισμού στην περίπτωση ανάπτυξης του βακτηρίου μόνο σε υδρολυμένο τυρόγαλα (Εικόνα 17A, B) καθώς και στην περίπτωση ανάπτυξης του βακτηρίου παρουσία θρεπτικών συστατικών με πηγή άνθρακα υδρολυμένο τυρόγαλα (Εικόνα 18A, B). Σφαιρίδια PHB εντοπίστηκαν μόνο στην πρώτη περίπτωση. Για τις συνθήκες ανάπτυξης του βακτηρίου μόνο σε τυρόγαλα (Εικόνα 19 A) και παρουσία θρεπτικών συστατικών με πηγή άνθρακα τυρόγαλα (Εικόνα 19 B), ήταν δυνατή η λήψη μόνο εικόνων οπτικού μικροσκοπίου τις οποίες ήταν διακριτά τα κύτταρα, ενώ από τις εικόνες φθορισμού που λήφθηκαν δεν εντοπίζεται φθορισμός από σφαιρίδια PHB.



Εικόνα 17: (A) Πληθυσμός βακτηρίων σε οπτικό μικροσκόπιο σε συνθήκες ανάπτυξης μόνο σε υδρολυμένο τυρόγαλα. (B) Πληθυσμός βακτηρίων σε μικροσκόπιο φθορισμού όπου απεικονίζονται και τα σφαιρίδια PHB που έχουν παραχθεί σε συνθήκες ανάπτυξης μόνο σε υδρολυμένο τυρόγαλα .



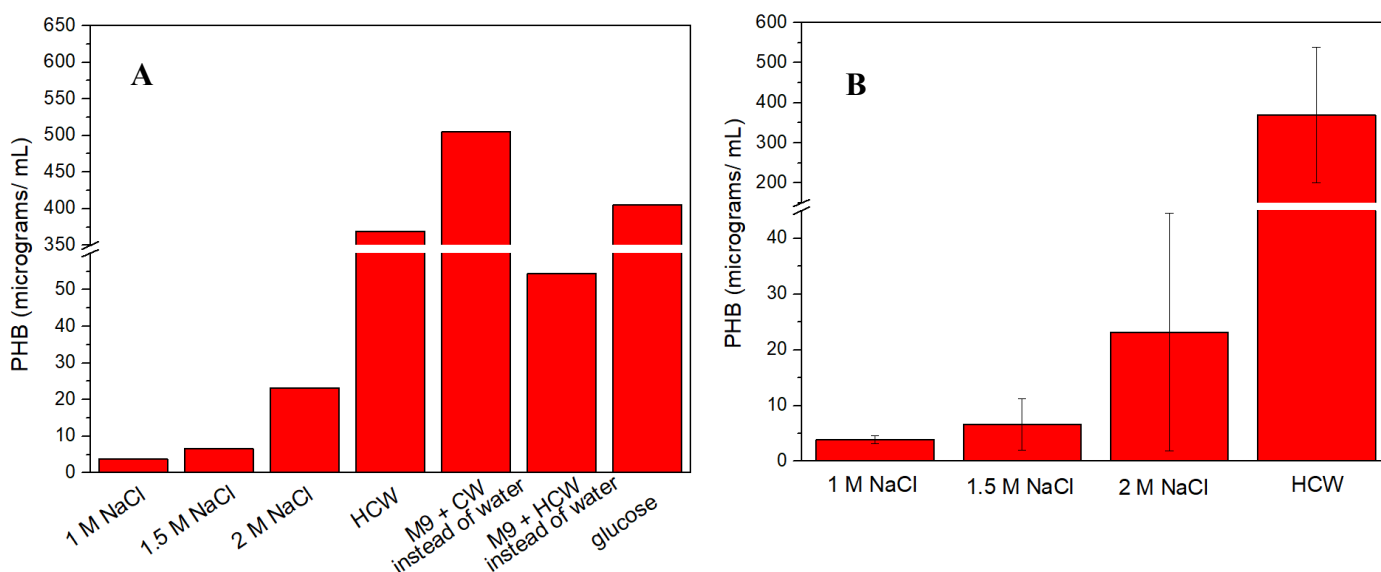
Εικόνα 18: (A) Πληθυσμός βακτηρίων σε οπτικό μικροσκόπιο σε συνθήκη ανάπτυξης παρουσία όλων των θρεπτικών συστατικών και πηγή άνθρακα υδρολυμένο τυρόγαλα. (B) Πληθυσμός βακτηρίων σε μικροσκόπιο φθορισμού σε συνθήκη ανάπτυξης παρουσία όλων των θρεπτικών συστατικών και πηγή άνθρακα υδρολυμένο τυρόγαλα .



Εικόνα 19: (A) Πληθυσμός βακτηρίων σε οπτικό μικροσκόπιο σε συνθήκη ανάπτυξης μόνο σε τυρόγαλα. (B) Πληθυσμός βακτηρίων σε οπτικό μικροσκόπιο σε παρουσία όλων των θρεπτικών συστατικών και πηγή άνθρακα τυρόγαλα.

3.3. Ποσοτικοποίηση του PHB με HPLC

Εκτός από την ποιοτική παρατήρηση του παραγόμενου PHB σε κάθε συνθήκη ανάπτυξης του βακτηρίου, επιχειρήθηκε και η ποσοτικοποίησή του στο χρονικό σημείο των 72 h. Αυτό επιτεύχθηκε με την χρήση HPLC, μετρώντας το κροτονικό οξύ που παράγεται από την χώνεψη του βιοπολυμερούς. Επιλέχθηκε το ίδιο χρονικό σημείο για κάθε καλλιέργεια, προκειμένου να είναι δυνατή η κανονικοποίηση της οπτικής πυκνότητας μεταξύ όλων των δειγμάτων που αναλύθηκαν με την συγκεκριμένη μέθοδο. Με HPLC ελέγχθηκαν όλες οι συνθήκες στις οποίες εντοπίστηκαν PHB με μικροσκοπία φθορισμού, καθώς και οι συνθήκες στις οποίες δεν ήταν δυνατός ο ποιοτικός έλεγχος, δηλαδή στις συνθήκες ανάπτυξης παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων NaCl και στις συνθήκες ανάπτυξης παρουσία όλων των θρεπτικών συστατικών, με το τυρόγαλα ή το υδρολυμένο τυρόγαλα να αντικαθιστούν το απαραίτητο για την καλλιέργεια νερό. Από τα χρωματογραφήματα που προέκυψαν για την ποσοτικοποίηση χρησιμοποιήθηκε η κορυφή κοντά στα 7.1 min του χρωματογραφήματος κάθε συνθήκης, όπως προέκυψε από την πρότυπη καμπύλη του κροτονικού οξέος. Στα παρακάτω ποσοτικά διαγράμματα γίνεται διάκριση μεταξύ των συνθηκών στις οποίες είχαν πραγματοποιηθεί βιολογικές επαναλήψεις όταν έγινε η HPLC και στις συνθήκες στις οποίες η ποσοτικοποίηση έγινε από δείγματα που συλλέχθηκαν από μία καλλιέργεια.



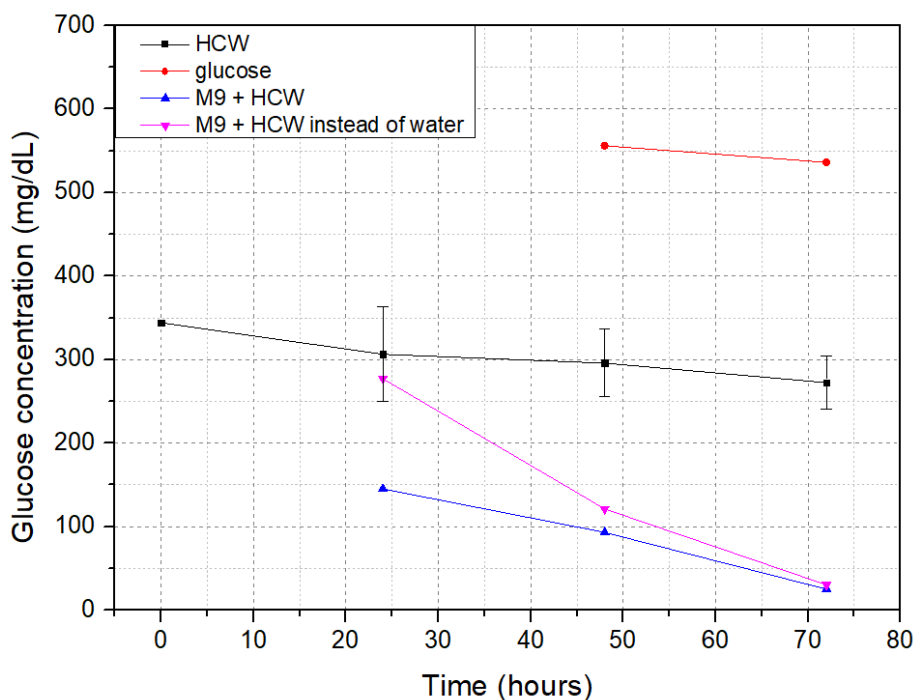
Εικόνα 20: (A) Συγκέντρωση του PHB σε $\mu\text{g/mL}$ καλλιέργειας κυττάρων σε όλες τις συνθήκες ανάπτυξης στο χρονικό σημείο των 72 ωρών του βακτηρίου. (B) Συγκέντρωση του PHB σε $\mu\text{g/mL}$ καλλιέργειας κυττάρων στις συνθήκες ανάπτυξης με βιολογικές επαναλήψεις στο χρονικό σημείο των 72 ωρών του βακτηρίου.

Από τα δεδομένα της HPLC προκύπτει σημαντικά αυξημένη παραγωγή PHB στις συνθήκες ανάπτυξης με πηγή άνθρακα την γλυκόζη, σε ανάπτυξη μόνο σε υδρολυμένο τυρόγαλα καθώς και σε ανάπτυξη παρουσία όλων των θρεπτικών συστατικών με τυρόγαλα να αντικαθιστά το απαραίτητο νερό της καλλιέργειας. Στις συνθήκες ανάπτυξης παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων NaCl παρατηρείται παραγωγή PHB αλλά αρκετά μικρότερη,

γεγονός που πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι η το χρονικό σημείο των 72 ωρών σε αυτές τις συνθήκες ανάπτυξης δεν αντιστοιχεί στην στατική φάση, αφού αύξηση της οπτικής πυκνότητας της καλλιέργειας ξεκίνησε μόλις τότε.

3.4. Κατανάλωση γλυκόζης σε καλλιέργειες με υδρολυμένο τυρόγαλα και γλυκόζη

Η κατανάλωση της γλυκόζης από το βακτήριο στις συνθήκες ανάπτυξης όπου χρησιμοποιήθηκε υδρολυμένο τυρόγαλα και γλυκόζη προσδιορίστηκε με σκοπό να γίνει αντιληπτό αν το βακτήριο καταναλώνει σημαντική ποσότητα από το συγκεκριμένο σάκχαρο σε κάθε περίπτωση, και συνεπώς αν και πόσο συμβάλλει στην ανάπτυξη του. Οι συγκεκριμένες μετρήσεις έγιναν στα χρονικά σημεία 24, 48 και 72 ώρες σε όλες τις συνθήκες που ελέγχθηκαν, εκτός από την περίπτωση ανάπτυξης του βακτηρίου μόνο σε υδρολυμένο τυρόγαλα όπου ελέγχθηκε και το χρονικό σημείο των 0 ωρών. Για τις υπόλοιπες συνθήκες ανάπτυξης δεν είχαν συλλεχθεί δείγματα στο χρονικό σημείο των 0 ωρών και δεν ήταν δυνατό να γίνει κανονικοποίηση για να προκύψουν οι τιμές στον συγκεκριμένο χρόνο, αφού οι μετρήσεις που προέκυψαν ήταν ήδη σε μορφή συγκέντρωσης, όπως προέκυψαν από το όργανο.



Εικόνα 21: Καμπύλη κατανάλωσης γλυκόζης σε συνθήκη ανάπτυξης του βακτηρίου μόνο σε υδρολυμένο τυρόγαλα με γλυκόζη σε συγκέντρωση 7% w/v και υδρολυμένο τυρόγαλα ως πηγή άνθρακα και με αντικατάσταση του απαραίτητου νερού από υδρολυμένο τυρόγαλα.

Παρατηρώντας τα παραπάνω διαγράμματα, είναι εμφανής η κατανάλωση της γλυκόζης από το βακτήριο σε όλες τις συνθήκες ανάπτυξης που ελέγχθηκαν. Παρά το γεγονός ότι σε όλες τις συνθήκες εκτός της ανάπτυξης μόνο σε υδρολυμένο τυρόγαλα οι μετρήσεις έγιναν μόνο στα χρονικά σημεία των 24, 48 και 72 ωρών, είναι εμφανής η φθίνουσα τάση, η οποία εκφράζει την κατανάλωση του σακχάρου από το βακτήριο. Όσον αφορά την περίπτωση της ανάπτυξης του βακτηρίου με γλυκόζη σε συγκέντρωση 7% w/v ως πηγή άνθρακα, στο διάγραμμα δεν παρατηρείται τιμή συγκέντρωσης για το χρονικό σημείο των 24 ωρών, καθώς η τιμή του συγκεκριμένου δείγματος ήταν ιδιαίτερα υψηλή και εκτός ορίου ανίχνευσης του οργάνου. Στην περίπτωση της ανάπτυξης μόνο σε υδρολυμένο τυρόγαλα, μέτρηση έγινε και στο χρονικό σημείο των 0 ωρών, καθώς υπήρχε διαθέσιμο δείγμα, ενώ η κατανάλωση της γλυκόζης ελέγχθηκε σε βιολογικές επαναλήψεις της συγκεκριμένης συνθήκης ανάπτυξης, καθώς σε εκείνο το χρονικό διάστημα της πραγματοποίησης των πειραμάτων είχαν ολοκληρωθεί οι βιολογικές επαναλήψεις αυτής. Η φθίνουσα τάση που εκφράζει την κατανάλωση του σακχάρου από το βακτήριο, είναι εμφανής και σε αυτή την περίπτωση. Ακόμη, παρατηρώντας το εύρος συγκεντρώσεων που προσδιορίζονται σε κάθε συνθήκη ανάπτυξης, παρατηρείται πώς η τιμές είναι περισσότερο αυξημένες στην ανάπτυξη με πηγή άνθρακα καθαρή γλυκόζη, μειώνονται στην ανάπτυξη μόνο σε υδρολυμένο τυρόγαλα αλλά παραμένουν αρκετά αυξημένες, ενώ οι τιμές στην συνθήκη ανάπτυξης παρουσία θρεπτικών συστατικών με αντικατάσταση του νερού από υδρολυμένου τυρογάλακτος είναι χαμηλότερες από τις δύο προηγούμενες περιπτώσεις, αλλά μεγαλύτερες από την συνθήκη ανάπτυξης του βακτηρίου σε θρεπτικά συστατικά με πηγή άνθρακα υδρολυμένο τυρόγαλα. Τα παραπάνω αποτελέσματα επαληθεύονται υπολογιστικά, ενώ επιβεβαιώνουν και την αξιοπιστία του οργάνου.

3.5. Βιοχημικός χαρακτηρισμός αποβλήτων τυροκομείου

Προκειμένου η ανάπτυξη του βακτηρίου να είναι επιτυχής και συγκεκριμένη, τα απόβλητα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη του *Pseudomonas* sp. rhDVI υποβλήθηκαν σε βιοχημική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε από τα συνεργαζόμενα εργαστήρια «ΧΗΜΙΚΟΤΕΧΝΙΚΗ» στην Κρήτη, χρησιμοποιώντας τεχνικές που βασίζονται σε πρωτόκολλα της APHA. Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των αναλύσεων που προαναφέρθηκαν.

Πίνακας 13: Αποτελέσματα βιοχημικών αναλύσεων του δευτερογενούς τυρογάλακτος που χρησιμοποιήθηκε, για την ανάπτυξη του *Pseudomonas* sp. rhDVI.

Παράμετρος	Συγκεντρώσεις
BOD	27000 (mg/L)
COD	67500 (mg/L)
BOD/COD	0.40
Total nitrogen	1200 (mg/L)
Kjeldahl nitrogen	1110 (mg/L)
Total phosphorus	452 (mg/L)

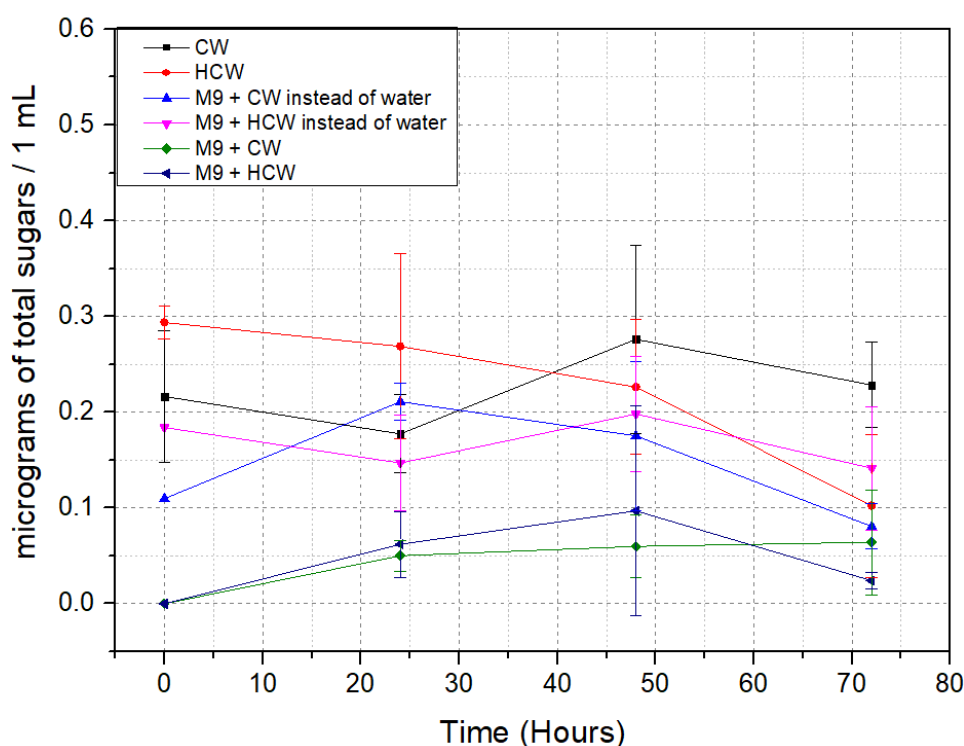
pH	5.5
Αλάτι	2.2 % w/v
Λίπη και έλαια	0.05 % w/v
Πρωτεΐνες	0.71 % w/v
Υδατάνθρακες	8.01 % w/v
Λακτόζη	7.4 % w/v

Με την χρήση του όρου BOD (βιοχημικά απαιτούμενο οξυγόνο) γίνεται αναφορά στην ποσότητα οξυγόνου που καταναλώνεται από μικροοργανισμούς κατά την διαδικασία αποσύνθεσης οργανικών ενώσεων στο νερό, ενώ ο όρος COD (χημικά απαιτούμενο οξυγόνο) περιγράφει την ποσότητα οξυγόνου που απαιτείται για την πλήρη οξείδωση οργανικών ενώσεων σε υδατικά απόβλητα μέσω οξειδωτικών μέσων. Σύμφωνα με τα πρωτόκολλα της Ευρωπαϊκής Ένωσης, το ανώτατο επιτρεπτό για την ασφαλή απόρριψη αποβλήτων στο φυσικό περιβάλλον είναι 25 mg/L για το BOD και 125 mg/L για το COD, τιμές σημαντικά χαμηλότερες από τις τιμές που προσδιορίστηκαν στο δείγμα τυρογάλακτος που αναλύθηκε. Ακόμη, ο λόγος BOD/COD σε εύρος τιμών 0.3-0.5 αναφέρει ότι στα απόβλητα περιέχονται ουσίες οι οποίες είναι δυνατόν να βιοαποικοδομηθούν από κατάλληλα προσαρμοσμένους μικροοργανισμούς (Jin Chung et al., 2022). Επομένως, από τα παραπάνω προκύπτει το δείγμα τυρογάλακτος που χρησιμοποιήθηκε πληροί τις προϋποθέσεις για να μπορεί να βιοαποικοδομηθεί από το *Pseudomonas* sp. pHDV1.

Ταυτόχρονα, παρατηρείται πως τόσο η τιμή του ολικού αζώτου όσο και του αζώτου κατά Kjeldahl είναι ιδιαίτερα υψηλές. Η πρώτη παράμετρος αφορά το άζωτο στις οργανικές αλλά και ανόργανες μορφές του, ενώ η δεύτερη παράμετρος αναφέρεται αποκλειστικά στο οργανικό άζωτο του αναλυόμενου δείγματος, δηλαδή στο πρωτεϊνικό άζωτο. Επιπλέον παρατηρείται και αυξημένη συγκέντρωση ολικού φωσφόρου στο δείγμα, γεγονός που καθιστά την απόρριψη του στην φύση σημαντικά επιβλαβή. Αναφορικά με τους υδατάνθρακες που προσδιορίστηκαν, εντοπίζεται λακτόζη η οποία απαρτίζει σημαντικό ποσοστό των ολικών σακχάρων, αλλά υπάρχει και μια υπόλοιπη ποσότητα υδατανθράκων που πρέπει να ληφθεί υπόψιν. Η μεγάλη περιεκτικότητα σακχάρων που παρατηρείται τονίζει έναν ακόμη λόγο που το τυρόγαλα συνιστά ένα ιδιαίτερα ρυπογόνο απόβλητο. Στις επόμενες ενότητες παρατίθενται τα δεδομένα που συγκεντρώθηκαν, σε προσπάθεια να γίνει αντιληπτό κατά πόσο το υπό μελέτη βακτήριο μπορεί να αναπτυχθεί, μειώνοντας το φορτίο άνθρακα, αζώτου και φωσφόρου, των παραγόντων δηλαδή που καθιστούν το τυρόγαλα έναν τόσο σημαντικό ρύπο.

3.6. Προσδιορισμός ολικών σακχάρων με την μέθοδο θυμόλης – θειικού

Ο προσδιορισμός των ολικών σακχάρων στα υπερκείμενα των καλλιεργειών σε κάθε συνθήκη ανάπτυξης που χρησιμοποιήθηκε τυρόγαλα πραγματοποιήθηκε με σκοπό να προσδιοριστεί αν οι υδατάνθρακες, που βρίσκονται σε σημαντική περιεκτικότητα στο τυρόγαλα, αποτελούν συστατικό το οποίο καταναλώνει το βακτήριο προκειμένου να αναπτυχθεί. Η κατανάλωση προσδιορίστηκε στα χρονικά σημεία 0, 24, 48 και 72 ώρες. Στο χρονικό σημείο των 0 ωρών, προσδιορίστηκε πειραματικά η ποσότητα των ολικών σακχάρων στις συνθήκες ανάπτυξης του βακτηρίου μόνο σε τυρόγαλα και μόνο σε υδρολυμένο τυρόγαλα, ενώ για τις υπόλοιπες συνθήκες ανάπτυξης η ποσότητα των ολικών σακχάρων προσδιορίστηκε μέσω κανονικοποίησης των τιμών που αντιστοιχούν στις συνθήκες που προσδιορίστηκαν πειραματικά, καθώς δεν είχαν συλλεχθεί τα απαραίτητα δείγματα σε αυτό το χρονικό σημείο στις υπόλοιπες συνθήκες.



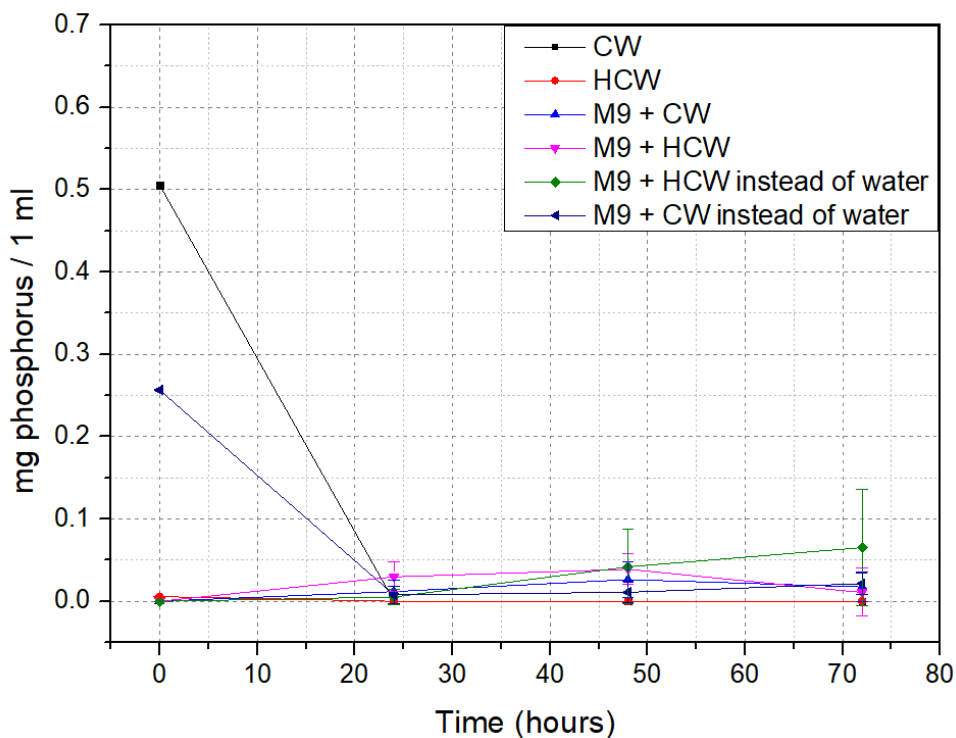
Εικόνα 22: Ολικά σάκχαρα στα χρονικά σημεία 0, 24, 48 και 72 ώρες σε συνθήκες ανάπτυξης μόνο σε τυρόγαλα και υδρολυμένο τυρόγαλα, παρουσία θρεπτικών συστατικών και πηγή άνθρακα τυρόγαλα και υδρολυμένο τυρόγαλα και παρουσία θρεπτικών συστατικών με αντικατάσταση του νερού από τυρόγαλα και υδρολυμένο τυρόγαλα.

Από τις παραπάνω καμπύλες, πέρα από την συνθήκη ανάπτυξης του βακτηρίου μόνο σε υδρολυμένο τυρόγαλα, δεν παρατηρείται κάποια καθοδική τάση στην ποσότητα των ολικών σακχάρων με την πάροδο του χρόνου, όπως αναμένεται. Ακόμη, αξίζει να σημειωθεί πως για τις συνθήκες ανάπτυξης στις οποίες τα χρονικά σημεία 0 ώρες έχουν προσδιοριστεί με κανονικοποίηση, τα δεδομένα πιθανόν να μην είναι ιδιαίτερα αντιπροσωπευτικά, καθώς ενδέχεται η κανονικοποίηση που χρησιμοποιήθηκε για να υπάρχει μια εικόνα για τις 0 ώρες

να έχει μεγάλο σφάλμα. Τα παραπάνω δεδομένα δεν μπορούν να οδηγήσουν στην διεξαγωγή σαφών συμπερασμάτων όσον αφορά την κατανάλωση από το συγκεκριμένο βακτηριακό στέλεχος, αν και βιβλιογραφικά εντοπίζονται άλλα είδη *pseudomonas* που μεταβολίζουν υδατάνθρακες (Wilkes et al., 2018). Οι μη σαφείς αυτές τάσεις που παρουσιάζονται παραπάνω είναι πιθανό να παρατηρούνται και από πειραματικό σφάλμα, το οποίο προκύπτει από την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών που υπάρχουν στα υπερκείμενα των καλλιεργειών με το αντιδραστήριο θυμόλης-θεικού οξέος, καθώς δεν έχει πραγματοποιηθεί αποπρωτονίωση πριν τον προσδιορισμό των ολικών σακχάρων, όπως αναφέρεται στην βιβλιογραφία (Grogger et al., 1960).

3.7. Προσδιορισμός ολικών φωσφορικών με την μέθοδο μπλε του μολυβδαινίου

Σε επόμενο βήμα επιχειρήθηκε ο προσδιορισμός της κατανάλωσης του ολικού ανόργανου φωσφόρου από το βακτήριο κατά την διάρκεια της ανάπτυξης του σε όλες τις συνθήκες που χρησιμοποιήθηκε τυρόγαλα. Η κατανάλωση προσδιορίστηκε στα χρονικά σημεία 0, 24, 48 και 72 ώρες, με σκοπό να παρατηρηθεί κατά πόσο μεταβολίζεται ο ανόργανος φώσφορος από το βακτήριο. Στο χρονικό σημείο των 0 ωρών, προσδιορίστηκε πειραματικά η ποσότητα του ολικού ανόργανου φωσφόρου στις συνθήκες ανάπτυξης του βακτηρίου μόνο σε τυρόγαλα και μόνο σε υδρολυμένο τυρόγαλα, ενώ για τις υπόλοιπες συνθήκες ανάπτυξης η ποσότητα του ολικού ανόργανου φωσφόρου προσδιορίστηκε μέσω κανονικοποίησης των τιμών που αντιστοιχούν στις συνθήκες όπου προσδιορίστηκε πειραματικά, καθώς δεν είχαν συλλεχθεί τα απαραίτητα δείγματα σε αυτό το χρονικό σημείο στις υπόλοιπες συνθήκες.



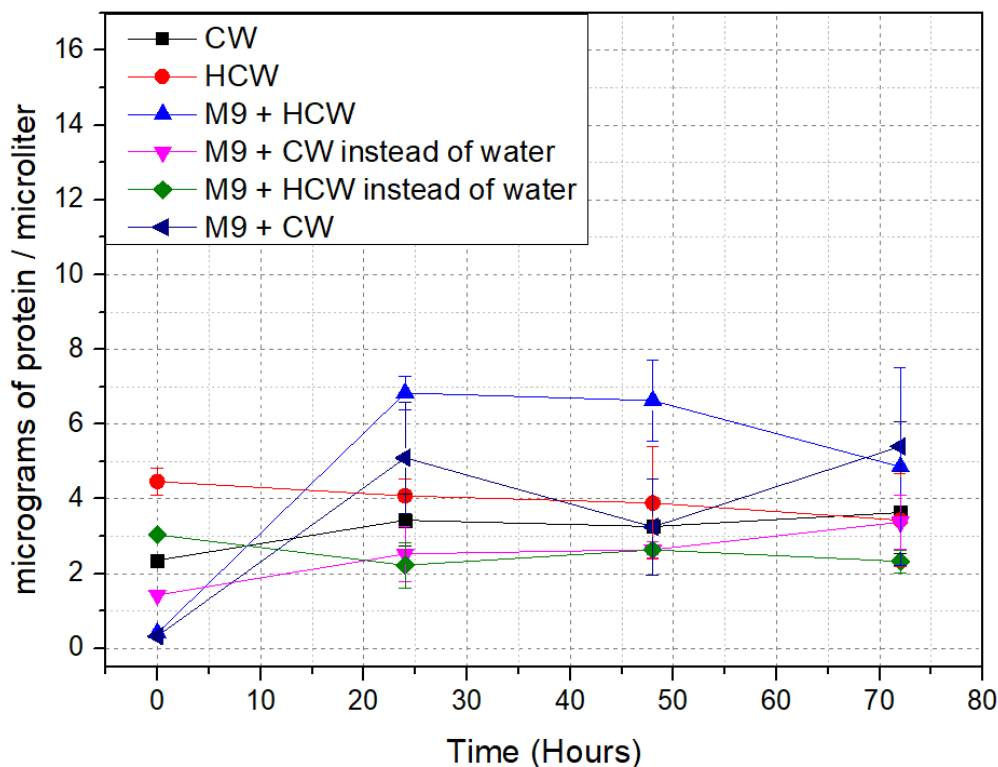
Εικόνα 23: Ολικός ανόργανος φώσφορος στα χρονικά σημεία 0, 24, 48 και 72 ώρες σε συνθήκες ανάπτυξης μόνο σε τυρόγαλα και υδρολυμένο τυρόγαλα, παρουσία θρεπτικών συστατικών και

τυρόγαλα και υδρολυμένο τυρόγαλα ως πηγή άνθρακα και παρουσία θρεπτικών συστατικών με αντικατάσταση του νερού από τυρόγαλα και υδρολυμένο τυρόγαλα.

Παρατηρώντας τα παραπάνω, είναι εμφανής η κατανάλωση του φωσφόρου από το βακτήριο σε συνθήκες ανάπτυξης μόνο σε τυρόγαλα και μόνο σε υδρολυμένο τυρόγαλα, ενώ ακόμη φαίνεται πως στο χρονικό σημείο 0 ωρών παρατηρείται σημαντικά μεγαλύτερη συγκέντρωση φωσφόρου στο τυρόγαλα σε σχέση με το υδρολυμένο τυρόγαλα. Αυτό είναι πιθανό να οφείλεται στο γεγονός ότι το εμπορικά διαθέσιμο σκεύασμα λακτάσης που χρησιμοποιείται για την υδρόλυση της λακτόζης του τυρογάλακτος περιέχει ανθρακικό ασβέστιο το οποίο έχει την δυνατότητα να ιζηματοποιήσει τον ανόργανο φώσφορο (Bachra et al., 1963). Στις συνθήκες ανάπτυξης όπου το τυρόγαλα και το υδρολυμένο τυρόγαλα χρησιμοποιείται ως πηγή άνθρακα, προκύπτει ξανά το ζήτημα της τιμής στο χρονικό σημείο των 0 ωρών το οποίο προκύπτει από κανονικοποίηση, εξαιτίας της πολύ χαμηλής ποσότητας που χρησιμοποιήθηκε στην καλλιέργεια. Ωστόσο, από τις τιμές στα υπόλοιπα χρονικά σημεία και στις δύο συνθήκες ανάπτυξης, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η ποσότητα φωσφόρου παραμένει σχετικά σταθερή, επομένως δεν παρατηρείται κατανάλωση. Στις συνθήκες ανάπτυξης που το τυρόγαλα και το υδρολυμένο τυρόγαλα αντικαθιστά το απαραίτητο νερό στην καλλιέργεια παρατηρούνται διαφορετικές τάσεις. Στην πρώτη περίπτωση είναι εμφανής η κατανάλωση του φωσφόρου με την πάροδο του χρόνου. Ωστόσο, στην δεύτερη περίπτωση η ποσότητα του φωσφόρου φαίνεται να είναι σχετικά σταθερή. Και σε αυτές τις περιπτώσεις δημιουργείται ξανά το ζήτημα των τιμών στο χρονικό σημείο των 0 ωρών, το οποίο προκύπτει από κανονικοποίηση.

3.8. Προσδιορισμός συνολικής πρωτεΐνης με την μέθοδο Bradford

Σε επόμενη φάση, έγινε προσπάθεια να προσδιοριστεί η κατανάλωση του πρωτεϊνικού περιεχομένου στα υπερκείμενα των καλλιεργειών στις οποίες χρησιμοποιήθηκε τυρόγαλα και υδρολυμένο τυρόγαλα. Ο σκοπός των μετρήσεων αυτών ήταν να γίνει αντιληπτό κατά πόσο μπορεί να μεταβληθεί από το βακτήριο το άζωτο, το οποίο βρίσκεται σε σημαντικό βαθμό σε πρωτεϊνική μορφή. Η κατανάλωση προσδιορίστηκε στα χρονικά σημεία 0, 24, 48 και 72 ώρες. Στο χρονικό σημείο των 0 ωρών, προσδιορίστηκε πειραματικά η ποσότητα της συνολικής πρωτεΐνης στις συνθήκες ανάπτυξης του βακτηρίου μόνο σε τυρόγαλα και μόνο σε υδρολυμένο τυρόγαλα, ενώ για τις υπόλοιπες συνθήκες ανάπτυξης η ποσότητα του ολικού ανόργανου φωσφόρου προσδιορίστηκε μέσω κανονικοποίησης των τιμών που αντιστοιχούν στις συνθήκες όπου προσδιορίστηκε πειραματικά, καθώς δεν είχαν συλλεχθεί τα απαραίτητα δείγματα σε αυτό το χρονικό σημείο στις υπόλοιπες συνθήκες.



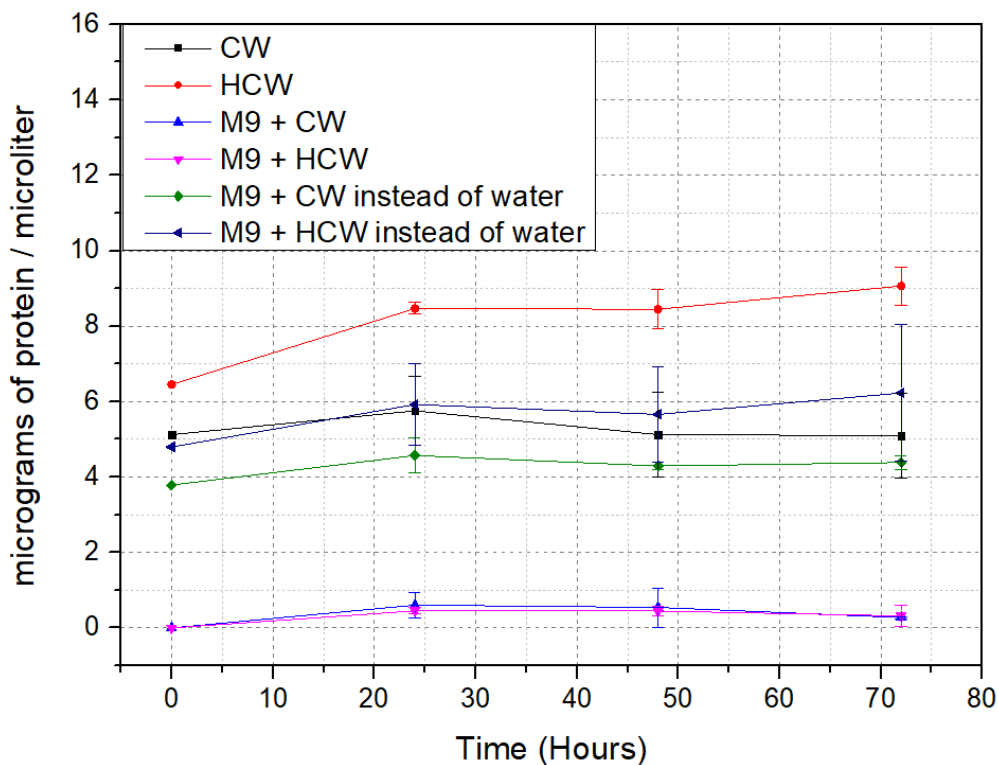
Εικόνα 24: Πρωτεϊνικό περιεχόμενο στα χρονικά σημεία 0, 24, 48 και 72 ώρες σε συνθήκες ανάπτυξης μόνο σε τυρόγαλα και υδρολυμένο τυρόγαλα, παρουσία θρεπτικών συστατικών και τυρόγαλα και υδρολυμένο τυρόγαλα ως πηγή άνθρακα και παρουσία θρεπτικών συστατικών με αντικατάσταση του νερού από τυρόγαλα και υδρολυμένο τυρόγαλα.

Από τα παραπάνω φαίνεται πως δεν σημειώνεται κατανάλωση πρωτεΐνης από το βακτήριο σε καμία από τις συνθήκες ανάπτυξης που χρησιμοποιήθηκε τυρόγαλα και υδρολυμένο τυρόγαλα, αφού η συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης παραμένει σχετικά σταθερή σε όλα τα χρονικά σημεία. Επομένως, προκύπτει πως το οργανικό άζωτο το οποίο στο τυρόγαλα υπάρχει σε πρωτεϊνική μορφή δεν μεταβολίζεται από το συγκεκριμένο βακτήριο. Ωστόσο, εξαιτίας της πολυπλοκότητας που παρουσιάζει τόσο το τυρόγαλα όσο και το υδρολυμένο τυρόγαλα ως δείγμα, κρίθηκε αναγκαίο το πρωτεϊνικό περιεχόμενο να ελεγχθεί και με άλλη χρωματομετρική μέθοδο, καθώς η ευαισθησία της Bradford επηρεάζεται από κάποια από τα συστατικά της μήτρας, όπως για παράδειγμα το αλάτι που περιέχεται σε αυτήν (Friedenauer et al., 1989, Miranda, 2024).

3.9. Προσδιορισμός συνολικής πρωτεΐνης με την μέθοδο BCA

Προκειμένου λοιπόν, να επαληθευτούν τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από την ανάλυση των υπερκειμένων δειγμάτων σε όλες τις συνθήκες ανάπτυξης που χρησιμοποιήθηκε τυρόγαλα και υδρολυμένο τυρόγαλα, το πρωτεϊνικό περιεχόμενο προσδιορίστηκε και με την μέθοδο BCA. Και σε αυτήν την περίπτωση η ανάλυση έγινε σε δείγματα που λήφθηκαν στα χρονικά σημεία 0, 24, 48 και 72 ώρες.. Στο χρονικό σημείο των 0 ωρών, προσδιορίστηκε

πειραματικά η ποσότητα του συνολικού πρωτεϊνικού περιεχομένου στις συνθήκες ανάπτυξης του βακτηρίου μόνο σε τυρόγαλα και μόνο σε υδρολυμένο τυρόγαλα, ενώ για τις υπόλοιπες συνθήκες ανάπτυξης η ποσότητα του ολικού ανόργανου φωσφόρου προσδιορίστηκε μέσω κανονικοποίησης των τιμών που αντιστοιχούν στις συνθήκες όπου προσδιορίστηκε πειραματικά, καθώς δεν είχαν συλλεχθεί τα απαραίτητα δείγματα σε αυτό το χρονικό σημείο στις υπόλοιπες συνθήκες.



Εικόνες 25: Πρωτεϊνικό περιεχόμενο στα χρονικά σημεία 0, 24, 48 και 72 ώρες σε συνθήκες ανάπτυξης μόνο σε τυρόγαλα και υδρολυμένο τυρόγαλα, παρουσία θρεπτικών συστατικών και τυρόγαλα και υδρολυμένο τυρόγαλα ως πηγή άνθρακα και παρουσία θρεπτικών συστατικών με αντικατάσταση του νερού από τυρόγαλα και υδρολυμένο τυρόγαλα.

Από τα παραπάνω, είναι φανερό πως για όλες τις συνθήκες ανάπτυξης, η συνολική πρωτεΐνη σε κάθε χρονικό σημείο παραμένει σχετικά σταθερή, γεγονός που επιβεβαιώνει τις τάσεις που προκύπτουν από την μέθοδο Bradford. Ωστόσο, φαίνεται ακόμη πώς οι συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης μειώνονται συστηματικά όσο αραιώνεται η ποσότητα του τυρογάλακτος και του υδρολυμένου τυρογάλακτος στις συνθήκες ανάπτυξης που μελετήθηκαν, δηλαδή από την ανάπτυξη μόνο σε τυρόγαλα και υδρολυμένο τυρόγαλα προς στην ανάπτυξη παρουσία θρεπτικών μέσω και τυρογάλακτος και υδρολυμένου τυρογάλακτος αντί για νερό και την ανάπτυξη σε θρεπτικά μέσα με τυρόγαλα και υδρολυμένο τυρόγαλα ως πηγή άνθρακα, γεγονός που επιβεβαιώνει την αξιοπιστία της μεθόδου.

3.10. Χαρακτηρισμός εξωκυτταρικής σύστασης με Φασματοσκοπία Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Σε επόμενη φάση, επιχειρήθηκε ο χαρακτηρισμός του τυρογάλακτος και του υδρολυμένου τυρογάλακτος, με NMR, με σκοπό να προσδιοριστεί η σύσταση των δύο βασικών μητρών, αλλά και ποια από τα συστατικά του κάθε δείγματος πιθανόν καταναλώθηκαν από το βακτήριο. Λήφθηκαν φάσματα στα υπερκείμενα δείγματα καλλιέργειών του βακτηρίου μόνο σε τυρόγαλα και μόνο σε υδρολυμένο τυρόγαλα στα χρονικά σημεία 0, 24, 48 και 72 ώρες .και προσδιορίστηκαν με το λογισμικό chenomix οι δέκα πρώτες ενώσεις που βρίσκονται σε σημαντική συγκέντρωση σε κάθε φάσμα.

Πίνακας 14: Σύσταση τυρογάλακτος στα χρονικά σημεία 0, 24, 48 και 72 ώρες.

Μεταβολίτες τυρογάλακτος	0 ώρες	24 ώρες	48 ώρες	72 ώρες
	Μέγιστη συγκέντρωση (mM)	Μέγιστη συγκέντρωση (mM)	Μέγιστη συγκέντρωση (mM)	Μέγιστη συγκέντρωση (mM)
lactose	129.3852	122.2484	103.8506	123.1259
2-phosphoglycerate	69.5654	33.32	95.8468	87.5301
erythritol	33.5018	61.7129	57.8266	61.2687
xylitol	33.2873	29.5287	30.7234	30.4326
arabinitol	33.5018	28.3081	35.1731	32.5215
guanidoacetate	30.3551	27.4797	25.6932	27.168
glycolate	28.355	25.4567	24.4419	25.3348
ethanol	23.2743	20.2678	δεν ανιχνεύτηκε	δεν ανιχνεύτηκε
glucitol	20.7264	18.3139	17.7263	21.2115
d-threitol	20.5793	17.9443	17.8899	19.1456
glycerol	18.6555	17.4726	19.896	19.0787
lactulose	14.8006	8.1212	12.203	15.3439
mannitol	14.4631	11.7892	14.357	14.2015
galactitol	13.8173	12.622	12.7244	13.4509
ethylene glycol	13.2685	11.8141	11.6978	11.4899
glycine	δεν ανιχνεύτηκε	11.08	10.8853	11.1776
serine	δεν ανιχνεύτηκε	δεν ανιχνεύτηκε	17.0136	15.4797
mannose	δεν ανιχνεύτηκε	δεν ανιχνεύτηκε	δεν ανιχνεύτηκε	11.9303

Πίνακας 15: Σύσταση υδρολυμένου τυρογάλακτος στα χρονικά σημεία 0, 24, 48 και 72 ώρες.

Μεταβολίτες υδρολυμένου τυρογάλακτος	0 ώρες	24 ώρες	48 ώρες	72 ώρες
	Μέγιστη συγκέντρωση (mM)	Μέγιστη συγκέντρωση (mM)	Μέγιστη συγκέντρωση (mM)	Μέγιστη συγκέντρωση (mM)
2-phosphoglycerate	179.5516	96.9555	136.8461	261.8778
galactose	115.9657	94.7032	116.5091	270.0956
glucose	112.1982	110.2338	135.6471	242.2153
ethanol	49.3074	23.1625	δεν ανιχνεύτηκε	δεν ανιχνεύτηκε
erythritol	41.3927	30.4163	30.8985	53.4777
xylitol	39.2645	26.1266	25.4617	53.987
glycerate	32.9765	20.3535	26.5399	50.2043
d-threitol	31.5525	19.5485	24.7297	67.6585
arabinose	31.0533	24.3253	26.3374	55.8932
glucitol	28.7431	20.9328	22.8963	46.8477
serine	26.781	10.6159	δεν ανιχνεύτηκε	δεν ανιχνεύτηκε
glycolate	26.3321	14.3352	19.3359	56.4883
mannitol	δεν ανιχνεύτηκε	14.6664	16.3642	39.8738
fructose	δεν ανιχνεύτηκε	13.7669	17.896	43.4055
ascorbate	δεν ανιχνεύτηκε	11.7543	δεν ανιχνεύτηκε	δεν ανιχνεύτηκε
guanidoacetate	δεν ανιχνεύτηκε	10.5709	14.3949	41.4025
threonate	δεν ανιχνεύτηκε	9.711	δεν ανιχνεύτηκε	δεν ανιχνεύτηκε
galactitol	δεν ανιχνεύτηκε	9.5927	δεν ανιχνεύτηκε	δεν ανιχνεύτηκε
ribose	δεν ανιχνεύτηκε	8.9413	δεν ανιχνεύτηκε	δεν ανιχνεύτηκε
acetate	δεν ανιχνεύτηκε	δεν ανιχνεύτηκε	17.1599	36.1492
lactate	δεν ανιχνεύτηκε	δεν ανιχνεύτηκε	δεν ανιχνεύτηκε	35.767

Στους παραπάνω πίνακες περιγράφεται η σύσταση των μητρών τυρογάλακτος και υδρολυμένου τυρογάλακτος αντίστοιχα, στα χρονικά σημεία 0, 24, 48 και 72 ώρες. Τα σκιασμένα κελιά κάθε πίνακα αναφέρονται σε ενώσεις οι οποίες ανιχνεύονται αυτόματα από το λογισμικό σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις αλλά δεν ήταν δυνατή και η χειροκίνητη επιβεβαίωσή τους. Γι'αυτόν τον λόγο, στους τελικούς πίνακες σύστασης κάθε είδους τυρογάλακτος συμπερίληφθηκαν οι δέκα πρώτες ενώσεις με σημαντική συγκέντρωση που μπορούσαν να επιβεβαιωθούν αυτόματα και χειροκίνητα, ενώ λήφθηκαν υπόψη και αυτές που προκύπτουν αυτόματα από το λογισμικό, καθώς εμφανίζονται στο εύρος των δέκα μεγαλύτερων συγκεντρώσεων που προσδιορίζονται από το λογισμικό. Παρατηρώντας τους παραπάνω πίνακες, γίνεται αντιληπτό πως το σύνολο των συστατικών σε σημαντικές συγκεντρώσεις και στις δύο κατηγορίες τυρογάλακτος είναι σάκχαρα, παράγωγα σακχάρων και ενδιάμεσα που συμμετέχουν στις διαδικασίες της γλυκόλυσης. Τα φάσματα επιβεβαιώνουν την επιτυχή υδρόλυση της λακτόζης, καθώς δεν ανιχνεύεται το συγκεκριμένο σάκχαρο σε σημαντική συγκέντρωση σε κανένα χρονικό σημείο στα φάσματα του υδρολυμένου τυρογάλακτος. Όσον αφορά τα συστατικά που πιθανόν να καταναλώνει το

βακτήριο, παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσης διάφορων σακχάρων με την πάροδο του χρόνου, στην περίπτωση του τυρογάλακτος, ωστόσο η συγκέντρωση κάποιων άλλων αυξάνεται σε μικρό βαθμό, γεγονός που θα μπορούσε να αποδοθεί στην διάσπαση των κυττάρων όταν βρίσκονται στην στατική φάση. Για την περίπτωση του υδρολυμένου τυρογάλακτος, προκύπτει πρόβλημα καθώς στο χρονικό σημείο των 72 ωρών παρατηρείται σημαντική αύξηση των συγκεντρώσεων, γεγονός που δεν είναι δυνατό να αιτιολογηθεί με κάποιον τρόπο. Από τα παραπάνω προκύπτει πως δεν μπορούν να εξαχθούν αξιόπιστα συμπεράσματα από την ανάλυση των δύο αυτών μητρών με φασματοσκοπία NMR με τις συγκεκριμένες παραμέτρους που χρησιμοποιήθηκαν στην συγκεκριμένη προσπάθεια, λόγω της πολυπλοκότητας των προς ανάλυση δειγμάτων.

4. Συμπεράσματα και προοπτικές

4.1. Συμπεράσματα

Η παρούσα μελέτη επικεντρώθηκε στην ανάπτυξη του βακτηρίου *Pseudomonas* sp. pHDV1 σε διαφορετικές συνθήκες στις οποίες αξιοποιείται το τυρόγαλα, ένας ιδιαίτερα επιβλαβής ρύπος, καθώς και στην παραγωγή PHB υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες ανάπτυξης. Αρχικά, μετά την καλλιέργεια του βακτηρίου σε κανονικές συνθήκες (control) η οποία χρησιμοποιήθηκε ως μέτρο σύγκρισης, ελέγχθηκε κατά πόσο το συγκεκριμένο στέλεχος του βακτηρίου μπορεί να επιβιώσει σε υψηλές συγκεντρώσεις NaCl (1 M, 1.5 M και 2 M) και αφού επιβεβαιώθηκε η επιτυχής ανάπτυξη του, δοκιμάστηκε η καλλιέργεια του βακτηρίου με πηγή άνθρακα γλυκόζη σε συγκέντρωση 7% w/v και γαλακτόζη σε συγκέντρωση 3.5% w/v, στους δύο δηλαδή μονοσακχαρίτες που αποτελούν το βασικό σάκχαρο που υπάρχει στο τυρόγαλα, την λακτόζη, (σε συγκέντρωση 7% w/v στο υπό μελέτη δείγμα). Η ανάπτυξη επιτεύχθηκε μόνο παρουσία γλυκόζης και γι' αυτόν τον λόγο το τυρόγαλα που χρησιμοποιήθηκε στις καλλιέργειες του βακτηρίου ήταν με την μορφή κανονικού αλλά και υδρολυμένου τυρογάλακτος, δηλαδή τυρόγαλα στο οποίο η λακτόζη είχε μετατραπεί πλήρως σε γλυκόζη και γαλακτόζη. Οι συνθήκες ανάπτυξης στις οποίες χρησιμοποιήθηκε τυρόγαλα ήταν ανάπτυξη του βακτηρίου μόνο σε τυρόγαλα και μόνο σε υδρολυμένο τυρόγαλα, παρουσία θρεπτικών συστατικών M9 με πηγή άνθρακα τυρόγαλα και υδρολυμένο τυρόγαλα και παρουσία θρεπτικών συστατικών M9 με αντικατάσταση του απαραίτητου νερού της καλλιέργειας από τυρόγαλα και υδρολυμένο τυρόγαλα. Η ανάπτυξη σε όλες τις συνθήκες ήταν επιτυχής, με τις δύο πρώτες να παρατηρείται καθυστέρηση 48 ωρών στην αύξηση της οπτικής πυκνότητας της καλλιέργειας, γεγονός που πιθανόν να οφείλεται στην αυξημένη καταπόνηση που υπέστη ο πληθυσμός του βακτηρίου, προκειμένου να προσαρμοστεί στις συγκεκριμένες συνθήκες. Όλες οι συνθήκες ανάπτυξης, εκτός από την ανάπτυξη σε υψηλές συγκεντρώσεις NaCl και παρουσία θρεπτικών συστατικών με αντικατάσταση του απαραίτητου νερού από τυρόγαλα και από υδρολυμένο τυρόγαλα λόγω τεχνικών προβλημάτων του οργάνου, ελέγχθηκαν με οπτική μικροσκοπία και μικροσκοπία φθορισμού

με χρήση της χρωστικής Nile red, ώστε να παρατηρηθεί ο πληθυσμός των κυττάρων αλλά και να παρατηρηθεί η πιθανή ύπαρξη σφαιριδίων PHB. Σφαιρίδια PHB εντοπίστηκαν μόνο στην περίπτωση ανάπτυξης του βακτηρίου μόνο σε υδρολυμένο τυρόγαλα και με πηγή άνθρακα γλυκόζη σε συγκέντρωση 7% w/v. Δείγματα στο χρονικό σημείο των 72 ωρών για όλες τις συνθήκες που παρατηρήθηκε η ύπαρξη PHB, καθώς και στις συνθήκες των οποίων ο έλεγχος δεν ήταν δυνατός, συλλέχθηκαν και ακολούθησε ποσοτικοποίηση του PHB, από την οποία προέκυψε ότι η μεγαλύτερη παραγωγή παρατηρείται στις συνθήκες ανάπτυξης του βακτηρίου με πηγή άνθρακα γλυκόζη, μόνο σε υδρολυμένο τυρόγαλα και παρουσία θρεπτικών συστατικών M9 με αντικατάσταση του απαραίτητου νερού της καλλιέργειας από τυρόγαλα. Σε επόμενη φάση, κατασκευάστηκαν καμπύλες κατανάλωσης γλυκόζης με ταινίες μέτρησης γλυκόζης αίματος σε όλες τις συνθήκες που χρησιμοποιήθηκε υδρολυμένο τυρόγαλα καθώς και στην περίπτωση ανάπτυξης του βακτηρίου με πηγή άνθρακα γλυκόζη, οι οποίες επιβεβαίωσαν την κατανάλωση του συγκεκριμένου σακχάρου από τον μικροοργανισμό. Στην συνέχεια, επιχειρήθηκε ο προσδιορισμός των ολικών σακχάρων, του ολικού ανόργανου φωσφόρου καθώς και του πρωτεϊνικού περιεχομένου των υπερκείμενων δειγμάτων σε όλες τις συνθήκες ανάπτυξης που χρησιμοποιήθηκε τυρόγαλα και υδρολυμένο τυρόγαλα, στα χρονικά σημεία 0, 24, 48 και 72 ώρες, με σκοπό να ελεγχθεί κατά πόσο η ανάπτυξη του βακτηρίου σε αυτές τις συνθήκες μειώνει το συνολικό ρυπογόνο φορτίο (συνολική ποσότητα άνθρακα, αζώτου και φωσφόρου) του αποβλήτου που χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα. Για τον προσδιορισμό των ολικών σακχάρων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος θυμόλης/θειικού οξέος, τα αποτελέσματα της οποίας όμως δεν είναι αξιόπιστα και δεν συμφωνούν με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, πιθανόν εξαιτίας παρεμβολών που δημιουργούνται από την αλληλεπίδραση του αντιδραστήριου θυμόλης με την συνολική πρωτεΐνη που υπάρχει στα υπερκείμενα που χρησιμοποιήθηκαν για την λήψη μετρήσεων. Ο ολικός ανόργανος φώσφορος προσδιορίστηκε με την μέθοδο μπλε του μολυβδαινίου, και προέκυψε πως στις περιπτώσεις της ανάπτυξης του βακτηρίου μόνο σε τυρόγαλα και παρουσία θρεπτικών συστατικών με αντικατάσταση του απαραίτητου νερού από τυρόγαλα, ο ολικός ανόργανος φώσφορος έχει σημαντική αρχική συγκέντρωση η οποία όμως μειώνεται σημαντικά με την πάροδο του χρόνου. Στις συνθήκες όπου το βακτήριο αναπτύσσεται παρουσία θρεπτικών συστατικών με πηγή άνθρακα τυρόγαλα και υδρολυμένο τυρόγαλα, καθώς και στην περίπτωση όπου το νερό αντικαθίσταται από υδρολυμένο τυρόγαλα, η συγκέντρωση ολικού ανόργανου φωσφόρου παραμένει ιδιαίτερα χαμηλή και σταθερή. Στην περίπτωση ανάπτυξης μόνο σε υδρολυμένο τυρόγαλα, παρατηρείται επίσης μείωση, ωστόσο οι αρχική συγκέντρωση ολικού ανόργανου φωσφόρου είναι δύο τάξεις μεγέθους από αυτήν του τυρογάλακτος, γεγονός που οφείλεται στην καθίζηση των φωσφορικών ιόντων από το ανθρακικό ασβέστιο που αποτελεί συστατικό των εμπορικά διαθέσιμων δισκίων λακτόσης που χρησιμοποιήθηκαν για την υδρόλυση της λακτόζης. Επομένως, αν και για την περίπτωση του τυρογάλακτος είναι σαφής η μείωση του ανόργανου φωσφόρου, αυτό δεν ισχύει και για το υδρολυμένο τυρόγαλα, καθώς δεν είναι δυνατό να προσδιοριστεί τι ποσοστό φωσφορικών έχει απομακρυνθεί από τα κείμενα λόγω της υδρόλυσης και τι εξαιτίας του βακτηρίου. Για τον προσδιορισμό του συνολικού πρωτεϊνικού περιεχομένου χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Bradford, από την οποία προέκυψε πως σε καμία συνθήκη ανάπτυξης δεν μειώνεται η συγκέντρωση συνολικής πρωτεΐνης. Ωστόσο, επειδή η συγκεκριμένη μέθοδος επηρεάζεται

από την αυξημένη συγκέντρωση NaCl που χαρακτηρίζει το τυρόγαλα, τα αποτελέσματα της δεν κρίθηκαν αξιόπιστα, και γι' αυτόν τον λόγο το συνολικό πρωτεϊνικό περιεχόμενο σε κάθε συνθήκη ανάπτυξης του βακτηρίου προσδιορίστηκε και με την μέθοδο BCA, η οποία συνιστά μια πιο ευαίσθητη και δεν επηρεάζεται ιδιαίτερα από την πολυπλοκότητα του τυρογάλακτος. Τα αποτελέσματα αυτής της μεθόδου συμφωνούν με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την Bradford, όμως κρίνονται πιο αξιόπιστα. Από τα παραπάνω, συμπεραίνεται ότι η χρήση του τυρογάλακτος ως υπόστρωμα για την ανάπτυξη του συγκεκριμένου μικροοργανισμού, καθιστά τον ρύπο λιγότερο μολυσματικό για το φυσικό περιβάλλον, αφού μειώνει σημαντικά τον ολικό ανόργανο φώσφορο που υπάρχει σε αυτόν, παρόλο που δεν επηρεάζει το ολικό άζωτο, και δεν είναι ακόμα γνωστό τι συμβαίνει όσον αφορά τον συνολικό άνθρακα, ο οποίος βρίσκεται με την μορφή υδατανθράκων στο μείγμα. Τέλος, επιχειρήθηκε ο χαρακτηρισμός των μητρών τυρογάλακτος και υδρολυμένου τυρογάλακτος, μετά την ανάπτυξη του βακτηρίου μόνο σε αυτές με φασματοσκοπία NMR, από τον οποίο το μόνο σαφές συμπέρασμα που προέκυψε είναι ότι οι δέκα πρώτες ενώσεις σε σημαντικές συγκεντρώσεις που ανιχνεύονται τόσο στο τυρόγαλα όσο και στο υδρολυμένο τυρόγαλα είναι σάκχαρα και παράγωγα σακχάρων. Η μείωση αυτών με την πάροδο το χρόνου παρατηρείται σε μικρό βαθμό στην περίπτωση του τυρογάλακτος, γεγονός που πιθανόν να μπορεί να αποδοθεί στον μεταβολισμό τους από το βακτήριο. Ωστόσο, για την περίπτωση του υδρολυμένου τυρογάλακτος, δεν είναι δυνατόν να διεξαχθεί οποιοδήποτε συμπέρασμα, καθώς παρατηρείται μια σημαντική αύξηση όλων των σακχάρων στο χρονικό διάστημα των 72 ωρών, το οποίο δεν μπορεί να εξηγηθεί με τα τωρινά δεδομένα.

4.2. Μελλοντικοί στόχοι

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας προσφέρουν σημαντικές πληροφορίες, όσον αφορά την αξιοποίηση του τυρογάλακτος, ως υπόστρωμα για την ανάπτυξη του *Pseudomonas* sp. rhDV1. Εντούτοις, κρίνεται αναγκαίο σε μεταγενέστερο χρόνο να πραγματοποιηθούν κάποιες δράσεις, οι οποίες θα συμβάλλουν στην διεξαγωγή οριστικών συμπερασμάτων για όσα ερωτήματα δεν έχουν ήδη απαντηθεί. Αρχικά, είναι επιθυμητή η λήψη εικόνων οπτικού μικροσκοπίου και μικροσκοπίου φθορισμού σε όσες συνθήκες αυτό δεν ήταν δυνατό μέχρι στιγμής, ενώ είναι απαραίτητη και η πραγματοποίηση HPLC σε όσες συνθήκες αυτό δεν έγινε ήδη, από δείγματα βιολογικών επαναλήψεων, ώστε να προσδιοριστεί και το κατάλληλο σφάλμα σε κάθε περίπτωση. Ακόμη, είναι απαραίτητη η συλλογή δειγμάτων στο χρονικό σημείο των 0 h για όλες τις συνθήκες ανάπτυξης του βακτηρίου στις οποίες χρησιμοποιείται τυρόγαλα και υδρολυμένο τυρόγαλα, ώστε να μπορεί να προκύψει ακριβής τιμή συγκέντρωσης ολικών σακχάρων, ολικού ανόργανου φωσφόρου και συνολικής πρωτεΐνης. Όσον αφορά την μέθοδο θυμόλης-θεικού οξέος, κρίνεται αναγκαία η απομάκρυνση των πρωτεϊνών από τα υπερκείμενα που θα χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση των συγκεντρώσεων των ολικών σακχάρων σε κάθε χρονικό σημείο. Επιπλέον, κρίνεται ορθό να ληφθούν επαναληπτικά φάσματα NMR στα υπερκείμενα των διάφορων χρονικών σημείων για τις συνθήκες ανάπτυξης του βακτηρίου σε τυρόγαλα και υδρολυμένο τυρόγαλα, με διαφορετικές παραμέτρους, ώστε να αυξηθεί η διακριτικότητα του σήματος που λαμβάνεται

και πιθανώς να διαφοροποιηθούν οι τιμές των συγκεντρώσεων που προκύπτουν από το λογισμικό chenomix. Ταυτόχρονα, στην παρούσα εργασία δεν πραγματοποιήθηκε απομόνωση και μελέτη των σφαιριδίων PHB που προκύπτουν, κάτι το οποίο θα μπορούσε να αποτελέσει έναν σημαντικό μελλοντικό τομέα μελέτης. Τέλος, όλα τα παραπάνω αναφέρονται μόνο για το wild type του βακτηρίου, ενώ υπάρχουν ακόμη και τα ΔphaR και ΔphaZ μεταλλάγματα. Η εφαρμογή όλων των παραπάνω πειραματικών διαδικασιών και στις μεταλλάξεις του μικροοργανισμού αποτελεί μια ενδιαφέρουσα πρόταση, για την συνέχεια αυτής της προσπάθειας.

5. Βιβλιογραφία

- Akinwumi, A. R., Nwinyi, O. C., Ayeni, A. O., Ahuekwe, E. F., & Chukwu, M. N. (2022). An overview of the production and prospect of polyhydroxyalkanoate (PHA)-based biofuels: Opportunities and limitations. *Scientific African*, *16*, e01233. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2022.e01233>
- Amelia, T. S. M., Govindasamy, S., Tamothran, A. M., Vigneswari, S., & Bhubalan, K. (2019). Applications of PHA in Agriculture. In *Biotechnological Applications of Polyhydroxyalkanoates* (pp. 347–361). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3759-8_13
- 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>
- Bachra, B. N., Trautz, O. R., & Simon, S. L. (1963). Precipitation of calcium carbonates and phosphates. I. Spontaneous precipitation of calcium carbonates and phosphates under physiological conditions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *103*(1), 124–138. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(63\)90018-3](https://doi.org/10.1016/0003-9861(63)90018-3)
- Beeby, M., Cho, M., Stubbe, J., & Jensen, G. J. (2012). Growth and Localization of Polyhydroxybutyrate Granules in *Ralstonia eutropha*. *Journal of Bacteriology*, *194*(5), 1092–1099. <https://doi.org/10.1128/JB.06125-11>
- Bucknall, D. G. (2020). Plastics as a materials system in a circular economy. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, *378*(2176), 20190268. <https://doi.org/10.1098/rsta.2019.0268>
- Colombo, B., Pepè Sciarria, T., Reis, M., Scaglia, B., & Adani, F. (2016). Polyhydroxyalkanoates (PHAs) production from fermented cheese whey by using a mixed microbial culture. *Bioresource Technology*, *218*, 692–699. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.07.024>

- Friedenauer, S., & Berlet, H. H. (1989). Sensitivity and variability of the Bradford protein assay in the presence of detergents. *Analytical Biochemistry*, *178*(2), 263–268.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90636-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90636-2)
- Ganju, S., & Gogate, P. R. (2017). A review on approaches for efficient recovery of whey proteins from dairy industry effluents. *Journal of Food Engineering*, *215*, 84–96.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.07.021>
- Grage, K., Jahns, A. C., Parlane, N., Palanisamy, R., Rasiah, I. A., Atwood, J. A., & Rehm, B. H. A. (2009). Bacterial Polyhydroxyalkanoate Granules: Biogenesis, Structure, and Potential Use as Nano-/Micro-Beads in Biotechnological and Biomedical Applications. *Biomacromolecules*, *10*(4), 660–669.
<https://doi.org/10.1021/bm801394s>
- Greenspan, P., Mayer, E. P., & Fowler, S. D. (1985). Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *The Journal of Cell Biology*, *100*(3), 965–973.
<https://doi.org/10.1083/jcb.100.3.965>
- Griebel, R., Smith, Z., & Merrick, J. M. (1968). Metabolism of poly(β -hydroxybutyrate). I. Purification, composition, and properties of native poly(β -hydroxybutyrate) granules from *Bacillus megaterium*. *Biochemistry*, *7*(10), 3676–3681.
<https://doi.org/10.1021/bi00850a047>
- Griebel, R. J., & Merrick, J. M. (1971). Metabolism of Poly- β -Hydroxybutyrate: Effect of Mild Alkaline Extraction on Native Poly- β -Hydroxybutyrate Granules. *Journal of Bacteriology*, *108*(2), 782–789. <https://doi.org/10.1128/jb.108.2.782-789.1971>
- Gröger, W. K. L. (1961). Determination of sugars in biological media with thymol in sulphuric acid. *Clinica Chimica Acta*, *6*(6), 866–873.
[https://doi.org/10.1016/0009-8981\(61\)90176-0](https://doi.org/10.1016/0009-8981(61)90176-0)
- He, F. (2011). BCA (Bicinchoninic Acid) Protein Assay. *BIO-PROTOCOL*, *1*(5).
<https://doi.org/10.21769/BioProtoc.44>
- Jendrossek, D. (2009). Polyhydroxyalkanoate Granules Are Complex Subcellular Organelles (Carbonosomes). *Journal of Bacteriology*, *191*(10), 3195–3202.
<https://doi.org/10.1128/JB.01723-08>
- Jin Chung, W., Shim, J., & Ravindran, B. (2022). Characterization of cheese processed wastewater and treatment using calcium nanoparticles synthesised by *Senna auriculata* L flower extract. *Journal of King Saud University - Science*, *34*(2), 101793.
<https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101793>
- Jo, S. Y., Son, J., Sohn, Y. J., Lim, S. H., Lee, J. Y., Yoo, J. I., Park, S. Y., Na, J.-G., & Park, S. J. (2021). A shortcut to carbon-neutral bioplastic production: Recent advances in microbial production of polyhydroxyalkanoates from C1 resources. *International Journal of Biological Macromolecules*, *192*, 978–998.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.10.066>
- Kalia, V. C., Ray, S., Patel, S. K. S., Singh, M., & Singh, G. P. (2019). The Dawn of Novel

- Biotechnological Applications of Polyhydroxyalkanoates. In *Biotechnological Applications of Polyhydroxyalkanoates* (pp. 1–11). Springer Singapore.
https://doi.org/10.1007/978-981-13-3759-8_1
- Kiselev, E. G., Zhila, N. O., & Volova, T. G. (2021). Biodegradable polymers – perspectives and applications in agriculture. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 689(1), 012036. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/689/1/012036>
- Kumar, V., Kumar, S., & Singh, D. (2020). Microbial polyhydroxyalkanoates from extreme niches: Bioprospection status, opportunities and challenges. *International Journal of Biological Macromolecules*, 147, 1255–1267.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.253>
- Lavelli, V., & Beccalli, M. P. (2022). Cheese whey recycling in the perspective of the circular economy: Modeling processes and the supply chain to design the involvement of the small and medium enterprises. *Trends in Food Science & Technology*, 126, 86–98. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.06.013>
- Liu, G., Cai, S., Hou, J., Zhao, D., Han, J., Zhou, J., & Xiang, H. (2016). Enoyl-CoA hydratase mediates polyhydroxyalkanoate mobilization in *Haloferax mediterranei*. *Scientific Reports*, 6(1), 24015. <https://doi.org/10.1038/srep24015>
- Luengo, J. M., García, B., Sandoval, A., Naharro, G., & Olivera, E. R. (2003). Bioplastics from microorganisms. *Current Opinion in Microbiology*, 6(3), 251–260.
[https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00040-7](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00040-7)
- Lyratzakis, A., Valsamidis, G., Kanavaki, I., Nikolaki, A., Rupprecht, F., Langer, J. D., & Tsiotis, G. (2021). Proteomic Characterization of the *Pseudomonas* sp. Strain pHDV1 Response to Monocyclic Aromatic Compounds. *PROTEOMICS*, 21(2).
<https://doi.org/10.1002/pmic.202000003>
- Masood, F., Yasin, T., & Hameed, A. (2015). Polyhydroxyalkanoates – what are the uses? Current challenges and perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology*, 35(4), 514–521.
<https://doi.org/10.3109/07388551.2014.913548>
- McAdam, B., Brennan Fournet, M., McDonald, P., & Mojicevic, M. (2020). Production of Polyhydroxybutyrate (PHB) and Factors Impacting Its Chemical and Mechanical Characteristics. *Polymers*, 12(12), 2908. <https://doi.org/10.3390/polym12122908>
- Merrick, J. M., Lundgren, D. G., & Pfister, R. M. (1965). Morphological Changes in Poly- β -Hydroxybutyrate Granules Associated with Decreased Susceptibility to Enzymatic Hydrolysis. *Journal of Bacteriology*, 89(1), 234–239.
<https://doi.org/10.1128/jb.89.1.234-239.19654>
- Miranda, M. P. (2024). Comparison of the effect of Sodium Chloride concentration on protein determination: Bradford and Biuret methods. *Analytical Biochemistry*, 687, 115450. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2023.115450>
- Mong, G. R., Tan, H., Chin Vui Sheng, D. D., Kek, H. Y., Nyakuma, B. B., Woon, K. S., Othman, M. H. D., Kang, H. S., Goh, P. S., & Wong, K. Y. (2024). A review on plastic

- waste valorisation to advanced materials: Solutions and technologies to curb plastic waste pollution. *Journal of Cleaner Production*, 434, 140180. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2023.140180>
- Nagul, E. A., McKelvie, I. D., Worsfold, P., & Kolev, S. D. (2015). The molybdenum blue reaction for the determination of orthophosphate revisited: Opening the black box. *Analytica Chimica Acta*, 890, 60–82. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.07.030>
- Nikolaki, A., Papadioti, A., Arvaniti, K., Kassotaki, E., Langer, J. D., & Tsiotis, G. (2014). The membrane complexome of a new *Pseudomonas* strain during growth on lysogeny broth medium and medium containing glucose or phenol. *EuPA Open Proteomics*, 4, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.euprot.2014.04.003>
- Nile Red. Thermofisher.* (n.d.) <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/N1142>
- Obruca, S., Sedlacek, P., Slaninova, E., Fritz, I., Daffert, C., Meixner, K., Sedrlova, Z., & Koller, M. (2020). Novel unexpected functions of PHA granules. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(11), 4795–4810. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10568-1>
- Ojumu, T. v., Yu, J., & Solomon, B. O. (2004). Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. *African Journal of Biotechnology*, 3(1), 18–24. <https://doi.org/10.5897/AJB2004.000-2004>
- Ong, S. Y., Chee, J. Y., & Sudesh, K. (2017). Degradation of Polyhydroxyalkanoate (PHA): a Review. *Journal of Siberian Federal University. Biology*, 10(2), 21–225. <https://doi.org/10.17516/1997-1389-0024>
- Papasotiriou, D. G., Markoutsas, S., Meyer, B., Papadioti, A., Karas, M., & Tsiotis, G. (2008). Comparison of the Membrane Subproteomes during Growth of a New *Pseudomonas* Strain on Lysogeny Broth Medium, Glucose, and Phenol. *Journal of Proteome Research*, 7(10), 4278–4288. <https://doi.org/10.1021/pr800192n>
- Pierce BCA Protein Assay Kit. Thermofisher.* (n.d.) https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0011430_Pierce_BCA_Protein_Asy_UG.pdf
- Polymenakou, P. N., & Stephanou, E. G. (2005). Effect of temperature and additional carbon sources on phenol degradation by an indigenous soil *Pseudomonad*. *Biodegradation*, 16(5), 403–413. <https://doi.org/10.1007/s10532-004-3333-1>
- Rehm, B. H. A., & Steinbüchel, A. (1999). Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 25(1–3), 3–19. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(99\)00010-0](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(99)00010-0)
- Roohi K.B., Zaheer, M. R., & Kuddus, M. (2018). PHB (poly-β-hydroxybutyrate) and its enzymatic degradation. *Polymers for Advanced Technologies*, 29(1), 30–40. <https://doi.org/10.1002/pat.4126>
- Rumin, J., Bonnefond, H., Saint-Jean, B., Rouxel, C., Sciandra, A., Bernard, O., Cadoret, J.-P., & Bougaran, G. (2015). The use of fluorescent Nile red and BODIPY for lipid

- measurement in microalgae. *Biotechnology for Biofuels*, 8(1), 42.
<https://doi.org/10.1186/s13068-015-0220-4>
- Samrot, A. v., Samanvitha, S. K., Shobana, N., Renitta, E. R., Senthilkumar, P., Kumar, S. S., Abirami, S., Dhiva, S., Bavanilatha, M., Prakash, P., Saigeetha, S., Shree, K. S., & Thirumurugan, R. (2021). The Synthesis, Characterization and Applications of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) and PHA-Based Nanoparticles. *Polymers*, 13(19), 3302. <https://doi.org/10.3390/polym13193302>
- Santos, A. J., Oliveira Dalla Valentina, L. V., Hidalgo Schulz, A. A., & Tomaz Duarte, M. A. (2017). From Obtaining to Degradation of PHB:Material Properties. Part I. *Ingeniería y Ciencia*, 13(26), 269–298. <https://doi.org/10.17230/ingciencia.13.26.10>
- Sharma, V., Sehgal, R., & Gupta, R. (2021). Polyhydroxyalkanoate (PHA): Properties and Modifications. *Polymer*, 212, 123161. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2020.123161>
- Solis, M., & Silveira, S. (2020). Technologies for chemical recycling of household plastics – A technical review and TRL assessment. *Waste Management*, 105, 128–138. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.01.038>
- Steinbüchel, A., Aerts, K., Liebergesell, M., Wieczorek, R., Babel, W., Föllner, C., Madkour, M. H., Mayer, F., Pieper-Fürst, U., Pries, A., & Valentin, H. E. (1995). Considerations on the structure and biochemistry of bacterial polyhydroxyalkanoic acid inclusions. *Canadian Journal of Microbiology*, 41(13), 94–105. <https://doi.org/10.1139/m95-175>
- Tarazona, N. A., Hernández-Arriaga, A. M., Kniewel, R., & Prieto, M. A. (2020). Phasin interactome reveals the interplay of PhaF with the polyhydroxyalkanoate transcriptional regulatory protein PhaD in *Pseudomonas putida*. *Environmental Microbiology*, 22(9), 3922–3936. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15175>
- Thomas, A. P., Kasa, V. P., Dubey, B. K., Sen, R., & Sarmah, A. K. (2023). Synthesis and commercialization of bioplastics: Organic waste as a sustainable feedstock. *Science of The Total Environment*, 904, 167243. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.167243>
- Tsirogianni, I., Aivaliotis, M., Karas, M., & Tsiotis, G. (2004). Mass spectrometric mapping of the enzymes involved in the phenol degradation of an indigenous soil pseudomonad. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1700(1), 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2004.04.003>
- Turco, R., Santagata, G., Corrado, I., Pezzella, C., & di Serio, M. (2021). In vivo and Post-synthesis Strategies to Enhance the Properties of PHB-Based Materials: A Review. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.619266>
- Uchino, K., Saito, T., Gebauer, B., & Jendrossek, D. (2007). Isolated Poly(3-Hydroxybutyrate) (PHB) Granules Are Complex Bacterial Organelles Catalyzing Formation of PHB from Acetyl Coenzyme A (CoA) and Degradation of PHB to Acetyl-CoA. *Journal of Bacteriology*, 189(22), 8250–8256. <https://doi.org/10.1128/JB.00752-07>

- Wilkes, R. A., Mendonca, C. M., & Aristilde, L. (2019). A Cyclic Metabolic Network in *Pseudomonas protegens* Pf-5 Prioritizes the Entner-Doudoroff Pathway and Exhibits Substrate Hierarchy during Carbohydrate Co-Utilization. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(1). <https://doi.org/10.1128/AEM.02084-18>
- Xayachak, T., Haque, N., Parthasarathy, R., King, S., Emami, N., Lau, D., & Pramanik, B. K. (2022). Pyrolysis for plastic waste management: An engineering perspective. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10(6), 108865. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.108865>
- Xie, H., Valsamidis, G., Mathioudaki, E., & Tsiotis, G. (2019). Complete Genome Sequence of *Pseudomonas* sp. Strain pHDV1, an Isolate Capable of Efficient Degradation of Aromatic Hydrocarbons. *Microbiology Resource Announcements*, 8(2). <https://doi.org/10.1128/MRA.01171-18>
- Ye, C., Hu, P., Ma, M.-X., Xiang, Y., Liu, R.-G., & Shang, X.-W. (2009). PHB/PHBHHx scaffolds and human adipose-derived stem cells for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*, 30(26), 4401–4406. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.05.001>
- Yee, L.-N., Chuah, J.-A., Chong, M.-L., Phang, L.-Y., Raha, A. R., Sudesh, K., & Hassan, M. A. (2012). Molecular characterisation of phaCAB from *Comamonas* sp. EB172 for functional expression in *Escherichia coli* JM109. *Microbiological Research*, 167(9), 550–557. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2011.12.006>
- Zhou, F., Liu, P., Liu, Q., Jin, X.-H., Xiong, X.-Y., Zheng, Z.-J., & Ouyang, J. (2022). Extending galactose-oxidation pathway of *Pseudomonas putida* for utilization of galactose-rich red macroalgae as sustainable feedstock. *Journal of Biotechnology*, 348, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2022.02.009>
- Zytner, P., Kumar, D., Elsayed, A., Mohanty, A., Ramarao, B. v., & Misra, M. (2023). A review on polyhydroxyalkanoate (PHA) production through the use of lignocellulosic biomass. *RSC Sustainability*, 1(9), 2120–2134. <https://doi.org/10.1039/D3SU00126A>
- Γελαδάς Δ. (2023). Παραγωγή πολύ-υδροξυβουτυρικού από στελέχη του βακτηρίου *Pseudomonas* sp. pHDV1 και χαρακτηρισμός με ηλεκτρονική μικροσκοπία [Μεταπτυχιακή Εργασία]. Πανεπιστήμιο Κρήτης.