

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ



Μεταπτυχιακή διατριβή

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΞΩΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ (ΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΟΠΟΙΗΤΕΣ,
ΒΙΟΚΡΟΚΙΔΩΤΙΚΑ) ΑΠΟ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ
ΑΝΕΠΤΥΓΜΕΝΟΥΣ ΣΕ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ-ΑΠΟΒΛΗΤΑ

Φωστήρα Παναγιώτου

Λεμεσός 2016

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΞΩΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ (ΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΟΠΟΙΗΤΕΣ,
ΒΙΟΚΡΟΚΙΔΩΤΙΚΑ) ΑΠΟ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ
ΑΝΕΠΤΥΓΜΕΝΟΥΣ ΣΕ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ-ΑΠΟΒΛΗΤΑ

της
Φωστήρα Παναγιώτου

Λεμεσός 2016

ΕΝΤΥΠΟ ΕΓΚΡΙΣΗΣ

Μεταπτυχιακή διατριβή

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΞΩΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ (ΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΟΠΟΙΗΤΕΣ,
ΒΙΟΚΡΟΚΙΔΩΤΙΚΑ) ΑΠΟ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ
ΑΝΕΠΤΥΓΜΕΝΟΥΣ ΣΕ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ-ΑΠΟΒΛΗΤΑ

Παρουσιάστηκε από

Φωστήρα Παναγιώτου

Επιβλέπων καθηγητής : Δρ. Ιωάννης Βυρίδης

Μέλος επιτροπής : Δρ. Μιχάλης Κουτίνας

Μέλος επιτροπής : Δρ. Ευάγγελος Δασκαλάκης

Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Κύπρου

ΜΑΙΟΣ 2016

Πνευματικά δικαιώματα

Copyright © Φωστήρα Παναγιώτου 2016

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Η έγκριση της μεταπτυχιακής διατριβής από το Τμήμα Γεωτεχνικών Επιστημών Και Διαχείρισης Περιβάλλοντος του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου δεν υποδηλώνει απαραίτητως και αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα εκ μέρους του Τμήματος.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η υλοποίηση αυτής της πτυχιακής πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Environmental Engineering Lab του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Περιβάλλοντος, στο Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Κύπρου με την υποστήριξη ενός αριθμού ανθρώπων στους οποίους θα ήθελα να στείλω τις θερμότερες ευχαριστίες μου. Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον καθηγητή μου Δρ. Ιωάννη Βυρίδη για την καθοδήγηση, βοήθεια και υποστήριξη του καθ' όλη την διάρκεια διεκπεραίωσης της παρούσας διπλωματικής και για την διαρκή και σχολαστική παρακολούθηση της προόδου του ερευνητικού θέματος και για την εξαιρετική συνεργασία που είχαμε.

Τα λόγια και οι ευχαριστίες όμως δεν είναι αρκετά για να αποδώσουν αυτά που αξίζει να αποδοθούν στην Έφη Μαρία Δράκου για την άριστη συνεργασία που είχαμε. Η τύχη και η τιμή της γνωριμίας μου μαζί της δεν μπορεί να αποδοθεί σε λίγες μόνο παραγράφους. Η ανεκτίμητη παιδαγωγική της βοήθεια, η συνεχής και υπομονετική καθοδήγησή της, οι συμβουλές, τον πολύτιμο χρόνο που διάθεσε για τα σημαντικά στοιχεία και εξηγήσεις πάνω στο θέμα, για την προθυμία και βοήθεια που δεν δίστασε να μου δώσει σε όλη την διάρκεια της συγγραφής της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας συνέβαλλαν τα μέγιστα για το τελικό αποτέλεσμα αυτής της διατριβής, η οποία δεν θα ήταν το ίδιο χωρίς τη δική της συμβολή.

Τέλος, αναμφίβολα θα ήθελα να ευχαριστήσω το κοντινό, φιλικό και οικογενειακό μου περιβάλλον για την στήριξη και εμπιστοσύνη που μου έδειξαν όλα αυτά τα χρόνια των σπουδών μου και της μέχρι τώρα σταδιοδρομίας μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής διερευνήθηκε η δυνατότητα ανάπτυξης μικροοργανισμών σε συγκεκριμένα υποστρώματα που θεωρούνται απόβλητα και στη συνέχεια μελετήθηκε η δυνατότητα παραγωγής εξωπολυσακχαριτών (EPS) από του μικροοργανισμούς αυτούς. Οι εξωπολυσακχαρίτες είναι πολύπλοκα μόρια υψηλού μοριακού βάρους αποτελούμενα κυρίως από σάκχαρα και πρωτεΐνες, με καθοριστικές ιδιότητες όπως είναι η παραγωγή γαλακτωματοποιητών και κροκιδωτικών, δίνοντάς τους έτσι την ικανότητα να έχουν ευρεία εφαρμογή σε βιομηχανική κλίμακα όπως είναι για παράδειγμα η βιομηχανία τροφίμων, καλλυντικών και φαρμάκων. Η παραγωγή τους όμως αντιμετωπίζει ένα σημαντικό εμπόδιο και αυτό οφείλεται στην εύρεση φτηνού υποστρώματος για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών και ακολούθως της παραγωγής EPS.

Στο πρώτο κεφάλαιο αναπτύσσεται το θεωρητικό υπόβαθρο σχετικά με τους εξωπολυσακχαρίτες, τη παραγωγή, τις αδιαμφισβήτητα σημαντικές εφαρμογές τους και επίσης γίνεται αναφορά στα θρεπτικά υποστρώματα εμβολιασμού. Στο δεύτερο κεφάλαιο δίνεται έμφαση στις τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτέλεση των πειραμάτων όσον αφορά την ανάπτυξη των μικροοργανισμών (καλλιέργεια και εμβολιασμός) ακολούθως αναφέρεται στις τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν για την εξαγωγή αποτελεσμάτων όσον αφορά τη παραγωγή EPS, γαλακτωματοποιητών και κροκιδωτικών. Ακολούθως στο τρίτο κεφάλαιο γίνεται επέκταση του πειραματικού μέρους όπου καταγράφονται οι πειραματικές διαδικασίες και αποτελέσματα για την διεκπεραίωση του στόχου της παρούσας διατριβής. Τέλος αναφέρονται τα συμπεράσματα που εξάχθηκαν και επίσης γίνεται αναφορά σε πιθανές μελλοντικές έρευνες που μπορούν να γίνουν σχετικά με το θέμα της παραγωγής EPS από φτηνά υποστρώματα.

ABSTRACT

The present thesis explored the possibility of developing microorganisms in substrates that are considered waste and then studied the possibility of producing exopolysaccharides (EPS) out of these microorganisms. The exopolysaccharides are complex molecules with high molecular weight consisting mainly of sugars and proteins, with important properties such as the production of emulsifiers and flocculants, giving them the ability to have wide application in industrial scale, for example food industry, cosmetics and medicines. Their production faces a major obstacle of finding cheap substrate for the growth of microorganisms and then the production of EPS.

In the first chapter develops the theoretical background on the exopolysaccharides, the production, the important applications and also made reference to the nutritious substrates vaccination. In the second chapter focus on techniques that were used in the experiments regarding the growth of microorganisms (cultivation) follows refers to techniques used to extract results regarding the production of EPS, emulsifiers and flocculants. In the third chapter becomes an extension of the research in which are recorded the experimental procedures and results in carrying out the objective of this thesis. Finally mentioned conclusions and also references to a possible future investigations that can be done about the issue of EPS production from cheap substrates.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	v
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	vi
ABSTRACT	vii
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	viii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	xi
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	xii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	xiv
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	xvi
ΑΠΟΔΟΣΗ ΟΡΩΝ.....	xvii
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	xviii
1 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ.....	1
1.1 ΕΞΩΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΕΣ (EPS)	1
1.1.1 EPS και Βιοφίλμ.....	2
1.1.2 Βιοσύνθεση EPS.....	4
1.1.3 Γαλακτωματοποιητές και Κροκιδωτικά	5
1.1.4 EPS και Εφαρμογές	7
1.2 Ομάδα βακτηρίων που παράγει EPS	11
1.3 ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ.....	13
1.3.1 Υπόστρωμα Καλλιέργειας-Ενεργοποίησης.....	13
2 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	19
2.1 Ενεργοποίηση Μικροοργανισμών.....	19
2.2 Εμβολιασμός και ανάπτυξη.....	20
2.3 Εκχύλιση Εξωπολυσακχαριτών.....	20
2.4 Εξέταση παραγωγής EPS	22

2.4.1	Γαλακτωματοποίηση	22
2.4.2	Βιοκροκίδωση.....	23
2.4.3	ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΞΗΡΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ.....	25
2.4.4	Μέτρηση πρωτεϊνών και σακχαρών	25
3	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΤΕΛΕΜΑΤΑ	30
3.1	ΠΕΙΡΑΜΑ 1a	30
3.1.1	Γαλακτωματοποίηση	31
3.1.2	Βιοκροκίδωση.....	32
3.1.3	ΠΕΙΡΑΜΑ 1b	32
3.1.4	Γαλακτωματοποίηση	32
3.1.1	Βιοκροκίδωση.....	33
3.1.2	Σύγκριση δύο πειραμάτων για 96h.....	34
3.1.3	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	35
3.2	ΠΕΙΡΑΜΑ 2	36
3.2.1	Γαλακτωματοποίηση	36
3.2.2	Βιοκροκίδωση.....	37
3.2.3	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	37
3.3	ΠΕΙΡΑΜΑ 3	38
3.3.1	Γαλακτωματοποίηση	38
3.3.2	Βιοκροκίδωση.....	39
3.3.3	ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΞΗΡΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ.....	39
3.3.4	ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ (Μέθοδος Lowry)	40
3.3.5	ΣΑΚΧΑΡΑ	40
3.3.6	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	41
3.4	ΠΕΙΡΑΜΑ 4	42
3.4.1	Γαλακτωματοποίηση	42

3.4.2	Βιοκροκίδωση.....	46
3.4.3	ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΞΗΡΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ.....	46
3.4.4	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ (Μέθοδος Comassie brilliant blue)	47
3.4.5	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΣΑΚΧΑΡΩΝ.....	47
3.4.6	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	48
3.5	ΠΕΙΡΑΜΑ 5	49
3.5.1	Γαλακτωματοποίηση	49
3.5.2	ΒΙΟΚΡΟΚΙΔΩΣΗ.....	53
3.5.3	DRY WEIGHT	53
3.5.4	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ (Μέθοδος Comassie Brilliant Blue).....	54
3.5.5	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΣΑΚΧΑΡΩΝ.....	55
3.5.6	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	55
	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ/ΕΠΙΛΟΓΟΣ.....	56

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Εφαρμογές EPS στη βιομηχανία τροφίμων	10
Πίνακας 2: Εφαρμογές EPS στη βιομηχανία καλλυντικών και φαρμάκων	11
Πίνακας 3: σύσταση βιομέσου ενεργοποίησης	19

Εικόνα 20: Γαλακτωματοποίηση D2 (LB-EPS) bilge waste water (αριστερά), crude glycerol (δεξιά), οργανική φάση: ελαιόλαδο.....	51
Εικόνα 21: Γαλακτωματοποίηση D2 (LB-EPS), crude glycerol, οργανική φάση: κηροζίνη .	51
Εικόνα 22: Γαλακτωματοποίηση D2 (LB-EPS), crude glycerol, οργανική φάση: πετρέλαιο	52
Εικόνα 23: Γαλακτωματοποίηση D2 (TB-EPS) crude glycerol, οργανική φάση: κηροζίνη (αριστερα), πετρέλαιο (δεξιά)	52

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1: Καμπύλη Βαθμονόμησης για τις πρωτεΐνες (μέθοδος Lowry)	27
Διάγραμμα 2:Καμπύλη Βαθμονόμησης για τις πρωτεΐνες (μέθοδος Commassie Brilliant Blue)	28
Διάγραμμα 3:Καμπύλη Βαθμονόμησης για τα σάκχαρα	29
Διάγραμμα 4: Γαλακτωματοποίηση (D2, LVD-10, LA9, PFL) σε γλυκόζη 5g/L για 48h και 96h, οργανική φάση-ελαιόλαδο, LB-EPS	31
Διάγραμμα 5: Βιοκροκίδωση καλλιέργεια στις 48h, TB-EPS	32
Διάγραμμα 6: Γαλακτωματοποίηση με οργανική φάση το ελαιόλαδο σε 48h ,72h και 96h (D2, LVD-10, LA9, PFL), LB-EPS	33
Διάγραμμα 7: Βιοκροκίδωση (D2, LA9, LVD-10, R.rubber, υπόστρωμα: 5g/L glucose & 1% crude glycerol, TB-EPS)	33
Διάγραμμα 8: Σύγκριση γαλακτωματοποίησης για τους 4 μικροοργανισμούς, LB-EPS, μέσο οργανικής φάσης- ελαιόλαδο	34
Διάγραμμα 9: Σύγκριση βιοκροκίδωσης, 96h, TB-EPS.....	34
Διάγραμμα 10: Γαλακτωματοποίηση (LA9, LVD-10, R.ruber), A:crude glycerol 3%, B: 5g/L glucose & 3% crude glycerol, οργανική φάση –ελαιόλαδο,48h,72h,96h, LB-EPS	36
Διάγραμμα 11: Βιοκροκίδωση για 48h, 72h, 96h (A: crude glycerol 3%, B: 5g/L glucose & 3% crude glycerol), TB-EPS	37
Διάγραμμα 12: Γαλακτωματοποίηση LA9, LVD-10, R.rubber (A: crude glycerol (3%) B: glucose 25g/L), LB-EPS, 48h, 72h, 96h.....	38
Διάγραμμα 13: Βιοκροκίδωση για TB-EPS, 24h, 48h, 72h	39
Διάγραμμα 14: Ποσοτικός προσδιορισμός ξηρής βιομάζας για 48h	39
Διάγραμμα 15: Συγκέντρωση πρωτεϊνών στις 48h, σε TB-EPS και LB-EPS.....	40
Διάγραμμα 16: : Συγκέντρωση σακχάρων στις 48h, σε TB-EPS και LB-EPS	40
Διάγραμμα 17: γαλακτωματοποίηση (LVD-10, LA9), TB-EPS, LB-EPS, BW: bilge waste water, c.gly: crude glycerol, οργανική φάση:ελαιόλαδο,ηλιέλαιο, diesel,24h.....	42

Διάγραμμα 18: Γαλακτωματοποίηση (LVD-10, LA9), TB-EPS, LB-EPS, BW: bilge waste water, c.gly: crude glycerol, οργανική φάση: ελαιόλαδο, ηλιέλαιο, diesel, 48h.....	43
Διάγραμμα 19: Γαλακτωματοποίηση (LVD-10, LA9), TB-EPS, LB-EPS, BW: bilge waste water, c.gly: crude glycerol, οργανική φάση: ελαιόλαδο, ηλιέλαιο, diesel, 72h.....	43
Διάγραμμα 20: βιοκροκίδωση 24h, 48, 72h, TB-EPS.....	46
Διάγραμμα 21: ποσοτικός προσδιορισμός ξηρής βιομάζας, 48h, LB-EPS, TB-EPS.....	46
Διάγραμμα 22: Συγκέντρωση πρωτεϊνών, 48h, TB-EPS, LB-EPS	47
Διάγραμμα 23: Συγκέντρωση σακχάρων 48h, TB-EPS, LB-EPS.....	47
Διάγραμμα 24: D2, BW: bilge waste water, C.glycerol : crude glycerol, οργανική φάση: ελαιόλαδο, diesel, κηροζίνη, TB-EPS, LB-EPS, 24h.....	49
Διάγραμμα 25: Γαλακτωματοποίηση D2, BW: bilge waste water, C.glycerol: crude glycerol, οργανική φάση: ελαιόλαδο, diesel, κηροζίνη, TB-EPS, LB-EPS, 48h.....	50
Διάγραμμα 26: Γαλακτωματοποίηση D2, BW: bilge waste water, C.glycerol: crude glycerol, οργανική φάση: ελαιόλαδο, diesel, κηροζίνη, TB-EPS, LB-EPS, 72h.....	50
Διάγραμμα 27: Βιοκροκίδωση D2, BW: bilge waste water, C. glycerol: crude glycerol, TB-EPS, 24h, 48h, 72h	53
Διάγραμμα 28: ποσοτικός προσδιορισμός ξηρής βιομάζας, D2, BW: bilge waste water, C.glycerol: crude glycerol, LB-EPS, 48h.....	53
Διάγραμμα 29: Συγκέντρωση πρωτεϊνών D2, BW: bilge waste water, C.glycerol: crude glycerol, TB-EPS, LB-EPS, 48h	54
Διάγραμμα 30: Συγκέντρωση σακχάρων D2, BW: bilge waste water, C. glycerol: crude glycerol, TB-EPS, LB-EPS, 48h	55

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

EPS: Εξωπολυσακχαρίτες

LB-EPS: loosely bounds – εξωπολυσακχαρίτες

TB-EPS: tightly bounds – εξωπολυσακχαρίτες

Fe: Σίδηρος

Cu: Χαλκός

Mn: Μαγγάνιο

Zn: Ψευδάργυρος

Co: Κοβάλτιο

CaCl₂: Χλωριούχο ασβέστιο

D2: Enterobacter sp

LVD-10-10/ LVD-10: Pseudomonas aeruginosa

LA9: Enterobacter sp

PFL: Pseudomonas Fluorescens

R.Ruber: Rhodococcus Ruber

ΑΠΟΔΟΣΗ ΟΡΩΝ

bioflocs	Βιο-κροκιοτικά
Bioemulsifier	Γαλακτωματοποιητές
Γαλακτωματοποίηση	Γαλακτωματοποίηση
Βιοκροκίδωση	Δραστηριότητα κροκίδωσης
Dry weight	Ποσοτικός προσδιορισμός ξηρής βιομάζας
Tightly bounds	Συνεκτικά δεσμευμένα
Lowsly bounds	Χαλαρά δεσμευμένα
Crude glycerol	Απόβλητο γλυκερόλης
Bilge waste water	Υπερχειλίσει υγρού αποβλήτου

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η βιοτεχνολογία θεωρείται ένας σύνθετος επιστημονικός κλάδος που αναπτύσσεται ραγδαία και στοχεύει στη αξιοποίηση των βιολογικών και όχι μόνο επιστημών που έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια για την παραγωγή νέων, προηγμένων προϊόντων και υπηρεσιών. Βιοτεχνολογία ορίζεται ως το σύνολο των τεχνιτών και βιολογικών διεργασιών με τη χρήση μικροοργανισμών για την παραγωγή χρήσιμων και εμπορικά αξιοποιήσιμων προϊόντων, υπηρεσιών, εξοικονομώντας ενέργεια και παρασκευάζοντας έτσι ποιοτικότερα προϊόντα για το καταναλωτή. Οι μικροοργανισμοί και ιδιαίτερα τα βακτήρια αποτελούν μια ομάδα κυττάρων με αδιαμφισβήτητα μεγάλη πρακτική και θεωρητική σημασία αφού χρησιμοποιούνται ευρύτατα για την παραγωγή βιοτεχνολογικών προϊόντων τα οποία παρουσιάζουν μεγάλη κλίμακα εφαρμογών. Ιατρική, φαρμακευτική, βιομηχανία τροφίμων, πρωτογενής παραγωγή ενέργειας, περιβάλλον και ποιότητα ζωής είναι μερικοί από τους τομείς στους οποίους συνεισφέρει καθημερινά η βιοτεχνολογία τις δυο τελευταίες δεκαετίες. Σήμερα, τον 21^ο αιώνα, αποτελεί σημαντική ελπίδα και ασφαλή εγγύηση για την αντιμετώπιση των ζωτικών προβλημάτων του σύγχρονου ανθρώπου. Συνεπώς, είναι δικαιολογημένο το ενδιαφέρον και οι τεράστιες επενδύσεις σε παγκόσμια κλίμακα στην εκπαίδευση, στην έρευνα και στις εφαρμογές της Βιοτεχνολογίας.

Με γνώμονα την ανάγκη ανεξάρτησης από τα χημικά σύνθετα συστατικά, τις ανάγκες τις παγκόσμια αγοράς, τη μείωση του κόστους των προϊόντων, τη βελτίωση της ποιότητας, την ανάπτυξη μη ενεργοβόρων και φιλικών προς το περιβάλλον τεχνολογιών, τη μείωση του όγκου των εγκαταστάσεων και του κόστους κατασκευής, η έρευνα έχει εστιαστεί στην παραγωγή τέτοιου είδους προϊόντα. Οι εξωκυτταρικές πολυμερείς ουσίες (EPS) είναι ενώσεις που παράγονται από τους μικροοργανισμούς και έχουν πολύ μεγάλη σημασία λόγω της σύστασής τους, για αυτό και η έρευνα έχει ασχοληθεί σε μεγάλο βαθμό για τη παραγωγής τους. Μερικές από τις εφαρμογές του είναι η αξιοποίηση τους από διάφορες βιομηχανίες για τη παραγωγής προϊόντων όπως είναι η βιομηχανία τροφίμων, καλλυντικών, απορρυπαντικών και φαρμακευτικής βιομηχανίας, επίσης κατά τις τελευταίες δεκαετίες αναφέρεται ότι έχουν αναδειχθεί βιομηχανικά ως βιοπολυμερή με σημαντική εμπορική αξία. Αξίζει να σημειωθεί ότι έχουν την ιδιότητα κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες να παράγουν γαλακτοματοποιείτες ή αλλιώς

βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες οι οποίες χρησιμοποιούνται στον τομέα των υδρογονανθράκων καθώς διαλυτοποιούν υδρόφοβα υποστρώματα. Η βιοαπόικοδόμηση και διαλυτοποίηση είναι ένας μηχανισμός που οδηγεί στην ανάκτηση του πετρελαίου και άλλων υδρογονανθράκων από το περιβάλλον. Επιπλέον παράγουν κροκιδωτικά τα οποία εφαρμόζονται σήμερα στο τομέα διαχείρισης υγρών αποβλήτων και όχι μόνο.

Το μεγαλύτερο όμως εμπόδιο που αντιμετωπίζει ο τομέας αυτός στη βιολογική παραγωγή των EPS και στην βιομηχανική εφαρμογή τους είναι το υψηλό κόστος ανάπτυξης των μικροοργανισμών αφού κάθε οργανισμός απαιτεί συγκεκριμένες συνθήκες ανάπτυξης και συγκεκριμένα το υπόστρωμα ανάπτυξης. Τα υποστρώματα που εφαρμόστηκαν μέχρι σήμερα είναι κυρίως θρεπτικά μέσα που αποτελούνται από διάφορους πολυσακχαρίτες όπως είναι η γλυκόζη, η σακχαρόζη, η σουκρόζη και η φουκόζη. Στόχος της παρούσας διατριβής είναι η διερεύνηση παραγωγής EPS από διαφορετικούς μικροοργανισμούς με διάφορες μεθόδους και η ανάπτυξή τους σε υποστρώματα που προέρχονται από διάφορες βιομηχανίες και θεωρούνται απόβλητα.

1 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

1.1 ΕΞΩΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΕΣ (EPS)

Τα τελευταία χρόνια, η αύξηση της ανάγκης για εξερεύνηση φυσικών πηγών όσον αφορά βιοτεχνολογικές διεργασίες οδήγησε σε ένα ανανεωμένο ενδιαφέρον στην παραγωγή εξωπολυσακχαριτών από μικροοργανισμούς. Εξωκυτταρικές πολυμερείς ουσίες ή αλλιώς εξωπολυσακχαρίτες (EPS) αποτελούνται κυρίως από πρωτεΐνες και σάκχαρα, αλλά και από χουμικές ενώσεις, νουκλεϊνικά οξέα, λιπίδια και άλλα κυτταρικά συστατικά. Είναι πολύπλοκα μόρια υψηλού μοριακού βάρους και συγκεκριμένα μεγάλα πολυμερή μονοσακχαριτών, αποτελούμενα από 3 ή 4 μονομερή και οργανώνονται σε ένα σύνολο των 10, σε επαναλαμβανόμενες ομάδες. Οι πολυσακχαρίτες διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τον τύπο του επαναλαμβανόμενου μονοσακχαρίτη, το μήκος της αλυσίδας, τον τύπο του δεσμού που συνδέει τα απλά σάκχαρα και τον βαθμό διακλάδωσης. Οι επαναλαμβανόμενες δομικές μονάδες (μονοσακχαρίτες) ενώνονται μεταξύ τους με γλυκοζιτικούς δεσμούς και ένα σάκχαρο μπορεί να ενωθεί με περισσότερα από δύο σάκχαρα, δημιουργώντας έτσι πολύ μεγάλες μακρομοριακές αλυσίδες με σύνθετα μόρια. Οι μονοσακχαρίτες που εμφανίζονται συχνά στα EPS είναι εξόζες, πεντόζες, ουρονικά οξέα, και αμινοσάκχαρα. Η διαλεύκανση της δομής των EPS είναι πολύ σημαντική για τον καθορισμό των βιολογικών ιδιοτήτων των πολυμερών ως προς τη βιοτεχνολογική τους εφαρμογή. Πολλές χημικές και φυσικές τεχνικές χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της πρωτοταγής δομής των EPS όπως είναι η χημική αποικοδόμηση και παραγοντοποίηση, σε συνδυασμό με χρωματογραφικές μεθόδους, και η ανάλυση φασματομετρίας ώστε να καθοριστεί η σύνθεση σακχάρων, η διαμόρφωση τους, η παρουσία και η θέση πιθανών υποκαταστατών. Οι ρεολογικές ιδιότητες των πολυμερών αυτών σίγουρα επηρεάζονται από την πρωτογενή διαμόρφωση. Επιπλέον, η δευτεροβάθμια διαμόρφωση παίρνει συχνά τη μορφή συγκεντρωτικής έλικας.

Ιδιότητά των εξωκυτταρικών πολυμερή ουσιών είναι να εκκρίνονται από τους μικροοργανισμούς στην εξωτερική του μεμβράνη με την ιδιότητα να σχηματίζουν αποικίες μικροοργανισμών (βιοφίλμ). Από όλα αυτά τα συστατικά, τα EPS είναι κυρίως υπεύθυνα για τη δομική και λειτουργική ενότητα των βιοφίλμ και για τις φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητές τους. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες που διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην αξία των EPS είναι το σχήμα, η χρώση, η πολικότητα, η υδροφοβικότητα και η ευελιξία στο να επηρεάζει την ικανότητά προσρόφησης σε επιφάνειες και άλλα EPS. Η ικανότητά τους να

κατακρατούν νερό και παράλληλα να σχηματίζουν βιοφίλμ με αποτέλεσμα να χρησιμοποιούνται σε μια ευρεία ποικιλία τροφίμων και βιομηχανικών εφαρμογών, συμπεριλαμβανομένων των υφασμάτων, βαφών, φαρμακευτικών προϊόντων και καλλυντικών, ακόμη και ως γαλακτωματοποιητές και σταθεροποιητικούς ή παράγοντες πάχυνσης. Επιπλέον, προωθούν το σχηματισμό κροκιδωτικών (bioflocs) τροποποιώντας έτσι τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μικροβιακών αδρανών υλικών, νηματοειδή βακτηριακών στελεχών, οργανικών και ανόργανων σωματιδίων. Μπορούν όμως να επηρεαστούν από πολλούς παράγοντες, όπως το pH, την αλατότητα και τη θερμοκρασία. Υπάρχουν περιπτώσεις που τα EPS παράγουν επιφανειοδραστικές ή τασιενεργές ουσίες, οι οποίες όταν διαλύονται σε ένα υγρό ή σε ένα σύστημα δύο φάσεων προσροφούνται στην επιφάνεια διαχωρισμού των δύο φάσεων, με αποτέλεσμα να μειώνεται η επιφανειακή τάση. Ανήκουν στην κατηγορία των γαλακτωματοποιητών και έχουν ευρεία εφαρμογή στη βιοαποικοδόμηση, η οποία θεωρείται ένας από τους πρωταρχικούς μηχανισμούς για την ανάκτηση του πετρελαίου και άλλων ρύπων υδρογονανθράκων από το περιβάλλον.

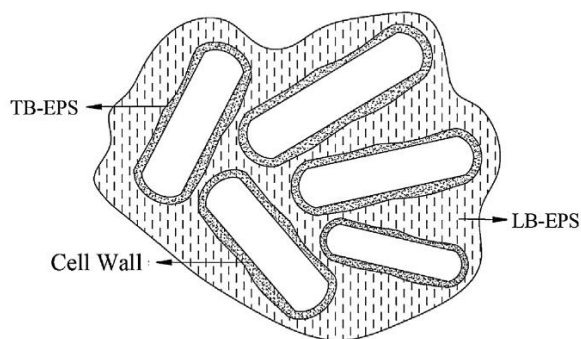
1.1.1 EPS και Βιοφίλμ

Οι πολυσακχαρίτες που παράγονται από μικροοργανισμούς μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με τη θέση τους στο κύτταρο: a) κυτοσολικοί πολυσακχαρίτες οι οποίοι περιέχουν πηγή άνθρακα και ενέργειας για το κύτταρο, b) αυτοί που συνθέτουν κυτταρικό τοίχωμα και περιλαμβάνουν πεπτιδογλικάνες, αμινοξέα και λιποσακχαρίτες, c) και τέλος αυτοί που βρίσκονται στο εξωτερικό περιβάλλον σχηματίζοντας βιοφίλμ με τη μορφή καψουλών.

Πιο συγκεκριμένα, τα EPS αποτελούν ένα τρισδιάστατο πλέγμα βιοφίλμ, με μορφή γέλης, που είναι ιδιαίτερα ενυδατωμένο και συχνά φορτισμένο, στο οποίο οι μικροοργανισμοί ενσωματώνονται και ακινητοποιούνται. Το ποσοστό των EPS στα βιοφίλμ κυμαίνεται στα 50-90% της συνολικής οργανικής ύλης. Αξίζει να σημειωθεί ότι η παραγωγή τους είναι μια άμεση απάντηση στις επιλεκτικές περιβαλλοντικές πιέσεις, συμπεριλαμβανομένων ωσμωτικής πίεσης, θερμοκρασίας, pH, πίεσης, και ακτινοβολίας. Σε περιπτώσεις όπως στα οξεόφιλα ή θερμόφιλα είδη και τα Αρχαία, τα EPS τους μπορούν να προσαρμοστούν στις ακραίες αυτές συνθήκες καθώς διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη μικροβιακή προσαρμογή, δημιουργώντας ένα περιβάλλον που επιτρέπει τη διατήρησή τους. Για παράδειγμα, σε περίπτωση αποξήρανσης διατηρούν ένα ενυδατωμένο μικρό-περιβάλλον

γύρω από το βιοφίλμ και αυτό οδηγεί στην επιβίωση του κυττάρου. Επίσης, η δημιουργία βιοφίλμ μειώνει την ευαισθησία του κυττάρου ως προς την τοξικότητα από εξωτερικούς παράγοντες. Η αρχιτεκτονική του βιοφίλμ επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων υδροδυναμικές συνθήκες, συγκέντρωση των θρεπτικών ουσιών, τη βακτηριακή κινητικότητα και μεσοκυττάρια επικοινωνία, καθώς και τους πολυσακχαρίτες και τις πρωτεΐνες. Αυτό αποδεικνύεται από την αλλαγμένη μορφολογία του βιοφίλμ που παράγεται από μεταλλαγμένα συστατικά που στερούνται των EPS.

Τα EPS μπορούν να ταξινομηθούν στα διαλυτά EPS (soluble EPS) και στα δεσμευμένα EPS (bound EPS). Τα διαλυτά EPS αποτελούν το ίδιο συστατικό με τα διαλυτά μικροβιακά προϊόντα (Soluble Microbial Products - SMP). Τα SMP είναι διαλυτές οργανικές ενώσεις που απελευθερώνονται στο διάλυμα κατά την κυτταρική λύση (αποσύνθεση της βιομάζας), εκκρίνονται κατά τη διάρκεια του μεταβολισμού του υποστρώματος (ανάπτυξη βιομάζας) και χάνονται κατά τη διάρκεια της σύνθεσης. Από την άλλη πλευρά, τα δεσμευμένα EPS αποτελούνται από μια δυναμική δομή διπλής στρώσης, η οποία υποδιαιρείται στα χαλαρά δεσμευμένα EPS (Loosely Bound EPS-LB-EPS) και στα συνεκτικά δεσμευμένα EPS (Tightly Bound EPS-TB-EPS). Η υποδιαίρεση αυτή εξαρτάται από τη δύναμη της οριοθέτησης μεταξύ των EPS και των κυττάρων. Η συγκεκριμένη ποικιλία EPS συνήθως διαχωρίζεται με φυγοκέντρηση. Έτσι αυτά που είναι χαλαρά συνδεδεμένα απελευθερώνονται στο υπερκείμενο υγρό (LB-EPS) και τα υπόλοιπα παραμένουν στο κύτταρο (TB-EPS).



Εικόνα 1: Απεικόνιση TB-EPS και LB-EPS

1.1.2 Βιοσύνθεση EPS

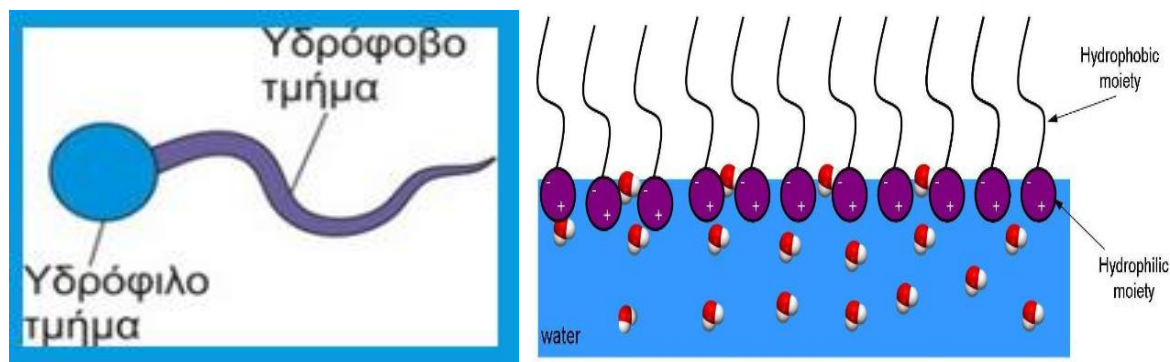
Οι εξωπολυσακχαρίτες συντίθενται ενδοκυτταρικά και εξάγονται στο εξωκυτταρικό περιβάλλον, ως μακρομόρια. Υπάρχουν, όμως, μερικές γνωστές εξαιρέσεις (π.χ. λεβάνες και δεξτράνες) των οποίων η σύνθεση και ο πολυμερισμός γίνεται έξω από τα κύτταρα όπου με τη δράση των ενζύμων μετατρέπονται το υπόστρωμα σε πολυμερές και το εκκρίνουν στο εξωκυτταρικό περιβάλλον. Συγκεκριμένα, η βιοσύνθεση, περιλαμβάνει το υπόστρωμα που προσλαμβάνεται, την κεντρική οδό του μεταβολίτη και τη σύνθεση πολυσακχαρίτη. Ανάλογα με τον τύπο του υποστρώματος, μπορεί να προσλαμβάνεται από το κύτταρο είτε μέσω ενός παθητικού ή ενός ενεργού συστήματος μεταφοράς, στη συνέχεια καταβολίζεται με ενδοκυτταρική φωσφορυλίωση, ή μπορεί να μεταφερθεί και να οξειδωθεί απευθείας στη περιπλασματική οδό. Η περιπλασματική οξειδωτική οδός υπάρχει μόνο σε ορισμένα βακτήρια, ενώ η ενδοκυτταρική φωσφορυλίωση είναι παρούσα μεταξύ όλων βακτηρίων. Τα συστήματα αυτά έχει αναφερθεί ότι μπορούν να λειτουργούν και να παράγουν ταυτόχρονα, εφόσον υπάρχει όμως διαθέσιμο υπόστρωμα σε αρκετά στελέχη EPS. Στο κυτταρόπλασμα, το υπόστρωμα καταβολίζεται μέσω γλυκόλυσης και οι κύριοι μεταβολίτες που σχηματίζονται χρησιμοποιούνται ως πρόδρομες ουσίες στη σύνθεση των μικρών βιομορίων π.χ. αμινοξέα ή μονοσακχαρίτες. Πέρα όμως από αυτό, η έκκριση του EPS είναι μια δύσκολη διαδικασία για το βακτήριο. Για παράδειγμα, στα υδρόφιλα με υψηλό μοριακό βάρος τα πολυμερή που συναρμολογούνται στο κυτταρόπλασμα πρέπει να διασχίσουν το κύτταρο. Την παραγωγή και βιοσύνθεση των EPS επηρεάζουν διάφοροι παράγοντες όπως φαίνεται και παρακάτω:

- Βακτηριακό Στέλεχος
- Βιομέσο ανάπτυξης
- Πηγή άνθρακα
- Πηγή αζώτου
- Θρεπτικά συστατικά (φωσφορικά, βιταμίνες, ιχνοστοιχεία)
- pH
- Θερμοκρασία
- Αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες
- Αμιγές και μικτές καλλιέργειες

1.1.3 Γαλακτωματοποιητές και Κροκιδωτικά

1.1.3.1 Γαλακτωματοποιητές

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως οι εξωκυτταρικές πολυμερείς ουσίες παράγουν επιφανειοδραστικές ουσίες ή αλλιώς γαλακτωματοποιητές (bioemulsifier) οι οποίοι παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον ως προς την εφαρμογή τους κυρίως όσον αφορά τους υδρογονάνθρακες. Είναι αμφίφιλες ενώσεις που περιέχουν ένα υδρόφιλο (κεφαλή) και ένα υδρόφοβο (ουρά) τμήμα και ως εκ τούτου είναι σε θέση να εμφανίζουν μια ποικιλία δραστηριοτήτων στην επιφάνεια τους που επιτρέπουν την διαλυτοποίηση των υδρόφοβων υποστρωμάτων. Το υδρόφοβο τμήμα (μη πολικό) του υποστρώματος συνήθως αποτελείται από αλυσίδες υδρογονανθράκων ή από αρωματικούς δακτύλιους, ενώ το υδρόφιλο τμήμα (πολικό) μπορεί να αποτελείται από διάφορες ομάδες όπως υδροξύλεια, καρβοξύλεια, αμινομάδες, υδρογονάνθρακες κ.α (Εικόνα 2). Έτσι προκύπτει ένα μόριο που παρουσιάζει μια μοναδική συμπεριφορά όπου το ένα τμήμα διαλύεται στο νερό και το άλλο στο λάδι. Ο πλήρης διαχωρισμός των δύο φάσεων και η αδυναμία διασποράς της μιας φάσης στην άλλη είναι συνέπεια της επιφανειακής τους τάσης καθώς τα δύο υγρά δέχονται δυνάμεις μόνο προς το εσωτερικό της μάζας τους με αποτέλεσμα να δημιουργούν ένα είδος υμένα στην επιφάνειά του. Με την παρουσία όμως των γαλακτωματοποιητών επιταχύνουν την ανάμειξη και την διασπορά του ενός υγρού στο άλλο. Δηλαδή, παρεμβαίνουν με ισχυρές δυνάμεις μειώνοντας τις απωθητικές δυνάμεις που ασκούνται μεταξύ δύο ανόμοιων φάσεων, με αποτέλεσμα να μειώνεται η επιφανειακή τάση, αναμειγνύονται και αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, δημιουργώντας έτσι ένα γαλάκτωμα.



Εικόνα 2: Δομή εξωπολυσακχαριτών

Η βιοαποικοδόμηση είναι ένας από τους πρωταρχικούς μηχανισμούς για την ανάκτηση του πετρελαίου και άλλων υδρογονανθράκων από το περιβάλλον. Θεωρείται μια περιβαλλοντικά αποδεκτή μέθοδος για την ανάκτηση και την διάσπαση του πετρελαίου. Οι υδρογονάνθρακες πετρελαίου προσδένονται σε συστατικά του εδάφους ή του νερού (πετρελαιοκυλίδα) και είναι δύσκολο να αφαιρεθούν με αποτέλεσμα την υποβάθμισή του οικοσυστήματος. Οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες μπορούν να γαλακτωματοποιήσουν τους υδρογονάνθρακες αυτούς και να ενισχύσουν τη διαλυτότητα τους στο νερό. Άρα, λοιπόν, η ενσωμάτωση των γαλακτωματοποιητών σε μια θεραπεία βιολογικής αποκατάστασης ενός υδρογονάνθρακα σε μολυσμένο περιβάλλον θα μπορούσε να είναι πραγματικά επωφελής. Υπάρχουν οι συνθετικές επιφανειοδραστικές ουσίες που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία εδώ και πολλά χρόνια καθώς έχουν ένα τεράστιο αριθμό εφαρμογών που αφορά τους bioemulsifiers που χαρακτηρίζονται από μια βελτιωμένη λειτουργικότητα και σταθερότητα, η οποία διευρύνει το φάσμα των πιθανών εφαρμογών, οι οποίες περιλαμβάνουν: τις βιομηχανίες πετρελαίου και πετρελαιοειδών, νερό και βιοαπόκατάσταση εδαφών, την επεξεργασία μετάλλων, απορρυπαντικά και προμήθειες πλυντηρίων, γεωργία, κλωστοϋφαντουργία, επεξεργασία πολτού και χαρτιού, βαφές, καλλυντικά, φαρμακευτικά προϊόντα, προϊόντα προσωπικής φροντίδας και της μεταποίησης τροφίμων. Εκτός όμως από τις συνθετικά συντιθέμενες είναι και αυτές μικροβιακής προέλευσης γνωστές ως βιοεπιφανειοδραστικές. Αυτές οι ενώσεις είναι καλοί υποψήφιοι για εφαρμογή σε διεργασίες και μπορούν να αντικαταστήσουν αποτελεσματικά συνθετικά τασιενεργά λόγω της ειδικής τους δραστηριότητας όπως είναι χαμηλή τοξικότητα, υψηλή βιοαποικοδομησιμότητα και η αποτελεσματικότητα σε ακραίες συνθήκες θερμοκρασίας, πίεσης, pH και αλατότητας. Παραδείγματα γένους μικροοργανισμών που παράγουν τέτοιου είδους ουσίες είναι ο *enterobacter sp.* και *rhodococcus*. Λόγω των μοναδικών ιδιοτήτων τους οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες έχουν λάβει εκτεταμένη προσοχή καθώς είναι μη τοξικές και έχουν όλα τα πλεονεκτήματα των χημικά παραγόμενων επιφανειοδραστικών. Επιπλέον, ορισμένες βιοεπιφανειοδραστικές έχουν δείξει να είναι πιο αποτελεσματικές αφού παρουσιάζουν ειδικές επιφανειοδραστικές ιδιότητες από πολλές συμβατικές συνθετικές, παρέχοντας νέες δυνατότητες για βιομηχανικές εφαρμογές. Για αυτούς τους λόγους έχουν σημαντικές εφαρμογές στον τομέα της προστασίας του περιβάλλοντος, στην παρασκευή φαρμάκων και καλλυντικών, στη βιομηχανία πετρελαίου, σε βιολογικά φυτοφάρμακα, στον τομέα της γεωργίας και των τροφίμων. Ως εκ τούτου, οι bioemulsifiers μπορούν να

ανακτηθούν με απλές και ανέξοδες τεχνικές που πιθανόν να έχουν μια πιο ανταγωνιστική τιμή.

1.1.3.2 Βιο-Κροκιδωτικά

Εδώ και αρκετές δεκαετίες χρησιμοποιούνται συσσωματωτικά από οργανικά πολυμερή για να βοηθήσουν τη διαδικασία της κροκίδωσης (flocs). Ο παράγοντας που λέγεται κροκίδωση ορίζεται ως η αποσταθεροποίηση των κολλοειδών σωματιδίων με τη χρήση χημικών μέσων. Είναι χρήσιμη στην προαγωγή της κυτταρικής συσσωμάτωσης κολλοειδούς, για αυτό χρησιμοποιείται ευρέως σε βιομηχανικές εφαρμογές, όπως λυμάτων επεξεργασία πόσιμου νερού και τροφίμων. Συσσωμάτωση είναι η συνένωση των αποσταθεροποιημένων κολλοειδών με στόχο τη δημιουργία μεγαλύτερων σωματιδίων ούτως ώστε να μπορούν να καθιζάνουν. Τα τελευταία χρόνια έχουν αρχίσει να χρησιμοποιούνται ολοένα και περισσότερο συσσωματωτικά από φυσικά πολυμερή ή αλλιώς βιολογικά πολυμερή, λόγω του ότι είναι φιλικά προς το περιβάλλον, υπάρχουν σε αφθονία στη φύση, είναι οικονομικά και μη τοξικά. Η βιοαποικοδομησιμότητα και η ασφάλεια του πολυμερούς αποτελεί αντιπροσωπευτικό πλεονεκτήματα έναντι των συνθετικών κροκιδωτικών, τα οποία είναι επικίνδυνα για την ανθρώπινη υγεία και των οποίων η αποικοδόμηση στο περιβάλλον είναι δύσκολη. Επομένως, έτσι και τα EPS λόγω των ειδικών ιδιοτήτων τους (ικανότητα προσρόφησης, υδροφοβικότητα/υδροφιλικότητα), μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην επεξεργασία των λυμάτων αφού διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην κροκίδωση της ίλυος, και τη διευθέτηση της αφυδάτωσης. Τα EPS προωθούν το σχηματισμό των κροκιδωτικών τροποποιώντας τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μικροβιακών αδρανών υλικών, νηματοειδή βακτηριακών στελεχών, και οργανικών και ανόργανων σωματιδίων, με βασική λειτουργία να συγκρατούν τα κύτταρα μαζί. (Satpute et al. 2010)

1.1.4 EPS και Εφαρμογές

Οι εξωπολυσακχαρίτες και η παραγωγή τους είναι ένας τομέας που απασχολεί τους ερευνητές σε πολύ μεγάλο βαθμό τα τελευταία χρόνια. Λόγω της σημαντικότητας της σύστασής τους και ο τρόπος που παράγονται έχουν εφαρμοστεί σε πολλές βιομηχανίες όπως είναι οι βιομηχανίες καλλυντικών, οι φαρμακευτικές βιομηχανίες, τροφίμων, επεξεργασία υγρών αποβλήτων ακόμα και στη βιοαποικοδόμηση του πετρελαίου. Υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον από τους ερευνητές για τον εντοπισμό και την απομόνωση νέων μικροβιακών

πολυσακχαριτών που μπορεί να ανταγωνιστούν με τα παραδοσιακά, λόγω των ενισχυμένων φυσικοχημικών τους ιδιοτήτων, την δραστηριότητά τους ως προς τη γαλακτωματοποίηση και κροκιδωση, την αντοχή τους σε οργανικούς διαλύτες, τη βιολογική δραστηριότητα (π.χ. αντικαρκινικά ή ανοσολογικά αποτελέσματα) και τις ρεολογικές τους ιδιότητες (π.χ. υψηλότερο ιξώδες) για χαμηλότερες συγκεντρώσεις πολυμερούς, μεγαλύτερη σταθερότητα σε ευρύτερες τιμές pH, θερμοκρασίες και ιοντική ισχύ. Τα EPS που εφαρμόζονται βιομηχανικά είναι αυτά που παράγονται κυρίως από φυτά, άγλη και ζωικές πηγές καθώς μόνο μερικά από τον τεράστιο αριθμό των νέων βακτηριακών EPS αναφέρεται ότι έχουν αναδειχθεί βιομηχανικά.

Μικροβιακά EPS έχουν κερδίσει πρωτεύοντα ρόλο στη βιομηχανία τροφίμων αφού χρησιμοποιούνται για την αύξηση του ιξώδους, θεωρείται επίσης παράγοντας πήξης, σταθεροποιητές, ή συμβάλλουν στην ποιότητα των τροφίμων ως λιπαντικά, κροκιδωτικά, ή ενισχυτικά γεύσης. Το gellan EPS για παράδειγμα χρησιμοποιείται ως πηκτικό χωρίς τη συμμετοχή ιόντων. Τα EPS dextran και pullulan χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα για την παρασκευή των σπάνιων σακχάρων ή εξειδικευμένων πολυσακχαριτών. Επιπλέον το Xanthan gum είναι συμβατό με πολλά άλλα συστατικά στα τρόφιμα και δίνει καλή απελευθέρωση στη γεύση, βελτιώνει την ποιότητα, αυξάνει τη σταθερότητα, βοηθά επίσης να αναστείλει στερεά σωματίδια, όπως τα μπαχαρικά. Είναι επίσης μια προτιμώμενη μέθοδος πύκνωσης υγρών για άτομα με διαταραχές στην κατάποση, διότι δεν αλλάζει το χρώμα ή τη γεύση στα τρόφιμα.

Ακόμη, διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη γεωργία. Μικροοργανισμοί που κατοικούν στη ριζόσφαιρα και ρίζες των φυτών απελευθερώνουν EPS στο έδαφος που εμπλέκονται στο σχηματισμό και τη σταθερότητα του εδάφους, τη ρύθμιση θρεπτικών, της ροής του νερού και της προστασίας των ριζών από τη παθογένεση. Λόγω των περιβαλλοντικών ανησυχιών και της συνεχής εξερεύνησης παραγωγής EPS από μικροοργανισμούς, σήμερα χρησιμοποιούνται εμβόλια, σπρέι και φυτοφάρμακα που περιέχουν εξωπολυσακχαρίτες (Xanthan Gum) για τη βελτίωση της γονιμότητας του εδάφους. Η παραγωγή επιφανειδραστικών ουσιών από εξωπολυσακχαρίτες χρησιμοποιούνται για την βιοαποικοδόμηση και απομάκρυνση της βενζίνης από μολυσμένα εδάφη. Μια άλλη εφαρμογή είναι η παραγωγή κροκιδωτικών από EPS που συμβάλλουν σε διεργασίες επεξεργασίας αστικών και υγρών αποβλήτων. Παρόλα αυτά όμως τα κροκιδωτικά έχουν αποδειχθεί ότι είναι τοξικά και επικίνδυνα για την ανθρώπινη υγεία, έτσι η μικροβιακή παραγωγή EPS θα μπορούσε να χρησιμεύσει ως ασφαλή εναλλακτική λύση κροκιδωτικών,

παράδειγμα *Virgibacillus sp.*

Στη βιβλιογραφία αναφέρεται επίσης ότι τα συστατικά των EPS παρουσιάζουν μεγαλύτερο δυναμικό σε εξειδικευμένα τμήματα αγοράς όπως αυτά της βιομηχανίας καλλυντικών, φαρμακευτικών προϊόντων και της βιοιατρικής λόγω των μοναδικών επιθυμητών φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους αλλά και της υψηλής καθαρότητας που παρουσιάζουν, μικροβιακοί πολυσακχαρίτες χρησιμοποιούνται σήμερα σε καλλυντικά σκευάσματα. Το xanthan gum χρησιμοποιείται σχεδόν σε κάθε είδος καλλυντικών συστατικών, χρησιμεύει ως σταθεροποιητής, επίσης χρησιμοποιείται στις οδοντόκρεμες, διευκολύνοντας την αναστολή των συστατικών (υψηλού ιξώδους) και το εύκολο βούρτσισμα προς και από τα δόντια (αραιώση υψηλή διάτμηση).

Το Xanthan gum είναι αναμφισβήτητα ο σημαντικότερος εξωπολυσακχαρίτης στη βιομηχανία. Είναι ιδιαίτερα χρήσιμος ως παράγοντας πάχυνσης στην ανάκτηση του αργού πετρελαίου σε λάδια έτσι μπορεί να αντικαταστήσει πετροχημικά και άλλα μη βιοδιασπώμενα συστατικά. Αυτό οφείλεται στη ιδιότητα των EPS να παράγει επιφανειοδραστικές ουσίες οι οποίες έχουν την ιδιότητα να μειώνει την κινητικότητα του νερού και έτσι να γίνεται ευκολότερη η ανάκτηση του πετρελαίου. Λόγω των ιδιοτήτων τους μειώνουν την επιφάνεια και την διεπιφανειακή τάση και σχηματίζουν σταθερά γαλακτώματα όπου οι υδρογονάνθρακες μπορούν να διαλυτοποιούνται στο νερό και το νερό σε υδρογονάνθρακες. (Kambourova et al. 2015)

Όσον αφορά τη διαδικασία της ζύμωσης για τη παραγωγή EPS για να είναι πιο αποδοτική, είναι απαραίτητη η βελτιστοποίηση της ζύμωσης ως προς τις συνθήκες (π.χ. pH, θερμοκρασία, συγκέντρωση πηγής άνθρακα). Αυτό όμως που αποτελεί το κυριότερο εμπόδιο εφαρμογής τους, καθώς έχει υψηλό κόστος παραγωγής λόγω του ακριβού υποστρώματος που απαιτείται και τις συνθήκες ανάπτυξης και καθαρισμού τους. Συγκεκριμένα η διαδικασία της ζύμωσης αποτελεί το ένα τρίτο του κόστους παραγωγής των EPS και ο λόγος είναι η πηγή άνθρακα, ανεξάρτητα από το αν η παραγωγή είναι σε μικρό εργαστήριο ή μεγάλη βιομηχανική κλίμακα. Από την άλλη πλευρά, οι πρόσφατες προσπάθειες αφιερώνονται στη διατήρησή τόσο της ποιότητας των προϊόντων όσο και της απόδοσης με τη χρήση οικονομικά αποδοτικών και φιλικών προς το περιβάλλον διαδικασιών παραγωγής που χρησιμοποιούν φθηνότερα υποστρώματα ζύμωσης. Η χρησιμοποίηση πολύπλοκων πρώτων υλών απαιτεί εντατικές ερευνητικές δραστηριότητες για την ανάπτυξη διεργασιών όπως αυτή της προεπεξεργασίας, της ζύμωσης και άλλες τεχνικές επεξεργασίας. Τα τελευταία χρόνια, έχει υπάρξει ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον για τον εντοπισμό και την απομόνωση νέων

μικροβιακών πολυσακχαριτών που μπορεί να ανταγωνιστούν με τα παραδοσιακά, λόγω των ενισχυμένων φυσικοχημικών τους ιδιοτήτων, την δραστηριότητά τους ως προς τη γαλακτωματοποίηση κροκίδωση, την αντοχή τους σε οργανικούς διαλύτες, στη βιολογική δραστικότητα (π.χ. αντικαρκινικά ή ανοσολογικά αποτελέσματα) και τις ρεολογικές τους ιδιότητες (π.χ. υψηλότερο ιξώδες για χαμηλότερες συγκεντρώσεις πολυμερούς, μεγαλύτερη σταθερότητα σε ευρύτερες pH, θερμοκρασίες και ιοντική ισχύ). Στον πίνακα 1 και πίνακα 2 καταγράφονται μερικά βιομηχανικά EPS και η χρήση τους.

EPS	Main food area of application
Xanthan	Confectionary Salad dressing Jam, sauces Frozen food industry Syrups and toppings Cottage cheese Fruit milk drinks Yogurt creaming emulsions Poultry nonmeat ingredients Spices
Gellan	Icings and glazes Beverages Fruit pieces or meat chunks, including pet food fruit and milk Confectionery and bakery products Low solid and reduced-calorie jams Pie fillings and puddings Preserve flavor release characteristics of sauces Provide a structure and improve cheese yield
Dextran	Confectionary Pudding mixes Gum and jelly candies Ice cream
Pullulan	Snack foods in Japan Packaging of ham Breath freshener
Alginate	Ice creams Dessert creams, frozen foods Jam, sauces Beer, dough Dairy, processed cheese Bakery
Cellulose	Dietary fiber Thickening agent Food matrix
Levan	Prebiotic food Food or feed additive
Curdlan	Texture and stability of foods Low-calorie foods Carrying agent for flavor compound

Πίνακας 1: Εφαρμογές EPS στη βιομηχανία τροφίμων

EPS	Functional relevance
Xanthan	Low shear Dermal irritation and sensitization Hydrophilic matrix Stabilizer, thickener, and emulsifying agent
Gellan	High clarity Dispersibility Biocompatibility
Dextran	Low solubility in water Antigenic properties
Bacterial cellulose	Mechanical strength High porosity
Hyaluronic acid	Viscoseparation
Alginate	Immobilizing insulin-producing cells Surgical dressings Wound management Controlled drug release
Levan	Anti-AIDS agents Coating material in a drug delivery formulation
Pullulan	Capsules for dietary supplements

Πίνακας 2: Εφαρμογές EPS στη βιομηχανία καλλυντικών και φαρμάκων

1.2 Ομάδα βακτηρίων που παράγει EPS

Τα βακτήρια είναι μονοκύτταροι οργανισμοί και σπανιότερα πολυκύτταροι, προκαρυωτικοί οργανισμοί, οι οποίοι εμφανίζονται κυρίως σε βιότοπους σε τεράστιους αριθμούς. Πολλοί μικροοργανισμοί, πολλά είδη Gram-θετικών και Gram-αρνητικών βακτηρίων, Αρχαία, μύκητες και μερικά αλγη είναι γνωστό ότι παράγουν

εξωπολυσακχαρίτες. Αρκετά θετικά και αρνητικά κατά gram βακτήρια όπως *Bacillus*, *Halomonas*, *Enterobacter*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, και *Cyanobacteria* είναι γνωστό ότι παράγουν EPS.

→**Enterobacter**: Είναι αρνητικά κατά gram και προαιρετικά αναερόβια βακτήρια ευρέως διαδεδομένα στη φύση και ανήκουν στην οικογένεια *Enterobacteriaceae*. *Enterobacter* μπορεί να απομονωθεί κυρίως από θαλάσσια ιζήματα που συλλέγονται από ακτές, παράγουν EPS και emulsifies διάφορα αδιάλυτα στο νερό υποστρώματα. Επίσης βρίσκονται στα υγρά απόβλητα, στις αποχετεύσεις, στο έδαφος, στα φυτά, στους ανθρώπους και τα ζώα. Για παράδειγμα ο *Enterobacter cloacae* είναι το πιο συνηθέστερο απομονωμένο είδος *Enterobacter* από τους ανθρώπους και τα ζώα, αφού βρίσκεται σε ανθρώπινα και ζωικά περιττώματα. Αρκετά είδη έχουν απομονωθεί από τα ούρα, τις αναπνευστικές οδούς, και περιστασιακά από το αίμα ή νωτιαίο υγρό. Αρκετά είδη και συγκεκριμένα τα *E.cloacae*, *E.sakazakii*, *E.aerogenes*, *E.agglomerans* και *E.ferrogoviae*, είναι ευκαιριακά παθογόνα των ζώων και των ανθρώπων δεν θεωρούνται όμως εντερικά παθογόνα.

Στο περιβάλλον αναπτύσσονται και μεταβολίζουν μέχρι τους 20-30°C, και μερικά στους 37°C, επιπρόσθετα πολλά είδη της οικογένειας *Enterobacteriaceae* επιβιώνουν εύκολα στη φύση απαιτώντας μόνο νερό και ένα ελάχιστο πηγή ενέργειας

→**Rhodococcus**: *Rhodococcus* είναι αερόβια μη κινητικά θετικά κατά gram βακτήρια και σχετίζονται στενά με *Mycobacterium* και *Corynebacterium*. Ενώ μερικά είδη είναι παθογόνα, τα περισσότερα όμως είναι καλοήθη και έχουν βρεθεί να αναπτύσσονται σε ένα ευρύ φάσμα περιβάλλοντος, όπως το έδαφος και το νερό. Τα στελέχη του *Rhodococcus* είναι σημαντικά λόγω της ικανότητάς τους να καταβολίζουν ένα μεγάλο αριθμό ενώσεων και παράγουν βιοδραστικά στεροειδή, ακρυλαμίδια, και ακρυλικό οξύ, επίσης συμμετέχουν στην αποθείωση των ορυκτών καυσίμων. Μια άλλη σημαντική εφαρμογή των *Rhodococcus* είναι η ικανότητά του να μεταβολίζουν επιβλαβείς περιβαλλοντικούς ρύπους, συμπεριλαμβανομένων τολουόλιο, ναφθαλίνης και ζιζανιοκτόνα. Αυτό το στέλεχος παράγει μια μεγάλη ποσότητα του εξωκυτταρικού πολυσακχαρίτη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανοχή τοξικών ουσιών όπως είναι το βενζόλιο βοηθώντας έτσι τα κύτταρα να επιβιώσουν. Ένα νέο στέλεχος, το *Rhodococcus ruber* απομονώνεται από δείγματα εδάφους που χρησιμοποιούν ακρυλονιτριλίου ως μοναδική πηγή αζώτου τους.

→**Pseudomonas**: είναι ένα γένος gram αρνητικών βακτηρίων, αερόβιο και ανήκει στην οικογένεια *Pseudomonadaceae*. Τα μέλη του γένους αυτού επιδεικνύουν μεγάλη

μεταβολική ποικιλομορφίας. Κατά συνέπεια είναι σε θέση να αποικίσουν κάτι που απασχολεί και συνεχίζει να απασχολεί την επιστημονική έρευνα. Τα καλύτερα μελετημένα είδη είναι *P. aeruginosa*, *P. Syringae* και τα βακτήρια του εδάφους *P.putida*, και το *P. Flurecenses*. Το γένος αυτό έχει εφαρμοστεί βιομηχανικά για την παραγωγή EPS και κυρίως του levan που χρησιμοποιείται στη βιομηχανία τροφίμων.

Το *Pseudomonas aeruginosa* είναι ένα κοινό αρνητικό κατά gram ραβδόμορφο βακτήριο που μπορεί να προκαλέσει ασθένεια σε φυτά και ζώα, συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπων αφού είναι κυρίως παθογόνο. Βρίσκεται στο έδαφος, στο νερό, στη χλωρίδα του δέρματος, και σε τεχνητά περιβάλλοντα σε όλο τον κόσμο. Αναπτύσσεται όχι μόνο σε κανονικές ατμόσφαιρες, αλλά και υπό ανοξικές συνθήκες, έτσι έχει αποικίσει σε πολλά φυσικά και τεχνητά περιβάλλοντα. Χρησιμοποιεί επίσης σε ένα ευρύ φάσμα βιολογικών υλικών για τα τρόφιμα και ζώα.

1.3 ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ

1.3.1 Υπόστρωμα Καλλιέργειας-Ενεργοποίησης

Μικροβιολογικό Θρεπτικό υπόστρωμα ορίζεται ως το κάθε υγρό ή στερεό μέσω του οποίου καλύπτονται οι θρεπτικές ανάγκες ενός μικροβιακού κυττάρου. Καλείται υπόστρωμα καλλιέργειας και χρησιμοποιείται ώστε να επιτευχθεί η ανάπτυξη των μικροοργανισμών στο εργαστήριο. Ο τύπος του υποστρώματος έχει μια ουσιαστική επίδραση στις μικροβιακές κοινότητες στην ιλύ, και το μικροβιακό μεταβολισμό, επηρεάζοντας έτσι την παραγωγή των EPS. Το υπόστρωμα αποτελείται κυρίως από πηγή άνθρακα (σάκχαρα), πηγή αζώτου και αναφέρεται σε αμμωνιακά άλατα και οργανική ύλη, Βιταμίνες ως δομικά συστατικά διαφόρων ενζύμων, ιχνοστοιχεία: Fe, Cu, Mn, Zn, Co, και φυσικά σε ανόργανα άλατα π.χ. νατρίου, καλίου, ασβεστίου, μαγνησίου και φωσφορικά άλατα. Τα υποστρώματα κατηγοριοποιούνται σε υγρά και στερεά όπου η διαφορά τους είναι στο άγαρ που λειτουργεί ως πηκτικός παράγοντας και χρησιμοποιείται στη δημιουργία στερεής καλλιέργειας μικροοργανισμών σε τριβλύα. Το άγαρ είναι ουδέτερο συστατικό και δεν επιδρά στη φυσιολογία του μικροοργανισμού, δεν υδρολύεται από τους μικροοργανισμούς, χρησιμοποιείται σε περιεκτικότητα 1,2-1,5%, μεγαλύτερη από αυτή που παρεμποδίζει την ανάπτυξη λόγω μείωσης της τιμής της ενεργότητας ύδατος.

Τα υποστρώματα καλλιέργειας χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, α) χημικά ορισμένο θρεπτικό υπόστρωμα του οποίου η σύστασή του είναι γνωστή και β) τα σύνθετα θρεπτικά

υποστρώματα των οποίων η σύστασή τους είναι άγνωστη και συνήθως καλύπτουν τις ανάγκες και θρεπτικές απαιτήσεις πολλών διάφορων μικροοργανισμών. Στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε χημικά ορισμένο υπόστρωμα καλλιέργειας με pH 7-8 με σκοπό την ενεργοποίηση των μικροοργανισμών.

Για τον πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη των μικροοργανισμών απαιτείται το κατάλληλο θρεπτικό υλικό. Μετά την επώαση οι μικροοργανισμοί απαιτούν το κατάλληλο υπόστρωμα για να φανεί κατά πόσο παράγονται εξωπολυσακχαρίτες, κάτι το οποίο είναι και σκοπός της παρούσας εργασίας. Αν και η σύνθεση και η ποσότητα του πολυσακχαρίτη που συντίθεται από ένα μικροοργανισμό είναι γενετικά καθορισμένη, χαρακτηριστικά όπως η κινητική απόδοση, καθώς και το μοριακό βάρος του πολυμερούς και η λεπτή δομή του επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από τον τύπο της πηγής του άνθρακα. Τα φυσικο-χημικά χαρακτηριστικά ενός δεδομένου πολυσακχαρίτη θα καθορίσουν τις λειτουργικές ιδιότητες (π.χ. πύκνωση, πηκτικό, σταθεροποιητικό, κροκιδωτικά και την ικανότητα σχηματισμού βιοφιλμ) και άρα στη δυνατότητα εφαρμογής τους σε διάφορους τομείς. Η ικανότητα ενός μικροβιακού παράγοντα να παράγει EPS χρησιμοποιώντας διαφορετικά σάκχαρα ανοίγει τη δυνατότητα διερεύνησης λιγνοκυτταρινούχων υλικών ως υποστρώματα, καθιστώντας το βιοδιεργασία περισσότερο ευέλικτη και συμβάλλοντας στη μείωση του κόστους παραγωγής. Μερικά υποστρώματα που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή εξωπολυσακχαριτών όπως αναφέρονται στην βιβλιογραφία είναι η γλυκόζη, φουκόζη, γλυκερόλη, γαλακτόζη, σουκρόζη κ.α. Έτσι όπως αναφέρθηκε και στο θεωρητικό μέρος μεγαλύτερο πρόβλημα στη παραγωγή των εξωπολυσακχαριτών και εφαρμογής τους είναι η χρήση φτηνού υποστρώματος δηλαδή πηγής άνθρακα, καθώς στη βιομηχανία το πρόβλημα που αντιμετωπίζουν είναι το κόστος τους.

Μέχρι τώρα ένα ευρύ φάσμα βιομηχανικών και γεωργικών παραπροϊόντων και αποβλήτων υλικών χρησιμοποιούνται ως θρεπτικά συστατικά για βιομηχανικές ζυμώσεις, έχουν γίνει διάφορες μελέτες ανάπτυξης μικροοργανισμών σε υποστρώματα-απόβλητα, ούτως ώστε να διερευνηθεί η ικανότητα παραγωγής εξωπολυσακχαριτών από μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται κάτω από τέτοιες συνθήκες. Μερικά παραδείγματα αποβλήτων που χρησιμοποιήθηκαν είναι η αερόβια ενεργός ιλύς η οποία προέρχεται από εργοστάσια επεξεργασίας αστικών λυμάτων (Liu & Fang 2002) είναι και το πιο δημοφιλέστερο υπόστρωμα-απόβλητο. Επίσης χρησιμοποιείται και η αναερόβια λάσπη, ένα άλλο απόβλητο είναι αυτό που προκύπτει από τα ελαιοτριβία (López et al. 2001) πολτού χαρτιού και απόβλητα οινοποιείου.(Sheng et al. 2010). Στη παρούσα μελέτη

χρησιμοποιήθηκαν απόβλητα βιομηχανιών όπως γλυκερόλης και το bilge waste water για την ανάπτυξη των καλλιεργειών και παραγωγής EPS.

1.3.1.1 Συνθήκες Εμβολιασμού

Απαραίτητη προϋπόθεση για την επιτυχία του πειράματος είναι η προστασία του μικροοργανισμού που μελετάται από τυχόν μολύνσεις καθώς και η ασφάλεια του ερευνητή. Για το σκοπό αυτό αρχικά απολυμαίνονται όλες οι επιφάνειες με αραιωμένη αιθανόλη (70% αιθανόλη, 30% H₂O). Ακολούθως, ο εμβολιασμός των μικροοργανισμών πραγματοποιείται σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής (Laminar flow cabinet), ώστε να αποφεύγονται οι μολύνσεις. Ένας εναλλακτικός τρόπος ασφαλούς εμβολιασμού της καλλιέργειας, είναι η χρήση του λύχνου, ο οποίος μπορεί να διατηρεί ασηπτικές συνθήκες καθώς η φλόγα βοηθά στην προφύλαξη της καλλιέργειας και όλων των εργαλείων που θα χρησιμοποιηθούν, δημιουργώντας έτσι αποστειρωμένο ένα περιβάλλον. Στη συνέχεια οι καλλιέργειες τοποθετούνται σε επωαστήρα κλίβανο σε ελεγχόμενες συνθήκες (θερμοκρασία 30°C και 100 στροφές το λεπτό) μέχρι να ολοκληρωθεί η επώαση.

1.3.1.2 ΓΛΥΚΟΖΗ

Η γλυκόζη είναι ένας απλός μονοσακχαρίτης, που παρά την απλότητα του αποτελεί το σημαντικότερο υδατάνθρακα στη βιολογία αφού τα κύτταρα τη χρησιμοποιούν ως πρωταρχική πηγή ενέργειας για τον οργανισμό καθώς χρησιμοποιείται ως καύσιμο για τη κυτταρική αναπνοή. Η γλυκόζη αποτελείται από 6 άνθρακες και 5 υδροξυλικές ομάδες. Όλες οι μορφές της γλυκόζης είναι άχρωμες και εύκολα διαλυτές στο νερό, στο οξικό οξύ, και σε διάφορα άλλα διαλυτικά αλλά είναι ελάχιστα διαλυτή σε μεθανόλη και αιθανόλη. Στα φυτά και σε ορισμένους προκαρυωτικούς μικροοργανισμούς είναι προϊόν φωτοσύνθεσης, επίσης παράγεται μέσω της ενζυματικής υδρόλυσης του αμύλου για αυτό και πολλές καλλιέργειες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγή αμύλου, όπως το καλαμπόκι, το ρύζι, το σιτάρι, ο φλοιός καλαμποκιού που χρησιμοποιούνται σε διάφορα μέρη του κόσμου. Πέρα όμως από αυτά η γλυκόζη λόγω της δομής και σύστασης, χρησιμοποιείται σε μεγάλο βαθμό στο τομέα της βιοτεχνολογίας ως υπόστρωμα ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Η γλυκόζη είναι απλό μονομερές και μονοσακχαρίτης από τους πιο διαδεδομένους στη χρήση του ως υπόστρωμα ανάπτυξης καλλιεργειών.

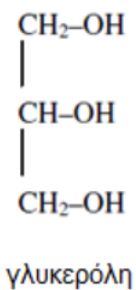
1.3.1.3 ΑΠΟΒΛΗΤΟ ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ

Η γλυκερόλη θεωρείται μία ανανεώσιμη πηγή άνθρακα. Αποτελεί την εμπειρική ονομασία της χημικής οργανικής ένωσης προπανο-1,2,3-τριόλη η οποία είναι τρισθενής αλκοόλη. Αυτή η ένωση διαθέτει στο μόριο της τρεις υδροξυλομάδες με αποτέλεσμα να την καθιστά υδατοδιαλυτή και υδρόφιλη ως προς τη φύση της. Η γλυκερόλη είναι ένα βιομηχανικό προϊόν με ένα εύρη φάσμα χρήσεων, αφού μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διαλύτης, πλαστικοποιητής, καθώς επίσης και ως πρώτη ύλη σε βιομηχανίες φαρμάκων, καλλυντικών βερνικιών σαπώνων, εκρηκτικών υλών. Επίσης είναι μη τοξική και βιοαπόικοδομήσιμη. Η παραγωγή της γλυκερόλης προκύπτει από μικροβιακές ζυμώσεις και συγκεκριμένα την αλκοολική με δημοφιλέστερη ζύμη να είναι ο *Saccharomyces cerevisiae* και να προκύπτει σχηματισμός δευτερογενών μεταβολικών προϊόντων. Πλέον όμως με τις χημικές και βιοτεχνολογικές μεθόδους μπορεί να χρησιμοποιηθεί απευθείας ως πρώτη ύλη για τη παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Κατά τη διαδικασία της μετεστερεοποίησης που πραγματοποιείται για τη παραγωγή βιοντόζελ, η γλυκερόλη παράγεται σε υψηλά ποσά η οποία είναι τρισθενής αλκοόλη, περιέχει τρεις υδροξυλομάδες και θεωρείται υδρόφιλη. Η γλυκερόλη είναι ένα βιομηχανικό προϊόν με πολλαπλές χρήσεις όπως α) πρώτη ύλη για την παραγωγή φαρμάκων, καλλυντικών βερνίκια, βαφές σαπούνια ακόμα και εκρηκτικές ύλες, β) διαλύτης για πλαστικοποίηση και γ) σπανιότερα ως υποκατάστατο της ζάχαρης για τους διαβητικούς. Η παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας με πρώτη ύλη τη γλυκερόλη επιτυγχάνεται κυρίως μέσω των μικροβιακών ζυμώσεων. Παράδειγμα τέτοιων προϊόντων που προκύπτουν από τέτοιες διεργασίες είναι η α) 1,3-προπανοδιόλη, β) το ηλεκτρικό οξύ, γ) η 2,3-βουτανοδιόλη, δ) το κιτρικό οξύ, ε) το οξικό οξύ και f) η αιθανόλη, τα περισσότερα από τα οποία αναλύονται παρακάτω καθώς και οι εφαρμογές τους .

Πέρα όμως από αυτά η γρήγορη ανάπτυξη της διεργασίας παραγωγής βιολογικού πετρελαίου την τελευταία δεκαετία πολλαπλασίασε παράλληλα τα αποθέματα γλυκερόλης και συγκεκριμένα της βιομηχανικής, πράγμα που συνείσφερε στη μείωση της τιμής της πώλησης της αλλά ταυτόχρονα προκάλεσε σοβαρές περιβαλλοντικές ανησυχίες. Ο λόγος είναι ότι η γλυκερόλη θεωρείτο απόβλητο και συνάμα περιείχε υπολείμματα όπως αλκοόλη, άλατα, βαρέα μέταλλα και λιπαρά οξέα με αποτέλεσμα να χρειάζεται περεταίρω επεξεργασία για τη μετέπειτα χρήση της. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω καθίσταται σαφές ότι η παραγωγή βιολογικών καυσίμων συγκεντρώνει μια σειρά από οφέλη, δίνοντας το έναυσμα για την αποδέσμευση του πλανήτη από τα κοιτάσματα του πετρελαίου και για το

περιβαλλοντικό πρόβλημα που αντιμετωπίζει, συμβάλλοντας έτσι στη στροφή προς τη παραγωγή βιοκαυσίμων με βιολογικές μεθόδους. Η παραγωγή βιοντίζελ είναι μια πρόσφατη και πολλά υποσχόμενη μέθοδος για την αντικατάσταση του πετρελαιο, με μοναδικό εμπόδιο τη παραγωγή του υποπροϊόντος της γλυκερόλης καθώς αντιμετωπίζεται πρόβλημα διαχείρισής της και επίσης θεωρείται τοξική για το περιβάλλον. Έχει μεγάλη αξία και θεωρείται ένας καλός υποψήφιος για την μείωση του κόστους παραγωγής προϊόντων.

Υπάρχουν μελέτες που αναφέρονται στη παραγωγή εξωπολυσακχαριτών από μικροβιακά κύτταρα όπου η γλυκερόλη χρησιμοποιούταν ως υπόστρωμα ανάπτυξης ως πηγή άνθρακα σε συγκεκριμένες συνθήκες. Στην παρούσα εργασία το απόβλητο της γλυκερόλης το οποίο πάρθηκε από βιομηχανία παραγωγής βιοντίζελ η οποία εγκαθίστανται στη Πάφο, χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα ανάπτυξης των καλλιεργειών και των EPS, λόγω της μεγάλης θρεπτικής του αξία.



Εικόνα 3: Χημικός τύπος γλυκερόλης

1.3.1.4 BILGE WASTE WATER

Ένα από τα περιβαλλοντικά προβλήματα που αντιμετωπίζει ο πλανήτης είναι η θαλάσσια ρύπανση, είτε από ατυχήματα με πετρελαιοφόρα, είτε από τις θαλάσσιες μεταφορές των αγαθών. Η ρύπανση από τις θαλάσσιες μεταφορές μπορεί να χωριστεί και σε δύο κατηγορίες. Η πρώτη αφορά τις διάφορες διαρροές, σε απορρίψεις αποβλήτων κατά την πλύση των δεξαμενών και η δεύτερη αφορά διάφορα ατυχήματα που μπορεί να προκληθούν από συγκρούσεις εκρήξεις και ζημιές. Τα ελαιώδη αυτά κατάλοιπα που δημιουργούνται κατά την κανονική λειτουργία του πλοίου θεωρούνται επικίνδυνα απόβλητα. Το απόβλητο αυτό μεταφέρεται σε αντιδραστήρες από μονάδες διαχείρισης αποβλήτων για πρωτοβάθμια, δευτεροβάθμια και τριτοβάθμια επεξεργασία.

Το bilge waste water αναφέρεται στις τυχαίες υπερχειλίσεις υγρού αποβλήτου από τα

πλοία στα ανοικτά των ωκεανών και στις παράκτιες περιοχές προκαλώντας σοβαρά περιβαλλοντικά προβλήματα με σοβαρές ανεπιθύμητες επιπτώσεις στο οικοσύστημα. Αποτελείται από μια φάση με θαλασσινό νερό και μια ελαιώδη φάση, η οποία περιέχει συνήθως ντίζελ και μαζούτ, υπολείμματα υδρογονανθράκων υγρά και άλλους ρύπους, όπως τα μέταλλα, απορρυπαντικά, διαλύτες, οι οποίοι προέρχονται από μία ποικιλία πηγών για παράδειγμα κινητήρες, σωληνώσεις και μηχανικές πηγές βρίσκονται στα μηχανήματα στο χώρο ενός πλοίου (Nievas et al. 2005) . Κύριο όμως συστατικό του bilge waste water είναι οι υδρογονάνθρακες και αυτό είναι βασικό στοιχείο όσον αφορά τον καθαρισμό του από διάφορες βιομηχανίες. Στη διαδικασία αυτή χρησιμοποιούνται μικροοργανισμοί και συνήθως αυτόχθονοι οι οποίοι αποδομούν τους υδρογονάνθρακες παράγοντας μια ποικιλία επιφανειοδραστικών ουσιών μειώνοντας έτσι τη διαλυτοτητά του και επίσης, οι επιφανειοδραστικές ουσίες έχει αποδειχθεί ότι ενισχύει τη μικροβιακή αποικοδόμηση των υδρογονανθράκων. Σε προηγούμενες πειραματικές μελέτες σχετικά με την επεξεργασία αποβλήτων bilge waste με αυτόχθονες μικροοργανισμούς παρατηρήθηκε έντονη μείωση του pH, μαζί με μία αύξηση της θολότητας και διασπορά της ελαιώδους φάσης. Οι αλλαγές αυτές οφείλονταν στην παραγωγή biosurfactants / bioemulsifier.

Για το λόγο αυτό, το bilge waste water χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη ως υπόστρωμα για ανάπτυξη μικροοργανισμών και τη παραγωγή EPS.

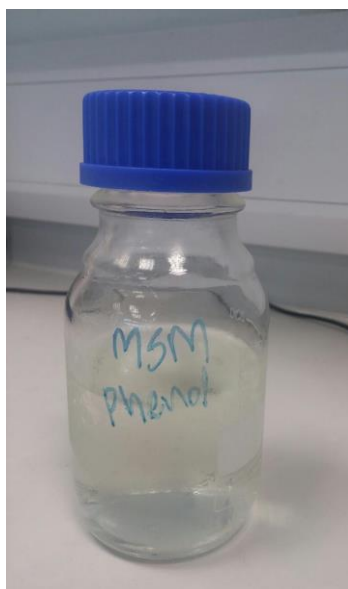
2 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

2.1 Ενεργοποίηση Μικροοργανισμών

Η παρασκευή των βιομέσων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του αναλυτικού ζυγού, με ακριβές ζύγιση της βάσης του θρεπτικού ζωμού, η οποία μετέπειτα τοποθετήθηκε σε γυάλινο δοχείο με την προσθήκη 500ml απιονισμένου νερού για κάθε καλλιέργεια η σύσταση του αναγράφεται στο πίνακα 3. Τα συστατικά του βιομέσου αναμείχθηκαν και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η αποστείρωση του στους 120°C στον αυτόκαυστο (εικόνα 5). Πριν από τον εμβολιασμό της καλλιέργειας η οποία πάρθηκε από τον θάλαμο όπου διατηρείτο στους -80°C σε γλυκερόλη, το pH του βιομέσου ρυθμίστηκε με την προσθήκη βάσης γύρω στο 7,5-8,5. Το βιομέσο συντηρήθηκε σε θερμοκρασία 4°C (εικόνα 4). Τέλος πραγματοποιήθηκε η ενεργοποίησή τους, μεταφέρθηκε, δηλαδή, περίπου 15ml βιομέσου και η καλλιέργεια, σε falcon tubes τον 20ml.

K_2HPO_4	0,2g/L
NH_4Cl	0.5g/L
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2g/L
KH_2PO_4	0.5g/L
NaCl	10-15g/L
$CaCl_2$	0.002g/L
Φαινόλη	0,5g/L
Yeast	0.5g/l

Πίνακας 3: σύσταση βιομέσου ενεργοποίησης



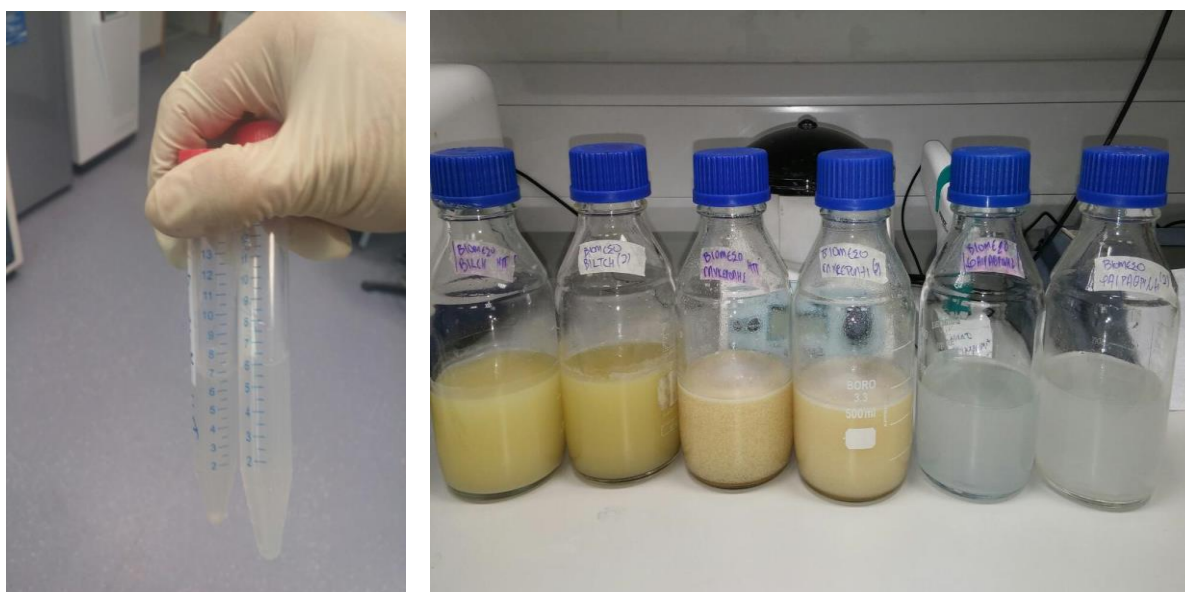
Εικόνα 4: βιομέσο φαινόλης



Εικόνα 5: αυτόκαυστος

2.2 Εμβολιασμός και ανάπτυξη

Το βιομέσο το οποίο προοριζόταν για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών (γλυκόζης, γλυκερόλης) και των EPS παράλληλα αποστειρώθηκε εκτός από το bilge waste water το οποίο είναι καθαρό απόβλητο και η αναλογία του ήταν 100%. Ακολούθως οι υγρές καλλιέργειες που ενεργοποιήθηκαν σε falcon tubes μεταφέρθηκαν μέσα στις μπουκάλες που περιείχαν τα υποστρώματα προς εξέταση. Το μοναδικό πρόβλημα που έπρεπε να αντιμετωπιστεί ήταν το ότι η γλυκερόλη ήταν ένα παχύρευστο κολλοειδές υγρό και παρέμενε λίγη ποσότητα στα falcon tubes και από την άλλη η σύσταση του bilge waste water δεν ήταν ακριβής.



Εικόνα 6 : Δείγμα καλλιέργειας σε υπόστρωμα ενεργοποίησης (A) και σε υποστρώματα ανάπτυξης (B)

2.3 Εκχύλιση Εξωπολυσακχαριτών

Για την εξέταση παραγωγής των EPS ακολουθήθηκε η διαδικασία Bezawada et al., (2013) με ορισμένες τροποποιήσεις για όλα τα δείγματα και συνθήκες ανεξαιρέτως. Αρχικά πάρθηκε 20ml δείγμα από την καλλιέργεια ζωμού μετά την επώαση και φυγοκεντρήθηκαν σε συνθήκες 20°C, σε 6000 στροφές για 15 λεπτά. Σκοπός της φυγοκέντρησης (εικόνα 7) είναι ο διαχωρισμός του βιομέσου και η κατακάθιση της βιομάζας. Στο υπερκείμενο υγρό (υγρή φάση) υπάρχουν τα ελεύθερα μόρια EPS

(LB-EPS), το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε falcon tubes και προστέθηκε αιθανόλη 25ml (1:1) καθαρότητας 95% με σκοπό την απελευθέρωση και κατακρήμνιση των EPS. Η βιομάζα που καθιζάνει κατά τη φυγοκεντρηση περιλαμβάνει κύτταρα όπου υπάρχουν δεσμευμένα EPS (TB-BOUNDS) τα οποία υπέστησαν περαιτέρω επεξεργασία για την ανάκτηση τους. Στα falcon tubes που καθίζανε η βιομάζα προστέθηκε απιονισμένο νερό ίσης ποσότητας με την αρχική καλλιέργεια (25ml) και αναδεύτηκαν στη συσκευή vortex mixer (εικόνα 9). Ακολούθως τοποθετήθηκαν σε ποτήρι ζέσεως με νερό πάνω σε θερμαντική πλάκα σε 65°C για 30 λεπτά με σκοπό να θερμανθούν και να σπάσουν τα κύτταρα ώστε να απελευθερωθούν τα EPS στην υγρή φάση. Τέλος, το δείγμα φυγοκεντρήθηκε, το υπερκείμενο υγρό θεωρήθηκε ότι περιέχει τα TB-EPS έτσι μεταφέρθηκε σε άλλο falcon tube και προστέθηκε αιθανόλη 25ml. Τα δείγματα με αιθανόλη τοποθετήθηκαν στο θάλαμο για όλη την νύχτα.

Την επόμενη μέρα, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν σε συνθήκες 4°C, 6000 στροφές για 40 λεπτά ώστε τα EPS να προσκολληθούν στα τοιχώματα και τα νεκρά κύτταρα να παραμείνουν στη υγρή φάση απ' όπου μετά το τέλος της φυγοκέντρησης αφαιρέθηκαν. Τα falcon tubes παρέμειναν για λίγο στο θάλαμο επώασης ώστε να εξατμιστεί η αιθανόλη. Τα προς εξέταση δείγματα περιέχουν τα μόρια (EPS) σε απιονισμένο νερό ποσότητας 25ml όπως ήταν και το αρχικό δείγμα της καλλιέργειας.



Εικόνα 7: Φυγόκεντρος

2.4 Εξέταση παραγωγής EPS

Για την εξέταση παραγωγής εξωπολυσακχαριτών και τον χαρακτηρισμό του χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι ώστε να μελετηθεί η ικανότητα παραγωγής τους από συγκεκριμένες ομάδες μικροοργανισμούς. Στη βιβλιογραφία αναφέρονται ποικίλες μέθοδοι ανάλογα όμως με τους στόχους του κάθε ερευνητή. Στη παρούσα μελέτη διερευνήθηκε δημιουργία γαλακτώματος (surfactants) με τη μέθοδο γαλακτωματοποίησης (emulsive index) και για τα βιοκροκιδωτικά η μέθοδος της βιοκροκίδωσης (flocculation activity). Μελετήθηκε επίσης ο ποσοτικός προσδιορισμός ξηρής βιομάζας που ουσιαστικά μετρούσε τη ποσότητα EPS των δειγμάτων. Επιπλέον μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις πρωτεϊνών και σακχάρων που είναι και τα κύρια συστατικά των εξωπολυσακχαριτών, Lowry method και Commassie Brilliant Blue για πρωτεΐνες και Anthrone method για τα σάκχαρα.

2.4.1 Γαλακτωματοποίηση

Μέσω του γαλακτωματοποίησης μπορεί να διαπιστωθεί η ιδιότητα των μικροοργανισμών να παράγουν surfactants, οι οποίοι, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, μπορούν να διασπούν δύσκολα υποστρώματα όπως είναι το πετρέλαιο.

Η παραγωγή επιφανειοδραστικών ουσιών (surfactants) είναι εμφανή από την δημιουργία γαλακτώματος της οργανικής φάσης ή/και του θολώματος της υδατικής φάσης,

- Για να δοκιμαστεί η ικανότητα των πολυμερών για τη σταθεροποίηση και δημιουργία γαλακτωμάτων, χρησιμοποιήθηκαν διάφορα έλαια και υδρογονάνθρακες ελαιόλαδο, πετρέλαιο, ηλιέλαιο παραφινέλαιο, κηροζίνη ως μέσο οργανικής φάσης. Τα έλαια αυτά αναμιγνύονταν με το ανάλογο δείγμα 3ml (αναλογία 1:1) σε δοκιμαστικούς σωλήνες σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ακολούθως αναμείχθηκαν στο vortex mixer (εικόνα 9)
- Την επόμενη μέρα ο δείκτης γαλακτωματοποίησης προσδιορίστηκε με το ολικό ύψος του υγρού και το ύψος του γαλακτώματος όπου η ποσότητα μπορεί να υπολογιστεί μέσω της εξίσωσης:

$$\text{ΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗ} = \frac{\text{Ύψος Γαλακτώματος (cm)}}{\text{Ολικό ύψος στήλης (cm)}}$$

*100

Η παραγωγή surfactants είναι εμφανή από την δημιουργία γαλακτώματος της οργανικής φάσης ή/και του θολώματος της υδατικής φάση. Αξίζει να σημειωθεί ότι η δημιουργία σταθερού και υψηλού γαλακτώματος παρουσιάζεται περίπου στις 5-10 μέρες από τη μέρα εμβολιασμού ανάλογα βέβαια από το μικροοργανισμό (Freitas et al. 2014). Στην εικόνα 8 παρουσιάζεται πως φαίνεται η γαλακτωματοποίηση με ελαιόλαδο και πετρέλαιο ως υπόστρωμα με τον εμπορικό surfactant Triton-X-100 (Freitas et al. 2014).



Εικόνα 8: δείγμα γαλακτωματοποίησης



Εικόνα 9: vortex mixer

2.4.2 Βιοκροκίδωση

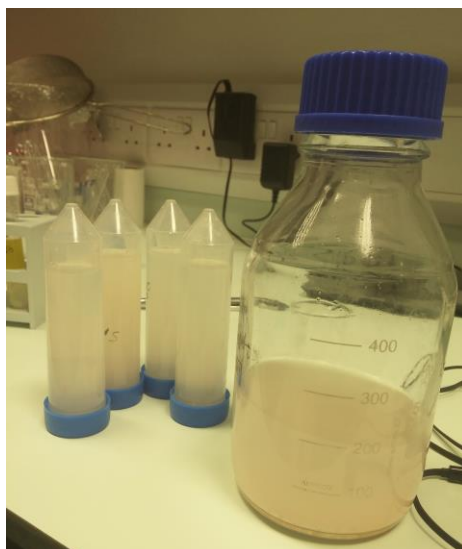
Εδώ και αρκετές δεκαετίες χρησιμοποιούνται συσσωματωτικά από οργανικά πολυμερή για να βοηθήσουν τη διαδικασία της κροκίδωσης. Τα τελευταία χρόνια έχουν αρχίσει να χρησιμοποιούνται ολοένα και περισσότερο συσσωματωτικά από φυσικά πολυμερή αλλιώς βιολογικά πολυμερή, λόγω του ότι είναι φιλικά προς το περιβάλλον, υπάρχουν σε αφθονία στη φύση, είναι οικονομικά και μη τοξικά. Πολλές ερευνητικές ομάδες μελετούν την παραγωγή βιολογικών πολυμερών EPS από μικροοργανισμούς.

Η μέθοδος αυτή έχει να κάνει συνήθως με την εξέταση ύπαρξης EPS και την συσσωμάτωσή τους σε ένα κροκιδωτικό υλικό. Όταν τα στερεά αυτά σωματίδια είναι μικρότερα από 1μm, τότε τα σωματίδια αυτά δεν καθιζάνουν εύκολα. Ο λόγος είναι η ανάπτυξη ηλεκτρικών φορτίων στην επιφάνειά τους που αποτρέπει την προσέγγιση και συσσωμάτωσή τους, ώστε να αποκτήσουν μέγεθος ικανό για καθίζηση. Τα σωματίδια αυτά ονομάζονται κολλοειδή (Colloids). Όσον αφορά τα EPS, λειτουργούν ως κολλοειδή και ένα

είδος αργίλου ως κροκιδωτικό δημιουργώντας μεγαλύτερα σωματίδια με αποτέλεσμα να καθιζάνουν. Αυτό διαπιστώνεται με την μέτρηση της απορρόφησης η οποία όσο πιο μικρή τόσο περισσότερα EPS υπάρχουν, διαφορετικά το συσσωματικό δεν καθιζάνει γρήγορα και μετριέται σε υψηλή απορρόφηση. Η παρούσα μελέτη χρησιμοποίησε την μέθοδο αυτή ώστε να διαπιστωθεί αν υπάρχουν EPS στα συγκεκριμένα δείγματα. Κολλοειδές διάλυμα είναι το ομογενές μείγμα που περιέχει ομοιόμορφα διασκορπισμένα σωματίδια σχηματίζοντας σταθερά αιωρήματα λόγω του όμοιου αρνητικού τους φορτίου και της ηλεκροστατικής άπωσης μεταξύ τους. Η καολίνη ήταν το υλικό δοκιμής ως κολλοειδές διάλυμα καθώς είναι ένα είδος αργίλου που έχει σκοπό την μέτρηση της δραστηριότητας των διάφορων μορφών EPS (LB-EPS και TB-EPS). Δηλαδή τα EPS προσκολλώνται στην επιφάνεια των κροκιδωτικών με τη βοήθεια μία πηγής ασβεστίου (CaCl_2) και καθιζάνουν. Έτσι παρασκευάστηκε το διάλυμα καολίνης με συγκέντρωση 5g/L αιωρήθηκε σε απιονισμένο νερό και προστέθηκαν 1% (v/v) CaCl_2 και το pH ρυθμίστηκε γύρω στο 7.5-8.(Bezawada et al. 2013).

Για την εξέταση παραγωγής των EPS με την μέθοδο αυτή, μεταφέρθηκαν 50ml διάλυμα καολίνης σε falcon tubes και 0,1ml από τον δείγμα που εξετάστηκε. Παράλληλα, παρασκευάστηκε και control όπου αντί για δείγμα χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο νερό. Ακολούθως, αναδεύτηκαν στον θάλαμο επώασης σε συνθήκες 100rpm και θερμοκρασία 30°C για 4 λεπτά και στη συνέχεια αφέθηκαν να ηρεμήσουν για 5 λεπτά. Τέλος, μετρήθηκε η απορρόφηση στο uv/vis φασματοφωτόμετρό στα 550 nm (Zhang et al. 2014). Το δείγμα που μετρήθηκε πάρθηκε από το πάνω μέρος του falcon tube καθώς τα EPS κατακάθισαν μαζί με τη καολίνη. Η ποσότητα υπολογίζεται με την εξίσωση :

$$\text{ΒΙΟΚΡΟΚΙΔΩΣΗ} = (\text{Acontrol}-\text{Aδείγματος}/\text{Acontrol}) * 100$$



Εικόνα 10: Διάλυμα καολίνης και δείγματα

2.4.3 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΞΗΡΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ

Για τον προσδιορισμό της ξηρής βιομάζας των δειγμάτων, τα δείγματα αφού φυγοκεντρήθηκαν αναμειχθηκαν με 95% αιθανόλη σε αναλογία 1:1 και διατηρήθηκε στους -20°C για μία νύχτα για καταβύθιση των EPS. Την επόμενη μέρα τα δείγματα κατακρημνίστηκαν σε διηθητικά φίλτρα μέσω της διαδικασίας της διήθησης. Τα EPS συλλέχθηκαν από τα φίλτρα, και μετρήθηκε το ξηρό βάρος τους μετά από θέρμανσή τους στο φούρνο στους 80°C για 24 ώρες για να εξατμιστεί η υγρασία.

Dry weight	g/L
TB-EPS	<1
LB-EPS	<2.5

Πίνακας 1: Σύσταση ξηρής βιομάζας στα EPS

2.4.4 Μέτρηση πρωτεϊνών και σακχαρών

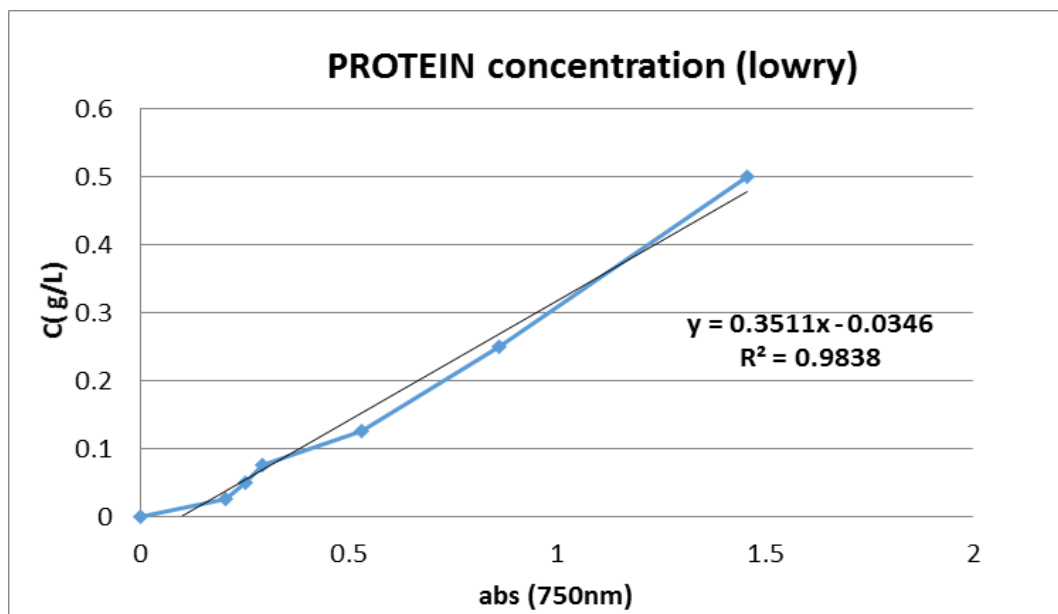
Οι πρωτεΐνες και τα σάκχαρα είναι αδιαμφισβήτητα το βασικό συστατικό των εξωπολυσακχαριτών και έχουν καθριστική σημασία στις εφαρμογές τους. Οι τιμές όσον αφορά τη συγκέντρωση των συστατικών αυτών καταγράφονται πιο κάτω (Bezawada et al. 2013) :

	mg/L
ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ (LB-EPS)	<1000
ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ (TB-EPS)	<950
ΣΑΚΧΑΡΑ (LB-EPS)	<260
ΣΑΚΧΑΡΑ (TB-EPS)	<225

Πίνακας 2: Σύσταση πρωτεϊνών και σακχάρων στα EPS

2.4.4.1 Μέθοδος Πρωτεϊνών-Lowry

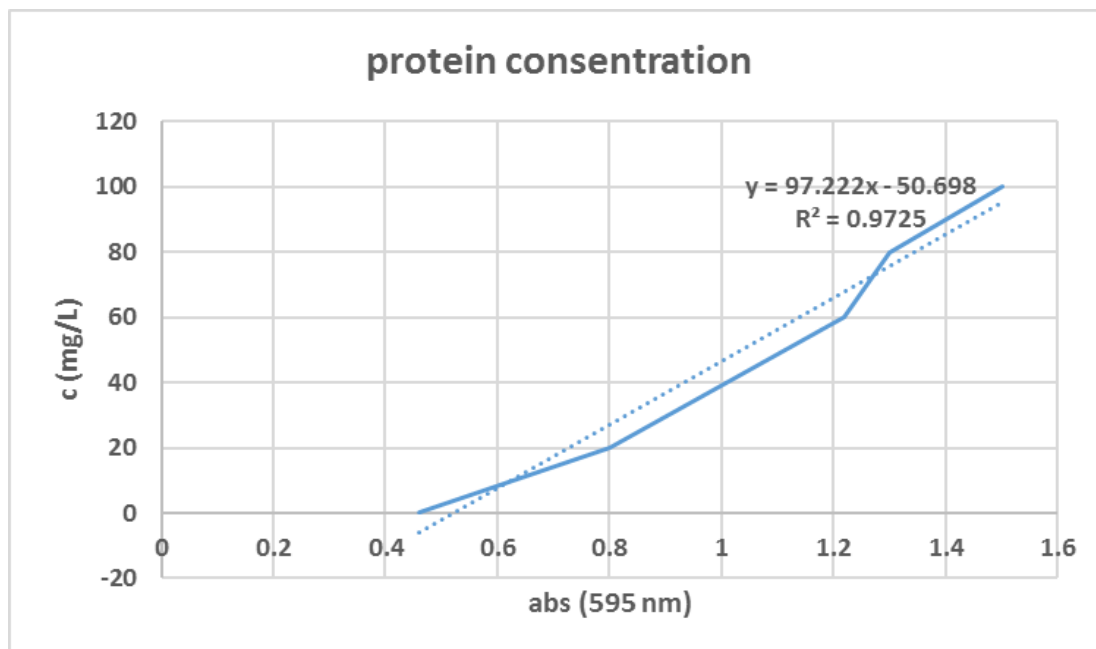
Για την ποσοτικοποίηση των συστατικών των EPS, χρησιμοποιούνται συμβατικές χημικές χρωματομετρικές αναλύσεις. Στο εν λόγω πείραμα για τη μέτρηση των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η τροποποιημένη μέθοδος Lowry. Οι πρωτεΐνες προεπεξεργάστηκαν με ιόντα χαλκού σε αλκαλικό διάλυμα και στη συνέχεια έγινε προσθήκη του αντιδραστηρίου Folin. Ως πρότυπο χρησιμοποιήθηκε η αλβουμίνη βόειου ορού (Bovine Serum Albumin - BSA) και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 750nm. Πρίν όμως από τη μέτρηση των δειγμάτων παρασκευάστηκε καμπύλη βαθμονόμησης για τις πρωτεΐνες ώστε να υπολογιστεί στη συνέχεια μέσω της εξίσωσης, η συγκέντρωση των πρωτεϊνών τα δείγματα. Έγιναν διάφορες αραιώσεις για τη συγκέντρωση των πρωτεϊνών: C=0.05,0.075, 0.1, 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1g/L, μετρήθηκε η απορροφησή τους στα 750nm και παρασκευάστηκε η πιο κάτω καμπύλη βαθμονόμησης με γραμμική συνάρτηση $R^2=0.9835$



Διάγραμμα 1: Καμπύλη Βαθμονόμησης για τις πρωτεΐνες (μέθοδος Lowry)

2.4.4.2 Μέθοδος Πρωτεϊνών Coomassie brilliant blue

Χρησιμοποιήθηκε και μια άλλη μέθοδος για τις πρωτεΐνες αυτή του Coomassie Brilliant Blue. Σε duran bottle (250ml) τοποθετήθηκαν 0.01 g Brilliant Blue, 5ml αιθανόλη καθαρότητας 95%, 10 ml H₂PO₄ (95%) και συμπληρώθηκε με απιονισμένο νερό, αναδεύτηκε και τοποθετήθηκε στον ψυγείο στους 4° C (Bradford 1976).



Διάγραμμα 2: Καμπύλη Βαθμονόμησης για τις πρωτεΐνες (μέθοδος Coomassie Brilliant Blue)

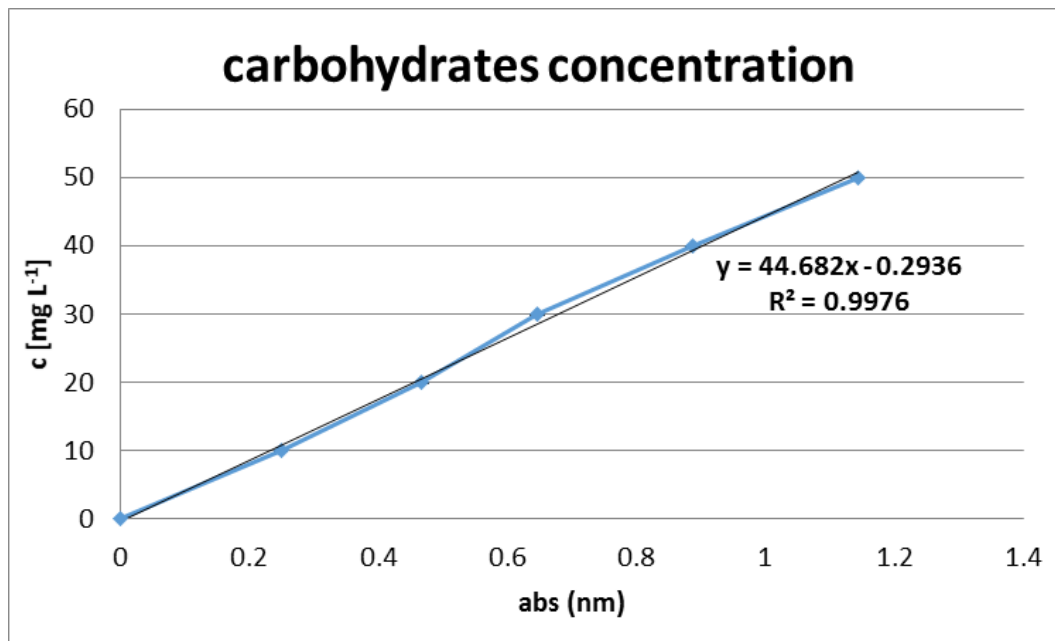


Εικόνα 11: Διάλυμα Coomassie brilliant blue

2.4.4.3 Πολυσακχαρίτες

Για τη μέτρηση των πολυσακχαριτών με τη μορφή υδατανθράκων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Anthrone φαινόλης-θεικού οξέος με χρήση διαλύματος φαινόλης 5% w/v και πυκνού θεικού οξέως. Ως πρότυπο χρησιμοποιήθηκε η γλυκόζη. Οι πρωτεΐνες και οι πολυσακχαρίτες προσδιορίστηκαν για το καθένα από τα εκχυλισμένα κλάσματα, LB-EPS και TB-EPS ξεχωριστά. Κατά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων αθροίστηκαν οι τιμές των

LB-EPS και TB-EPS, το άθροισμα των οποίων θεωρήθηκε ότι αποτελεί τη συνολική ποσότητα των δεσμευμένων EPS (bound EPS). Παρακάτω φαίνεται η καμπύλη βαθμονόμησης η οποία είναι γραμμική με $R^2=0.9976$ και έτσι μπορεί να χρησιμοποιηθεί με ακρίβεια για τη συγκέντρωση σακχάρων.



Διάγραμμα 3: Καμπύλη Βαθμονόμησης για τα σάκχαρα

3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΤΕΛΕΜΑΤΑ

Στο προηγούμενο κεφάλαιο αναφέρθηκαν αναλυτικά οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν για την διερεύνηση των αποτελεσμάτων, στο κεφάλαιο αυτό θα παρουσιαστούν το πειραματικό μέρος και τα αποτελέσματα. Ως πρώτη προσέγγιση εκτέλεσης των πειραμάτων ήταν η εξέταση διάφορων καλλιεργειών που υπήρχαν στο εργαστήριο από παλαιότερες απομονώσεις με σκοπό να φανεί κατά πόσο οι συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί έχουν τη ικανότητα να παράγουν εξωπολυσακχαρίτες σε καθορισμένα υποστρώματα. Από παλαιότερες μελέτες έχει αποδειχθεί ότι η γλυκόζη είναι μια πηγή που οδηγεί στην ανάπτυξη και την παραγωγή EPS αφού θεωρείται ο απλούστερος μονοσακχαρίτης και μονομερές. Δεύτερος στόχος ήταν να δοκιμαστούν διάφορα απόβλητα βιομηχανιών ως υποστρώματα (φτηνά υποστρώματα για την παραγωγής προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας) για να φανεί αν και αυτά με τη σειρά τους μπορούν να πετύχουν το πρώτο στόχο.

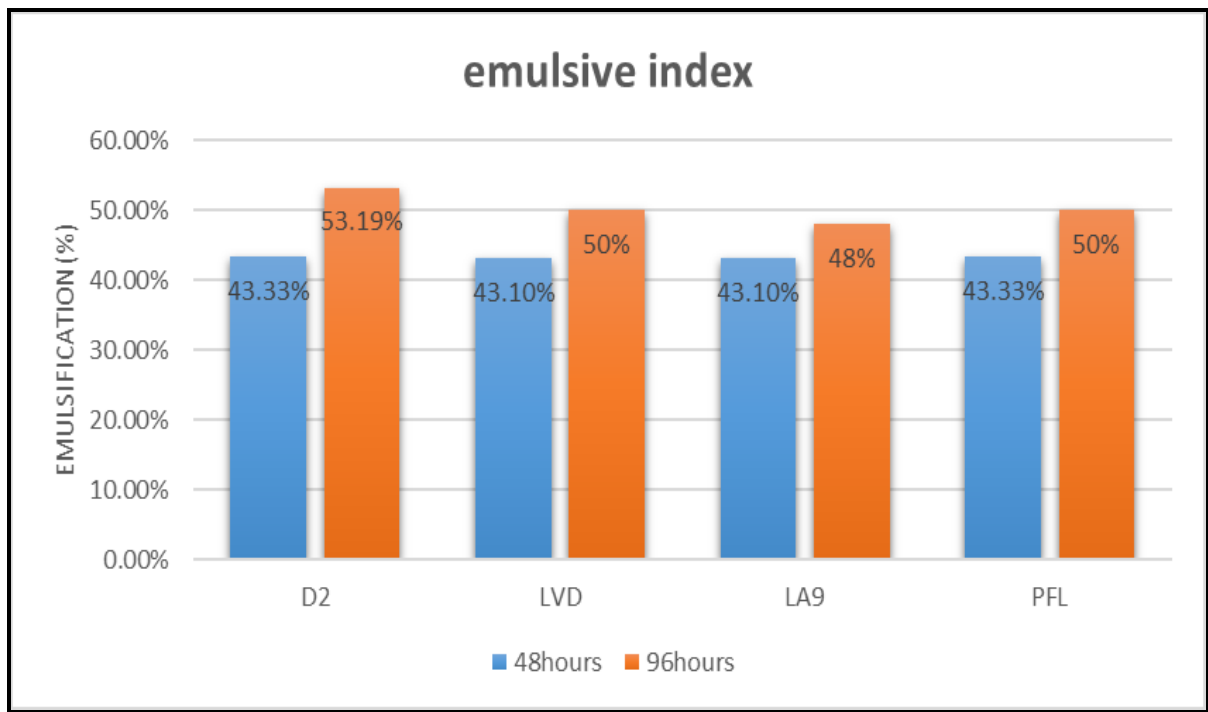
Συγκεκριμένα θα εξεταστεί η παραγωγή γαλακτωματοποιητών και βιοκροκιδωτικών που έχουν ευρεία εφαρμογή σε βιομηχανίες που αφορούν κυρίως υδρογονάνθρακες.

3.1 ΠΕΙΡΑΜΑ 1a

Η εκτέλεση του πρώτου πειράματος αφορά την εξέταση παραγωγής EPS από συγκεκριμένη ομάδα μικροοργανισμών. Το πρώτο μέρος του πειράματος αφορά τη χρήση υποστρώματος γλυκόζης για τη παραγωγή EPS σε ποσότητα 5g/L. Η ομάδα μικροοργανισμών αφορά τους *Enterobacter sp (D2)*, *Pseudomonas aeruginosa (LVD-10)*, *Enterobacter sp. (LA9)* και *Pseudomonas Fluresences (PFL)* ο οποίος χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης για το λόγο ότι είναι εμπορικό βακτήριο (DSMZ provider) που παράγει EPS. Αφού κατασκευάστηκαν τα βιομέσα, ο μικροοργανισμός ενεργοποιήθηκε σε βιομέσο φαινόλης και στη συνέχεια αναπτύχθηκε σε βιομέσο γλυκόζης (5g/L), για 48 μέχρι 96 ώρες, εκτελέστηκαν οι δοκιμές παραγωγής EPS (επιφανειοδραστικών ουσιών και κροκιδωτικών) με Γαλακτωματοποίηση για LB-EPS και Βιοκροκίδωση για TB-EPS αντίστοιχα.

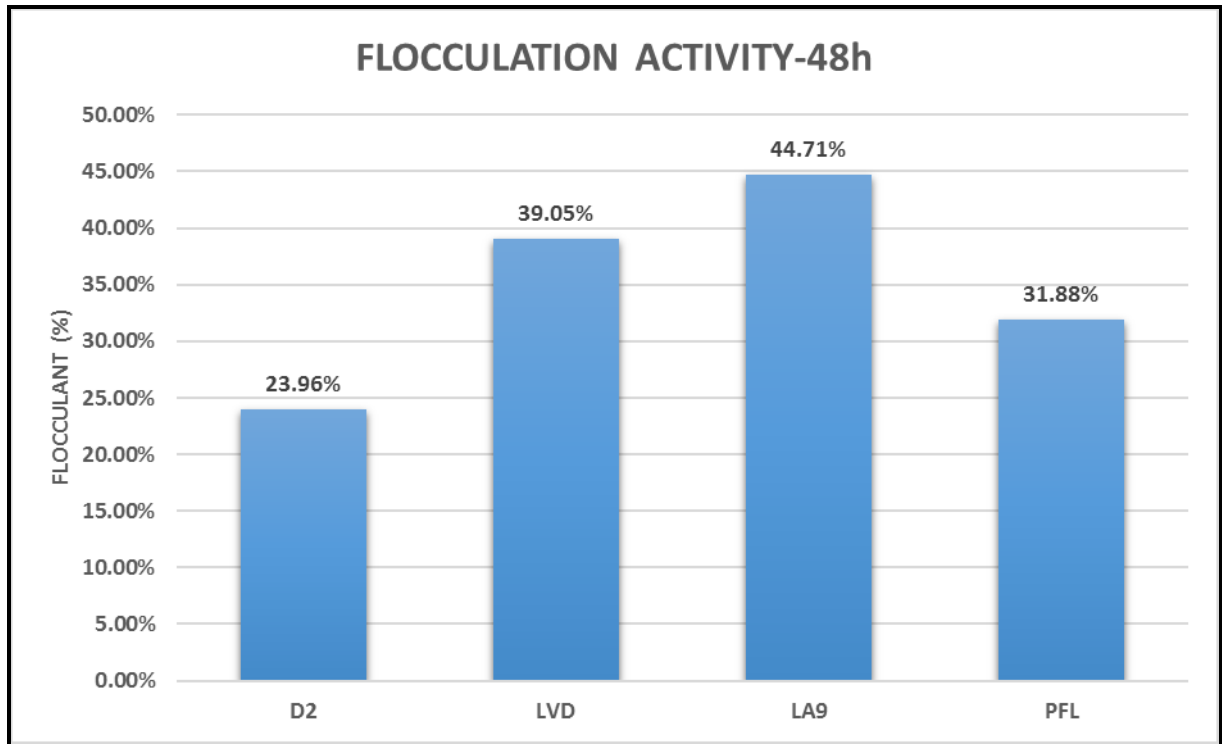
3.1.1 Γαλακτωματοποίηση

Για τον προσδιορισμό παραγωγής γαλακτωματοποιητών χρησιμοποιήθηκε ως μέσο οργανικής φάσης το ελαιόλαδο (έλαια) και το πετρέλαιο (υδρογονάνθρακες). Εξετάστηκε η γαλακτωματοποίηση απο τα lowly bounds.



Διάγραμμα 4: Γαλακτωματοποίηση (D2, LVD-10, LA9, PFL) σε γλυκόζη 5g/L για 48h και 96h, οργανική φάση-ελαιόλαδο, LB-EPS

3.1.2 Βιοκροκίδωση



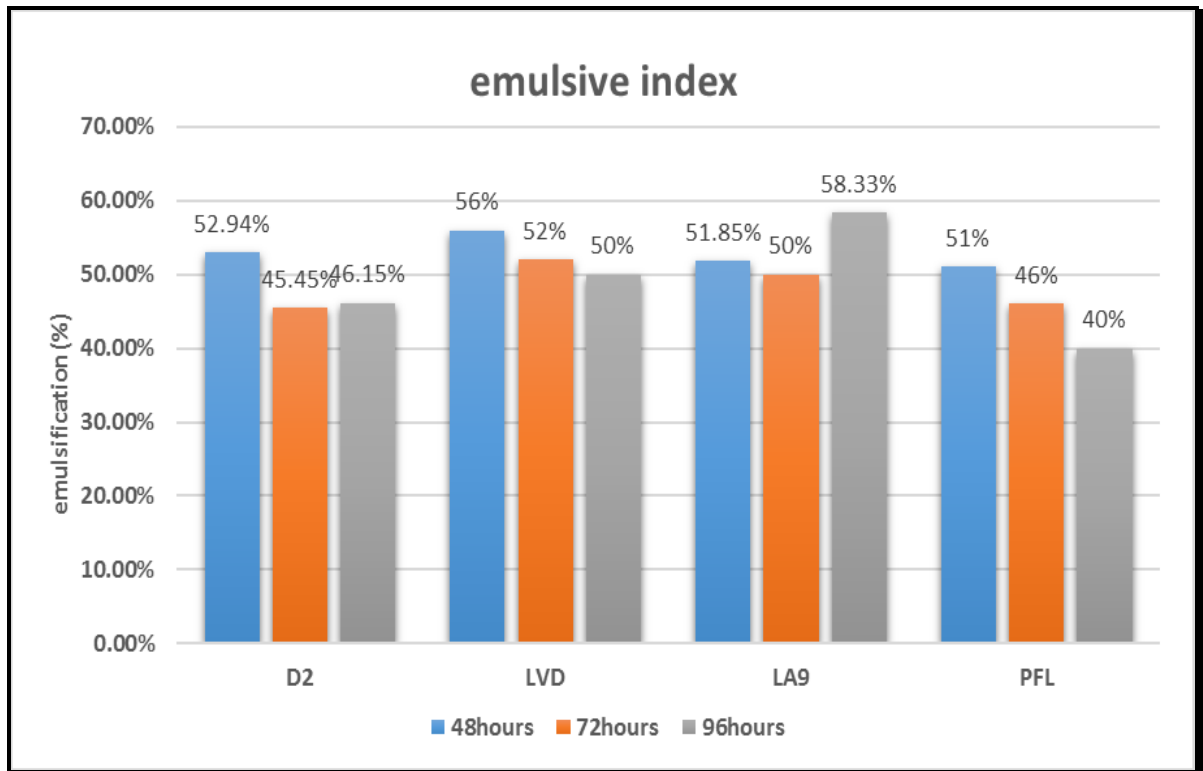
Διάγραμμα 5: Βιοκροκίδωση καλλιέργεια στις 48h, TB-EPS

3.1.3 ΠΕΙΡΑΜΑ 1b

Στο δεύτερο μέρος του πειράματος χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα γλυκόζης 5g/L με 1% (v/v) απόβλητο γλυκερόλης. Ο λόγος είναι να φανεί κατά πόσο η παρουσία της γλυκερόλης θα ευνοήσει τη παραγωγή EPS από τους μικροοργανισμούς. Σε αυτό το πείραμα ελέγχθηκαν οι 48,72 και 96h.

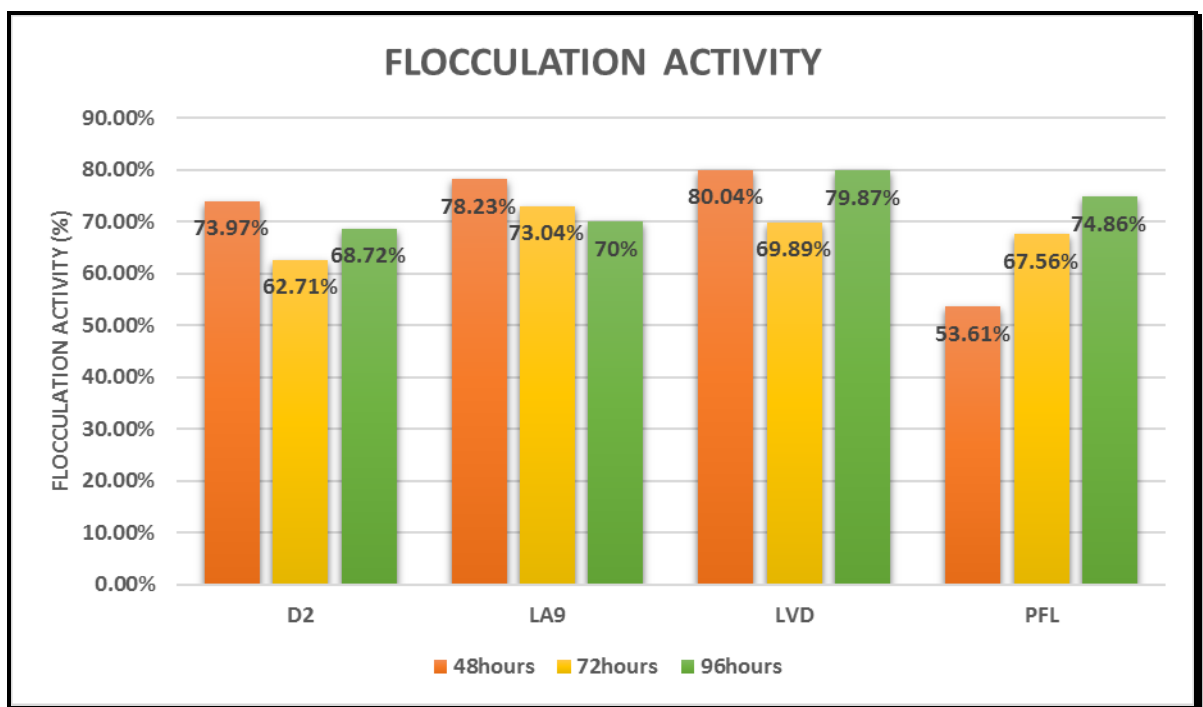
3.1.4 Γαλακτωματοποίηση

Η εξέταση γαλακτωματοποίησης πραγματοποιήθηκε με ελαιόλαδο και παραφυνέλαιο, αφού όπως αναφέρθηκε προηγούμενως χρησιμοποιούνται διάφορα έλαια μέχρι να βρεθεί αυτό με την υψηλότερη γαλακτωματοποίηση.



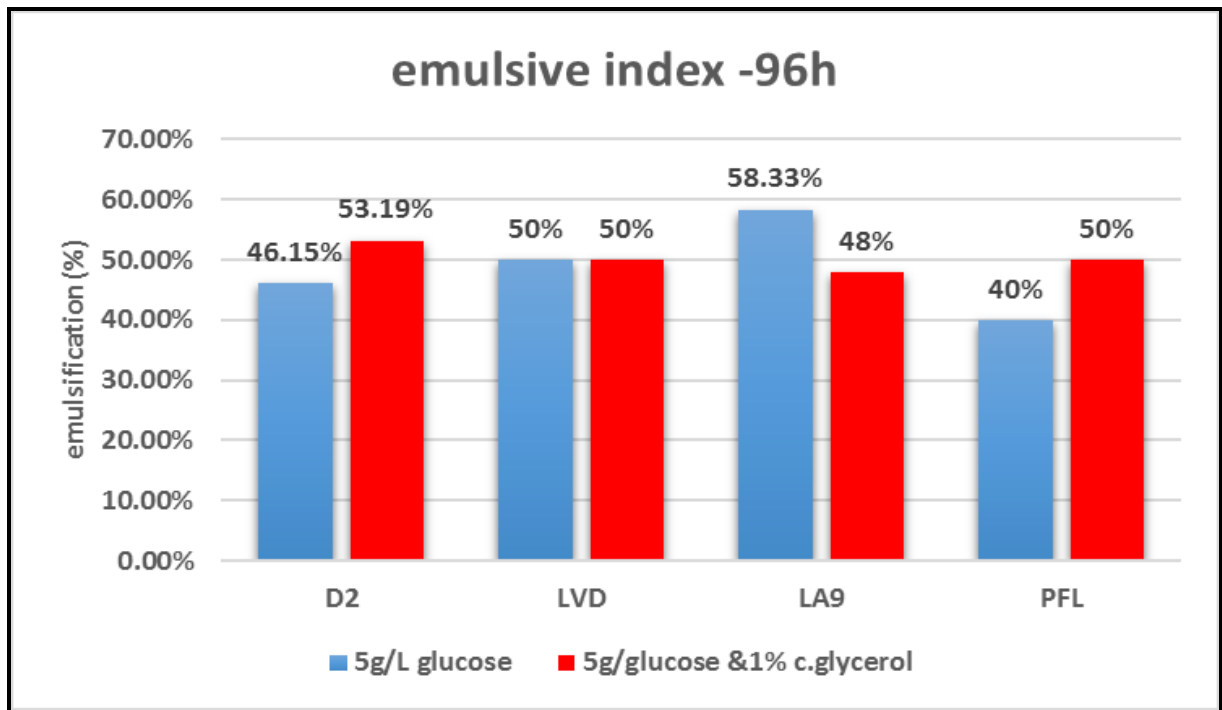
Διάγραμμα 6: Γαλακτωματοποίηση με οργανική φάση το ελαιόλαδο σε 48h ,72h και 96h (D2, LVD-10, LA9, PFL), LB-EPS

3.1.1 Βιοκροκίδωση

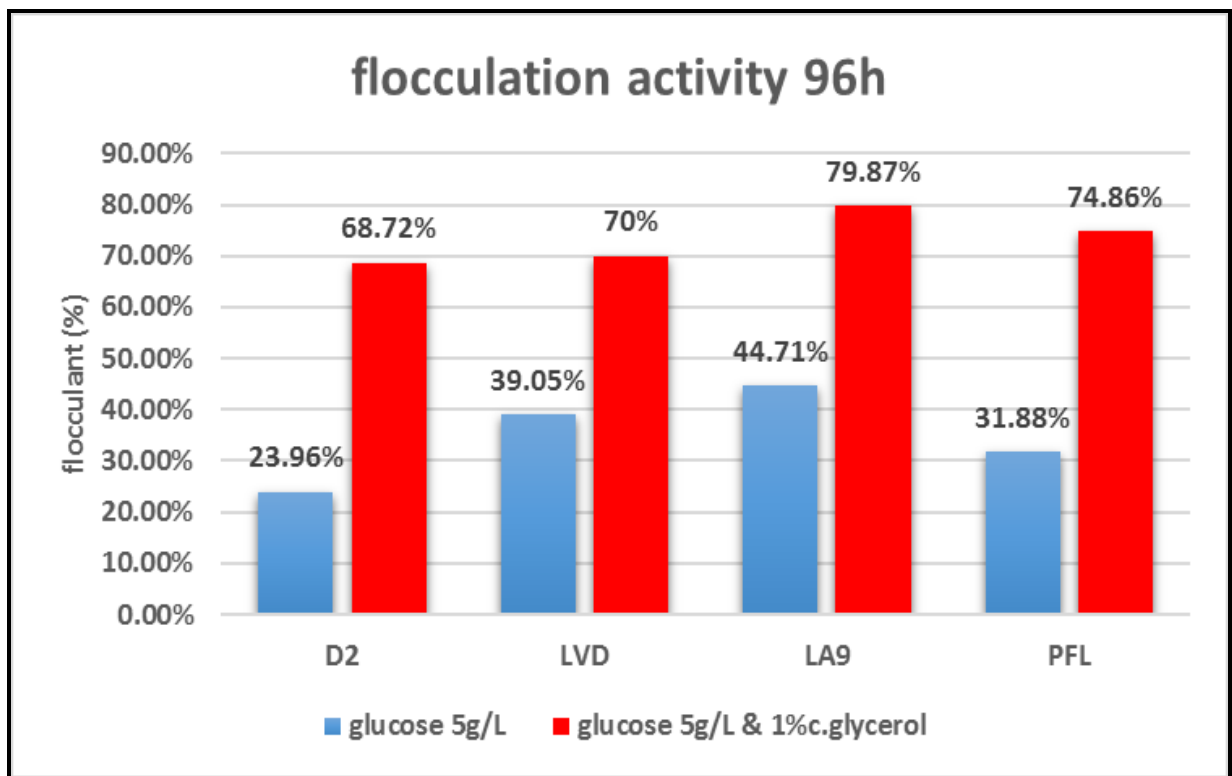


Διάγραμμα 7: Βιοκροκίδωση (D2, LA9, LVD-10, R.rubber, υπόστρωμα: 5g/L glucose & 1% crude glycerol, TB-EPS)

3.1.2 Σύγκριση δύο πειραμάτων για 96h



Διάγραμμα 8: Σύγκριση γαλακτωματοποίησης για τους 4 μικροοργανισμούς, LB-EPS, μέσο οργανικής φάσης- ελαιόλαδο



Διάγραμμα 9: Σύγκριση βιοκροκίδωσης, 96h, TB-EPS

3.1.3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σκοπός του πρώτου μέρους του πειράματος ήταν η παρατήρηση για το αν οι συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί παράγουν EPS σε γλυκόζη.

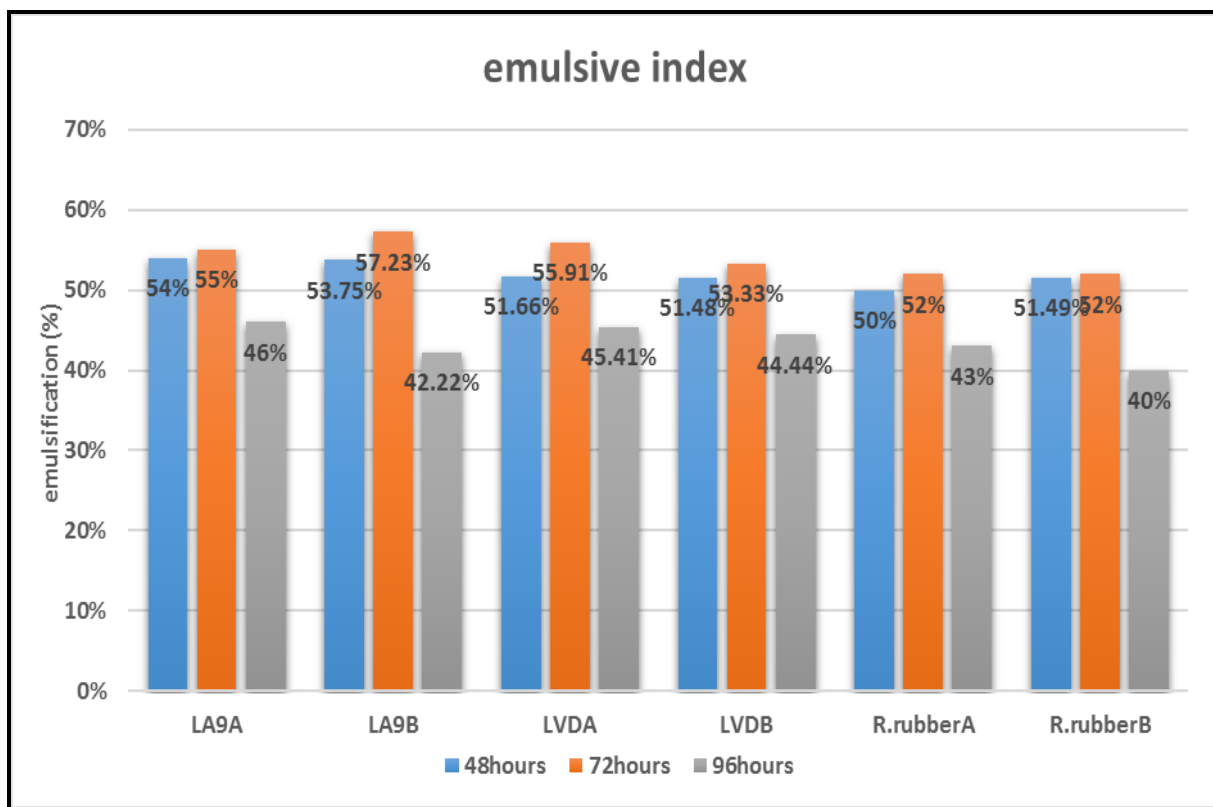
- Όσον αφορά τη γαλακτωματοποίηση (emulsive index) τα ποσοστά κυμαίνονται και για τους 4 μικροοργανισμούς στο 43-53% (διάγραμμα 1) πράγμα που αποδεικνύει την παραγωγή emulsifier, με καλύτερη απόδοση στις 96 ώρες.
- Τα αποτελέσματα του βιοκροκίδωση ήταν μέτρια και παρατηρήθηκε ότι στις 48 ώρες υπάρχει μεγαλύτερη ποσότητα eps σε σχέση με της 96 ώρες. Ο enterobacter sp-LA9 είχε την καλύτερη απόδοση.
- Το δεύτερο μέρος η γλυκερόλη φαίνεται να υποβοηθά τη γλυκόζη ως υπόστρωμα για τη παραγωγή EPS κυρίως στη βιοκροκίδωση (στη γαλακτωματοποίηση οι διαφορές ήταν μικρότερες).
- Όπως φαίνεται και στα ποσοστά είναι πολύ μεγαλύτερα από το προηγούμενο πείραμα και για τα δύο τεστ (Διάγραμμα 5,6)

3.2 ΠΕΙΡΑΜΑ 2

Το απόβλητο της γλυκερόλης έδειξε να έχει θετικά αποτελέσματα ως προς τη παραγωγή EPS, έτσι στο δεύτερο πείραμα παρασκευάστηκαν δύο υποστρώματα ανάπτυξης. Το πρώτο (A) αποτελείται από crude glycerol 3% (v/v) και το δεύτερο (B) από crude glycerol 3% (v/v) μαζί με γλυκόζη 5g/L (εδώ αυξήθηκε η ποσότητα γλυκερόλης για να φανεί κατά πόσο θα παραχθούν περισσότερα EPS). Επιπλέον, επιλέχθηκαν οι μικροοργανισμοί που είχαν καλύτερα αποτελέσματα στο πρώτο πείραμα δηλαδή ο LA9 και ο LVD-10. Εδώ επίσης χρησιμοποιήθηκε ένας μικροοργανισμός ως δείκτης ο *Rhodococcus Rubber* (R.rubber) ο οποίος είναι εμπορικός μικροοργανισμός (DSMZ provider) που παράγει EPS (κυρίως biosurfactants). Η εξέταση παραγωγής των EPS πραγματοποιήθηκε με τη γαλακτωματοποίηση (LB-EPS) και βιοκροκίδωση (TB-EPS) σε χρόνους 48h, 72h και 96h, αφού παρατηρήθηκε ότι στις 24h δεν είχε τόσο καλά ποσοστά.

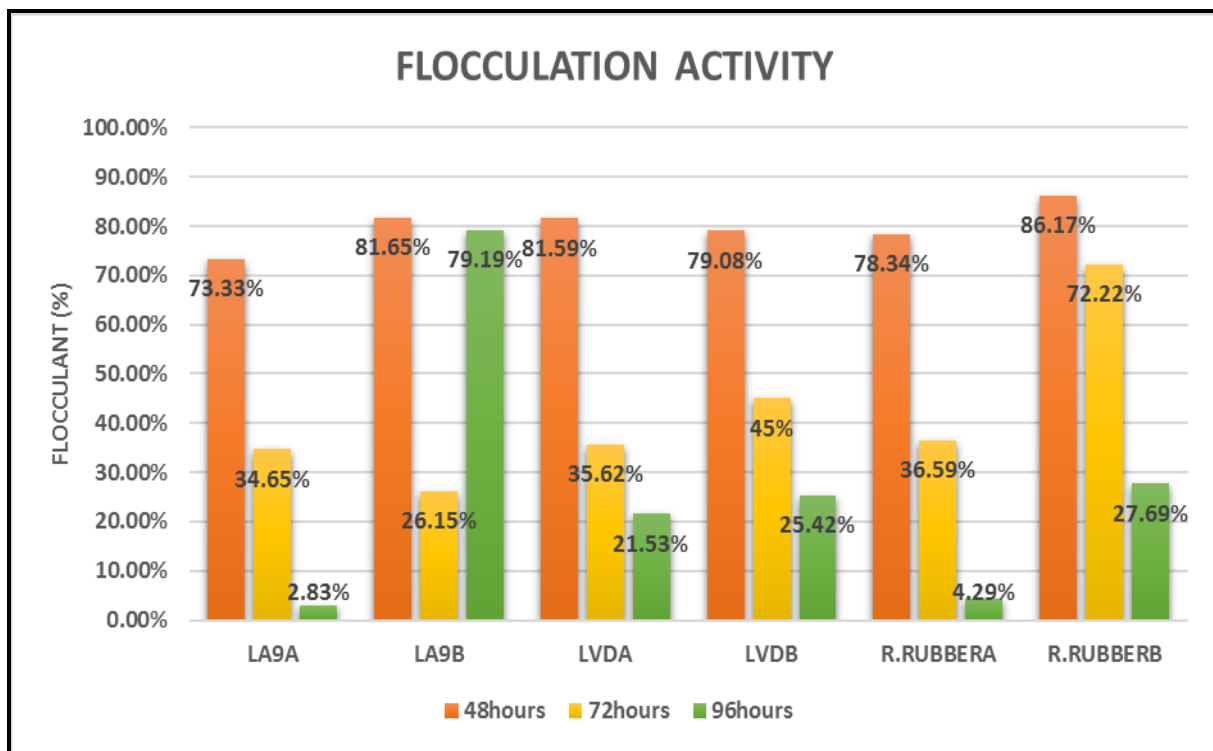
3.2.1 Γαλακτωματοποίηση

Ως μέσο οργανικής φάσης χρησιμοποιήθηκαν το ελαιόλαδο και η κηροζίνη.



Διάγραμμα 10: Γαλακτωματοποίηση (LA9, LVD-10, R.ruber), A: crude glycerol 3%, B: 5g/L glucose & 3% crude glycerol, οργανική φάση –ελαιόλαδο, 48h, 72h, 96h, LB-EPS

3.2.2 Βιοκροκίδωση



Διάγραμμα 11: Βιοκροκίδωση για 48h, 72h, 96h (A: crude glycerol 3%, B: 5g/L glucose & 3% crude glycerol), TB-EPS

3.2.3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

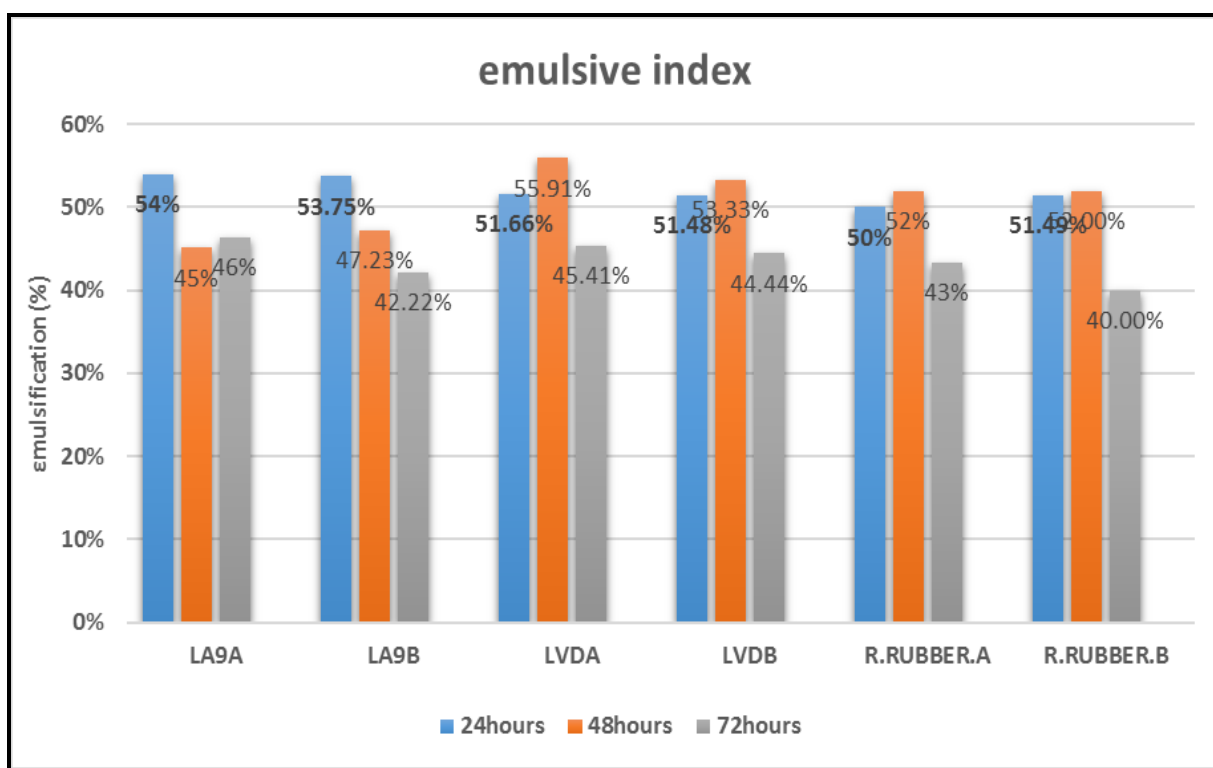
- Το συγκεκριμένο πείραμα είχε καλά αποτελέσματα όσον αφορά τα tests που διεξάχθηκαν. Παρατηρήθηκε ότι το γαλακτωματοποίηση κυμαίνεται γύρω στο 40-52% και, συγκριτικά με τον δείκτη, ο LA9 και ο LVD-10 είχαν ανταγωνιστικές τιμές γαλακτωματοποίησης, το ίδιο και στη βιοκροκίδωση. Να σημειωθεί ότι η υδατική φάση των δειγμάτων στο γαλακτωματοποίηση, είχε θόλωμα, αυτό ίσως φανερώνει την παρουσία surfactants αλλά όχι σε ποσότητες που να δημιουργούν γαλάκτωμα.
- Παρατηρείται ότι το υπόστρωμα A με 3% crude glycerol έχει υψηλές αποδόσεις και στα 2 πειράματα εξέτασης.
- Οι μικροοργανισμοί LA9 και LVD-10 παρουσιάζουν πολύ καλά αποτελέσματα ως προς το δείκτη.
- Αξίζει να σημειωθεί ότι ο LA9 παρουσιάζει υψηλό flocculant σε σχέση με τα υπόλοιπα βακτήρια

3.3 ΠΕΙΡΑΜΑ 3

Το προηγούμενο πείραμα έδειξε πως η γλυκερόλη από μόνη της ευνοεί την παραγωγή EPS. Το πείραμα που ακολουθεί θα συγκρίνει την Α: γλυκερόλη (3%) με Β: γλυκόζη υψηλής σχετικά ποσότητας 25g/L ώστε να είναι συγκρίσιμα ως προς των μοριακό αριθμό των ανθράκων για να διευκρινιστεί κατά πόσο επηρεάζει αυτό. Θα συμμετέχουν οι ίδιοι μικροοργανισμοί του προηγούμενου πειράματος (LVD-10, LA9, R.rubber).

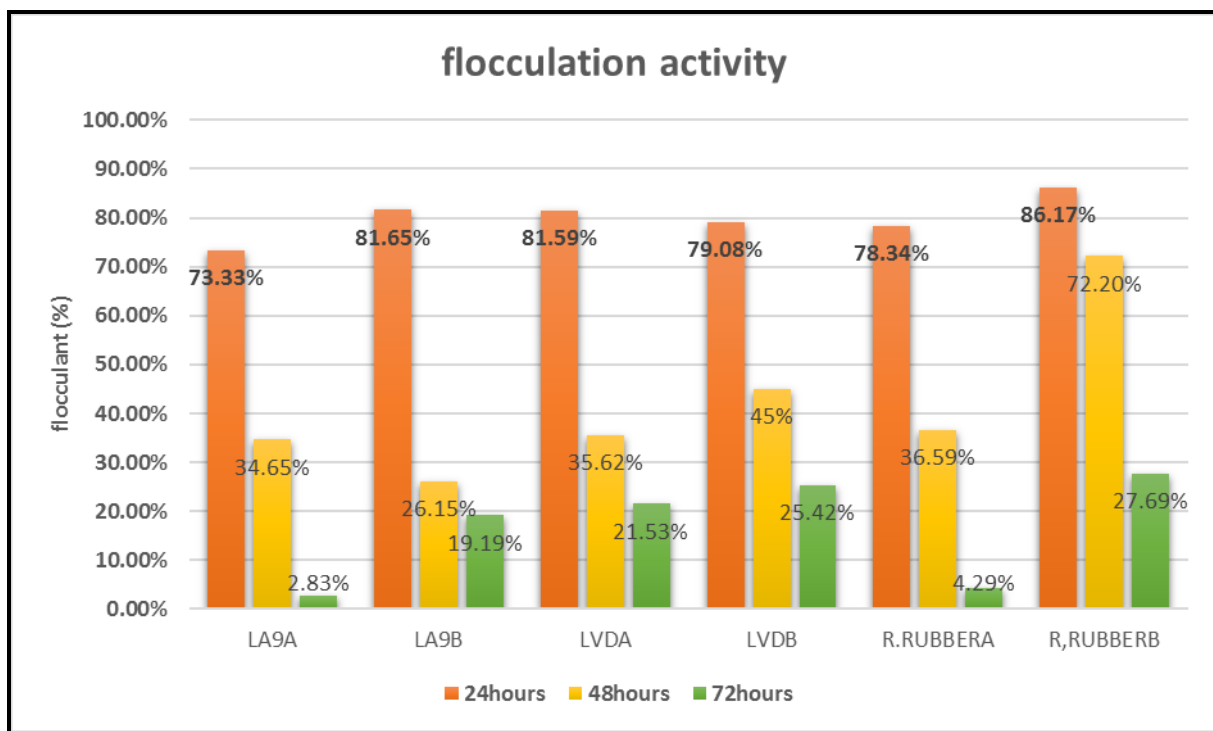
3.3.1 Γαλακτωματοποίηση

Εξετάστηκε η γαλακτωματοποίηση με ελαιόλαδο και πετρέλαιο, όπου το ελαιόλαδο εμφάνισε ικανοποιητικά ποσοστά LB-EPS. Αυτό φαίνεται και στη πιο κάτω γραφική παράσταση.



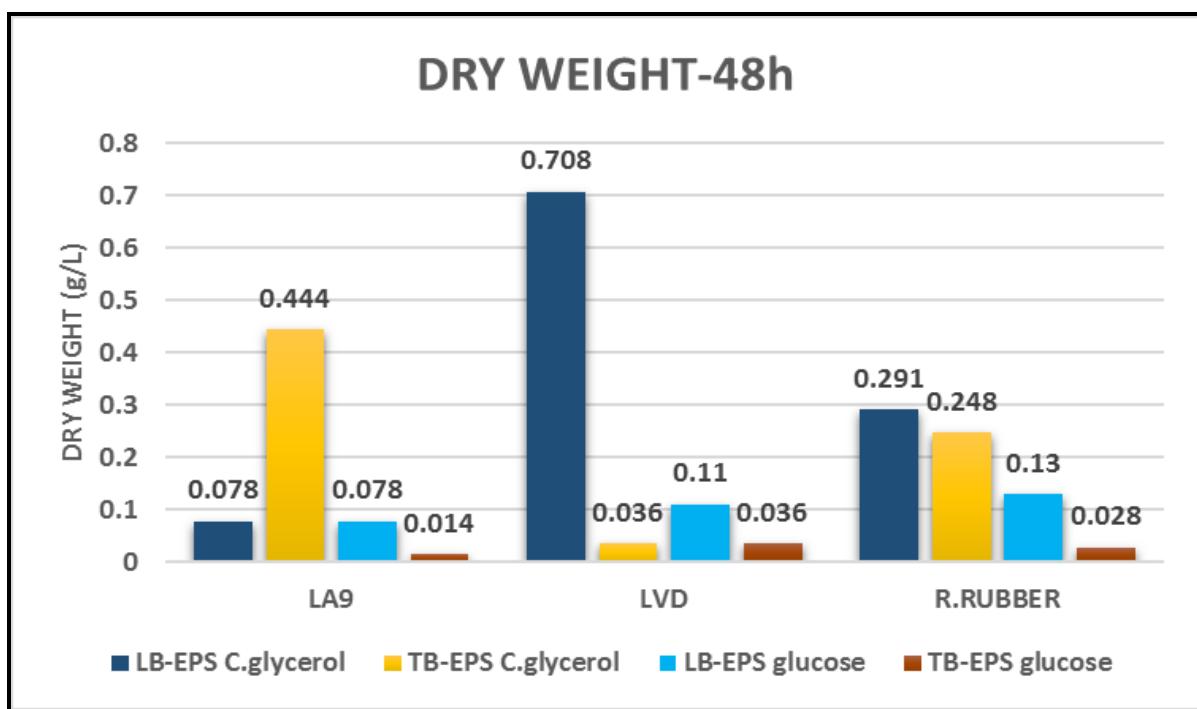
Διάγραμμα 12: Γαλακτωματοποίηση LA9, LVD-10, R.rubber (A: crude glycerol (3%) B: glucose 25g/L), LB-EPS, 48h, 72h, 96h

3.3.2 Βιοκροκίδωση



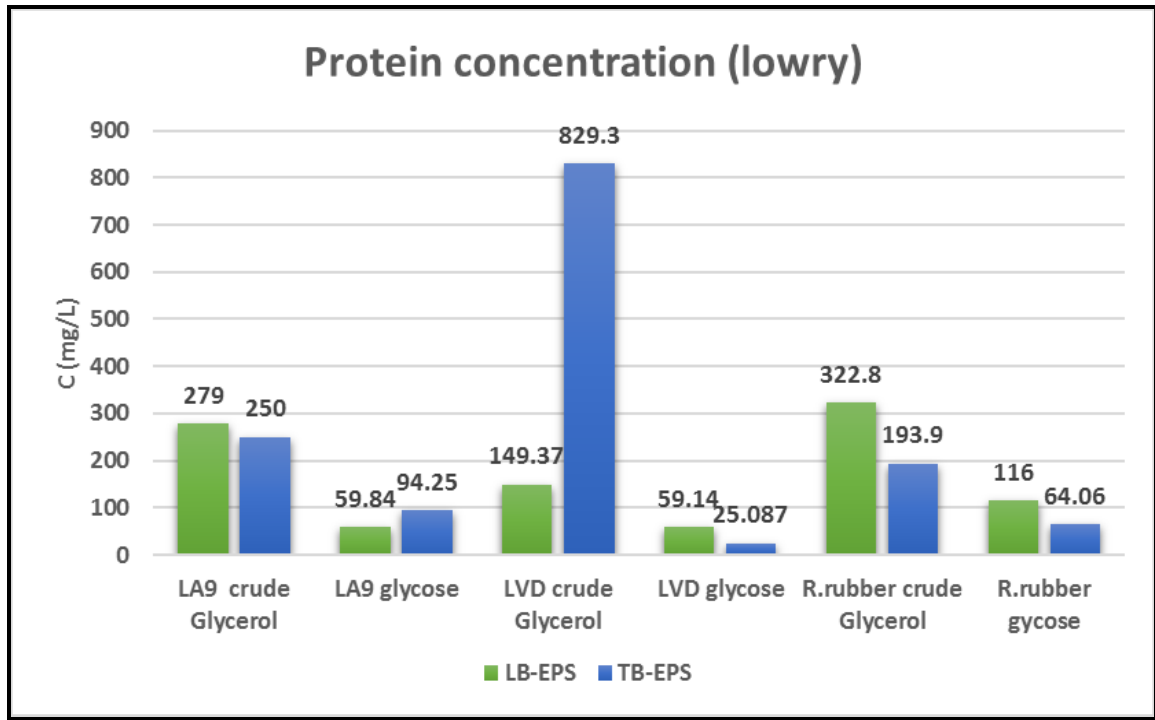
Διάγραμμα 13: Βιοκροκίδωση για TB-EPS, 24h, 48h, 72h

3.3.3 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΞΗΡΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ



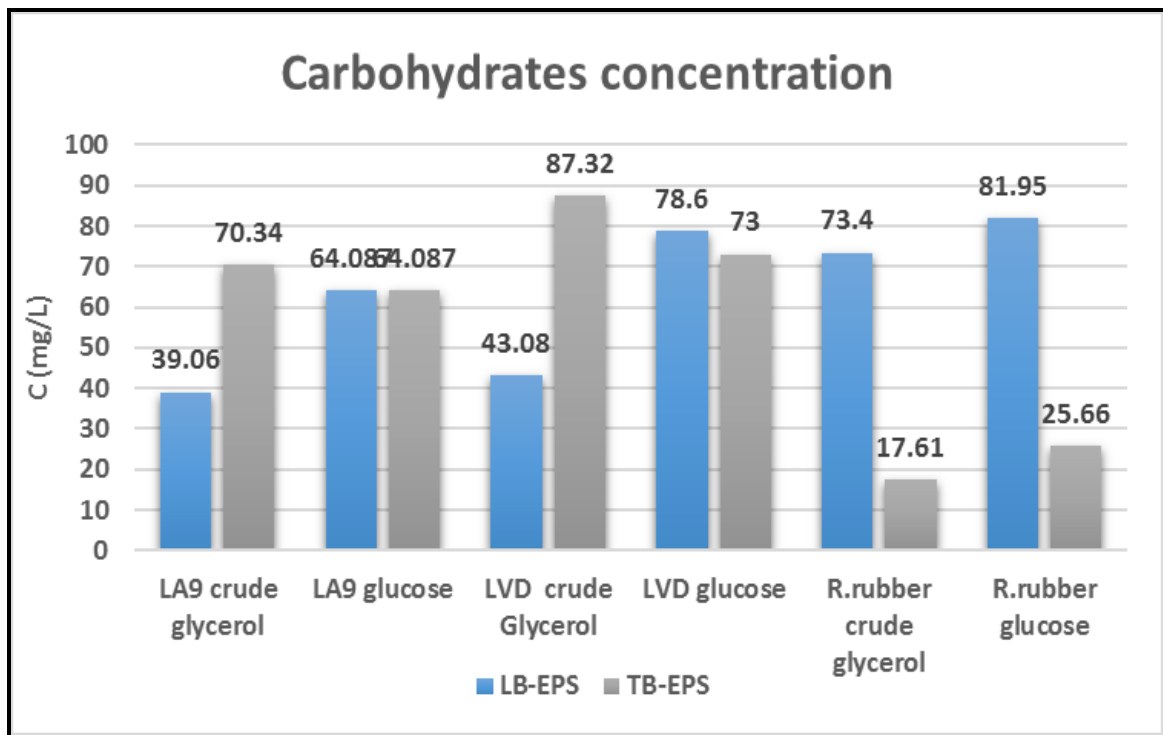
Διάγραμμα 14: Ποσοτικός προσδιορισμός ξηρής βιομάζας για 48h

3.3.4 ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ (Μέθοδος Lowry)



Διάγραμμα 15: Συγκέντρωση πρωτεϊνών στις 48h, σε TB-EPS και LB-EPS

3.3.5 ΣΑΚΧΑΡΑ



Διάγραμμα 16: Συγκέντρωση σακχάρων στις 48h, σε TB-EPS και LB-EPS

3.3.6 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

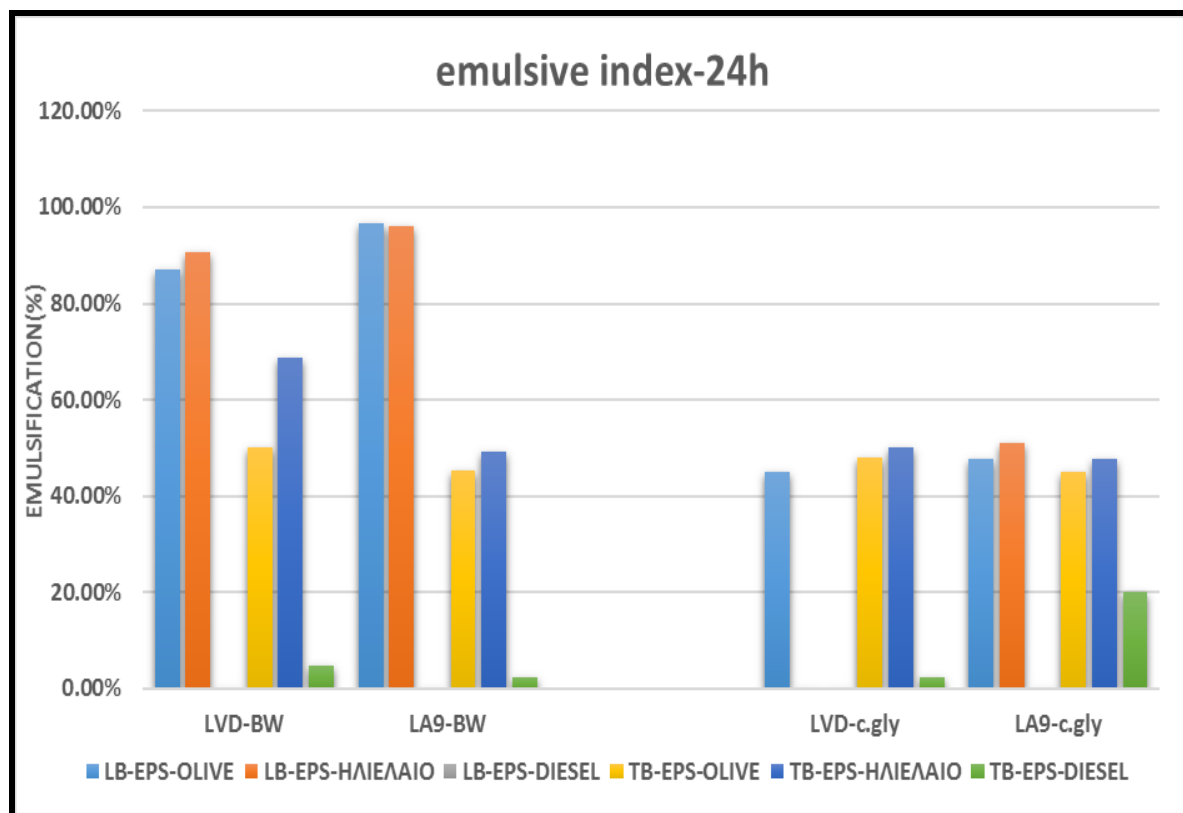
- Αναμφισβήτητα το απόβλητο της γλυκερόλης ακόμα και με τη χαμηλή συγκέντρωση που προστέθηκε είναι φανερά ανταγωνιστικό με την υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης ως υπόστρωμα
- Στο πείραμα αυτό παρατηρήθηκε μεγαλύτερη βιοκροκίδωση και γαλακτωματοποίηση για τα δύο υποστρώματα σε σχέση με τα προηγούμενα πειράματα
- Επίσης παρατηρείται υψηλή συγκέντρωση πρωτεϊνών και στα σάκχαρα στο στέλεχος LVD-10 που αναπτύχθηκε σε γλυκερόλη στα TB-EPS, η τιμή αυτή οφείλεται στη γλυκερόλη που κόλλησε πάνω στα EPS φαίνεται να είναι ο πιθανότερος λόγος
- Παρόλα αυτά οι τιμές είναι μέσα στα επιθυμητά όρια και συμπίπτουν μεταξύ τους

3.4 ΠΕΙΡΑΜΑ 4

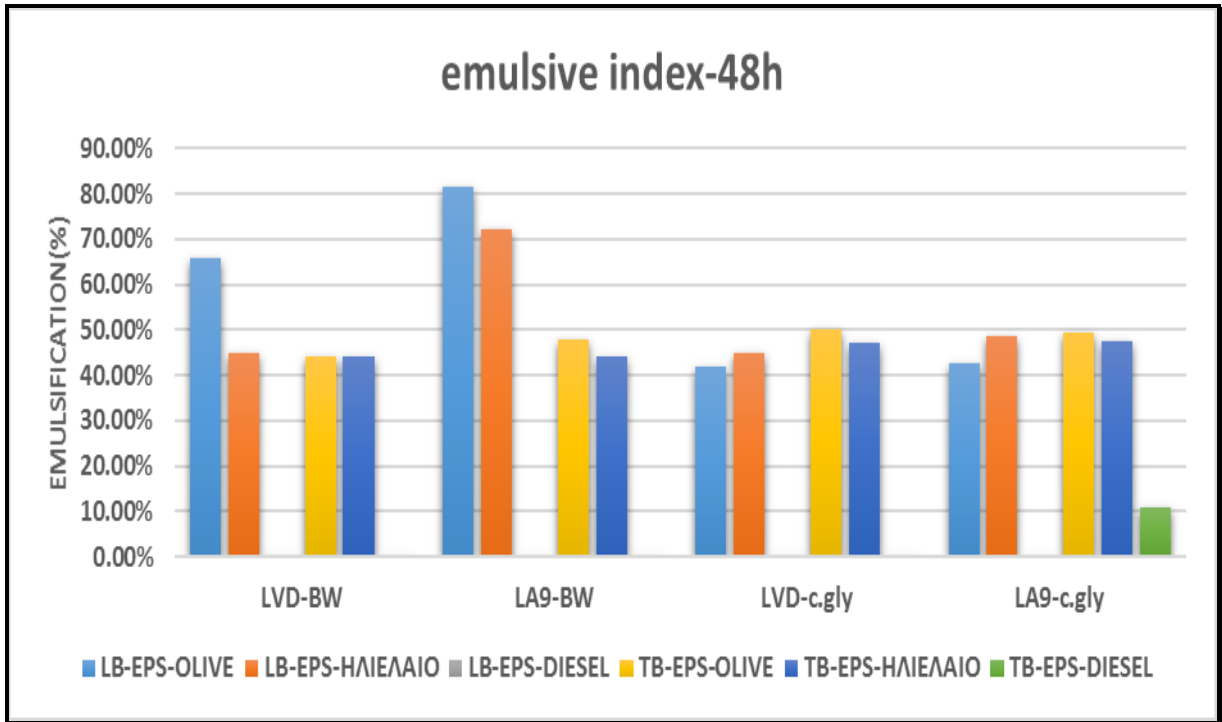
Το συγκεκριμένο πείραμα αφορά τους μικροοργανισμούς LVD-10 (*Pseudomonas aeruginosa*) και τον LA9 (*Enterobacter sp.*) οι οποίοι αναπύχθηκαν σε απόβλητο bilge waste water (BW) και crude glycerol 4,5% (v/v). Πάρθηκαν δείγματα για τις 24, 48 και 72 ώρες όπου έγινε εκχύλιση (Tightly bounds-eps, loosely bounds-eps) και ακολούθησαν τα διάφορα tests: Γαλακτωματοποίηση (TB-EPS και LB-EPS), Βιοκροκίδωση (TB-EPS), πρωτεϊνικό και υδατανθρακικό μέρος καθώς και ξηρό βάρος (g/L)

3.4.1 Γαλακτωματοποίηση

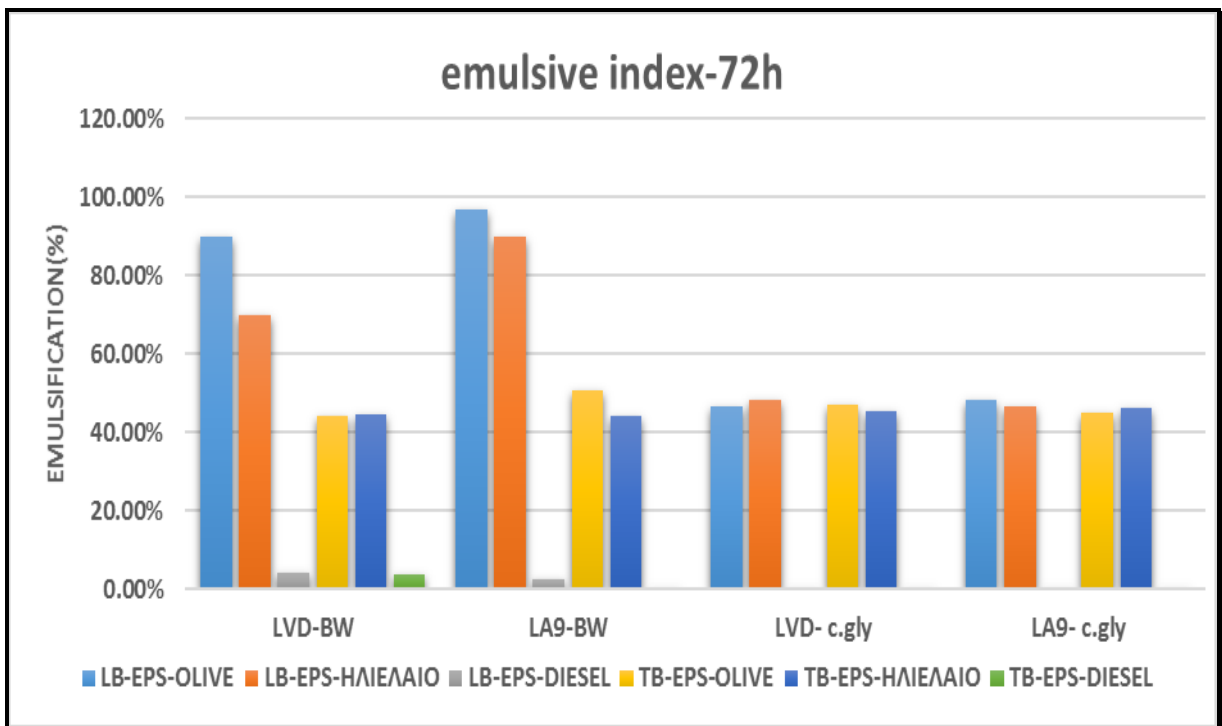
Για το προσδιορισμό γαλακτωματοποίησης, χρησιμοποιήθηκαν ως μέσα οργανικής φάσης, ελαιόλαδο, ηλιέλαιο και πετρέλαιο.



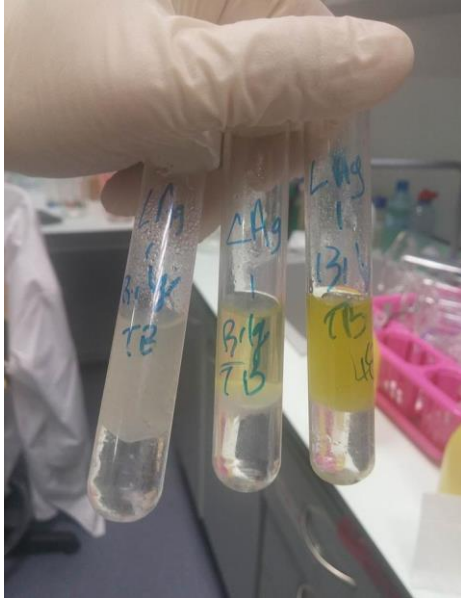
Διάγραμμα 17: γαλακτωματοποίηση (LVD-10, LA9), TB-EPS, LB-EPS, BW: bilge waste water, c.gly: crude glycerol, οργανική φάση:ελαιόλαδο,ηλιέλαιο, diesel,24h



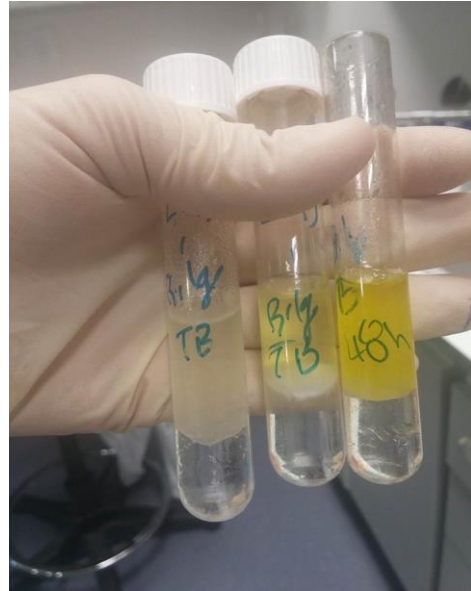
Διάγραμμα 18: Γαλακτωματοποίηση (LVD-10, LA9), TB-EPS, LB-EPS, BW: bilge waste water, c.gly: crude glycerol, οργανική φάση: ελαιόλαδο,ηλιέλαιο, diesel,48h



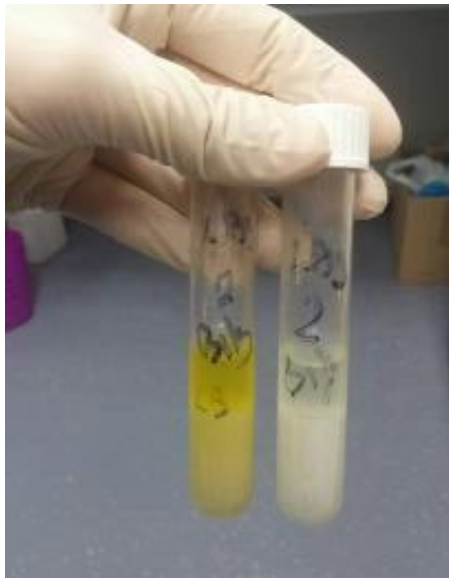
Διάγραμμα 19: Γαλακτωματοποίηση (LVD-10, LA9), TB-EPS, LB-EPS, BW: bilge waste water, c.gly: crude glycerol, οργανική φάση: ελαιόλαδο, ηλιέλαιο, diesel,72h



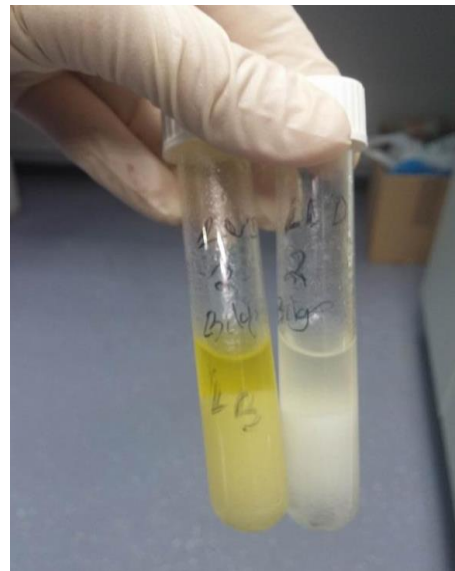
Εικόνα 12: Γαλάκτωμα LA9 (TB-EPS), σε bilge waste water, οργανική φάση ελαιόλαδο (δεξιά), πετρέλαιο (μέση), ηλιέλαιο (αριστερά)



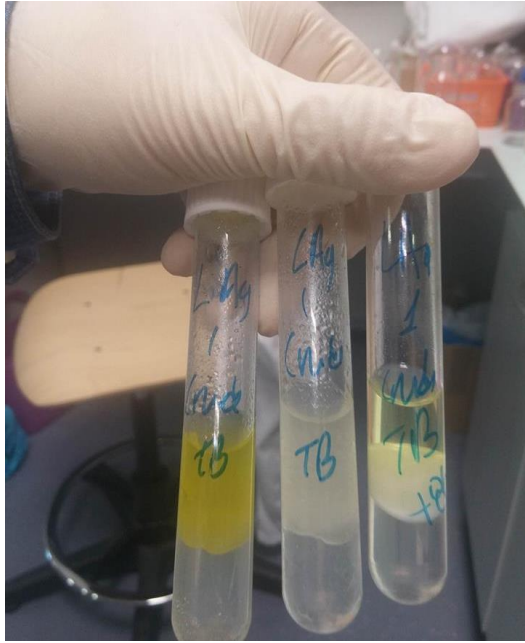
Εικόνα 13: Γαλάκτωμα LVD-10 (TB-EPS), σε bilge waste water, οργανική φάση ελαιόλαδο (δεξιά), πετρέλαιο (μέση), ηλιέλαιο (αριστερά)



Εικόνα 14: Γαλάκτωμα για LA9 (LB-EPS) ανεπτυγμένο σε bilge waste water, με οργανική φάση το ελαιόλαδο, (αριστερά) και ηλιέλαιο (δεξιά)



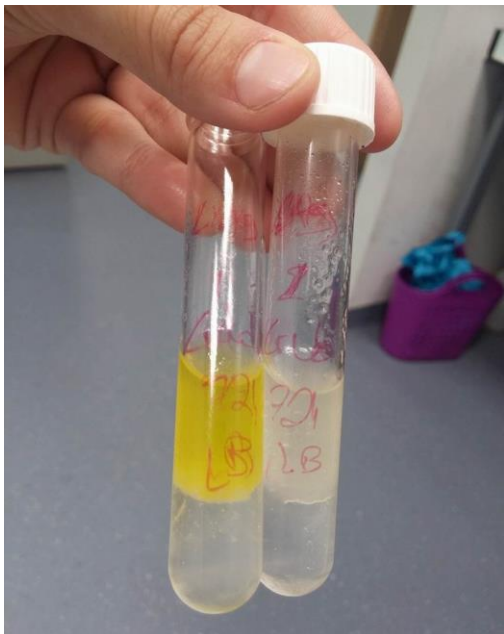
Εικόνα 15: Γαλάκτωμα για LVD-10 (LB-EPS) ανεπτυγμένο σε bilge waste water με οργανική φάση το ελαιόλαδο (αριστερά) και ηλιέλαιο (δεξιά)



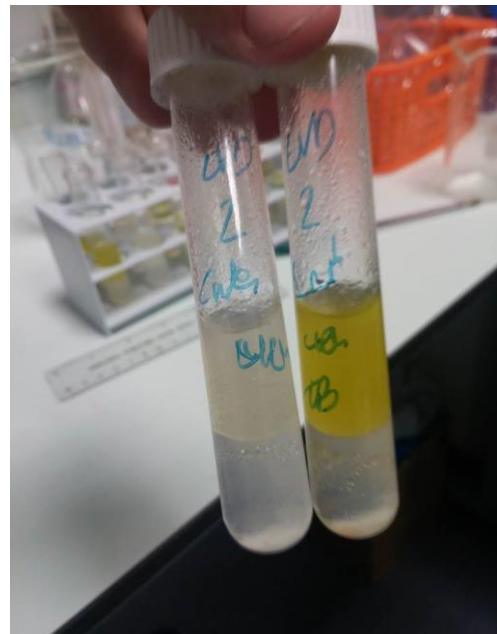
Εικόνα 17: Γαλάκτωμα LA9 (TB-EPS), ανάπτυξη σε crude glycerol, οργανική φάση, ελαιόλαδο (αριστερά), ηλιέλαιο (μέση), πετρέλαιο (δεξιά)



Εικόνα 16 : Γαλάκτωμα LVD-10 (TB-EPS), ανάπτυξη σε crude glycerol, οργανική φάση, ελαιόλαδο (δεξιά), ηλιέλαιο (αριστερά), πετρέλαιο (μέση)

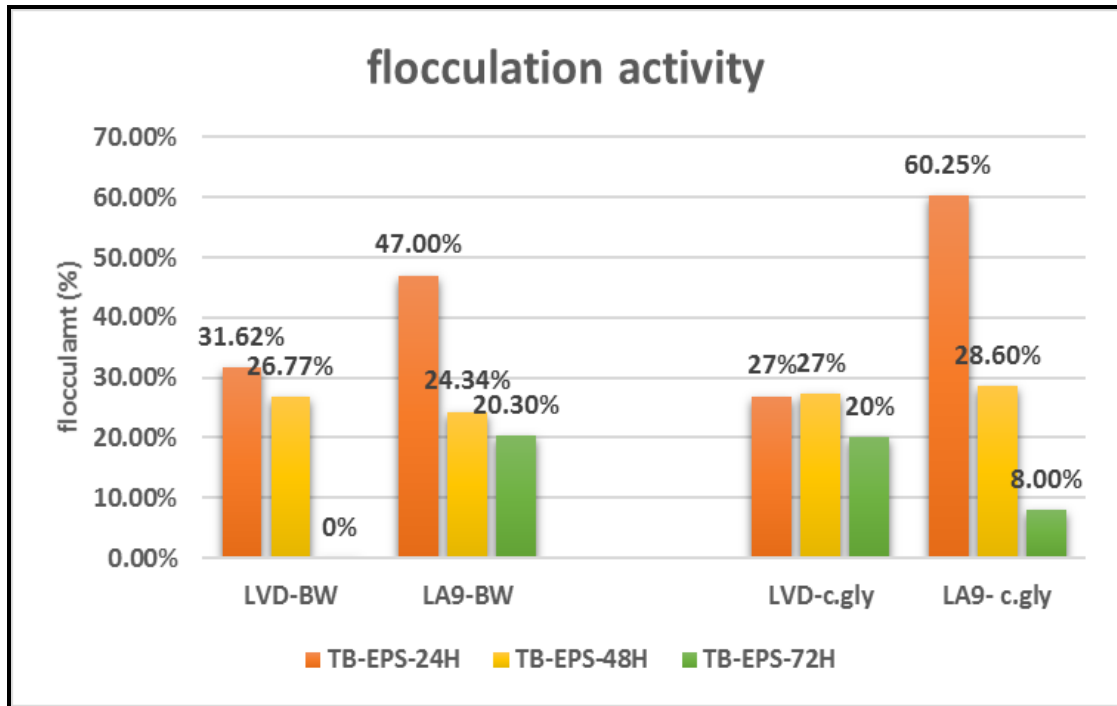


Εικόνα 19: Γαλάκτωμα LA9 (LB-EPS) ανάπτυξη σε crude glycerol, οργανική φάση, ελαιόλαδο (αριστερά), ηλιέλαιο (δεξιά)



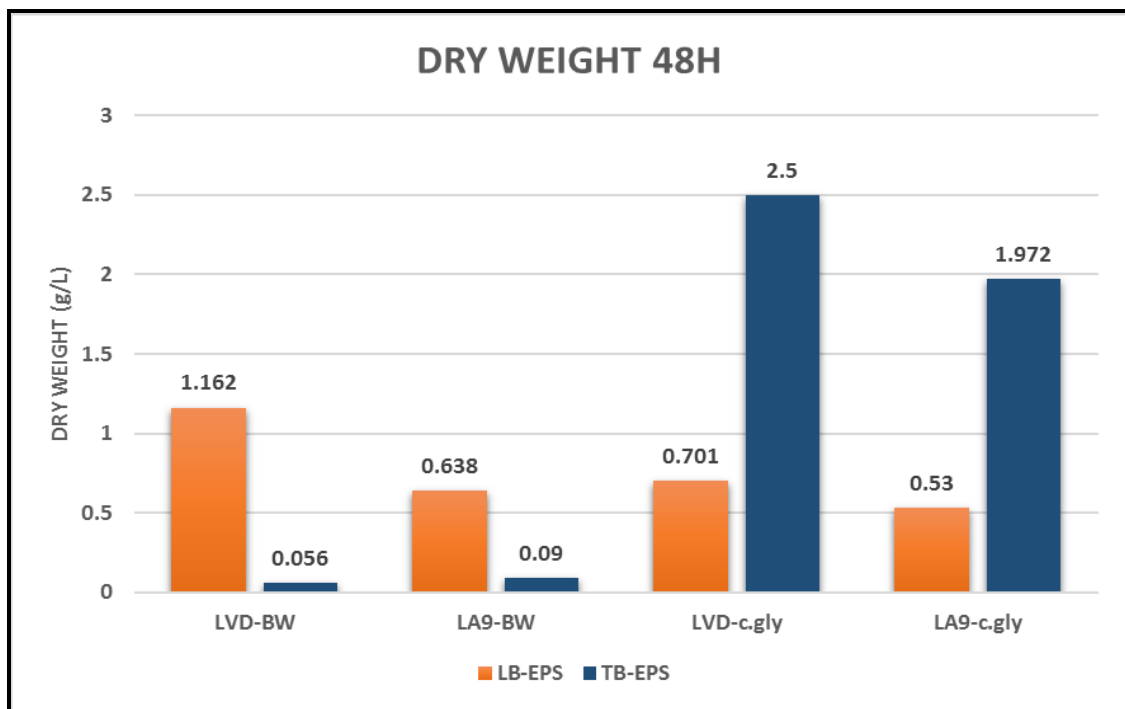
Εικόνα 18: Γαλάκτωμα LVD-10 (LB-EPS) ανάπτυξη σε crude glycerol, οργανική φάση, ελαιόλαδο (αριστερά), ηλιέλαιο (δεξιά)

3.4.2 Βιοκροκίδωση



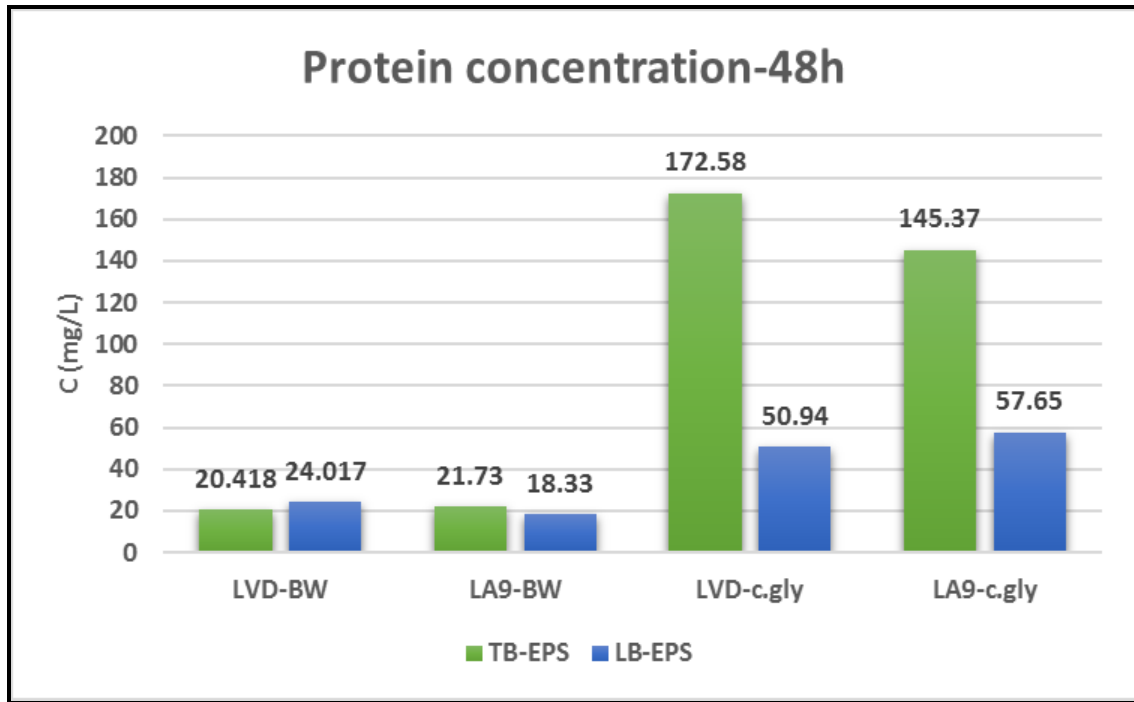
Διάγραμμα 20: βιοκροκίδωση 24h, 48, 72h, TB-EPS

3.4.3 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΞΗΡΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ



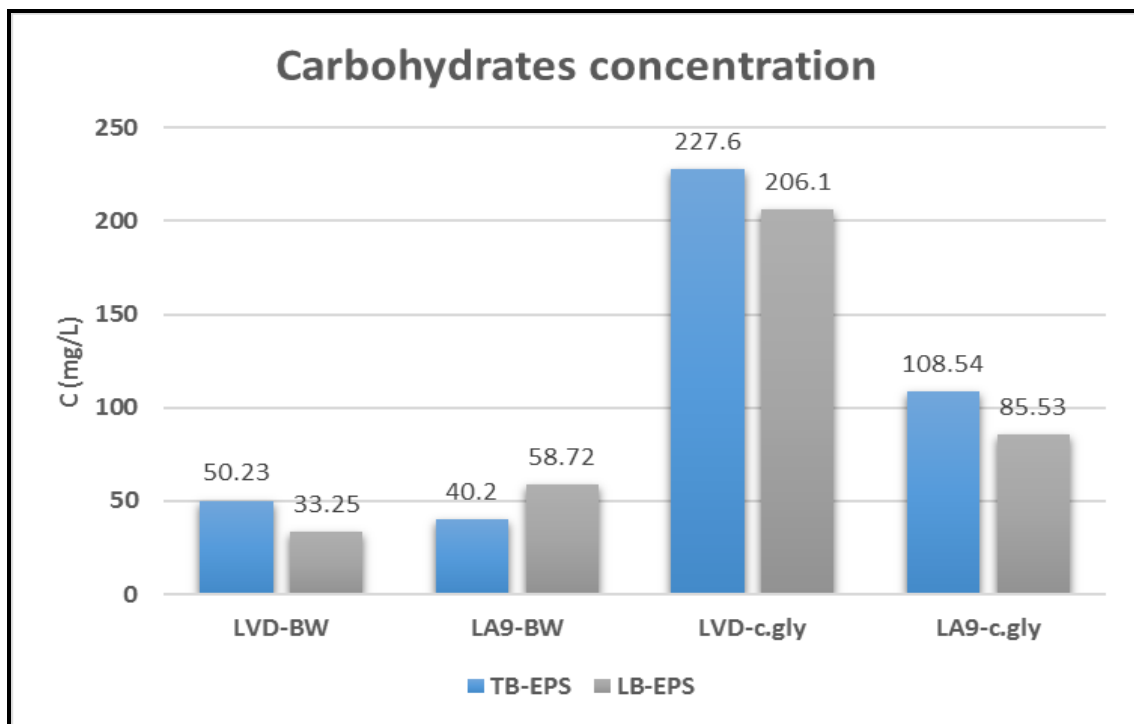
Διάγραμμα 21: ποσοτικός προσδιορισμός ξηρής βιομάζας, 48h, LB-EPS, TB-EPS

3.4.4 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ (Μέθοδος Comassie brilliant blue)



Διάγραμμα 22: Συγκέντρωση πρωτεϊνών, 48h, TB-EPS, LB-EPS

3.4.5 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΣΑΚΧΑΡΩΝ



Διάγραμμα 23: Συγκέντρωση σακχάρων 48h, TB-EPS, LB-EPS

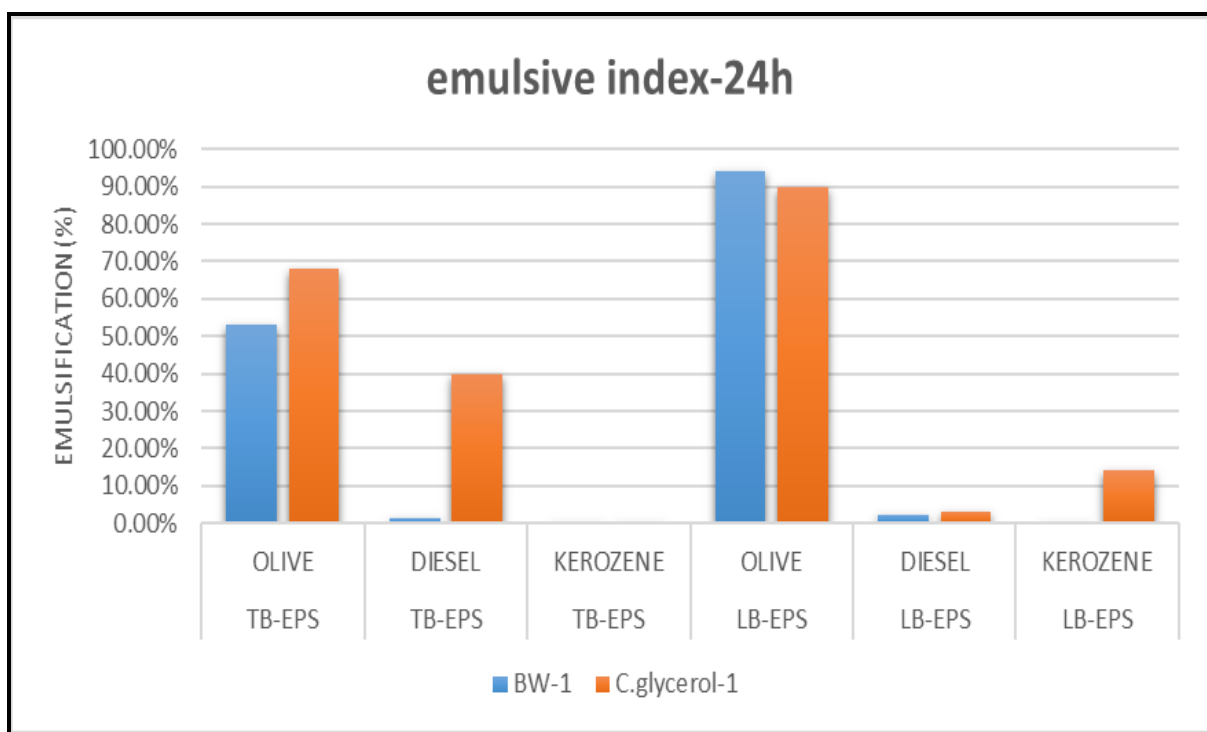
3.4.6 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

- Στο πείραμα αυτό παρατηρείται ότι το απόβλητο του bilge waste water παρουσιάζει πολύ καλά αποτελέσματα στους δυο αυτούς μικροοργανισμούς και στα πειράματα εξέτασης που διεξάχθηκαν, κυρίως όμως στο γαλακτωματοποίηση παρουσίασε πολύ υψηλά ποσοστά, σε σχέση με τη γλυκερόλη
- Όσον αφορά το ποσοτικό προσδιορισμό, τη συγκέντρωση πρωτεϊνών και σακχάρων, τα δείγματα που αναπτύχθηκαν σε απόβλητο γλυκερόλης είχαν τις υψηλότερες τιμές,.
- Επίσης τα ποσοστά ξηρής βιομάζας στο υπόστρωμα της γλυκερόλη για τα TB-EPS μάλλον προκύπτει στο γεγονός ότι η γλυκερόλη πιθανόν να κόλλησε στα κύτταρα και στα EPS. Παρόλα αυτά όμως συμπίπτει στα επιθυμητά πλαίσια που προσδιορίζει η βιβλιογραφία όσον αφορά τη ξηρή βιομάζα

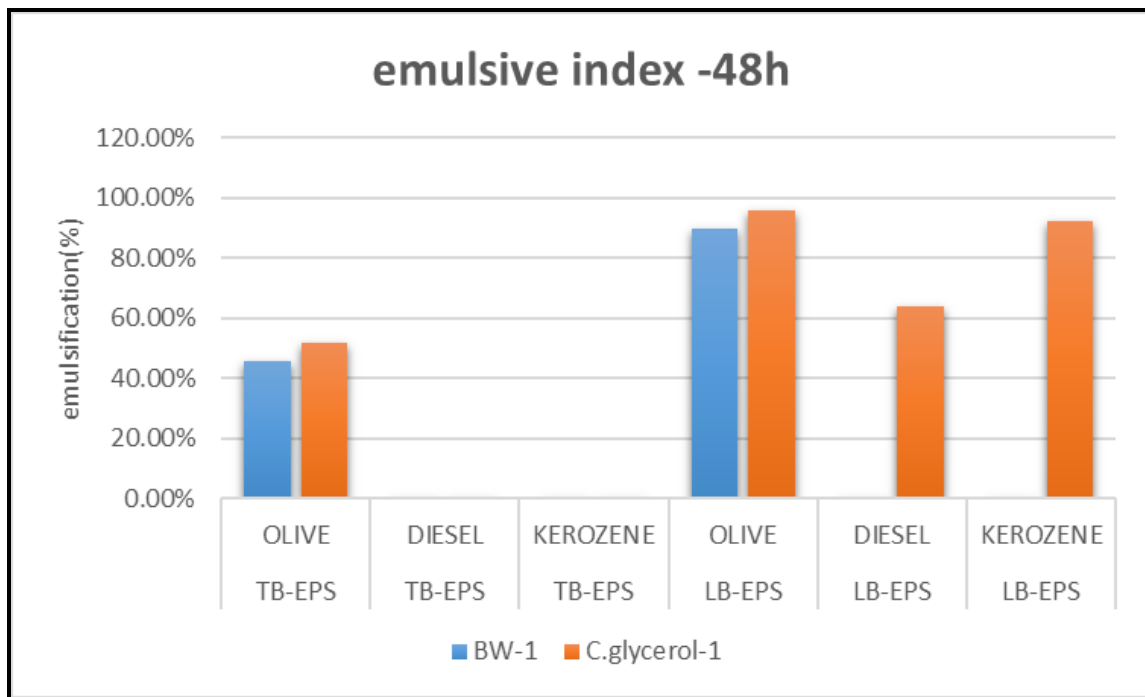
3.5 ΠΕΙΡΑΜΑ 5

Στο τελευταίο και καθόλου απροσπέλαστο πείραμα ελέγχθηκε ο μικροοργανισμός *Enterobacter* sp -D2. Ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός από προηγούμενα πειράματα έδειξε την ικανότητά του να παράγει EPS. Το απόβλητο ου Bilge waste water και της γλυκερόλης (4,5%) έδειξαν τα καλύτερα αποτελέσματα έτσι θα χρησιμοποιηθούν ως υποστρώματα ανάπτυξης του D2, εις διπλούν. αναπτύχθηκαν σε χρόνους 24h-72h, και πραγματοποιήθηκαν όλα τα test που αναφέρθηκαν και πιο πάνω. Να σημειωθεί εδώ ότι για το ποσοτικό προσδιορισμό ξηρής βιομάζας των EPS, τη συγκέντρωση πρωτεϊνών, και συγκέντρωση σακχάρων έγινε επανάληψη του πειράματος.

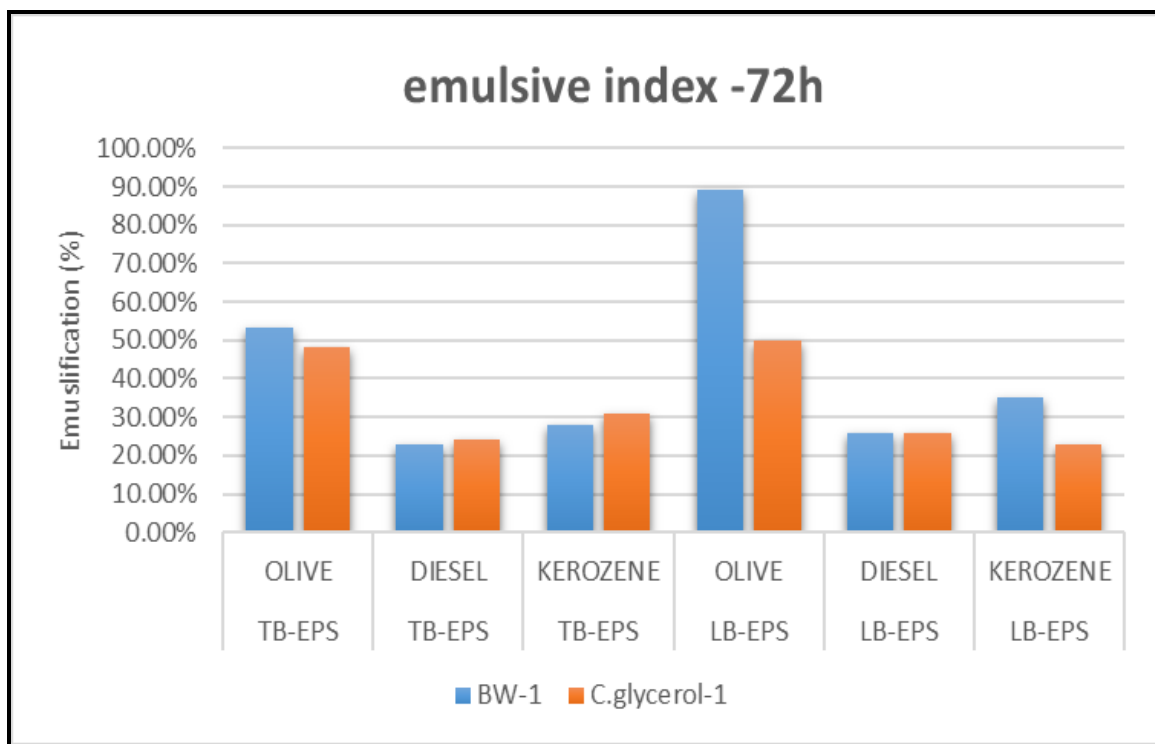
3.5.1 Γαλακτωματοποίηση



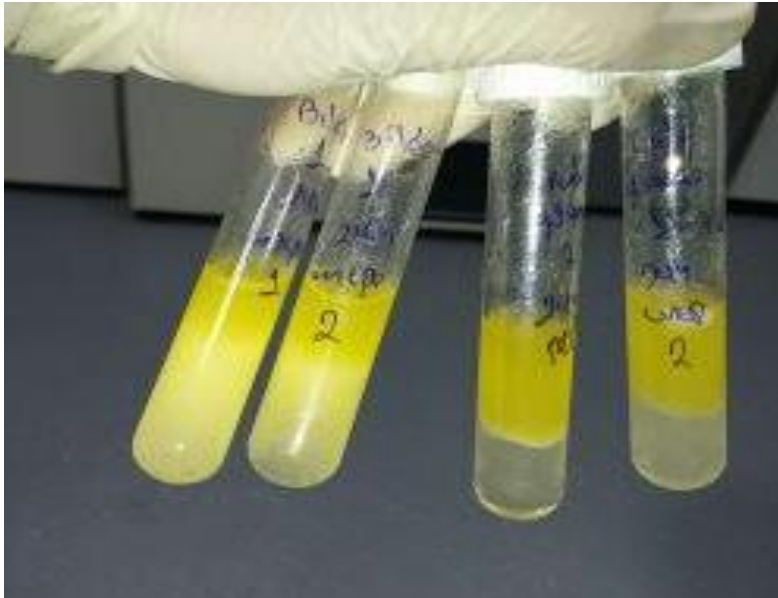
Διάγραμμα 24: D2, BW: bilge waste water, C.glycerol : crude glycerol, οργανική φάση: ελαιόλαδο, diesel, κηροζίνη, TB-EPS, LB-EPS, 24h



Διάγραμμα 25: Γαλακτωματοποίηση D2, BW: bilge waste water, C.glycerol: crude glycerol, οργανική φάση: ελαιόλαδο, diesel, κηροζίνη, TB-EPS, LB-EPS, 48h



Διάγραμμα 26: Γαλακτωματοποίηση D2, BW: bilge waste water, C.glycerol: crude glycerol, οργανική φάση: ελαιόλαδο, diesel, κηροζίνη, TB-EPS, LB-EPS, 72h



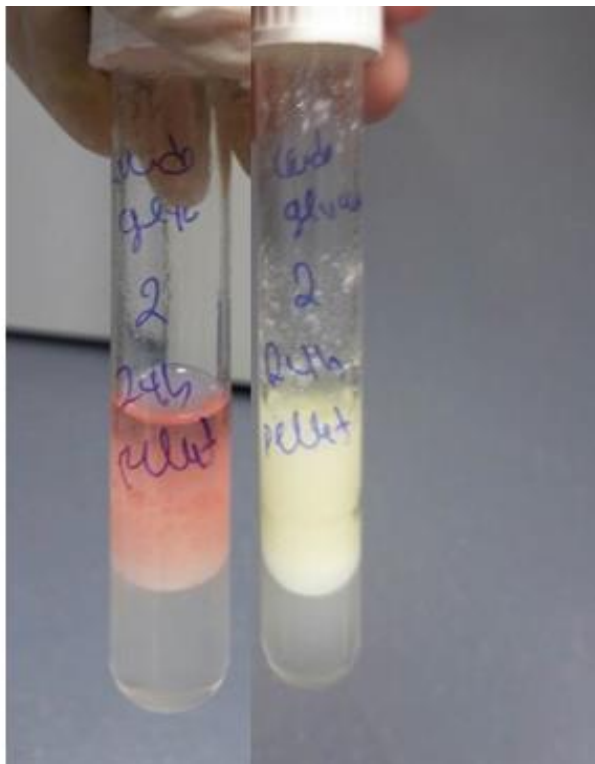
Εικόνα 20: Γαλακτωματοποίηση D2 (LB-EPS) bilge waste water (αριστερά), crude glycerol (δεξιά), οργανική φάση: ελαιόλαδο



Εικόνα 21: Γαλακτωματοποίηση D2 (LB-EPS), crude glycerol, οργανική φάση: κηροζίνη

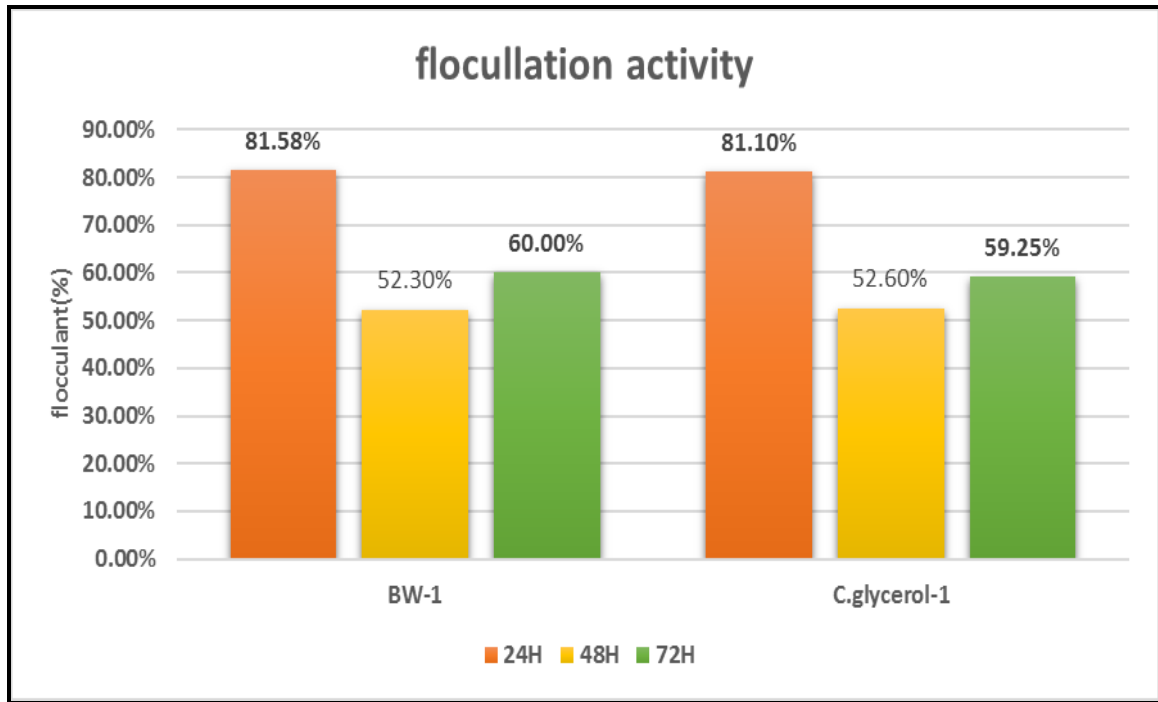


Εικόνα 22: Γαλακτωματοποίηση D2 (LB-EPS), crude glycerol, οργανική φάση: πετρέλαιο



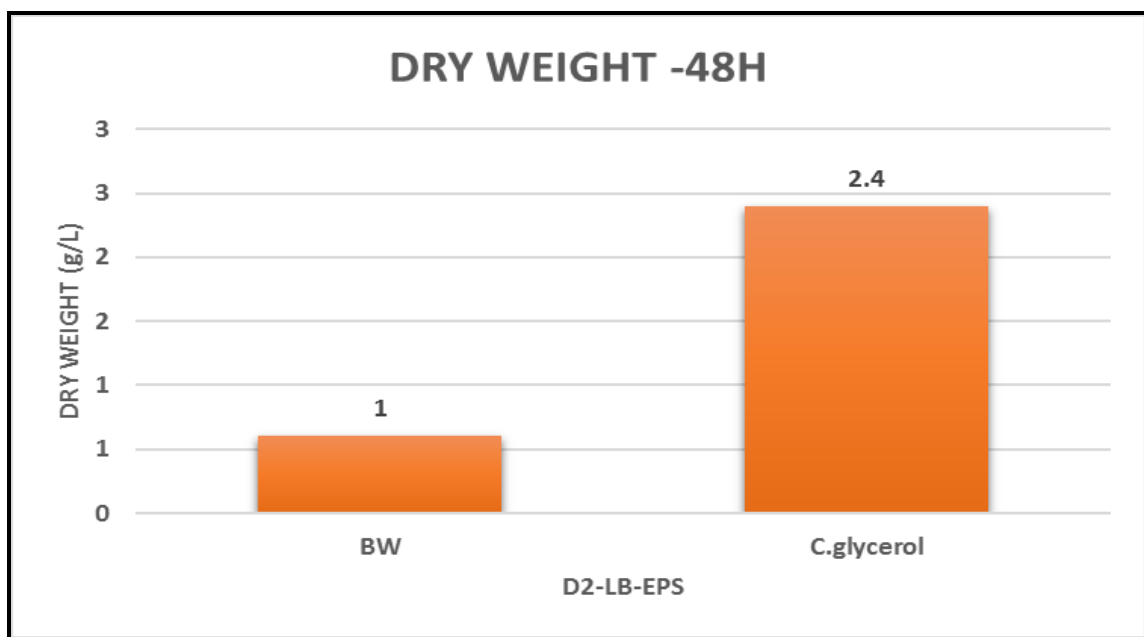
Εικόνα 23: Γαλακτωματοποίηση D2 (TB-EPS) crude glycerol, οργανική φάση: κηροζίνη (αριστερα), πετρέλαιο (δεξιά)

3.5.2 ΒΙΟΚΡΟΚΙΔΩΣΗ



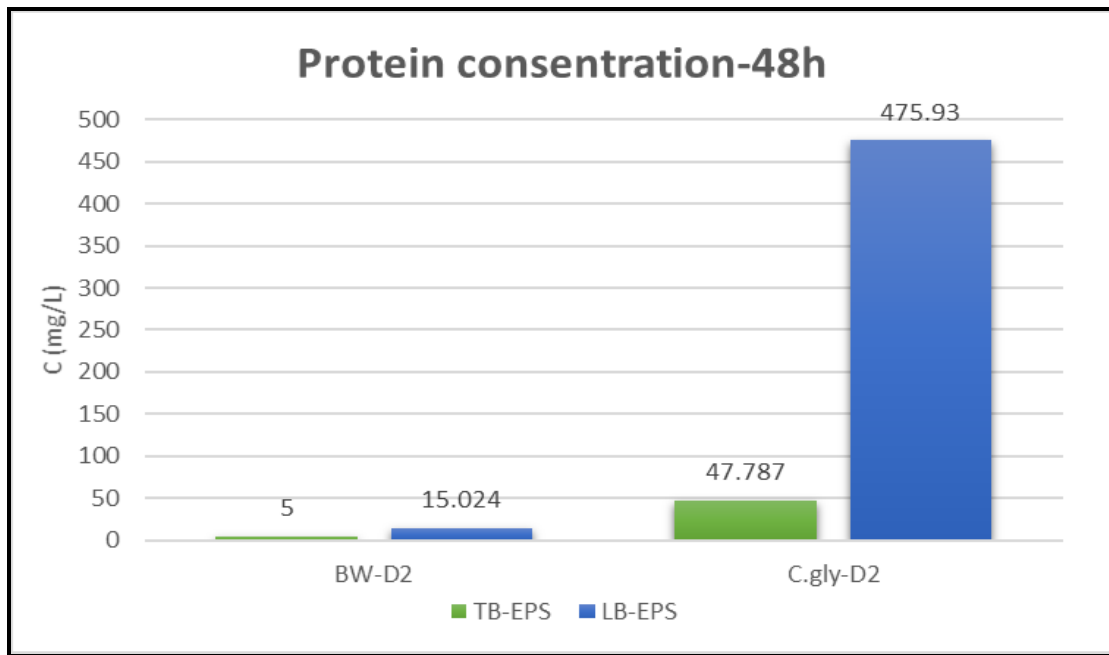
Διάγραμμα 27: Βιοκροκίδωση D2, BW: bilge waste water, C. glycerol: crude glycerol, TB-EPS, 24h, 48h, 72h

3.5.3 DRY WEIGHT



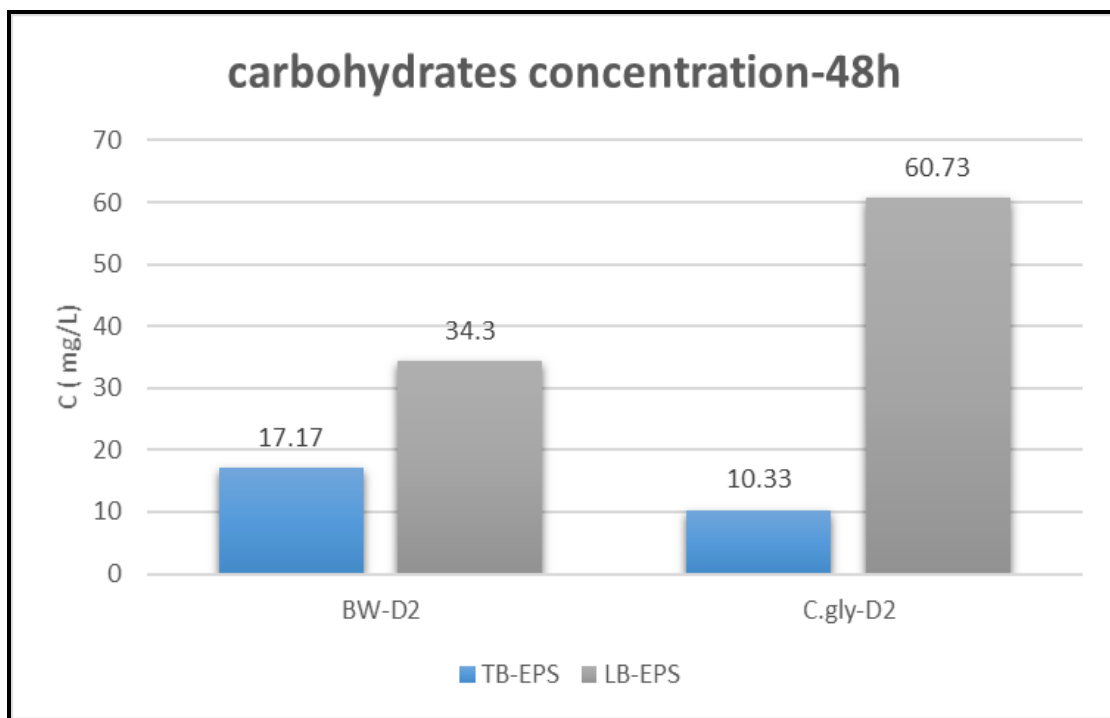
Διάγραμμα 28: ποσοτικός προσδιορισμός ξηρής βιομάζας, D2, BW: bilge waste water, C.glycerol: crude glycerol, LB-EPS, 48h

3.5.4 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ (Μέθοδος Commassie Brilliant Blue)



Διάγραμμα 29: Συγκέντρωση πρωτεϊνών D2, BW: bilge waste water, C.glycerol: crude glycerol, TB-EPS, LB-EPS, 48h

3.5.5 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΣΑΚΧΑΡΩΝ



Διάγραμμα 30: Συγκέντρωση σακχάρων D2, BW: bilge waste water, C. glycerol: crude glycerol, TB-EPS, LB-EPS, 48h

3.5.6 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

- Στο τελευταίο πείραμα παρατηρήθηκαν πολύ καλά αποτελέσματα, αφού ο D2 αποδεικτικέ πολύ αποδοτικός στη παραγωγή EPS.
- Όσον αφορά το γαλακτωματοποίηση το ελαιόλαδό ήταν το καλύτερο οργανικό και για τις 3 φάσεις και για τα δύο υποστρώματος. Σημαντική παρατήρηση ήταν στις 72 ώρες όπου δημιουργήθηκε γαλάκτωμα σε diesel και κηροζίνη, που όπως φάνηκε σε προηγούμενα πειράματα κανένας άλλος μικροοργανισμός δεν παρουσίασε αυτά τα αποτελέσματα
- Επίσης η βιοκροκίδω ήταν μέχρι 82% πράγμα που αποδεικνύει τον πιθανό σχηματισμό flocs
- Στο ποσοτικό προσδιορισμό η ποσότητα ήταν καλή
- Πρωτεΐνες και σάκχαρα : υπόστρωμα γλυκερόλης είχε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ/ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Για τη διεκπεραίωση των πειραμάτων και την εξαγωγή αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες μικροοργανισμών που υπήρχαν στο εργαστήριο και επιλέχθηκαν καθώς υπήρχαν αναφορές για αυτούς στη βιβλιογραφία ως προς τη παραγωγή εξωπολυσακχαριτών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα η επιλογή ήταν επιτυχής καθώς φάνηκε πως παράγονται EPS, γαλακτωματοποιητές και βιοκροκιδωτικά κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες και το κυριότερο στα επιθυμητά υποστρώματα. Ένας από τους στόχους της παρούσας εργασίας ήταν και η χρήση υποστρωμάτων ικανών να ευνοήσουν τη παραγωγή EPS και παράλληλα να είναι απόβλητα.

- Τα πρώτα αποτελέσματα έδειξαν ότι το υπόστρωμα της γλυκερόλης μπορούσε να ανταγωνιστεί το δημοφιλέστερο υπόστρωμα της γλυκόζης. Οι μικροοργανισμοί LA9, LVD-10 και D2 είχαν πολύ καλά αποτελέσματα όσον αφορά τη παραγωγή EPS αφού συγκρίθηκαν με εμπορικούς μικροοργανισμούς δείκτες. Έτσι για τη συνέχεια των πειραμάτων επιλέχθηκε ο LVD-10, LA9 και ο R.rubber ως δείκτης. Από τη μία η γαλακτωματοποίηση παρουσίασε αποτελέσματα της τάξης του 40-50% και από την άλλη η βιοκροκίδωση έφτασε σχεδόν το 80%. Ακολούθως πραγματοποιήθηκε χαρακτηρισμός των EPS ως προς την ύπαρξη πρωτεϊνών και σακχάρων. Τα αποτελέσματα ήταν αρκετά αποδοτικά καθώς οι συγκεντρώσεις ήταν εντός ορίων που πάρθηκαν από τη βιβλιογραφία.
- Στη συνέχεια αφού οι αποδόσεις των μικροοργανισμών αυτών (LVD-10, LA9) ήταν ενθαρρυντικές, χρησιμοποιήθηκε υψηλότερη συγκέντρωση αποβλήτου γλυκερόλης 4,5% (v/v) και επίσης έγινε εμβολιασμός των μικροοργανισμών για ανάπτυξη σε bilge waste water (100%) σε περιθώριο ωρών μέχρι 96 ώρες. Τα αποτελέσματα εδώ ήταν ακόμα καλύτερα και το σημαντικότερο ήταν ότι δημιουργήθηκε γαλάκτωμα και ήταν πιο εμφανή κυρίως στο bilge waste water. Οι τιμές των πρωτεϊνών, σακχάρων και ξηρής βιομάζας ήταν μέτριες προς υψηλές.
- Τελευταίο και σημαντικότερο πείραμα ήταν με τον *Enterobacter sp-D2* στα ίδια υποστρώματα με το προηγούμενο. Εδώ παρουσιάστηκε γαλάκτωμα σε οργανικές φάσης που προηγουμένως δεν έδειξαν κάτι τέτοιο όπως είναι η κηροζίνη και το

πετρέλαιο, το ελαιόλαδο είχε σταθερή γαλακτοματοποίηση. Η βιοκροκίδωση παρουσιάστηκε μέχρι και 80% πράγμα που αποδεικνύει την πιθανή δημιουργία flocs.

- Πέρα όπως από αυτά αντιμετωπίστηκαν προβλήματα όπως είναι η πυκνότητα της γλυκερόλης που πολλές φορές κολλούσε στα τοιχώματα και παρέμενε στα δείγματα. Μια λύση βελτιστοποίησης των πειραμάτων είναι η προεπεξεργασία του αποβλήτου της γλυκερόλης ή η χρήση εναλλακτικών μεθόδων εκχύλισης. Επιπλέον θα ήταν καλό να ήταν γνωστή η σύσταση του bilge waste water, ούτως ώστε να είναι γνωστές οι συνθήκες που παράγονται τα EPS, τα βιοκροκιδωτικά και οι γαλακτοματοποιεϊτές

Εν κατακλείδι ως μελλοντική έρευνα θα μπορούσε να θεωρηθεί η απομόνωση μικροοργανισμού όπως είναι ο D2 να αναπτυχθεί σε βελτιστοποιημένα και επεξεργασμένα υποστρώματα, όπως αυτά που προαναφέρθηκαν. Ακόμη μπορεί να γίνει μελέτη ανάπτυξης μικροοργανισμών και EPS σε βελτιστοποιημένες συνθήκες και παράλληλα μεγιστοποίηση παραγωγής EPS όπως pH, θερμοκρασία και συγκέντρωση υποστρώματος. Επιπλέον θα μπορούσαν να διεξαχθούν και άλλες μελέτες ποιοτικής και ποσοτικής ανάλυση παραγωγής EPS πέρα από τη γαλακτοματοποίηση και τη βιοκροκίδωση για παράδειγμα FTIR και HPLC αλλά και για το χαρακτηρισμό τους, με στόχο να παρθούν τα βέλτιστα αποτελέσματα. Τέλος θα ήταν καλό να πραγματοποιηθεί χαρακτηρισμός των EPS ως προς το είδος τους και η περαιτέρω εφαρμογή τους.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Bezawada, J. et al., 2013. Production of extracellular polymeric substances (EPS) by *Serratia* sp.1 using wastewater sludge as raw material and flocculation of the EPS produced. *Journal of Environmental Management*, 128, pp.83–91. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.04.039>.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), pp.248–254.
- Freitas, F. et al., 2014. Controlled production of exopolysaccharides from enterobacter A47 as a function of carbon source with demonstration of their film and emulsifying abilities. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(2), pp.641–657.
- Kambourova, M., Toksoy Oner, E. & Poli, A., 2015. *Chapter 15 - Exopolysaccharides from Prokaryotic Microorganisms—Promising Sources for White Biotechnology Processes*, Elsevier B.V. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63453-5.00017-3>.
- Liu, H. & Fang, H.H.P., 2002. Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges. *Journal of Biotechnology*, 95(3), pp.249–256.
- López, M.J., Moreno, J. & Ramos-Cormenzana, A., 2001. The effect of olive mill wastewaters variability on xanthan production. *Journal of Applied Microbiology*, 90(5), pp.829–835.
- Nievas, M.L. et al., 2005. Effect of pH modification on bilge waste biodegradation by a native microbial community. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 56(3), pp.151–157.
- Satpute, S.K. et al., 2010. Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. *Biotechnology Advances*, 28(4), pp.436–450. Available at:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.02.006>.

Sheng, G., Yu, H. & Li, X., 2010. Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems : A review. *Biotechnology Advances*, 28(6), pp.882–894. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.08.001>.

Zhang, P. et al., 2014. Composition of EPS fractions from suspended sludge and biofilm and their roles in microbial cell aggregation. *Chemosphere*, 117(1), pp.59–65. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.05.070>.

Basuvaraj, M., Fein, J. & Liss, S.N., 2015. Protein and polysaccharide content of tightly and loosely bound extracellular polymeric substances and the development of a granular activated sludge floc. *Water Research*, 82, pp.104–117. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2015.05.014>.

Calvo, C. et al., 2009. Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. Future prospects. *Science of the Total Environment*, 407(12), pp.3634–3640. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.07.008>.

Cheng, Y.S. et al., 2011. The impact of cell wall carbohydrate composition on the chitosan flocculation of *Chlorella*. *Process Biochemistry*, 46(10), pp.1927–1933. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2011.06.021>.

Donot, F. et al., 2012. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydrate Polymers*, 87(2), pp.951–962. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.083>.

Elkady, M.F. et al., 2011. *Bacillus mojavensis* strain 32A, a bioflocculant-producing bacterium isolated from an Egyptian salt production pond. *Bioresource Technology*, 102(17), pp.8143–8151. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.05.090>.

Freitas, F., Alves, V.D. & Reis, M. a M., 2011. Advances in bacterial exopolysaccharides: From production to biotechnological applications. *Trends in Biotechnology*, 29(8), pp.388–398.

- Gudiña, E.J. et al., 2012. Isolation and study of microorganisms from oil samples for application in Microbial Enhanced Oil Recovery. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 68, pp.56–64. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0964830512000030>.
- Li, P., Harding, S.E. & Liu, Z., 2001. Cyanobacterial Exopolysaccharides: Their Nature and Potential Biotechnological Applications. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 18(1), pp.375–404. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02648725.2001.10648020> [Accessed September 25, 2014].
- More, T.T. et al., 2014. Extracellular polymeric substances of bacteria and their potential environmental applications. *Journal of Environmental Management*, 144, pp.1–25. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301479714002503>.
- Nwodo, U.U., Green, E. & Okoh, A.I., 2012. Bacterial exopolysaccharides: Functionality and prospects. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(11), pp.14002–14015.
- Poli, A., Anzelmo, G. & Nicolaus, B., 2010. Bacterial exopolysaccharides from extreme marine habitats: production, characterization and biological activities. *Marine drugs*, 8(6), pp.1779–802. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2901825&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed September 25, 2014].
- Satpute, S.K. et al., 2010. Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. *Biotechnology Advances*, 28(4), pp.436–450.
- Torres, C. a V et al., 2012. Study of the interactive effect of temperature and pH on exopolysaccharide production by *Enterobacter* A47 using multivariate statistical analysis. *Bioresource Technology*, 119, pp.148–156. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.05.106>.