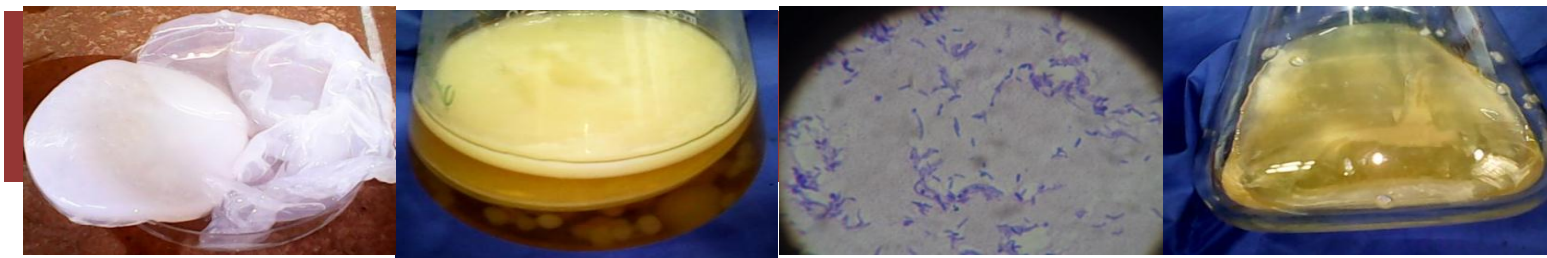




ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

«Παραγωγή βακτηριακής
κυτταρίνης από ανανεώσιμες
πρώτες ύλες της βιομηχανίας
τροφίμων και της βιομηχανίας
παραγωγής βιοντίζελ»



ΠΜΣ: Επιστήμη & Τεχνολογία Τροφίμων & Διατροφή του Ανθρώπου

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: Βιοδιεργασίες Τροφίμων και Βιοδιυλιστήρια

Ερμίντα Α. Τσούκο

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Κουτίνας Αποστόλης

Αθήνα 2014

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

«Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης από ανανεώσιμες πρώτες ύλες της βιομηχανίας τροφίμων και της βιομηχανίας παραγωγής βιοντίζελ»

Επιβλέπων καθηγητής: Κουτίνας Αποστόλης

Εξεταστική Επιτροπή: Κουτίνας Αποστόλης, Παπανικολάου Σεραφείμ, Μαντάλα Ιωάννα

Ερμίντα Λ. Τσούκο

Ευχαριστίες

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε στα εργαστήρια <<Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων>> και <<Μηχανικής και Επεξεργασίας Τροφίμων>> του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών στα πλαίσια του Π.Μ.Σ <<Επιστήμη & Τεχνολογία Τροφίμων & Διατροφή του Ανθρώπου>>. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους κυρίους Κουτίνα Αποστόλη και Παπανικολάου Σεραφείμ όπως και την κυρία Μαντάλα Ιωάννα για την ανάθεση αυτού του τόσο πρωτότυπου θέματος ως αντικείμενο της μεταπτυχιακής μου μελέτης. Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες στον κύριο Λαδάκη Δημήτρη για την πολύτιμη βοήθεια και στήριξή του καθόλη την διάρκεια της πορείας μου. Τέλος, επιθυμώ να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην υποψήφια διδάκτορα κα. Καχριμανίδου Βασιλική και τον μεταδιδάκτορα ερευνητή Δρ. Κοψαχείλη Νικόλαο που με βοήθησαν ουσιαστικά στην τελική διεκπεραίωση αυτής της μεταπτυχιακής μελέτης.

Περίληψη

Η κυτταρίνη είναι το πιο άφθονο βιοπολυμερές στη γη. Αποτελεί το κύριο συστατικό της φυτικής βιομάζας και μπορεί να παραχθεί μέσω μικροβιακής ζύμωσης ως εξωκυτταρικό πολυμερές. Λόγω των μοναδικών της ιδιοτήτων που είναι αποτέλεσμα της μικροϊνδιακής δομής της, η βακτηριακή κυτταρίνη έχει βρει πλήθος εφαρμογών στις βιομηχανίες χάρτου, κλωστοϋφαντουργίας και τροφίμων όπως και ως βιοϋλικό σε καλλυντικά και στην ιατρική.

Στην παρούσα εργασία αξιολογήθηκε η δυνατότητα παραγωγής μικροβιακής κυτταρίνης από ανανεώσιμες πρώτες ύλες προερχόμενες από διάφορα αγροβιομηχανικά υπολείμματα και από παραπροϊόντα ή υποπροϊόντα της βιομηχανίας τροφίμων καθώς και της βιομηχανίας βιοντίζελ. Πιο συγκεκριμένα, εξετάστηκε η προοπτική χρησιμοποίησης:

- ❖ στερεών αμυλοπρωτεϊνούχων αποβλήτων της βιομηχανία παραγωγής προϊόντων ζαχαροπλαστικής ως πηγή άνθρακα και αζώτου
- ❖ ακατέργαστης γλυκερόλης ως πηγή άνθρακα και υδρολυμάτων ηλιόπιτας ως πηγή αζώτου, και τα δύο προερχόμενα από την βιομηχανία παραγωγής βιοντίζελ

Τα παραπάνω απόβλητα με εξαίρεση την γλυκερόλη, μετατράπηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα για την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης, μέσω ενζυμικής υδρόλυσης με την χρήση ακατέργαστων ενζύμων (αμυλολυτικά και πρωτεολυτικά). Τα ακατέργαστα ένζυμα παρήχθησαν κατά την διάρκεια ζύμωσης στερεής κατάστασης από μύκητες του γένους *Aspergillus*.

Οι ζυμώσεις διαλείποντος έργου με το βακτηριακό στέλεχος *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM 15973 αρχικά διεξήχθησαν και μελετήθηκαν σε συνθετικά υποστρώματα που περιείχαν διάφορους μονοσακχαρίτες και δισακχαρίτες ως πηγές άνθρακα. Η ξυλόζη και η λακτόζη δεν μεταβολίστηκαν επαρκώς από το βακτηριακό στέλεχος οδηγώντας σε σχετικά χαμηλή παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης με αντίστοιχες συγκεντρώσεις 1,7 και 1,6 g/L. Στα υποστρώματα της γλυκόζης και της φρουκτόζης, παρήχθησαν αντίστοιχα 1,2 και 2 g/L βακτηριακής κυτταρίνης. Η μεγαλύτερη απόδοση βακτηριακής κυτταρίνης επιτεύχθηκε με την χρήση ακατέργαστης γλυκερόλης και σακχαρόζης με αντίστοιχες συγκεντρώσεις 3,2 g/L και 4,9 g/L.

Ακολούθησαν πειράματα έχοντας ως υπόστρωμα υδρολύματα ηλιαλεύρων ως πηγή αζώτου και λοιπών θρεπτικών συστατικών και ακατέργαστη γλυκερόλη ως πηγή άνθρακα και πειράματα έχοντας ως υποστρώμα υδρολύματα αμυλούχων προϊόντων ζαχαροπλαστικής. Ο συνδυασμός ακατέργαστης γλυκερόλης ως πηγή άνθρακα με υδρολύματα ηλιαλεύρων είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή 13,3 g/L βακτηριακής κυτταρίνης. Παρόμοια αποτελέσματα (13,05 g/L) προέκυψαν από τη χρήση υδρολυμάτων στερεών αποβλήτων προερχόμενα από γραμμές παραγωγής αμυλούχων προϊόντων ζαχαροπλαστικής (παιδικές τροφές). Το θρεπτικό αυτό υπόστρωμα ήταν ένα πλήρες θρεπτικό μέσο ζύμωσης που κάλυπτε τις ανάγκες του μικροοργανισμού σε άνθρακα, αζώτου και λοιπά θρεπτικά συστατικά.

Τέλος, αξιολογήθηκε η παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης με χρήση τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων αζώτου (350, 500, 700 mg/L) που περιέχεται στις ελεύθερες αμινομάδες πεπτιδίων και αμινοξέων (free amino nitrogen, FAN). Σύμφωνα με τα πειραματικά δεδομένα, η μικρότερη συγκέντρωση FAN, συντέλεσε στην μεγαλύτερη τιμή της βακτηριακής κυτταρίνης (3,2 g/L) έναντι των άλλων δύο.

Η βάση για όλες τις παραπάνω ζυμώσεις ήταν το μέσο καλλιέργειας Hestrin-Schramm (Hestrin and Schramm, 1954) και η διάρκειά τους ήταν 15 ημέρες.

Για να περιοριστεί το υψηλό κόστος της παραγωγής της βακτηριακής κυτταρίνης και να γίνει εφικτή η εμπορευματοποίησή της πρέπει να βελτιωθεί ο ρυθμός παραγωγής της βακτηριακής κυτταρίνης κατά την διάρκεια της ζύμωσης. Δεδομένου ότι η τιμή του υποστρώματος διαδραματίζει μείζονος σημασίας ρόλο για το κόστος παραγωγής της μικροβιακής κυτταρίνης, μέσω της παρούσας μελέτης παρουσιάζεται η δυνατότητα αξιοποίησης ανανεώσιμων πρώτων υλών χαμηλού ή και μηδενικού κόστους για τη βιομηχανική εφαρμογή της συγκεκριμένης βιοδιεργασίας.

Λέξεις κλειδιά: *Komagataeibacter sucrofermentans*, βακτηριακή κυτταρίνη, ανανεώσιμες πρώτες ύλες, βιοϋλικό, βιομηχανική εφαρμογή

Abstract

Cellulose is the most abundant biopolymer on earth. It is the main component of plant biomass, but it can also be produced as an extracellular metabolite through bacterial fermentation. Due to its unique properties and its microfibrillar structure, bacterial cellulose has found numerous applications in paper, textile and food industries as well as a biomaterial in cosmetics and medicine.

In the present study the possibility microbial cellulose production from renewable raw materials such as various agro-wastes and by-products of food industry and the biodiesel industry was evaluated. Specifically, it was evaluated the prospect of using :

1. flour- or starch-based solid wastes generated by a confectionery industry as carbon, nitrogen and other sources of nutrients
2. crude glycerol as carbon source and sunflower meal hydrolysates as nitrogen source, both generated from the biodiesel industry

These waste streams, besides glycerol, were bioconverted into a nutrient rich medium by enzymatic hydrolysis using crude enzymes (proteolytic and amylolytic). These crude enzymes were produced during solid state fermentation by fungi of the genus *Aspergillus*.

Batch fermentations with the bacterial strain *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM 15973 were initially performed in synthetic media using commercial sugars. Xylose and lactose were not well metabolized by the bacterial strain leading to rather low bacterial cellulose concentrations of 1,7 g/L and 1,6 g/L respectively. With respect to glucose and fructose, the bacterial cellulose concentrations were 1,2 and 2 g/L, respectively. The highest bacterial cellulose concentration was achieved by using crude glycerol (3,2 g/L) and commercial sucrose (4,9 g/L) as carbon sources.

The combination of crude glycerol as a carbon source together with sunflower meal hydrolysates as a source of nutrients, resulted in bacterial cellulose concentrations of 13,34 g/L. Similar results (13,05 g/L) were obtained by using hydrolysates produced from flour-rich waste streams generated by a confectionery industry as a complete fermentation medium.

The effect of different initial concentrations of FAN on bacterial cellulose production was also evaluated. The lowest FAN concentration resulted in the highest bacterial cellulose concentration (3,2 g/L) .

The basis for all fermentations was the culture medium Hestrin-Schramm (Hestrin and Schramm, 1954) and the duration of each fermentation was 15 days.

The results obtained through this study are promising for further investigation. However, substantial improvement in the fermentation strategy is required in order to improve significantly the productivity of bacterial cellulose and to reduce the processing costs. Taking into consideration that the cost of fermentation media significantly affects the production cost of bacterial cellulose, the possibility of utilizing industrial waste and by-product streams could lead to industrial implementation.

Key words: *Komagataeibacter sucrofermentans*, microbial cellulose, renewable raw materials, biomaterial, industrial implementation

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1 Μικροβιακά στελέχη που παράγουν κυτταρίνη.....	10
1.2 Βιοσύνθεση της μικροβιακής κυτταρίνης.....	11
1.3 Δομή της βακτηριακής κυτταρίνης.....	15
1.4 Ιδιότητες της βακτηριακής κυτταρίνης.....	18
1.5 Φυσιολογική λειτουργία της μεμβράνης κυτταρίνης.....	19
1.6 Εφαρμογές της BC.....	20
1.7 Παραγωγή μικροβιακής κυτταρίνης μέσω ζύμωσης.....	22
1.7.1 Επίδραση της πηγής άνθρακα.....	22
1.7.2 Επίδραση της πηγής αζώτου.....	23
1.7.3 Επίδραση της θερμοκρασίας.....	23
1.7.4 Επίδραση του pH.....	24
1.8 Ανανεώσιμες πρώτες ύλες ως θρεπτικά υποστρώματα για την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης.....	24
1.8.1 Συμβατική χρήση και εναπόθεση των γεωργικών υπολειμμάτων.....	25
1.8.2 Απόβλητα της βιομηχανίας βιοντίζελ.....	25
1.8.3 Απόβλητα βιομηχανίας ζαχαροπλαστικής.....	26
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	28
2.1 Αντιδραστήρια.....	28
2.2 Ζυμώσεις στερεής κατάστασης (Solid State Fermentation, SSF).....	28
2.2.1 Βιολογικό υλικό.....	28
2.2.2 Εμβόλιο για τις ζυμώσεις στερεής κατάστασης με τους <i>Aspergillus awamori</i> και <i>Aspergillus oryzae</i>	29
2.2.3 Ζύμωση στερεής κατάστασης του μύκητα <i>Aspergillus oryzae</i>	29
2.2.4 Ζύμωση στερεής κατάστασης του μύκητα <i>Aspergillus awamori</i>	30
2.3 Υδρολύσεις των θρεπτικών υποστρωμάτων.....	30
2.3.1 Θρεπτικά υποστρώματα για την πραγματοποίηση των υδρολύσεων.....	31
2.3.2 Υδρόλυση ηλιάλευρου προς παραγωγή θρεπτικού μέσου καλλιέργειας πλούσιο σε άζωτο.....	32
2.3.3 Υδρόλυση αμυλούχων υποστρωμάτων προς παραγωγή θρεπτικού μέσου καλλιέργειας πλούσιο σε άζωτο και γλυκόζη.....	33
2.4 Παράμετροι που αναλύθηκαν - Προετοιμασία των υδρολυμάτων για την χρήση τους σε πειράματα υγρών ζυμώσεων διαλείποντος έργου προς παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης...33	
2.5 Υγρές ζυμώσεις διαλείποντος έργου (batch) για παραγωγή μικροβιακής κυτταρίνης.....	34
2.5.1 Βιολογικό υλικό.....	34
2.5.2 Θρεπτικά υποστρώματα.....	36

2.5.3	Συνθήκες ανάπτυξης.....	37
2.5.4	Παραλαβή και καθαρισμός της μικροβιακής κυτταρίνης.....	37
2.5.5	Παράμετροι που εξετάστηκαν στα πειράματα υγρών ζυμώσεων διαλείποντος έργου προς παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης.....	37
2.6	Χημικές αναλύσεις.....	38
2.6.1	Προσδιορισμός Αζώτου των Ελεύθερων Αμινομάδων (FAN analysis)	38
2.6.2	Μέθοδος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)	39
2.6.3	Προσδιορισμός του ανόργανου φωσφόρου (Inorganic Phosphorus-IP).....	40
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	41
3.1	Αξιολόγηση πηγών άνθρακα ως προς την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης	41
3.2	Αξιολόγηση της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων αζώτου ως προς την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης	46
3.3	Αξιοποίηση πρωτεολυτικών ενζύμων για την υδρόλυση ηλιαλεύρων προς παραγωγή θρεπτικού μέσου καλλιέργειας.....	50
3.4	Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης αξιοποιώντας ακατέργαστη γλυκερόλη και υδρόλυμα ηλιάλευρου.....	51
3.5	Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης από αμυλούχο υδρόλυμα που προέρχεται από στερεά απόβλητα της εταιρείας ΓΙΩΤΗΣ.....	52
3.6	Παράθεση βιβλιογραφικών δεδομένων και σύγκριση των αποτελεσμάτων με εκείνα της παρούσας εργασίας	53
3.7	Χαρακτηρισμός της BC που προέκυψε από τα διάφορα υποστρώματα.....	55
4.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	60
5.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	62

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η κυτταρίνη είναι το πιο άφθονο βιοπολυμερές στη γη. Αποτελεί το κύριο συστατικό της φυτικής βιομάζας, αλλά και έναν εκπρόσωπο των μικροβιακών εξωκυτταρικών πολυμερών (ομοπολυσακχαρίτης). Η βακτηριακή κυτταρίνη (bacterial cellulose-BC) ανήκει στην κατηγορία των προϊόντων του πρωτογενούς μεταβολισμού και λειτουργεί ως μια προστατευτική μεμβράνη, ενώ η φυτική κυτταρίνη (PC) έχει δομικό ρόλο.

Η πιο γνωστή και παλιά εφαρμογή της βακτηριακής κυτταρίνης είναι η χρήση της ως πρώτη ύλη για την παραγωγή του nata-de-coco, ένα γηγενές επιδόρπιο που παράγεται στις Φιλιππίνες. Για την παραγωγή του προϊόντος αυτού, φύλλα από τζελ κυτταρίνης πάχους 1 cm τα οποία έχουν υποστεί ζύμωση με νερό καρύδας κόβονται σε κύβους και βυθίζονται σε σιρόπι ζάχαρης. Η ευρύτερη εφαρμογή του πολυσακχαρίτη εξαρτάται από το μέγεθος και το κόστος της παραγωγής. Ως εκ τούτου, η βασική έρευνα που πραγματοποιείται έχει ως στόχο στην βελτίωση των μικροβιακών στελεχών που παράγουν βακτηριακή κυτταρίνη όπως και στην βελτίωση της διαδικασίας παραγωγής.

Τα πιο αποδοτικά μικροβιακά στελέχη για την παραγωγή της μικροβιακής κυτταρίνης είναι τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια που παράγουν οξικό οξύ, όπως το βακτήριο *Acetobacter xylinum* (*Gluconacetobacter xylinus*, Yamada et al. 1997; Yamada, 2000), τα οποία έχουν καθιερωθεί ως μικροοργανισμοί-πρότυπα για βασική και εφαρμοσμένη έρευνα στην παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης λόγω της ικανότητάς τους να παράγουν σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις του πολυμερούς από ένα ευρύ φάσμα πηγών άνθρακα και αζώτου. Ένα από τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά της BC είναι η χημική της καθαρότητα που την διακρίνει από την φυτική, η οποία συνδέεται με ημικυτταρίνες και λιγνίνη, η απομάκρυνση των οποίων είναι δύσκολη.

Ο μοριακός τύπος της BC και της PC είναι ο ίδιος $(C_6H_{10}O_5)_n$ αλλά αυτά τα δύο είδη κυτταρίνης διαφέρουν ως προς τις φυσικές και χημικές τους ιδιότητες. Η πρώτη προτιμάται έναντι της δεύτερης, λόγω του υψηλότερου βαθμού πολυμερισμού και δείκτη κρυσταλλικότητας, της υψηλότερης αντοχής σε δυνάμεις εφελκυσμού και της μεγαλύτερης ικανότητα συγκράτησης νερού. Λόγω αυτών των ιδιοτήτων, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε διάφορους τομείς, όπως στην βιομηχανία κλωστοϋφαντουργίας, χάρτου, τροφίμων (σταθεροποιητής), ως βιοϋλικό σε

καλλυντικά και στην ιατρική, στην επεξεργασία αποβλήτων (πρώτη ύλη), στην τεχνολογία ήχου (μεμβράνη ηχητικής μεταγωγής) και στα ορυχεία (ανάκτηση μετάλλων και πετρελαίου). Τα ινίδια βακτηριακής κυτταρίνης είναι περίπου 100 φορές λεπτότερα από εκείνα της PC καθιστώντας το ένα εξαιρετικά πορώδες υλικό, το οποίο επιτρέπει τη μεταφορά αντιβιοτικών ή άλλων φαρμάκων εντός του τραύματος ενώ ταυτόχρονα χρησιμεύει ως φυσικό εμπόδιο σε εξωτερικές μολύνσεις. Ως εκ τούτου, χρησιμοποιείται εκτενώς στην επούλωση πληγών.

Αν και η σύνθεση ενός εξωκυτταρικού ζελατινώδους στρώματος από το βακτήριο *A. xylinum* αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1886 από τον A. J. Brown, η BC προσέλκυσε το ουσιαστικό ενδιαφέρον της ερευνητικής κοινότητας το δεύτερο μισό του 20^{ου} αιώνα.. Εντατικές μελέτες με πρότυπο το *A. xylinum*, ξεκίνησαν από τους Hestrin et al. (1954) οι οποίοι απέδειξαν ότι ο μικροοργανισμός υπό στατικές συνθήκες και σε λυοφιλωμένη μορφή συνθέτει κυτταρίνη παρουσία γλυκόζης και οξυγόνου. Στη συνέχεια, ο Colvin (1957) ανίχνευσε δημιουργία κυτταρίνης σε δείγματα που περιείχαν εκχύλισμα ελεύθερων κυττάρων του *A. xylinum*, γλυκόζη, και ATP.

1.1 Μικροβιακά στελέχη που παράγουν κυτταρίνη

Η κυτταρίνη παράγεται από μύκητες, βακτήρια και φύκη . Στα πράσινα άλγη, η κυτταρίνη, οι ξυλάνες ή οι μαννάνες παίζουν τον ρόλο δομικών πολυσακχαριτών των κυτταρικών τοιχωμάτων. Κυτταρίνη έχει βρεθεί, αν και σε μικρές ποσότητες, σε όλα τα καφέ φύκια (*Phaeophyta*), στα περισσότερα κόκκινα φύκη (*Rhodophyta*) και στα περισσότερα χρυσά φύκη (*Chrysophyta*). Η παρουσία της έχει επίσης αναφερθεί σε μερικούς μύκητες, υπό την μορφή εσωτερικού κυτταρικού τοιχώματος, συνήθως αποτελούμενη από μονάδες D-γλυκάνης συνδεδεμένες με β -(1 \rightarrow 3) και β -(1 \rightarrow 6) γλυκοζιτικούς δεσμούς. Στους μύκητες του γένους *Oomycetes*, η χιτίνη έχει αντικατασταθεί από κυτταρίνη και αντιπροσωπεύει περίπου το 15% της ξηρής μάζας του κυτταρικού τοιχώματος. Επίσης η κυτταρίνη παράγεται από Gram-αρνητικά βακτήρια που ανήκουν στα γένη: *Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Achromobacte*, *Aerobacter*, *Sarcina*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Salmonella* και *Alcaligenes* (Jonas και Farah, 1998) και από το Gram-θετικό βακτήριο *Sarcina ventriculi*, αποτελώντας το 15 % της συνολικής μάζας του. Οι πιο αποτελεσματικοί

παραγωγοί της κυτταρίνης είναι το *A. xylinum*, το *A. hansenii* και το *A. Pasteurianus*. (Chawla et al.2009)

Το βακτήριο *A. xylinum* έχει καθιερωθεί ως μικροοργανισμός-μοντέλο για τη βασική και εφαρμοσμένη μελέτη επί της κυτταρίνης. Ο μικροοργανισμός είναι υποχρεωτικά αερόβιος και ανήκει στα Gram-αρνητικά βακτήρια. Είναι βάκιλος που αποτελείται από μη κινητικά ραβδία, μεγέθους $0,5-0,8 \times 1-3 \mu\text{m}$. Οι αποικίες είναι λευκές κρεμώδεις και λείες. Οξειδώνει το οξικό και το γαλακτικό άλας σε διοξείδιο του άνθρακα και νερό και παράγει οξικό οξύ από αιθανόλη. Αναπτύσσεται παρουσία 0,35 % (v/v) οξικού οξέος. Το αμμωνιακό άζωτο είναι γενικά αφομοιώσιμο σε υπόστρωμα D-μαννιτόλης. Παρατηρείται παραγωγή διυδροξυακετόνης σε υπόστρωμα γλυκερόλη, 2-κετο-D- γλυκονικού άλατος ή/και 5-κετο-D- γλυκονικού άλατος σε υπόστρωμα D-γλυκόζης. Αντίστοιχα οξέα παράγονται από D-γλυκόζη, D-γαλακτόζη, D-ξυλόζη, L-αραβινόζη και αιθανόλη, αλλά όχι από την D- φρουκτόζη, L-σορβόζη, D-μαννιτόλη, D-σορβιτόλη, μαλτόζη ή λακτόζη. Η σύνθεση των βάσεων του DNA είναι 55,8– 63,4 mol % G+C. (Chawla et al.2009)

Είναι σημαντικό να εφαρμοστούν τεχνικές συντήρησης του μικροοργανισμού οι οποίες να εξασφαλίζουν την επαναληψιμότητα της διεργασίας παραγωγής κυτταρίνης καθώς και την μείωση του χρόνου προετοιμασίας. Επίσης, οι τεχνικές αυτές πρέπει να παρέχουν υψηλά ποσοστά επιβίωσης στα κύτταρα και δεν θα πρέπει να έχουν καμία επίδραση στον μεταβολισμό των μικροβιακών κυττάρων ούτε στη διαμόρφωση της δομής της κυτταρίνης. Κάποιες από τις τεχνικές που χρησιμοποιούνται είναι η κατάψυξη σε εναιώρημα με τη χρήση γλυκερόλης, διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO) ή αποκορυφωμένου γάλακτος ως προστατευτικοί παράγοντες και ξήρανση σε σταγόνες ζελατίνης. Η πιο αποτελεσματική μέθοδος είναι η χρήση DMSO (Chawla et al. 2009).

1.2 Βιοσύνθεση της μικροβιακής κυτταρίνης

Η σύνθεση της BC από το βακτήριο *A. xylinum* που συμβαίνει κατά την εκθετική φάση της ανάπτυξής (Freitas et al. 2011), είναι μια διαδικασία πολλαπλών σταδίων, ρυθμιζόμενη από μεγάλο αριθμό ενζύμων και από σύμπλοκα καταλυτικών και ρυθμιστικών πρωτεϊνών, των οποίων η υπερμοριακή δομή δεν είναι ακόμη σαφώς καθορισμένη.

Η διαδικασία περιλαμβάνει τη σύνθεση της ουριδίνης της διφωσφογλυκόζης (UDP-Glc), η οποία είναι πρόδρομη ένωση σχηματισμού της κυτταρίνης, ακολουθούμενη από τον πολυμερισμό της γλυκόζης σε β(1→4) αλυσίδες γλυκάνης και σύνδεσή τους σε μια πλεγματοειδή δομή.

Η μεταβολική οδός που ακολουθεί το βακτήριο *A. xylinum* για να συνθέσει κυτταρίνη, η οποία αποτελεί τελικό προϊόν του μεταβολισμού του άνθρακα, εξαρτάται από την φυσιολογική κατάσταση του κυττάρου και περιλαμβάνει είτε τον κύκλο των φωσφορικών πεντοζών για την οξειδωση των υδατανθράκων ή τον κύκλο του Krebs σε συνδυασμό με γλυκονογένεση για την οξειδωση των οργανικών οξέων ή άλλων παρεμφερών συστατικών (Σχήμα 1-1). Το μεταβολικό μονοπάτι της γλυκόλυσης δεν λαμβάνει χώρα στα οξικο-παραγωγά βακτήρια δεδομένου ότι δεν συνθέτουν το κρίσιμο ένζυμο αυτής της οδού, την φωσφο-φρουκτο-κινάση (EC 2.7.1.56). Στο βακτήριο *A. xylinum* η σύνθεση της κυτταρίνης είναι στενά συνδεδεμένη με καταβολικές διεργασίες οξειδωσης ενώ δεν εμπλέκεται με άλλες αναβολικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της πρωτεϊνοσύνθεσης. Κατά την σύνθεση της BC καταναλώνεται το 10% της ενέργειας που προέρχεται από τις καταβολικές αντιδράσεις.

Ενώσεις του άνθρακα, όπως εξόζες, γλυκερόλη, διυδροξυακετόνη, πυροσταφυλικό οξύ και διάφορα δικαρβοξυλικά οξέα μετατρέπονται από το *A. xylinum* σε κυτταρίνη, συνήθως με 50% απόδοση. Οι τελευταίες ενώσεις εισέρχονται στον κύκλο του Krebs και λόγω αποκαρβοξυλίωσης του οξαλοξικού οξέος σε πυροσταφυλικό οξύ υφίστανται μετατροπή σε εξόζες μέσω της γλυκονογένεσης, όπως συμβαίνει και με την γλυκερόλη, διυδροξυακετόνη και άλλα ενδιάμεσα του κύκλου των φωσφοπεντοζών (Σχήμα 1-1).

Το κρίσιμο ένζυμο στην κυτταρινοσύνθεση φαίνεται να είναι η πυροφωσφορυλάση (UGP), αφού κάποια μη κυτταρινοπαραγωγά κύτταρα (Cel⁻) εκδηλώνουν ανεπάρκεια αυτού του ενζύμου (Valla et al. 1989), αν και εμφανίζουν ενεργότητα του ενζύμου συνθάση της κυτταρίνης (CS). Επιπλέον, η ενεργότητα της πυροφωσφορυλάσης ποικίλλει μεταξύ διαφορετικών στελεχών του *A. xylinum* και η υψηλότερη τιμή της ανιχνεύθηκε στους πιο αποτελεσματικούς παραγωγούς κυτταρίνης, όπως είναι το *A. xylinum ssp. sucrofermentans BPR2001*. Το στέλεχος αυτό εμφανίζει υψηλή ενεργότητα της φωσφο-γλυκο-ισομεράσης, και κατέχει ένα σύστημα φωσφο-τρανφερασών εξαρτόμενο από το φωσφο-ενολο-πυροσταφυλικό.

Μηχανισμός της βιοσύνθεσης

Η σύνθεση της κυτταρίνης από το *A. xylinum* ή από οποιαδήποτε άλλο οργανισμό που παράγει κυτταρίνη, ακολουθεί δύο βήματα :

(i) το σχηματισμό β-(1→4) αλυσίδων γλυκάνης και τον πολυμερισμό τους

Το ένζυμο συνθάση της κυτταρίνης καταλύει τη βιοσύνθεση της κυτταρίνης πολυμερίζοντας την γλυκόζη σε β(1→4) μονάδες γλυκάνης. Η γωνία στρέψης μεταξύ των δύο γειτονικών υπολειμμάτων γλυκόζης στο μόριο της κυτταρίνης είναι 180 °.

Δύο υποθέσεις έχουν αναφερθεί για τον μηχανισμό αυτόν στο *A. xylinum*. Κατά την πρώτη δεν συμπεριλαμβάνεται λιπιδικό ενδιάμεσο κατά τον πολυμερισμό των β(1→4) μονάδων γλυκάνης. Ένα βακτηριακό κύτταρο μπορεί να πολυμερίσει έως και 108 μόρια γλυκόζης ανά ώρα (Hestrin και Schramm 1954) τα οποία συσσωματώνονται σε υποϊνίδια (προ-κυτταρινικό πολυμερές). Αυτά τα υποϊνίδια αποτελούν τις λεπτότερες ίνες που υπάρχουν στη φύση και είναι συγκρίσιμες μόνο με ίνες κυτταρίνης που ανιχνεύονται στο κάμβιο κάποιων φυτών. Ο σχηματισμός τους λαμβάνει χώρα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη.

Κατά την δεύτερη υπόθεση, συμπεριλαμβάνεται λιπιδικό ενδιάμεσο κατά τον πολυμερισμό των β(1→4) μονάδων γλυκάνης.

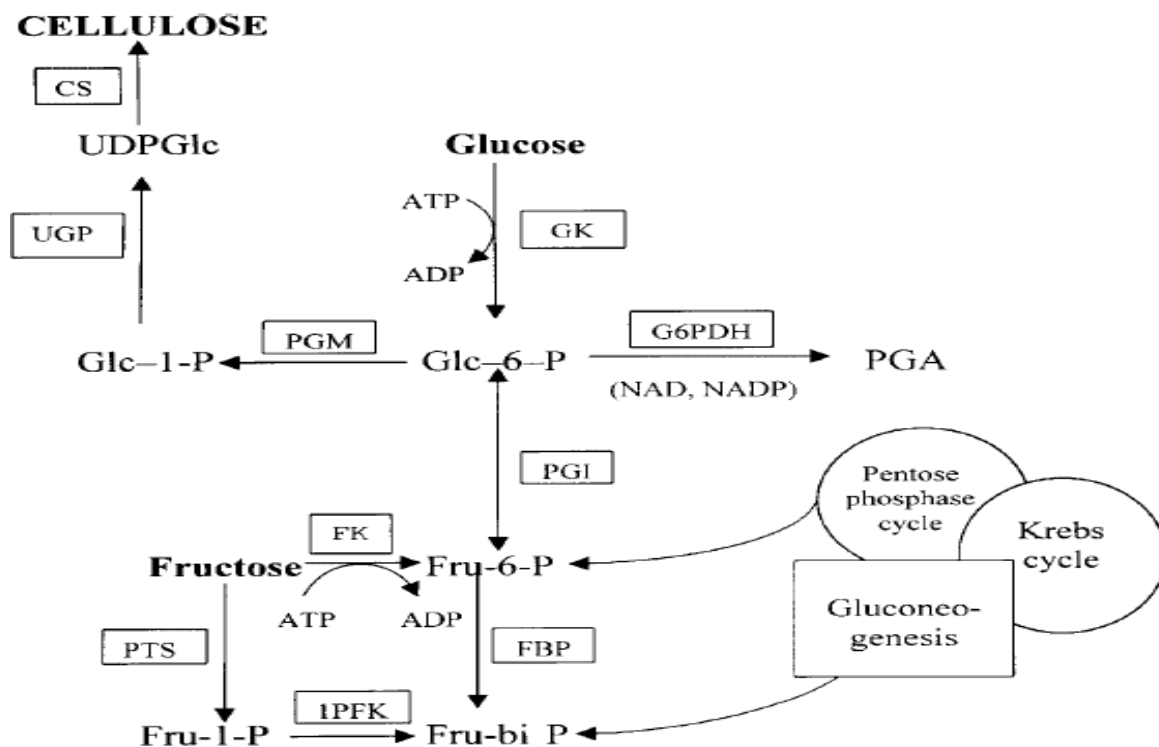
(ii) τον σχηματισμό της αλυσίδας κυτταρίνης

Τα μόρια του προ-κυτταρινικού πολυμερούς εξωθούνται στο εξωκυτταρικό περιβάλλον σχηματίζοντας πρωτοϊνίδια (ή μικροϊνίδια) διαμέτρου 2-4 nm. Περίπου 10-100 υποϊνίδια συσσωματώνονται για να σχηματίσουν κρυσταλλικά μικροϊνίδια. Αυτά τα μικροϊνίδια, και όχι οι μεμονωμένες β(1→4) αλυσίδες γλυκάνης φαίνεται να είναι η αρχική μορφή του κυτταρινικού προϊόντος. Τα μικροϊνίδια κρυσταλλοποιούνται με την σειρά τους σε ταινίες κυτταρίνης. Οι διαστάσεις των ταινιών αυτών είναι 3-4 nm (πάχος) × 70-80 nm (πλάτος) σύμφωνα με τον Zaar (1977), 3,2×133 nm σύμφωνα με τους Brown et al. (1976) και 4,1×117 nm σύμφωνα με τους Yamanaka et al. (2000). Αυτές οι ταινίες αλληλεπιδρούν με άλλες από γειτονικά κύτταρα, σχηματίζοντας ένα δισδιάστατο επίπεδο. Τέλος, παράλληλα επίπεδα αλληλεπιδρούν το ένα με το άλλο με δεσμούς υδρογόνου και δυνάμεις Van

der Waals, σχηματίζοντας ένα ζελατινώδες εναιώρημα στην επιφάνεια του μέσου καλλιέργειας (Brett 2000). Αρχικά, κάθε στιβάδα BC περιέχει νερό που μπορεί να αφαιρεθεί, αφήνοντας χημικές ομάδες να διατεθούν στην δημιουργία νέων δεσμών υδρογόνου μεταξύ γειτονικών αλυσίδων κυτταρίνης, μια διαδικασία που αυξάνει την κρυσταλλικότητα (Colvin και Leppard 1977) .

Αυτή η διαδικασία σχηματισμού των αλυσίδων κυτταρίνης περιγράφεται συνήθως ως κυτταρικά κατευθυνόμενη διότι, αν και συμβαίνει εξωκυτταρικά, ο αμοιβαίος προσανατολισμός και σύνδεση των αλυσίδων γλυκάνης, ο σχηματισμός των ινιδίων, και ταινιών κυτταρίνης προφανώς διέπονται από την αρχική διάταξη των πόρων εξώθησης του κυττάρου (50 έως 80 θέσεις γραμμικά διατεταγμένες κατά μήκος του μεγάλου άξονα του κυττάρου και σε εμφανή συνδυασμό με την εξωκυτταρική κυτταρινική ταινία).

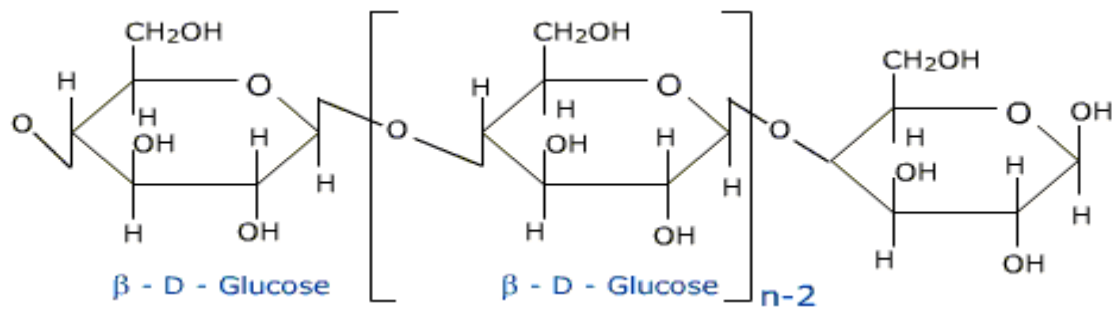
Η εφαρμογή ισχυρότερου αερισμού, ανάδευσης ή η παρουσία ορισμένων ουσιών που δεν μπορούν να διεισδύσουν στο εσωτερικό των κυττάρων, αλλά μπορεί να σχηματίσουν ανταγωνιστικούς δεσμούς υδρογόνου με τις $\beta(1\rightarrow4)$ αλυσίδες γλυκάνης επιφέρει σημαντικές αλλαγές στην υπερμοριακή οργάνωση των αλυσίδων κυτταρίνης με αποτέλεσμα τον σχηματισμό της κυτταρίνης II (Κεφ. 1-3).



Σχήμα 1-1 Μεταβολικό μονοπάτι του άνθρακα στον *A. xylinum*. CS, συνθάση της κυτταρίνης (EC 2.4.2.12); FBP, φρουκτόζη -1,6- διφωσφορική φωσφατάση (EC 3.1.3.11); FK, γλυκοκινάση (EC 2.7.1.2); G6PDH, γλυκόζη-6-φωσφορική αφυδρογονάση (EC 1.1.1.49); IPFK, φρουκτόζη-1-φωσφορική κινάση (EC 2.7.1.56); PGI, φωσφο-γλυκο-ισομεράση; PGM, φωσφο-γλυκο-μουτάση (EC 5.3.1.9); PTS, σύστημα φωσφο-τρανσφερασών; UGP, πυροφωσφορυλάση, UDPGlc (EC 2.7.7.9); Fru-bi-P, 1,6-δι-φωσφορική φρουκτόζη; Fru-6-P, 6- φωσφορική φρουκτόζη; GLC-6 (1)-P, 6 (1)-φωσφορική γλυκόζη; PGA, φωσφο-γλουκονικόξύ; UDPGlc, ουριδίνη διφωσφογλυκόζης

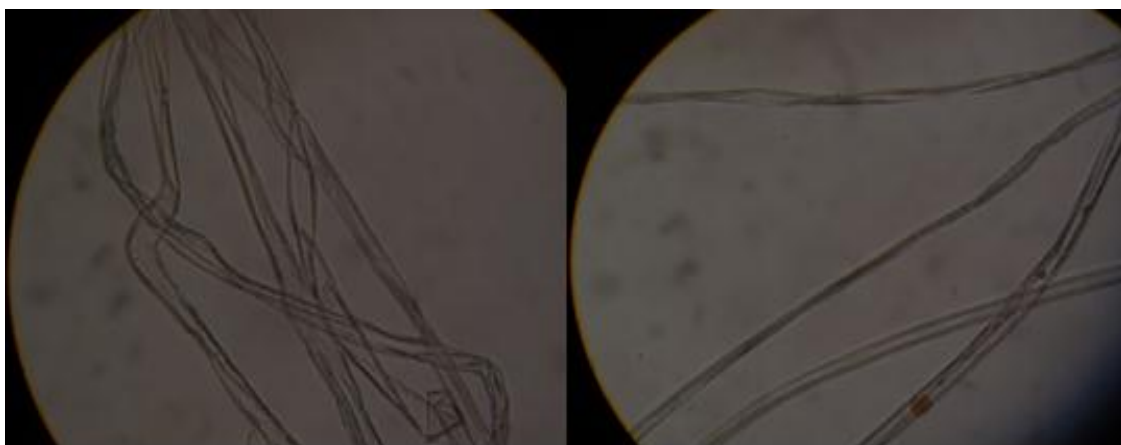
1.3 Δομή της βακτηριακής κυτταρίνης

Η BC είναι ένα γραμμικό πολυμερές που αποτελείται από μόρια D-γλυκόζης συνδεδεμένα με $\beta(1\rightarrow4)$ γλυκοζιτικούς δεσμούς (Εικ. 1-1).



Εικόνα 1-1 Επαναλαμβανόμενες μονάδες κυτταρίνης - υπολείμματα γλυκόζης προστίθενται στο μη αναγωγικό άκρο του πολυσακχαρίτη

Η μακροσκοπική μορφολογία της BC εξαρτάται από τις συνθήκες καλλιέργειας (Watanabe et al. 1998a; Yamanaka et al. 2000). Σε μικροαερόφιλες στατικές συνθήκες (Εικ. 1-2), τα βακτήρια συσσωρεύονται στην κυτταρινούχο μεμβράνη που σχηματίζεται στην επιφάνεια του θρεπτικού μέσου μέσω μικροϊνιδίων τα οποία σχηματίζουν παράλληλα αλλά αποδιοργανωμένα επίπεδα (Jonas και Farah, 1998). Οι κλώνοι της BC που παράγεται υπό στατικές συνθήκες (S-BC) (Εικ.1-3) διασυνδέονται λιγότερο συχνά από αυτούς της BC σε συνθήκες ανάδευσης (A-BC) κάτω από τις οποίες σχηματίζουν ακανόνιστους κόκκους, καλά διεσπαρμένους στο μέσο καλλιέργειας (Vandamme et al. 1998) (Εικ.1-3). Οι κλώνοι της A-BC διασυνδέονται σχηματίζοντας μια πυκνή πλεγματοειδή δομή, και έχουν σχεδόν κάθετες και παράλληλες κατευθύνσεις. Η λιγότερο οργανωμένη μορφή της A-BC προκύπτει από διατμητικές τάσεις κατά τη διάρκεια της ανάδευσης (Watanabe et al., 1998a, 1994).



Εικόνα 1-2 Μικροϊνίδια βακτηριακής κυτταρίνης



Εικόνα 1-3 Σφαιρίδια βακτηριακής κυτταρίνης σε ζυμώσεις υπό ανάδευση (αριστερά), μεμβράνη βακτηριακής κυτταρίνης σε στατικές συνθήκες καλλιέργειας (δεξιά)

Όσον αφορά στην τρισδιάστατη δομή (σάρωση σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο-SEM) της S-BC και A-BC τα ινίδια της πρώτης είναι πιο εκτεταμένα και συσσωρευμένα το ένα πάνω από το άλλο με τρόπο διασταυρούμενο ενώ οι άξονες ινιδίων της δεύτερης είναι μπλεγμένοι μεταξύ τους και κυρτοί. Εκτός αυτού, τα ινίδια της A-BC έχουν μεγαλύτερο πλάτος διατομής (0,1-0,2 μm) από αυτά της S-BC (0,05-0,1 μm).

Οι δύο κρυσταλλικές μορφές της κυτταρίνης, που ορίζονται ως I και II και των οποίων η αναλογία εξαρτάται από την προέλευση της κυτταρίνης, μπορούν να διακριθούν με ακτίνες X, φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), φασματοσκοπία Raman και υπέρυθη ανάλυση. Επιπλέον, ο δείκτης κρυσταλλικότητας και το μέγεθος των κρυσταλλιτών της κυτταρίνης μπορούν να υπολογιστούν με διάθλαση ακτίνων X. Η κυτταρίνη I, η οποία συντίθεται από την πλειοψηφία των φυτών και από το βακτήριο *A. xylinum* σε στατικές καλλιέργειες, αποτελείται από $\beta(1\rightarrow4)$ αλυσίδες γλυκάνης, διατεταγμένες παράλληλα και ομοαξονικά. Αντίθετα, οι αλυσίδες $\beta(1\rightarrow4)$ αλυσίδες γλυκάνης της κυτταρίνης II (θερμοδυναμικά πιο σταθερό άμορφο πολυμερές) διατάσσονται αντιπαράλληλα με τυχαίο τρόπο, συνδέονται με μεγαλύτερο αριθμό δεσμών υδρογόνου και συνεπώς αποκτούν μεγαλύτερη θερμοδυναμική σταθερότητα. Σημαντικό μέρος της συντίθεται σε αναδευόμενες συνθήκες καλλιέργειας ή σε περιπτώσεις αναγέννησης της κυτταρίνης I. Στη φύση, οι παραγωγοί της είναι κάποια φύκη, μύκητες και βακτήρια, όπως το είδος *Sarcina ventriculi* (Jonas και Farah, 1998) ενώ η βιομηχανική παραγωγή βασίζεται σε χημική μετατροπή της PC. Η A-BC έχει χαμηλότερο δείκτη

πολυμερισμού, κρυσταλλικότητας και μικρότερο μέγεθος κρυσταλλιτών από την S-BC (Watanabe et al., 1998a).

Με την χρήση CP / MAS ^{13}C -NMR ανιχνεύονται δύο διακριτές μορφές κυτταρίνης, I_{α} και I_{β} (Watanabe et al., 1998a) οι οποίες εμφανίζονται σε φύκη, βακτήρια και στην κυτταρίνη των φυτών (PC). Το περιεχόμενο της PC και της A-BC σε I_{α} κυτταρίνη είναι μικρότερο από αυτό της BC και της S-BC (Johnson και Neogi, 1989). Έχει αναφερθεί ότι η διαφορά στο κλάσμα μάζας της I_{α} κυτταρίνης είναι στενά συνδεδεμένη με το μέγεθος των κρυσταλλιτών της.

Άλλα αλλόμορφα της κυτταρίνης είναι η III και IV. Η πρώτη μπορεί να σχηματιστεί είτε από κυτταρίνη I ή από κυτταρίνη II μετά από επεξεργασία με υγρή αμμωνία με αποτέλεσμα την δημιουργία είτε της III_1 κυτταρίνης ή της III_2 κυτταρίνης. Η μορφές της κυτταρίνης IV_1 και IV_2 μπορούν να παρασκευαστούν από την αντίστοιχη μορφή κυτταρίνης III με θέρμανση σε γλυκερόλη (Huber et al., 2011).

1.4 Ιδιότητες της βακτηριακής κυτταρίνης

Στην φυσική της κατάσταση, η BC χαρακτηρίζεται ως ένα υδατο-διογκωμένο δίκτυο ινιδίων κυτταρίνης. Οι μηχανικές ιδιότητες των δομών που σχηματίζονται εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τις ιδιότητες του δικτύου οι οποίες με τη σειρά τους καθορίζονται από τις συνθήκες καλλιέργειας, την πηγή άνθρακα και την πηγή αζώτου.

Μερικοί συγγραφείς έχουν αναφέρει ότι η δομή της κυτταρίνης δεν επηρεάζεται αλλάζοντας την πηγή άνθρακα ή αζώτου (Keshk & Sameshima, 2006; Mikkelsen et al. 2009), ενώ άλλοι έχουν παρατηρήσει διαφορές. Η χρήση υποστρώματος μελάσσας σε συνδυασμό με Corn Steep Liquor (CSL) οδήγησε σε BC με υψηλότερο βαθμό κρυσταλλοποίησης από αυτή που προκύπτει σε μέσα που περιλαμβάνουν γλυκόζη, μαννιτόλη, yeast extract και πεπτόνη (El-Saied et al. 2008). Αντίθετα, άλλοι αναφέρουν μια μείωση στην κρυσταλλικότητα σε θρεπτικό μέσο μελάσσας. Σε μία άλλη μελέτη η χρήση της γλυκερόλης ως πηγή άνθρακα, έδωσε κυτταρίνη με 9% υψηλότερη κρυσταλλικότητα, χαμηλότερη ικανότητα συγκράτησης νερού και χαμηλότερο ιξώδες σε σύγκριση με το μέσο γλυκόζης. Κατά τη σύγκριση της κυτταρίνης που παράγεται κάτω από στατικές συνθήκες και εκείνης κάτω από αναδεδυόμενες, η δεύτερη οδήγησε σε απώλεια της μηχανικής αντοχής με μειωμένο βαθμό πολυμερισμού, χαμηλότερο δείκτη κρυσταλλικότητας, χαμηλότερο ποσοστό

της I κυτταρίνης, χαμηλότερο μέτρο ελαστικότητας του Young, υψηλότερη ικανότητα συγκράτησης νερού και υψηλότερο ιξώδες (Ruka et al. 2012).

Οι μηχανικές ιδιότητες μεμβρανών BC που έχουν υποστεί θερμική συμπίεση έχουν επίσης εξεταστεί. Συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί τιμή αντοχής σε εφελκυσμό $241,42 \pm 21,86$ MPa, μέγιστη επιμήκυνση $8,21 \pm 3,01$ % και μέτρο ελαστικότητας του Young $6,86 \pm 0,32$ GPa (Torres et al. 2012). Στον Πίνακα 1.2 παρατίθενται μερικές ιδιότητες της BC από διάφορες μελέτες.

Αυτές οι αξιολογικές μηχανικές ιδιότητες οφείλονται στην ενιαία δομή και στον υψηλό προσανατολισμό του δικτύου των πολύ λεπτών ινών όπως και στην καλή χημική σταθερότητα της BC.

Πίνακας 1.2 Φυσικές-μηχανικές ιδιότητες της βακτηριακής κυτταρίνης

Φυσικές και μηχανικές ιδιότητες	
Δείκτης κρυσταλλικότητας	60-90 %
Βαθμός πολυμερισμού (DP)	2000-6000 (Jonas και Farah, 1998) 16.000-20.000 (Watanabe et al.,1998b), (Klemm et al. 2011).
Μέτρο ελαστικότητας (Young's modulus)	16-18 GPa (M. Iguchi et al. 2000) 15-35 GPa (Klemm et al.,2005)
Αντοχή σε εφελκυσμό	256 MPa (M. Iguchi et al. 2000) 200-300 (Klemm et al.,2005)
Επιμήκυνση	1,7% (M. Iguchi et al. 2000) 1,5-2% (Klemm et al. 2005)
Ικανότητα συγκράτησης νερού	>95 % (Klemm et al. 2005)
Βιοαποικοδομησιμότητα	100 %
Βιοσυμβατότητα	Μεγάλη

1.5 Φυσιολογική λειτουργία της μεμβράνης κυτταρίνης

Η μήτρα του πολυμερούς στην οποία παγιδεύονται τα βακτηριακά στελέχη διευκολύνει την προσκόλλησή τους επάνω σε οποιαδήποτε προσβάσιμη επιφάνεια και την παροχή θρεπτικών συστατικών, καθώς η συγκέντρωσή τους στο πλέγμα του πολυμερούς είναι αισθητά αυξημένη λόγω των προσροφητικών ιδιοτήτων του, σε σύγκριση με το γύρω υδατικό περιβάλλον (Jonas και Farah, 1998; Costeron, 1999).

Σε άλλες μελέτες αναφέρεται ότι η κυτταρίνη λειτουργεί ως αποταμιευτικό συστατικό το οποία καταναλώνεται από τους μικροοργανισμούς όταν έχουν

εξαλειφθεί τα θρεπτικά συστατικά του υποστρώματος. Συνεπώς η αποσύνθεση της καταλύεται από εξω- και ενδογλυκανάσες η παρουσία των οποίων ανιχνεύτηκε στο μέσο καλλιέργειας κάποιων κυτταρινοπαραγωγών στελεχών *A. xylinum*.

Εξαιτίας του υδρόφιλου χαρακτήρα της μεμβράνης, αυξάνεται η αντίσταση των βακτηριακών κυττάρων έναντι δυσμενών μεταβολών (μείωση περιεχόμενου νερού, διακυμάνσεις του pH, εμφάνιση τοξικών ουσιών και παθογόνων οργανισμών κλπ.) και συνεπώς εξασφαλίζεται με αυτό τον τρόπο η επιβίωση τους στο εσωτερικό της μεμβράνης. Διαπιστώθηκε επίσης ότι η μεμβράνη προστατεύει τους μικροοργανισμούς από την υπερϊώδη ακτινοβολία και ότι η απομάκρυνση του πολυσακχαρίτη επιφέρει δραστική μείωση στην βιωσιμότητά τους (3 %) (Ross et al. 1991).

1.6 Εφαρμογές της BC

Η BC έχει μεγάλο εύρος μελλοντικών εφαρμογών λόγω των πολλών μοναδικών ιδιοτήτων της που την καθιστούν χρήσιμη στη βιομηχανία τροφίμων, στην ιατρική, σε εμπορικά και βιομηχανικά προϊόντα και άλλους τεχνικούς τομείς. Μερικές από τις χρήσεις της περιγράφονται παρακάτω (Klemm et al. 2011, Huber et al. 2011).

Τρόφιμα

Η παλαιότερη εφαρμογή της BC είναι η χρήση της ως πρώτη ύλη για την παραγωγή του nata de coco που είναι ένα παραδοσιακό γλυκό-επιδόρπιο των Φιλιππίνων. Επίσης, έχει χρησιμοποιηθεί ως πηκτικό μέσο για τη διατήρηση του ιξώδους σε τρόφιμα και ως σταθεροποιητικός παράγοντας. Λόγω της υφής και περιεκτικότητάς της σε ίνες, έχει χρησιμοποιηθεί ως πρόσθετο πλούσιο σε διαιτητικές ίνες σε πολλά προϊόντα τροφίμων, π.χ Cellulon[®], είναι ένας παράγοντας διόγκωσης που χρησιμοποιείται ως συστατικό τροφίμων και ενεργεί ως πηκτικό μέσο, ρυθμιστής υφής και παράγοντας μείωσης θερμίδων. Τέλος, στις χρήσεις της συμπεριλαμβάνεται και αυτή του πρόσθετου σε ποτά διαίτης στην Ιαπωνία από το 1992, όπως το kombucha που έχει ως βάση το τσάι.

Εμπορικά προϊόντα

Η βακτηριακή κυτταρίνη έχει πολλές εφαρμογές σε διάφορους βιομηχανικούς κλάδους. Ενδιαφέρον προκαλεί η χρήση της ως υλικό ενίσχυσης σε

διαφανή/ημιδιαφανή νανοσύνθετα υλικά (Fernandes et al. 2009) και ως υλικό επίστρωσης χαρτιού. Λόγω της υψηλής ηχητικής της ταχύτητας και της χαμηλής δυναμικής της απώλειας, η βακτηριακή κυτταρίνη έχει χρησιμοποιηθεί ως φίλτρο μεμβράνης σε ηχεία υψηλής πιστότητας και ακουστικά που διατίθενται στο εμπόριο από τη Sony Corporation (Iguchi et al., 2000). Τέλος δοκιμάζεται ως πρόσθετο στη βιομηχανία καλλυντικών και ως πρώτη ύλη στην κλωστουφαντουργία για την κατασκευή ενδυμάτων.

Ιατρική

Η BC έχει δοκιμαστεί με επιτυχία ως επίδεσμος ιδιαίτερα σε περιπτώσεις σοβαρών τραυμάτων και εγκαυμάτων τρίτου βαθμού (Czaja et al., 2006). Μελέτες έχουν δείξει ότι τα εγκαύματα που έλαβαν θεραπεία με μεμβράνες BC επουλώθηκαν ταχύτερα από τις παραδοσιακές θεραπείες. Αυτό οφείλεται στην μεγάλη ικανότητα συγκράτησης νερού της κυτταρίνης που προσφέρει μεγάλη υδρατμοδιαπερατότητα και υγρασία στο τραύμα, παράγοντες κρίσιμοι για την επούλωση. Επίσης, η BC εφαρμόζει πολύ καλά στην επιφάνεια του δέρματος, παρέχοντας ένα σύμμορφο κάλυμα ακόμη και σε δύσκολα μέρη όπως περιοχές του προσώπου. Η τεχνική αυτή έχει τόσο μεγάλη επιτυχία με αποτέλεσμα την δημιουργία εμπορικών προϊόντων κυτταρίνης, όπως το Biofill[®]. Ένα άλλο εμπορικό προϊόν είναι το XCell που παράγεται από την Xylos Corporation και χρησιμοποιείται κυρίως για τη θεραπεία πληγών από φλεβικά έλκη. Μελέτες έχουν επίσης πραγματοποιηθεί για την ενίσχυση των παραδοσιακών γαζών με κυτταρινικό βιοπολυμερές για να ενισχύσει τις ιδιότητες της γάζας. Υγρά φάρμακα ήταν σε θέση να απορροφηθούν από την επικαλυμμένη με κυτταρίνη γάζα. Η BC έχει επίσης χρησιμοποιηθεί σε υψηλής ευαισθησίας τομείς, όπως οστικά μοσχεύματα, μηχανική των ιστών και αναγέννηση (Svensson et al. 2005, Purpi et al. 2010). Μια βασική παράμετρος που την κάνει σημαντική στις ιατρικές εφαρμογές (καρδιαγγειακό, πεπτικό και ουροποιητικό σύστημα) είναι ότι μπορεί εύκολα να χυτευτεί σε διάφορα σχήματα, ενώ εξακολουθεί να διατηρεί τις ιδιότητές της. Μια πρόσφατη εφαρμογή της μικροβιακής κυτταρίνης στη μικροχειρουργική είναι ως συνθετικά αιμοφόρα αγγεία (Klemm et al. 2001). Μπορεί υπό την μορφή πλέγματος μεμβρανών να χρησιμοποιηθεί για δομές αντικατάστασης, όπως εξωτερική μεμβράνη του εγκεφάλου και σκληρή μήνιγγα. Εκτός από την αντικατάσταση, οι δομές αυτές έχουν χρησιμοποιηθεί ως μοσχεύματα για να αλληλεπιδρούν με το υπάρχον εσωτερικό βιολογικό υλικό. Η BC έχει επίσης χρησιμοποιηθεί σε

καθοδηγούμενη αναγέννηση ιστού. Το Bioprocess[®] και Gengiflex[®] είναι δύο από τα κοινά εμπορικά προϊόντα μικροβιακής κυτταρίνης που έχουν πλέον ευρείες εφαρμογές στη χειρουργική και στα οδοντικά εμφυτεύματα. Ένα παράδειγμα αποτελεί η ανάκτηση των περιοδοντικών ιστών με διαχωρισμό από επιθηλιακά κύτταρα του στόματος και των συνδετικών ιστών των ούλων από την επεξεργασμένη επιφάνεια ρίζας.

1.7 Παραγωγή μικροβιακής κυτταρίνης μέσω ζύμωσης

Γενικότερα, ανάμεσα στους παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή της BC είναι το υπόστρωμα, οι περιβαλλοντικές συνθήκες και ο σχηματισμός παραπροϊόντων. Ο καλύτερος δυνατός σχεδιασμός του μέσου είναι πολύ σημαντικός για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού και τον ελεγχόμενο σχηματισμό των προϊόντων ζύμωσης. Τα θρεπτικά συστατικά που απαιτούνται για την ανάπτυξη ενός μικροοργανισμού είναι ο άνθρακας, το άζωτο, ο φώσφορος, το θείο, το κάλιο και άλατα του μαγνησίου.

1.7.1 Επίδραση της πηγής άνθρακα

Οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες πηγές άνθρακα για την παραγωγή κυτταρίνης είναι η γλυκόζη και η σακχαρόζη. Ωστόσο, και άλλοι υδατάνθρακες όπως η φρουκτόζη, η μαλτόζη, η ξυλόζη, το άμυλο και η γλυκερόλη έχουν επίσης δοκιμαστεί. Στον Πίνακα 1-1 παρατίθενται τα θρεπτικά μέσα, διάρκεια και αποτελέσματα των ζυμώσεων για την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης που έχουν προκύψει από διάφορες μελέτες.

Η αιθανόλη εκτός από πρόσθετη πηγή άνθρακα λειτουργεί και ως παράγοντας εξάλειψης της αυθόρμητης μετάλλαξης ή εκφύλισης των μη-κυτταρινοπαραγωγών (Cel⁻) στελεχών του *A.xylinum*. Έχει αναφερθεί ότι προσθήκη αιθανόλης προκαλεί αύξηση της κυτταρίνης σχεδόν στο διπλάσιο. Άλλη μελέτη έχει δείξει ότι με προσθήκη 1,4% (w/w) αιθανόλης στο μέσο, η παραγωγή κυτταρίνης τετραπλασιάστηκε (15,2 g/L) (Πίνακας 1-1).

Όσον αφορά στην γλυκόζη, ο σχηματισμός γλυκονικού οξέος ως παραπροϊόν που μειώνει το pH της καλλιέργειας και, τελικά την παραγωγή κυτταρίνης αποτελεί πρόβλημα. Έχει διερευνηθεί και παρατηρηθεί ότι υπό την παρουσία λιγνοσουλφονικών, η παραγωγή γλυκονικού οξέος μειώθηκε και η BC αυξήθηκε. Η

αναστολή σχηματισμού του γλυκονικού οξέος οφείλεται στα αντιοξειδωτικά και στις πολυφαινολικές ενώσεις που ανιχνεύονται στα λιγνοσουλφονικά (Πίνακας 1-1).

Η επίδραση της προσθήκης των οργανικών οξέων έχει επίσης μελετηθεί. Ενδεικτικά, η απόδοση κυτταρίνης αυξήθηκε παρουσία 20 g/L οξικού οξέος. Η προσθήκη άλλων οργανικών οξέων (ηλεκτρικό, γαλακτικό και γλυκονικό οξύ) δεν αυξάνει την απόδοση της κυτταρίνης. Παρόλο αυτά, η χρήση γαλακτικού οξέος διαπιστώθηκε ότι είχε θετική επίδραση επί της κυτταρίνης σε θρεπτικό υπόστρωμα φρουκτόζης (4%, w/v) με CSL ή yeast extract ή πεπτόνη ως πηγή αζώτου. Θεωρείται ότι λειτουργεί ως πηγή ενέργειας και όχι ως υπόστρωμα για τη βιοσύνθεση της κυτταρίνης (Naritomi et al. 1998) (Πίνακας 1-1).

1.7.2 Επίδραση της πηγής αζώτου

Η βάση για τις περισσότερες ερευνητικές εργασίες είναι το μέσο καλλιέργειας που αναπτύχθηκε από τους Hestrin και Schramm και περιέχει yeast extract (0,5%) και πεπτόνη (0,5%) ως πηγές αζώτου. Διάφορες μικρές αλλαγές έχουν γίνει σε σχέση με το ποσοστό αυτών των συστατικών. Από όλες τις πηγές αζώτου που έχουν χρησιμοποιηθεί, το CSL φαίνεται να είναι το πιο αποτελεσματικό για την παραγωγή της BC.

Αναφορικά με καθορισμένες πηγές αζώτου, κάποια αμινοξέα όπως είναι η μεθειονίνη και το γλουταμινικό οξύ, αναφέρονται ως απαραίτητα. Συγκεκριμένα η μεθειονίνη έχει δείξει σημαντική επίδραση στην κυτταρική ανάπτυξη και την παραγωγή κυτταρίνης. Βιταμίνες όπως η πυριδοξίνη, το νικοτινικό οξύ, το ρ-αμινοβενζοϊκό οξύ και η βιοτίνη βρέθηκαν επίσης σημαντικά για την κυτταρική ανάπτυξη και την παραγωγή κυτταρίνης. Παρόλα αυτά, κάποιοι μελετητές δεν παρατήρησαν καμία θετική επίδραση στην βιοσύνθεση της κυτταρίνης με χρήση βιταμινών. (R. Jonas και L. F. Farah, 1997)

1.7.3 Επίδραση της θερμοκρασίας

Η θερμοκρασία είναι μια κρίσιμη παράμετρος που επηρεάζει τόσο την ανάπτυξη του μικροοργανισμού όσο και την παραγωγή κυτταρίνης. Στην πλειοψηφία των πειραμάτων, παρατηρήθηκε η μέγιστη παραγωγή κυτταρίνης μεταξύ 28 και 30 ° C. (Chawla et al. 2008)

1.7.4 Επίδραση του pH

Το βέλτιστο pH του μέσου καλλιέργειας για την βακτηριακή παραγωγή της κυτταρίνης κυμαίνεται σε τιμές από 4 έως 6. Η απόδοση της κυτταρίνης μειώνεται κάτω από pH=4. Το pH μειώνεται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης λόγω της συσσώρευσης γλυκονικού, οξικού ή γαλακτικού οξέος στο μέσο καλλιέργειας. Ως εκ τούτου, είναι σημαντική η ρύθμισή του εντός της βέλτιστης περιοχής (Chawla et al. 2008).

Πίνακας 1-1 Παραγωγή BC υπό διάφορες συνθήκες καλλιέργειας (Sani and Dahman, 2010; Chawla et al., 2009)

Μικροοργανισμός	Πηγή άνθρακα	Πρόσθετα	Χρόνος ζύμωσης	BC (g/L)
A. xylinum BRC 5	γλυκόζη	Αιθανόλη, O ₂	52 h	15,3
G. hansenii PJK (KCTC 10505 BP)	γλυκόζη	O ₂	48 h	1,72
G. hansenii PJK (KCTC 10505 BP)	γλυκόζη	αιθανόλη	72 h	2,50
Acetobacter sp. V6	γλυκόζη	αιθανόλη	8 d	4,16
Acetobacter sp. A9	γλυκόζη	αιθανόλη	8 d	15,20
A. xylinum BPR2001	μελάσα	-	72 h	7,8
A. xylinum BPR2001	φρουκτόζη	άγαρ, O ₂	72 h	14,1
A. xylinum BPR2001	φρουκτόζη	άγαρ	56 h	12
Acetobacter xylinum ssp. sucrofermentans BPR2001	φρουκτόζη	O ₂	52 h	10,4
Acetobacter xylinum ssp. sucrofermentans BPR2001	φρουκτόζη	άγαρ, O ₂	44 h	8,7
Acetobacter xylinum E25	γλυκόζη	--	7 d	3,5
G. xylinus strain (K3)	μαννιτόλη	πράσινο τσάι	7 d	3,3
Gluconacetobacter xylinus IFO 13773	γλυκόζη	λιγνοσουλφονικό ά	7 d	10
Acetobacter xylinum NUST4.1	γλυκόζη	Αλγινικό Νάτριο	5 d	6
Gluconacetobacter xylinus IFO 13773	μελάσα	--	7 d	5,76
Gluconacetobacter sp. RKY5	γλυκερόλη	--	144 h	5,63

1.8 Ανανεώσιμες πρώτες ύλες ως θρεπτικά υποστρώματα για την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης

Η μαζική εκμετάλλευση των ορυκτών πόρων κατά τη διάρκεια του περασμένου αιώνα, η οποία σχετίζεται με προβλήματα ρύπανσης και με προβλέψεις εξάντλησής τους, έθεσε ένα σημαντικό αριθμό περιβαλλοντικών και οικονομικών ζητημάτων. Η πλέον σύγχρονη τάση είναι η σταδιακή μετάβαση σε μια οικονομία με βάση ανανεώσιμα υλικά (βιομάζα) και απόβλητα βιομηχανίας ως πρώτη ύλη για την

παραγωγή χημικών προϊόντων, υλικών, καυσίμων και ενέργειας στο πλαίσιο των βιοδυλιστηρίων. Αυτό θα συμβάλλει στην αναβάθμιση της ανανεώσιμης βιομάζας και των αποβλήτων με ένα θετικό αντίκτυπο στην αντίστοιχη βιομηχανία και στις τοπικές και εθνικές οικονομίες.

1.8.1 Συμβατική χρήση και εναπόθεση των γεωργικών υπολειμμάτων

Όσον αφορά στον τομέα της γεωργίας, ένα μεγάλο μέρος των υπολειμμάτων (π.χ άχυρο σίτου) που προκύπτουν χρησιμοποιείται στην κτηνοτροφία ως ζωοτροφή, αν και δεν είναι υψηλής διαιτητικής αξίας λόγω του υψηλού ποσοστού σε ίνες και χαμηλού σε πρωτεΐνες, βιταμίνες και άλατα. Πολλά από αυτά, λόγω της ύπαρξης διάφορων παραγόντων όπως είναι τα φαινολικά συστατικά, παρεμποδίζουν τους συμβιωτικούς μικροοργανισμούς στον προστόμαχο. Η κομποστοποίηση αυτών των υλικών είναι χρήσιμη για τη λίπανση του εδάφους, καθώς αυξάνει την οργανική ύλη, τα θρεπτικά συστατικά, τη μικροβιακή συγκέντρωση και βελτιώνει τις φυσικές ιδιότητες του εδάφους όπως τον αερισμό και την ικανότητα προσρόφησης του νερού. Έχει παρατηρηθεί όμως ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις των φαινολικών συστατικών σε ορισμένα από αυτά τα υποπροϊόντα αποτελούν πρόβλημα για την παραγωγή λιπασμάτων, για το λόγο ότι παρεμποδίζουν τη βλαστική ικανότητα των φυτών. Σημαντικές είναι οι ποσότητες των υπολειμμάτων που ενσωματώνονται στους αγρούς, ενώ μεγάλο μέρος τους καίγεται προκαλώντας ζημιά στο περιβάλλον. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον υπάρχει τα τελευταία χρόνια για την αξιοποίηση των αγρο-βιομηχανικών υπολειμμάτων, όχι μόνο για να ελαχιστοποιηθούν οι περιβαλλοντικές επιπτώσεις αλλά και για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας.

1.8.2 Απόβλητα της βιομηχανίας βιοντίζελ

Η βιομηχανική παραγωγή του βιοντίζελ βασίζεται στη μετατροπή ανανεώσιμων πηγών ενέργειας, όπως τα φυτικά έλαια, τα ζωικά λίπη και χρησιμοποιημένα μαγειρικά έλαια, μέσω της διαδικασίας της μετεστεροποίησης κυρίως με μεθανόλη. Ο ηλίανθος (*Helianthus annuus*) έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον για την παραγωγή βιοντίζελ επειδή η καλλιέργειά του ευνοείται από την Ευρωπαϊκή Κοινή Γεωργική Πολιτική (Panoutsou et al. 2008).

Η αυξανόμενη ζήτηση για την παραγωγή βιοντίζελ από ελαιούχους σπόρους και πιο συγκεκριμένα από ηλίανθο, συναντά σημαντικά εμπόδια που σχετίζονται με τις

υψηλές ποσότητες παραπροϊόντων, όπως είναι η ακάθαρτη (ακατέργαστη) γλυκερόλη και τα στερεά υπολείμματα ηλιόπιτας (ηλιαλεύρων). Η ηλιόπιτα (SFM) είναι τα υπολείμματα πλούσια σε πρωτεΐνες (περίπου 30%) που προκύπτουν μετά την εκχύλιση του ελαίου από τους σπόρους, ενώ η ακατέργαστη γλυκερόλη παράγεται (10 % w/w) ως υποπροϊόν της μετεστεροποίησης του ελαίου με μεθανόλη.

Η ακατέργαστη γλυκερόλη έχει αποτελέσει μια πηγή ενέργειας και άνθρακα σε πολλές μικροβιακές βιομετατροπές για την παραγωγή διάφορων χημικών ουσιών, συμπεριλαμβανομένων της 1,3-προπανοδιόλης (Chatzifragkou et al. 2011), του ηλεκτρικού οξέος (Lee et al. 2001), της αιθανόλης (Ito et al. 2005), του κιτρικού οξέος και των πολύ-υδροξυ-αλκανοϊκών εστέρων (Ashby et al. 2004). Δεδομένου ότι το 2010, η παγκόσμια παραγωγή βιοντίζελ ανήλθε σε περισσότερους από 16×10^6 τόνους η διάθεση της γλυκερόλης γίνεται ένα θέμα που χρήζει σοβαρής προσοχής.

Οι ετήσιες ποσότητες ηλιόπιτας ανέρχονται παγκοσμίως σε 15×10^6 τόνους, γεγονός που επίσης χρειάζεται αξιολόγηση ώστε να γίνει η καλύτερη αξιοποίησή του ως πρώτη ύλη για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Ενδιαφέρον αποτελεί η χρήση του σε ζυμώσεις στερεάς διάφορα στελέχη μυκήτων για παραγωγή ακατέργαστων ενζύμων (κυρίως πρωτεασών). Άλλες βιοτεχνολογικές εφαρμογές αποτελούν τα αντιβιοτικά (Sircar et al. 1998) τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Jacobs et al. 2010) και οι επιφανειοδραστικές ουσίες (Jadhav et al. 2011).

1.8.3 Απόβλητα βιομηχανίας ζαχαροπλαστικής

Τα κύρια απόβλητα των βιομηχανιών ζαχαροπλαστικής αποτελούν τα αλευρούχα και αμυλούχα απόβλητα, καθώς επίσης τα σιρόπια και τα υπολείμματα σοκολάτας. Τα αλευρούχα απόβλητα μπορούν να αποτελέσουν ιδανικό υπόστρωμα για αερόβιες μικροβιακές ζυμώσεις λόγω της πλούσιας σύστασής τους σε υδατάνθρακες (κυρίως άμυλο, φρουκτόζη σε μικρές ποσότητες, σακχαρόζη και λακτόζη).

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η αξιολόγηση της δυνατότητας παραγωγής μικροβιακής κυτταρίνης (BC) από ανανεώσιμες πρώτες ύλες όπως διάφορα παραπροϊόντα ή υποπροϊόντα της βιομηχανίας τροφίμων και της βιομηχανίας βιοντίζελ. Πιο συγκεκριμένα, εξετάστηκε η προοπτική χρήσης :

1. στερεών αμυλοπρωτεϊνούχων αποβλήτων της βιομηχανία παραγωγής προϊόντων ζαχαροπλαστικής ως πηγή άνθρακα και αζώτου
2. ακατέργαστης γλυκερόλης ως πηγή άνθρακα και υδρολυμάτων ηλιαλεύρων ως πηγή αζώτου και λοιπών θρεπτικών συστατικών, και τα δύο προερχόμενα από την βιομηχανία παραγωγής βιοντίζελ

Οι ζυμώσεις διαλείποντος έργου με το βακτηριακό στέλεχος *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM 15973 αρχικά διεξήχθησαν και μελετήθηκαν σε εμπορικά θρεπτικά μέσα. Η ξυλόζη και η λακτόζη δεν μεταβολίστηκαν επαρκώς από το βακτηριακό στέλεχος οδηγώντας σε σχετικά χαμηλή παραγωγή BC με αντίστοιχες συγκεντρώσεις 1,7 και 1,6 g/L. Στα υποστρώματα της γλυκόζης και της φρουκτόζης, η συγκέντρωση της BC προσδιορίστηκε στο 1,2 και 2 g/L αντίστοιχα. Η μεγαλύτερη απόδοση σε BC επιτεύχθηκε με την χρήση ακατέργαστης γλυκερόλης και εμπορικής σακχαρόζης με αντίστοιχες συγκεντρώσεις 3,2 g/L και 4,9 g/L.

Για να περιοριστεί όμως το υψηλό κόστος της παραγωγής της κυτταρίνης και να γίνει εφικτή η εμπορευματοποίησή της πρέπει να γίνουν σημαντικές βελτιωτικές ενέργειες όσον αφορά στην παραγωγικότητα της ζύμωσης. Δεδομένου ότι η τιμή του υποστρώματος διαδραματίζει μείζονος σημασίας ρόλο για το κόστος παραγωγής της μικροβιακής κυτταρίνης, μέσω της παρούσας μελέτης παρουσιάζεται η δυνατότητα αξιοποίησης ανανεώσιμων πρώτων υλών χαμηλού ή και μηδενικού κόστους για τη βιομηχανική εφαρμογή της βιοδιεργασίας.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Αντιδραστήρια

Στον Πίνακα 2.1 αναγράφονται τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή των πειραμάτων όπως και η προέλευση τους.

Πίνακας 2-1 Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν και η προέλευση τους

Αντιδραστήρια	Προέλευση
Γλυκόζη, φρουκτόζη, ξυλόζη, λακτόζη, σουκρόζη, Na ₂ HPO ₄	Penta
Yeast extract, nutrient άγαρ, πεπτόνη	Lab M
Κιτρικό οξύ	Merck

2.2 Ζυμώσεις στερεής κατάστασης (Solid State Fermentation, SSF)

Οι ζυμώσεις στερεάς κατάστασης (SSF) πραγματοποιήθηκαν με σκοπό την παραγωγή ακατέργαστων πρωτεολυτικών και αμυλολυτικών ενζύμων τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την υδρόλυση ηλιάλευρου και προϊόντων ζαχαροπλαστικής (παιδικές τροφές της εταιρείας Γιώτης), και την μετατροπή τους σε θρεπτικά υποστρώματα κατάλληλα για την παραγωγή μικροβιακής κυτταρίνης. Πιο συγκεκριμένα, η χρήση του μύκητα *Aspergillus oryzae* σε ζυμώσεις στερεής κατάστασης έχει στόχο την παραγωγή κυρίως πρωτεολυτικών ενζύμων (πρωτεασών) τα οποία θα υδρολύσουν τις πρωτεΐνες του ηλιάλευρου. Από την άλλη, η χρήση του μύκητα *Aspergillus awamori* γίνεται για παραγωγή κυρίως αμυλολυτικών ενζύμων (α-αμυλάσες, β-αμυλάσες, γλυκοαμυλάσες) και πρωτεασών τα οποία θα διασπάσουν το άμυλο των προϊόντων ζαχαροπλαστικής στο μονομερές του την γλυκόζη και θα υδρολύσουν τις πρωτεΐνες του υποστρώματος .

2.2.1 Βιολογικό υλικό

Για τις SSF χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη του μύκητα *Aspergillus awamori* 2B.361 U 2/1 και *Aspergillus oryzae* τα οποία διατηρούνται στο Εργαστήριο

Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό μορφή σπορίων σε γυάλινα φιαλίδια με silica gel στους 4 °C.

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων, τα στελέχη ενυδατώθηκαν και απομονώθηκαν (με τη μέθοδο streaking) για να εξασφαλιστεί η καθαρότητά τους. Έπειτα, αποθηκεύτηκαν στους 4 °C σε κεκλιμένους δοκιμαστικούς σωλήνες πληρωμένους με 2% w/v nutrient άγαρ και 5% w/v πίτυρο σίτου όσον αφορά το στέλεχος *A. awamori*, και 2% w/v nutrient άγαρ, 2% w/v πίτυρο σίτου και 3% w/v ηλιάλευρο όσον αφορά στο στέλεχος *A. oryzae*.

Ανά τακτά χρονικά διαστήματα πραγματοποιούταν ανανέωση των μυκήτων, ώστε να διατηρηθεί η ζωτικότητα τους.

2.2.2 Εμβόλιο για τις ζυμώσεις στερεής κατάστασης με τους *Aspergillus awamori* και *Aspergillus oryzae*

Για τις SSF χρησιμοποιήθηκαν ως εμβόλιο σπόρια του *A. awamori* και *A. oryzae*. Η ποσότητα του εμβολίου για κάθε φιάλη αντιστοιχούσε σε 10^6 - 10^8 cfu (Koutinas et al., 2001). Το εμβόλιο αποτελούταν από 2 mL εναιωρήματος σπορίων το οποίο προέκυπτε από την προσθήκη 10 mL απιονισμένου νερού, που περιείχε Tween 80 (0,01%, v/v) στους κεκλιμένους δοκιμαστικούς σωλήνες με τον ανεπτυγμένο μύκητα. Στη συνέχεια, κωνικές φιάλες των 250 mL ίδιας σύνθεσης με αυτή των δοκιμαστικών σωλήνων και προσθήκη 50 mL αποσταγμένου νερού με μια σταγόνα 0,01% (v/v) Tween 80, επωάστηκαν με τα 2 mL εναιωρήματος και τοποθετήθηκαν σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο θερμοκρασίας 30 °C για περίπου 4 ημέρες ώστε να επιτευχθεί πλήρης ανάπτυξη των μυκήτων. Ο ρυθμός ανάδευσης για τον *A. awamori* ήταν 180 rpm ενώ για τον *A. oryzae* ήταν 70 rpm.

Όλα τα υλικά, σκέυη και διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν, αποστειρώθηκαν προηγουμένως σε αυτόκαυστο στους 120 °C για 20 min. Επίσης όλοι οι χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες (σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής).

2.2.3 Ζύμωση στερεής κατάστασης του μύκητα *Aspergillus oryzae*

Η ζύμωση στερεάς κατάστασης SSF με τον μύκητα *Aspergillus oryzae* πραγματοποιήθηκε σε κωνικές φιάλες των 250 mL, στις οποίες προστέθηκαν 5 g ηλιάλευρου. Ακολούθησε ο εμβολιασμός των κωνικών με εναιώρημα σπορίων του μύκητα (8,8 mL) προσέχοντας να διαβραχεί ομοιόμορφα όλη η επιφάνειά τους, ώστε

να επιτευχθεί ομοιόμορφη ανάπτυξη του μύκητα. Το ποσοστό υγρασίας του υποστρώματος ήταν 65% w/w. Για την δημιουργία του εναιωρήματος χρησιμοποιήθηκαν 50 mL απιονισμένο νερό και Tween 80 (0,01%, v/v) για κάθε κωνική με τον ανεπτυγμένο μύκητα, ηλικίας περίπου 4 ημερών. Ακολούθησε έντονη ανάδευση με μικρά γυάλινα σφαιρίδια (διαμέτρου 4 mm), ώστε να απελευθερωθούν τα σπόρια του μύκητα. Μετά τον εμβολιασμό οι φιάλες τοποθετήθηκαν σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο στους 30 °C, με ρυθμό ανάδευσης 70 rpm για 2 ημέρες .

Σύμφωνα με τους Kachrimanidou et al. (2013), η μέγιστη ενεργότητα των πρωτεασών (400 U/g) στη ζύμωση στερεής κατάστασης, επιτυγχάνεται σε χρονική διάρκεια ζύμωσης 48h, αρχικό ποσοστό υγρασίας του υποστρώματος 65%; μη ελεγχόμενη τιμή pH και θερμοκρασία 30 °C, όπως και εφαρμόστηκαν στην πειραματική διαδικασία.

Όλα τα υλικά, σκεύη και διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν, αποστειρώθηκαν προηγουμένως στους 120 °C για 20 min σε αυτόκαυστο. Επίσης όλοι οι χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες (σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής).

2.2.4 Ζύμωση στερεής κατάστασης του μύκητα *Aspergillus awamori*

Η διαδικασία της SSF του μύκητα *Aspergillus awamori* είναι παρόμοια με του *Aspergillus oryzae* όπως αυτή περιγράφεται παραπάνω (Κεφ. 2.2.3) με την διαφορά ότι το υπόστρωμα της ζύμωσης ήταν πίτυρο σίτου και ο ρυθμός του επωαστικού θαλάμου ήταν 180 rpm.

Η μέγιστη ενεργότητα των πρωτεασών και των αμυλασών επιτυγχάνεται όταν οι συνθήκες της ζύμωσης στερεής κατάστασης είναι οι ακόλουθες: διάρκεια ζύμωσης 48h, υγρασία 65% (v/w), φυσικό pH και θερμοκρασία 30 °C.

2.3 Υδρολύσεις των θρεπτικών υποστρωμάτων

Με τις βέλτιστες συνθήκες ζύμωσης στερεής κατάστασης των μυκήτων *A.oryzae* και *A.awamori* ακολούθησαν πειράματα υδρολύσεων.

Σκοπός των υδρολύσεων ήταν να παραχθεί υδατικό μέσο καλλιέργειας, πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά (π.χ. πηγές αζώτου, πηγές άνθρακα) τα οποία είναι

απαραίτητα για την μικροβιακή ανάπτυξη και παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας και πιο συγκεκριμένα μικροβιακής κυτταρίνης.

2.3.1 Θρεπτικά υποστρώματα για την πραγματοποίηση των υδρολύσεων

Τα θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν αποτελούν ανανεώσιμες πρώτες ύλες και ανήκουν στην κατηγορία των βιομηχανικών αποβλήτων, υποπροϊόντων ή παραπροϊόντων διεργασιών.

2.3.1.1 Ηλιάλευρο (*Sunflower-meal, SFM*)

Το ηλιάλευρο (SFM) που χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα χορηγήθηκε από τη βιομηχανία παραγωγής βιοντίζελ Π.Ν. Πέττας Α.Β.Ε.Ε. (Πάτρα, Ελλάδα). Η ελαιοπεριεκτικότητά του SFM ήταν πολύ χαμηλή λόγω εφαρμογής της μεθόδου εκχύλισης με διαλύτη για παραλαβή του εναπομείναντος ελαίου μετά από μηχανική συμπίεση του ηλιόσπορου. Η σύσταση του SFM παρουσιάζεται στον Πίνακα 2-2.

Πίνακας 2-2 Σύσταση του ηλιάλεου

Σύσταση	Στο παρόν πείραμα ^a	Βιβλιογραφικά δεδομένα ^b	Μέση σύσταση
Υγρασία (% , υγρή βάση)	3,76 ± 0,15	8-10,4	9
Ολικό Άζωτο (OA) (mg/g, ξ.β)	42,59 ± 0,47		
Πρωτεΐνη (% , 6.25*OA, ξ.β)	26,62 ± 0,29	29-34	32
Έλαιο (% , ξ.β)	0,93 ± 0,08	1,15-2	1,5
Τέφρα (% , ξ.β)	6.83 ± 0.35	4,3-7.1	6,5
Διαιτητικές ίνες (% ,ξ.β)	19,54 ± 0,63	29-50	41
Λιγνίνη			26,8-8,4
Ημικυτταρίνη		12,6-12,9	13
Κυτταρίνη		22,5-22,9	23

^aKachrimanidou et al., 2013

^bParrado and Bautista ,1993, Anne Lomascolo et al., 2012, Vojislav V. Banjac et al., 2013

2.3.1.2 Ακατέργαστη γλυκερόλη

Η ακατέργαστη γλυκερόλη χορηγήθηκε από τη βιομηχανία παραγωγής βιοντίζελ Π.Ν. Πέττας Α.Β.Ε.Ε. (Πάτρα, Ελλάδα). Η ακατέργαστη γλυκερόλη επεξεργάστηκε μέσω διαχωρισμού φάσεων σε διαχωριστική χοάνη συνολικής

διάρκειας 12 ωρών. Με τον τρόπο αυτό προέκυψε ακατέργαστη γλυκερόλη καθαρότητας 92,4% (w/w).

2.3.1.3 Παιδικές τροφές Γιώτης (αμυλούχα θρεπτικά προϊόντα)

Το εργαστήριο προμηθεύτηκε τα αμυλούχα απόβλητα από την εταιρεία ΓΙΩΤΗΣ ΑΕ, Βιομηχανία θρεπτικών προϊόντων. Η σύσταση τους αναφέρεται στον Πίνακα 2-3.

Πίνακας 2-3 Σύσταση φρουτόκρεμας Γιώτης

Σύσταση	Μέση σύσταση (g/100 g σκόνης)
Πρωτεΐνες	11,1
Άμυλο	31,2
Σακχαρόζη	17,4
Λακτόζη	27,8
Γλυκόζη	0,60
Φρουκτόζη	0,04
Γαλακτόζη	0,03
Μαλτοδεξτρίνη	0,07
Βιταμίνες	Ίχνη
Μεταλλικά άλατα	Ίχνη

2.3.2 Υδρόλυση ηλιάλεου προς παραγωγή θρεπτικού μέσου καλλιέργειας πλούσιο σε άζωτο

Το στερεό υπόστρωμα της ζύμωσης που περιέχει την μυκητιακή βιομάζα αναμίχθηκε σε μπλέντερ κουζίνας με 500 mL απεσταγμένο νερό και μεταφέρθηκε σε φιάλη Duran του 1 L που περιείχε 50 g/L ξηρό ανεπεξέργαστο (φρέσκο) ηλιάλεο. Με αυτό τον τρόπο γίνεται εκχύλιση του παραγόμενου συμπλέγματος ενζύμων για περαιτέρω υδρόλυση των μακρομορίων του ηλιάλεου.

Για κάθε φιάλη Duran χρησιμοποιήθηκαν δύο κωνικές φιάλες από τη ζύμωση στερεάς κατάστασης του *A. oryzae*. Στη συνέχεια οι φιάλες Duran τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο υπό ανάδευση με μαγνητικούς αναδευτήρες. Η διεργασία της ενζυμικής υδρόλυσης έλαβε χώρα στους 45 °C για 24 ώρες. Το υγρό που προκύπτει μετά το τέλος της υδρόλυσης μετά από φυγοκέντρηση (3900 rpm, 4 °C, 15 min) δύναται να αποθηκευτεί σε συνθήκες κατάψυξης μέχρι τη χρησιμοποίησή του.

Το πείραμα αυτό έγινε εις διπλούν ώστε να να μπορέσουμε να μετρήσουμε την παραγωγή FAN σε σχέση με τον χρόνο και να παραλάβουμε το επιθυμητό για την ζύμωση υδρόλυμα.

Όλα τα υλικά, σκεύη και διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν, αποστειρώθηκαν προηγουμένως στους 120 °C για 20 min σε αυτόκαυστο. Επίσης όλοι οι χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες (σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής).

2.3.3 Υδρόλυση αμυλούχων υποστρωμάτων προς παραγωγή θρεπτικού μέσου καλλιέργειας πλούσιο σε άζωτο και γλυκόζη

Το στερεό υπόστρωμα της ζύμωσης αναμείχθηκε σε μπλέντερ κουζίνας με 500 mL απεσταγμένο νερό και μεταφέρθηκε σε φιάλη Duran του 1 L που περιείχε την ποσότητα αλευρούχων υπολειμμάτων ίση με 35 g/L. Για κάθε φιάλη Duran χρησιμοποιήθηκαν 2 κωνικές φιάλες από τη ζύμωση στερεάς κατάστασης. Στη συνέχεια οι φιάλες Duran τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο, υπό ανάδευση με μαγνητικούς αναδευτήρες, στους 55 °C για 24 h.

Μετά το πέρας της υδρόλυσης εφαρμόστηκε φυγοκέντρηση (3900 rpm, 4 °C, 15 min) και το υπερκείμενο υγρό που παραλήφθηκε, αποθηκεύτηκε σε κατάψυξη μέχρι περαιτέρω επεξεργασίας.

Όλα τα υλικά, σκεύη και διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν, αποστειρώθηκαν προηγουμένως στους 120 °C για 20 min σε αυτόκαυστο. Επίσης όλοι οι χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες (σε θάλαμο νηματικής ροής).

2.4 Παράμετροι που αναλύθηκαν - Προετοιμασία των υδρολυμάτων για την χρήση τους σε πειράματα υγρών ζυμώσεων διαλείποντος έργου προς παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης

Μετά την ολοκλήρωση των υδρολύσεων, στα παραγόμενα υδρολύματα προσδιορίστηκε το άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων με την φωτομετρική μέθοδο της νινυδρίνης (Κεφ.2.6.1) και η συγκέντρωση του ανόργανου φωσφόρου (Κεφ.2.6.3). Επίσης πραγματοποιήθηκε ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των σακχάρων στο αμυλούχο υδρόλυμα με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (Κεφ.2.6.2). Το pH όλων των υδρολυμάτων ρυθμίστηκε με pH-μετρο τύπου Jenway 3020 και 5 M NaOH, στο εύρος τιμών 5,5-6,5 το οποίο θεωρείται βέλτιστο για την ανάπτυξη του *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM 15973 και την παραγωγή

βακτηριακής κυτταρίνης. Τέλος, τα υδρολύματα αποστειρώθηκαν με φίλτρο διαμέτρου οπών 0,2 μ m (Polycap 36 AS, Fisher).

2.5 Υγρές ζυμώσεις διαλείποντος έργου (batch) για παραγωγή μικροβιακής κυτταρίνης

Σε αυτό το πειραματικό στάδιο, πραγματοποιήθηκαν υγρές ζυμώσεις διαλείποντος έργου υπό μικροαερόβιες συνθήκες, με σκοπό την παραγωγή μικροβιακής κυτταρίνης. Τα υποστώματα που μελετήθηκαν διέφεραν ως προς την πηγή αζώτου και άνθρακα.

2.5.1 Βιολογικό υλικό

Το βακτηριακό στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη για την παραγωγή μικροβιακής κυτταρίνης ήταν το *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM 15973 (Πίνακας 2-4) (Toyosaki et al. 1996, Yamada et al. 2012). Ο μικροοργανισμός απομονώθηκε από μαυροκέρασο και προμηθεύτηκε από το Ινστιτούτο Leibniz-DSMZ της Γερμανίας (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures).

Αναγέννηση του στελέχους μετά την παραλαβή του σε λυοφιλιωμένη μορφή

Για να εξασφαλιστεί η καλή ανάπτυξη του στελέχους μετά την παραλαβή του σε λυοφιλιωμένη μορφή χρησιμοποιήθηκε μέσο καλλιέργειας με την εξής σύσταση (ανά 1 L απιονισμένου νερού): γλυκόζη 100 g; yeast extract 10 g; CaCO₃ 20 g; άγαρ 15 g; . Το pH του μέσου ρυθμίστηκε στο 6,8 και η θερμοκρασία επώασης στους 28 °C. Τρυβλία Petri πληρώθηκαν με το μέσο καλλιέργειας και εφαρμόστηκε η τεχνική επίστρωσης με χρήση μικροβιακού κρίκου.

Το ανθρακικό ασβέστιο λειτουργεί ως ρυθμιστικό και δημιουργεί ένα αδιαφανές γαλακτερού χρώματος στρώμα. Καθώς το στέλεχος αναπτύσσεται, παράγεται οξύ το οποίο αντιδρά με το CaCO₃ με αποτέλεσμα να δημιουργούνται διαυγείς ζώνες κάτω από τις αποικίες .

Συνθήκες αποθήκευσης

Παρασκευάστηκαν φιαλίδια ειδικού τύπου (2 mL) που περιείχαν 1 mL γλυκερόλη και ποσότητα αποικιών που λήφθηκαν με την χρήση μικροβιακού κρίκου. Τα φιαλίδια αποθηκεύτηκαν στους -80 °C. Άλλος τρόπος αποθήκευσης του μικροοργανισμού ήταν πλήρωση των φιαλιδίων με 1 mL γλυκερόλη και 1 mL εμβολίου- HS-γλυκόζη και συντήρησή τους στους -80 °C.

Παρασκευή εμβολίου

Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή εμβολίου ήταν το Hestrin–Schramm (HS-γλυκόζη) (Schramm & Hestrin, 1954) το οποίο περιέχει τα εξής συστατικά (ανά 1 L απιονισμένου νερού): γλυκόζη 20 g; yeast extract 5 g; βακτηριακή πεπτόνη 5 g; Na₂HPO₄ 2.7 g; κιτρικό οξύ 1.15 g;. Το pH του μέσου ρυθμίστηκε στο 6 με 5M NaOH. Η ζύμωση διήρκησε 2 ημέρες, κατά την οποία κωνικές φιάλες των 250 mL τοποθετήθηκαν σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο στους 30 °C με ρυθμό 120 rpm .

Πίνακας 2-4 Χαρακτηριστικά του *Komagataeibacter sucrofermentans*

Συστηματική Ταξινόμηση	Βασίλειο: <i>Bacteria</i> ; Φύλο: <i>Proteobacteria</i> ; Κλάση: <i>Alphaproteobacteria</i> ; Τάξη: <i>Rhodospirillales</i> ; Οικογένεια: <i>Acetobacteraceae</i> ; Γένος: <i>Komagataeibacter</i> ; Είδος: <i>Komagataeibacter sucrofermentans</i>
Συνώνυμα (προηγούμενες ονομασίες) του είδους	<i>Acetobacter xylinus</i> subsp. <i>sucrofermentans</i> (Toyosaki et al. 1996) <i>Gluconacetobacter sucrofermentans</i> (Cleenwerck et al. 2010) <i>Gluconacetobacter xylinus</i> subsp. <i>sucrofermentans</i> (Yamada et al. 1998).
Γεωγραφική προέλευση	Τόκυο, Ιαπωνία
Χαρακτηρισμός στελέχους	BPR 2001
Ιστορικό	<- JCM; JCM 9730 <- T. Tsuchida, Bio-Polymer Research Co., Ltd., Takatsu-ku, Kawasaki 213, Japan; BPR 2001

2.5.2 Θρεπτικά υποστρώματα

Μια σειρά ζυμώσεων διεξήχθη σε υποστρώματα με διάφορες πηγές άνθρακα και αζώτου και μελετήθηκε η επίδρασή τους στην παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης με σκοπό την επίτευξη της μέγιστης δυνατής απόδοσης .

Πηγές άνθρακα

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε υποστρώματα εμπορικών σακχάρων τα οποία υπόκειντο στις εξής 2 κατηγορίες: μονοσακχαρίτες (ξυλόζη, γλυκόζη, φρουκτόζη) και δισακχαρίτες (σακχαρόζη, λακτόζη).

Επίσης ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκαν αμυλούχα υδρολύματα (Κεφ. 2.3.1.3) και ακατέργαστη γλυκερόλη καθαρότητας 92.4% (Κεφ. 2.3.1.2) .

Πηγές αζώτου

Οι πηγές αζώτου που μελετήθηκαν ήταν συνδυασμός πεπτόνης και yeast extract (350 mg FAN/L), υδρολύματα ηλιάλευρου (Κεφ. 2.3.1.1) και αμυλούχα υδρολύματα (Κεφ. 2.3.1.3).

Περιγραφή υποστρωμάτων ως προς την πηγή άνθρακα και αζώτου

Η βάση για όλες τις ζυμώσεις ήταν το μέσο καλλιέργειας Hestrin–Schramm (HS-γλυκόζη) (Κεφ.2.5.1) το οποίο σε κάθε πείραμα διαφοροποιούταν ως προς την πηγή άνθρακα, ως προς την πηγή αζώτου ή και ως προς τα δύο, διατηρώντας σταθερές τις αρχικές συγκεντρώσεις, 20 g/L και 350 mg FAN/L αντίστοιχα.

Στα πειράματα με τα καθαρά (εμπορικά) σάκχαρα και την ακατέργαστη γλυκερόλη η διαφοροποίηση αφορούσε στην πηγή άνθρακα.

Στο επόμενο είδος ζύμωσης, η ακατέργαστη γλυκερόλη συνδυάστηκε με υδρόλυμα ηλιάλευρου οπότε η παραλλαγή σχετιζόταν με την πηγή άνθρακα και αζώτου.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε ζύμωση στην οποία το αμυλούχο υδρόλυμα που χρησιμοποιήθηκε, κάλυπτε τις ανάγκες του μικροοργανισμού σε άνθρακα και άζωτο.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων η οποία διαφοροποιούταν από το HS-γλυκόζη ως προς την πηγή άνθρακα και ως προς τις συγκεντρώσεις του αζώτου αφού χρησιμοποιήθηκε ακατέργαστη γλυκερόλη και οι εξής 3 συγκεντρώσεις αζώτου: 350, 560, 750 mg FAN/L.

2.5.3 Συνθήκες ανάπτυξης

Οι ζυμώσεις έλαβαν χώρο υπό μικροαερόβιες συνθήκες, σε κωνικές φιάλες των 250 mL με ενεργό όγκο 50 mL. Ο όγκος του εμβολίου ήταν 10% v/v και το pH ρυθμίστηκε στο 6 με 5M NaOH. Οι κωνικές φιάλες τοποθετήθηκαν σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο και θερμοκρασία 30 °C όπου αρχικά ανακινήθηκαν στις 100 rpm για 1-2 ημέρες και έπειτα επικράτησαν στατικές συνθήκες.

Όλα τα υλικά, σκεύη και διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν, αποστειρώθηκαν προηγουμένως σε αυτόκαυστο στους 120 °C για 20 min. Επίσης όλοι οι χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες (σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής). Σημειώνεται ότι το yeast extract και η πεπτόνη αποστειρώθηκαν ξεχωριστά.

2.5.4 Παραλαβή και καθαρισμός της μικροβιακής κυτταρίνης

Η μικροβιακή κυτταρίνη παραλήφθηκε με την μορφή ενυδατωμένων μεμβρανών ή κροκιδώσεων και πλύθηκε με τρεχούμενο νερό βρύσης για να απομακρυνθούν τα υπολείμματα της καλλιέργειας. Στη συνέχεια εμβαπτίστηκε σε 2 M NaOH για 24 ώρες περίπου ώστε να εξουδετερωθούν τα βακτηριακά κύτταρα. Έπειτα πλύθηκε αρκετές φορές με τρεχούμενο νερό βρύσης και αφέθηκε για μερικές ώρες στο νερό αυτό μέχρι να επιτευχθεί ουδέτερη τιμή pH. Περαιτέρω καθαρισμός της μεμβράνης επιτεύχθηκε μέσω αντίστροφης ώσμωσης. Τέλος, τοποθετήθηκε σε φούρνο στους 30 °C μέχρι να επιτευχθεί σταθερό βάρος.

2.5.5 Παράμετροι που εξετάστηκαν στα πειράματα υγρών ζυμώσεων διαλείποντος έργου προς παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης

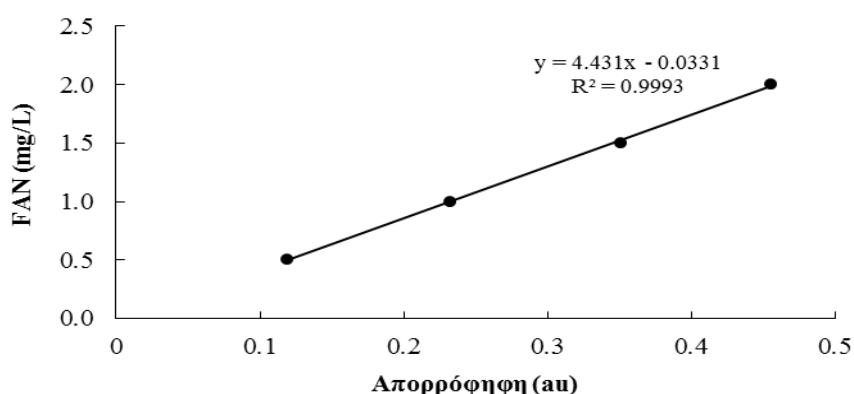
Για την μελέτη της μεταβολής της πηγής αζώτου και φωσφόρου συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης, στις υγρές καλλιέργειες προσδιορίστηκε το άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων με την φωτομετρική μέθοδο της νινυδρίνης (Κεφ.2.6.1) και η συγκέντρωση του ανόργανου φωσφόρου (Κεφ.2.6.3). Επίσης πραγματοποιήθηκε

ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των σακχάρων και της αλκοόλης με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (Κεφ.2.6.2).

2.6 Χημικές αναλύσεις

2.6.1 Προσδιορισμός Αζώτου των Ελεύθερων Αμινομάδων (FAN analysis)

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN, Free Amino Nitrogen) είναι η φωτομετρική μέθοδος της νινυδρίνης (Lie 1973). Σε δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκε 1 mL κατάλληλα αραιωμένου δείγματος και 0,5 mL αντιδραστηρίου χρώσης (color reagent). Οι δοκιμαστικοί σωλήνες πωματίστηκαν και μεταφέρθηκαν σε υδατόλουτρο στους 100°C για 16 min. Ακολούθησε ψύξη των δειγμάτων σε νερό στους 20 °C για 20 min. Έπειτα, προστέθηκαν 2,5 mL αντιδραστηρίου αραιώσης (dilution reagent) και αναδεύτηκαν μέχρι αλλαγή χρώματος (20 sec). Τέλος, μετρήθηκε η απορρόφηση σε φασματοφωτόμετρο (Hitachi U-2000 Spectrophotometer) στα 570 nm. Το τυφλό δείγμα για το μηδενισμό του φασματοφωτόμετρου, περιείχε 1 mL απιονισμένο νερό. Η συγκέντρωση του δείγματος σε FAN υπολογίστηκε από την πρότυπη καμπύλη αναφοράς εκφρασμένη σε mg/L (Διάγραμμα 2-1). Για την πρότυπη καμπύλη αναφοράς ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία, χρησιμοποιώντας διαφορετικές αραιώσεις πρότυπου διαλύματος γλυκίνης. Η σύσταση των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκε για την μέθοδο FAN περιγράφεται στον Πίνακα 2-6 .



Διάγραμμα 2-1 Καμπύλη αναφοράς της γλυκίνης με τη μέθοδο FAN

Πίνακας 2-5 Σύσταση αντιδραστηρίων για την μέτρηση FAN

Αντιδραστήρια για την μέτρηση FAN	Σύσταση
Colour reagent	<ul style="list-style-type: none">• 49,71 g όξινο φωσφορικό δινάτριο ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 5 g νινυδρίνη, 3 g φρουκτόζη και περίπου 60 g όξινο διφωσφορικό κάλιο (KH_2PO_4) διαλυμένα σε 1 L αποσταγμένο νερό.• pH: 6,6-6,8• Αποθήκευση: 4 °C
Dilution reagent	2 g ιωδικού καλίου (KIO_3) σε 616 ml αποσταγμένο νερό και προσθήκη 384 mL αιθανόλης (καθαρότητας 100%).
Αποθεματικό διάλυμα γλυκίνης	<ul style="list-style-type: none">• 0,1072 g γλυκίνης σε 100 mL αποσταγμένο νερό• Αποθήκευση: 4 °C
Πρότυπο διάλυμα γλυκίνης	<ul style="list-style-type: none">• 1 mL διαλύματος γλυκίνης σε 100 mL αποστειρωμένο νερό• 2 mL από το παραπάνω διάλυμα περιέχει 2 mg/L FAN.

2.6.2 Μέθοδος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των σακχάρων και των αλκοολών πραγματοποιήθηκε με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography). Όλα τα δείγματα αρχικά φυγοκεντρούνταν και στην συνέχεια φιλτράρονταν με την χρήση φίλτρων whatman που διέθεταν μεμβράνη διαμέτρου οπών 0.2 μm . Ο απαιτούμενος όγκος κάθε ένεσης ήταν 20 μL .

Χαρακτηριστικά υγρού χρωματογράφου:

Όργανο: Waters 600E

Στήλη (στατική φάση): Aminex HPX-87H (Bio-rad, Richmond, USA) (30cmx7,8 mL)

Κινητή φάση: 5 mM H_2SO_4 σε απιονισμένο, απεσταγμένο και φιλτραρισμένο νερό.

Ανιχνευτής: RI (410 Waters)

Ροή διαλυτών (κινητής φάσης): 0,6 mL/min

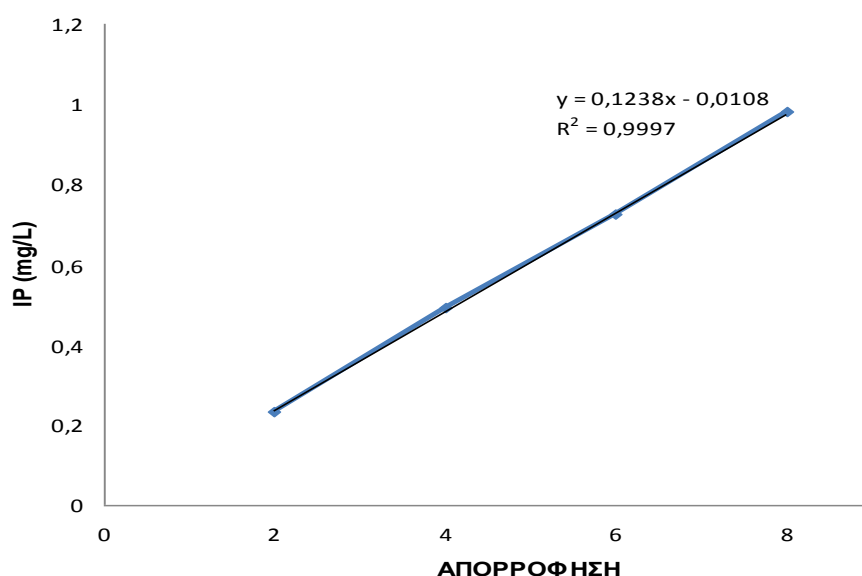
Όγκος ένεσης: 50 μl

2.6.3 Προσδιορισμός του ανόργανου φωσφόρου (Inorganic Phosphorus-IP)

Η ανάλυση της συγκέντρωσης του φωσφόρου έχει ως εξής:

- Κατάλληλη αραιώση δείγματος σε δοκιμαστικούς σωλήνες (2 ανά δείγμα)
(Vτελικό=5 mL)
- Προσθήκη σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα 0,4 mL 60 % (v/v) διαλύματος υπερχλωρικού οξέος (Fisons, England) και ανακίνηση για 20 δευτερόλεπτα.
- Προσθήκη 0,3 mL διαλύματος ασκορβικού οξέος 1% (w/v) και ανακίνηση για 20 δευτερόλεπτα.
- Προσθήκη 0,4 mL διαλύματος αμμωνιακού μολύβδου 5% (w/v) και ανακίνηση για 20 δευτερόλεπτα.
- Αναμονή για 10 λεπτά ώστε να αναπτυχθεί μπλέ χρώμα και μέτρηση της απορρόφησης στα 730 nm με την χρήση φασματοφωτόμετρου (U-2000, Spectrophotometer, Hitachi). Χρησιμοποιήθηκε απεσταγμένο νερό ως τυφλό για το μηδενισμό του φασματοφωτομέτρου.

Η πρότυπη καμπύλη που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του φωσφόρου σε σχέση με την απορρόφηση φαίνεται στο Διάγραμμα 2-2



Διάγραμμα 2-2 Πρότυπη καμπύλη υπολογισμού της συγκέντρωσης του φωσφόρου (IP)

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Αξιολόγηση πηγών άνθρακα ως προς την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης

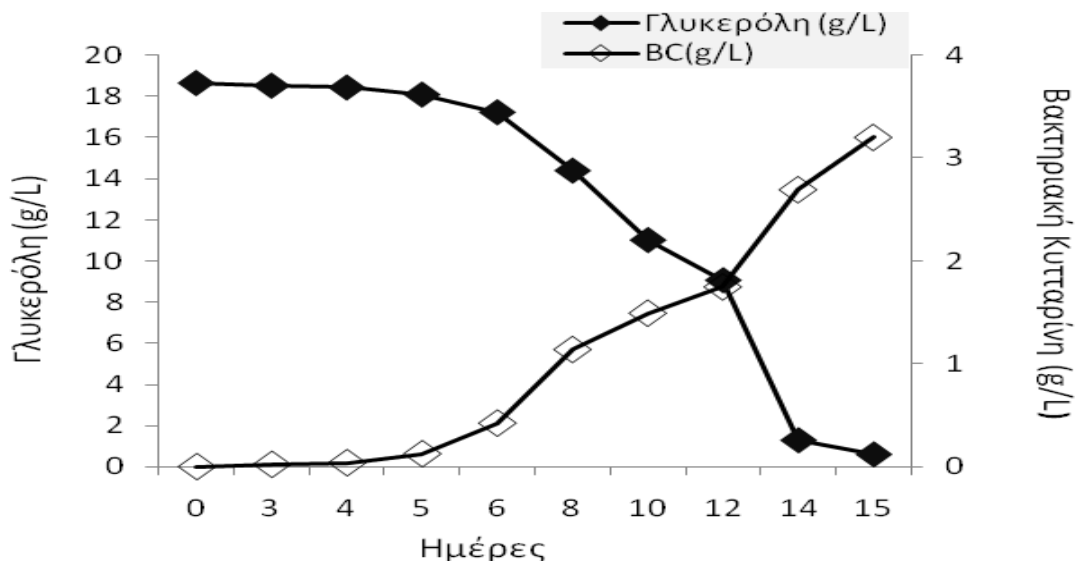
Στόχος της παρούσας πειραματικής εργασίας ήταν η παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης από διάφορες ανανεώσιμες πρώτες ύλες. Για τον σκοπό αυτό, διάφοροι καθαροί μονοσακχαρίτες, δισακχαρίτες και ακατέργαστη γλυκερόλη αξιολογήθηκαν, ώστε σε πρώτη φάση να διαπιστωθεί ποιες από αυτές τις πηγές άνθρακα μεταβολίζονται από το μικροβιακό στέλεχος και σε δεύτερη φάση να καθοριστεί η πιο αποτελεσματική στην παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης. Οι ζυμώσεις διαλείποντος έργου με το βακτηριακό στέλεχος *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM 15973 διήρκησαν 15 μέρες κατά μέσο όρο και μελετήθηκαν η παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης και η κατανάλωση των πηγών άνθρακα κατά την διάρκεια της ζύμωσης.

Αρχικά, επιλέχθηκε το θρεπτικό υπόστρωμα Hestrin–Schramm (HS-γλυκόζη) (Κεφ. 2.5.1) ως στάδιο εκκίνησης για τις ζυμώσεις προς παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης, ένα δοκιμασμένο και πλήρες σε θρεπτικά συστατικά υπόστρωμα που έχει χρησιμοποιηθεί σε πολλές μελέτες. Η συγκέντρωση της γλυκόζης (20 g/L) διατηρήθηκε σταθερή αφού σύμφωνα με τους Masaoka et al. (1993), η απόδοση της BC σε σχέση με την καταναλισκόμενη γλυκόζη μειώνεται όταν αυξάνεται η αρχική συγκέντρωση της γλυκόζης. Ενδεικτικά βρέθηκε ότι οι αποδόσεις της κυτταρίνης σε αρχικές συγκεντρώσεις γλυκόζης 8,6 g/L, 17 g/L, 34 g/L και 68,6 g/L ήταν 100%, 100%, 68% και 28 % (κβ) αντίστοιχα. Αυτό συμβαίνει διότι τα βακτηριακά κύτταρα οξειδώνουν μέρος της γλυκόζης προς γλυκονικό οξύ. Ως αποτέλεσμα, μειώνεται η ποσότητα της διαθέσιμης γλυκόζης που μπορεί να μετατραπεί σε κυτταρίνη και επιπλέον το συσσωρευμένο γλυκονικό οξύ μειώνει το pH (το βέλτιστο εύρος τιμών pH είναι 4-6) του μέσου καλλιέργειας και αναστέλλεται η παραγωγή κυτταρίνης (Schramm et al., 1957; Masaoka et al., 1993).

Στις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν γινόταν κάθε φορά αντικατάσταση του είδους του σακχάρου αλλά η σύσταση διατηρήθηκε ίδια με αυτή του HS-γλυκόζη υποστρώματος, ώστε τα αποτελέσματα να είναι συγκρίσιμα μεταξύ τους. Επίσης, σε αυτό το αρχικό πειραματικό στάδιο δεν κρίθηκε απαραίτητη η προσθήκη ιχνοστοιχείων, αμινοξέων ή άλλων χημικών ουσιών στο θρεπτικό υπόστρωμα αφού σύμφωνα με τους Ruka et al. (2012), Kuan et al. (2009) και Pourramezan et al. (2009)

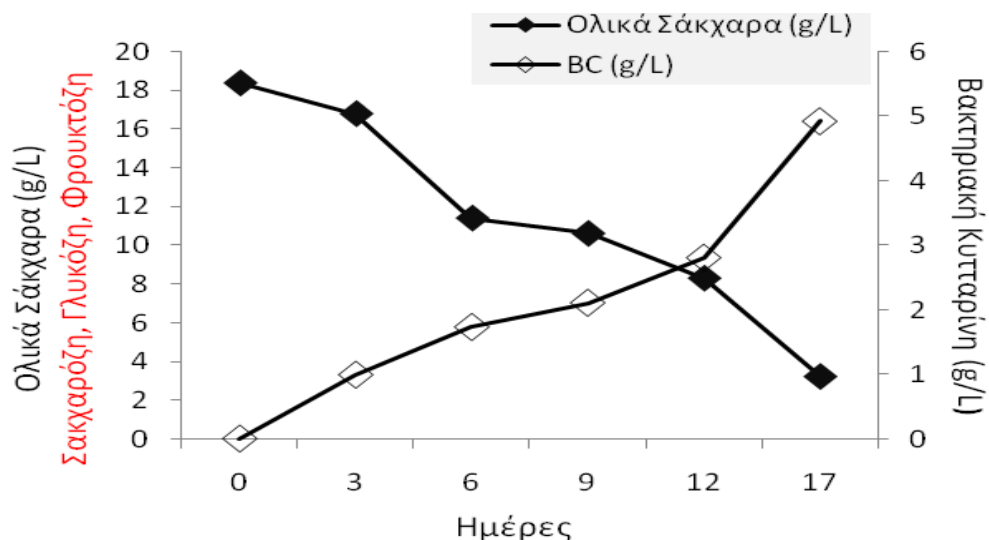
δεν έχουν κάποια αξιοσημείωτη επίδραση στην παραγωγή της BC. Παρόλο αυτά, σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα που αναφέρονται στην συνέχεια, η προσθήκη τους στο μέσο καλλιέργειας ενισχύει την παραγωγή της BC. Το Calcofluor White ST, παράγωγο στυλβενίου, που χρησιμοποιήθηκε ως λευκαντικό για την κυτταρίνη, αύξησε το ποσοστό πολυμερισμού της γλυκόζης σε κυτταρίνη, αλλά διαταράξε την κρυσταλλική μορφή της κυτταρίνης I σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από 0,1 mM (Benziman et al., 1980). Το αρνητικά φορτισμένο υδατοδιαλυτό παράγωγο της κυτταρίνης, καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη (CMC), που έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την ενίσχυση της παραγωγής της κυτταρίνης σε στατικές καλλιέργειες (Hirai et al 1998; Seifert et al 2003) μεταβάλλει τον βαθμό πολυμερισμού, μειώνει την κρυσταλλικότητα και αυξάνει την ικανότητα συγκράτησης νερού της μεμβράνης από 73 στο 96% (w/w). Η προσθήκη άλλων υδατοδιαλυτών πολυσακχαριτών όπως το άγαρ και το αλγινικό νάτριο έχει επίσης αναφερθεί ότι ενισχύει την παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης σε καλλιέργειες που πραγματοποιείται ανάδευση του θρεπτικού μέσου (Ishida et al. 2003; Bae et al. 2004; Zhou et al. 2007).

Σύμφωνα με τα πειραματικά δεδομένα, τα υποστρώματα της γλυκόζης, φρουκτόζης, σακχαρόζης και ακατέργαστης γλυκερόλης μεταβολίστηκαν ικανοποιητικά από τα βακτηριακά κύτταρα προς παραγωγή BC. Η μεγαλύτερη παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης επιτεύχθηκε με την χρήση ακατέργαστης γλυκερόλης (Διάγραμμα 3-1) και συνθετικής σακχαρόζης (Διάγραμμα 3-2) με αντίστοιχες συγκεντρώσεις 3,2 g/L και 4,9 g/L. Στο Διάγραμμα 3-4 παρουσιάζεται μια συγκριτική μελέτη της επίδρασης της πηγής άνθρακα στην παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης. Χαρακτηριστικά, η ξυλόζη και η λακτόζη δεν μεταβολίστηκαν επαρκώς από το βακτηριακό στέλεχος οδηγώντας σε σχετικά χαμηλή παραγωγή BC με αντίστοιχες συγκεντρώσεις 1,7 και 1,6 g/L. Όσον αφορά στην γλυκόζη και στην φρουκτόζη (Διάγραμμα 3-4, 3-3), η παραγωγή της BC κυμάνθηκε στο 1,2 και 2 g/L.



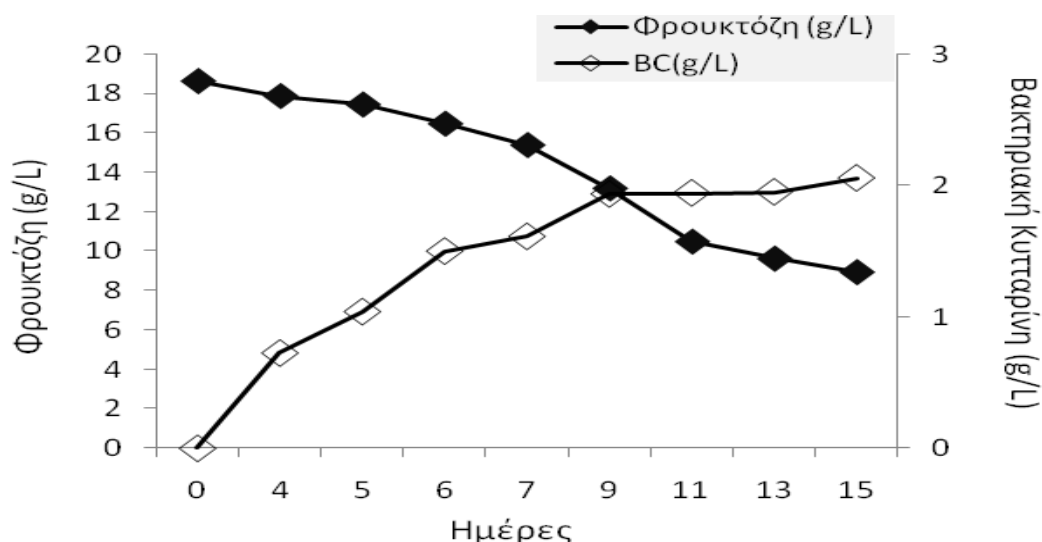
Διάγραμμα 3-1 Κατανάλωση της γλυκερόλης και παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης κατά την διάρκεια ζύμωσης ακατέργαστης γλυκερόλης καθαρότητας 92,4% (κβ.)

Στο Διάγραμμα 3-1 παρατηρείται ότι η κατανάλωση του υποστρώματος από το βακτηριακό στέλεχος καθυστερεί (μετά την 5^η ημέρα της ζύμωσης). Το ίδιο συμβαίνει και με την παραγωγή της BC η οποία ξεκινάει κατά την 5^η ημέρα της ζύμωσης. Αυτό μπορεί να οφείλεται στον μεγάλο χρόνο προσαρμογής (lag phase) του μικροοργανισμού λόγω διάφορων απροσδιόριστων παραγόντων που δεν κατέστη δυνατό να ελεγχθούν.



Διάγραμμα 3-2 Κατανάλωση της σακχαρόζης και παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης κατά την καλλιέργεια του μικροοργανισμού σε καθαρή σακχαρόζη

Στο Διάγραμμα 3-2 φαίνεται ότι η κατανάλωση του υποστρώματος της σακχαρόζης αρχίζει γρηγορότερα από την κατανάλωση της γλυκερόλης δηλαδή από την 3^η ημέρα της ζύμωσης.

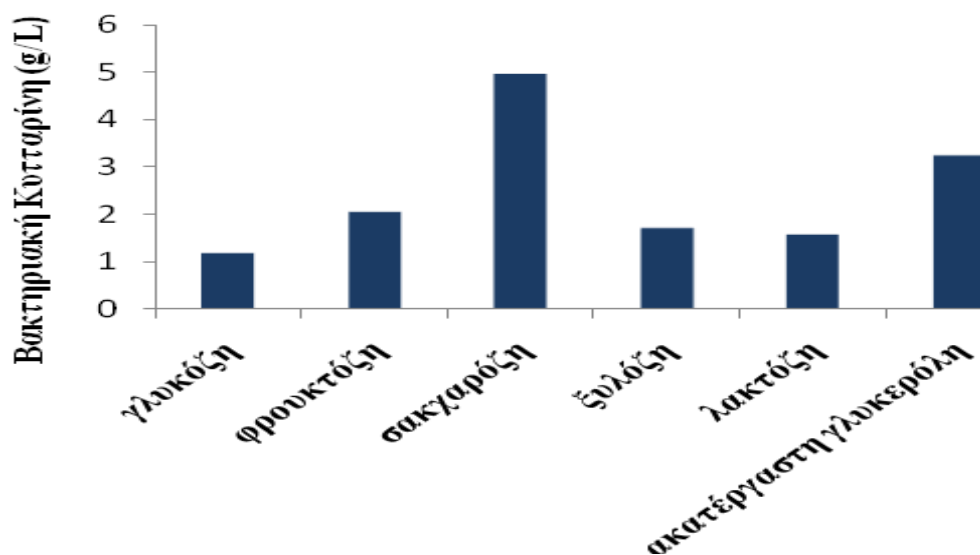


Διάγραμμα 3-3 Κατανάλωση της φρουκτόζης και παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης κατά τη διάρκεια ζύμωσης σε θρεπτικό μέσο που περιέχει καθαρή φρουκτόζη

Στο Διάγραμμα 3-3 που απεικονίζεται η κατανάλωση της καθαρής φρουκτόζης και η παραγωγή της BC, διακρίνεται ότι μεγάλο μέρος της φρουκτόζης (10 g/L) δεν έχει καταναλωθεί από τον μικροοργανισμό μετά από 15 ημέρες ζύμωσης.

Τα παραπάνω αποτελέσματα ως προς τις αποδόσεις σε BC, σε γενικές γραμμές συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες που περιγράφουν την χρήση διάφορων μονοσακχαριτών, δισακχαριτών και διάφορων αλκοολών ως πηγές άνθρακα για την παραγωγή της BC από στελέχη του *Glucanacetobacter xylinus*. Ένα από τα πιο αποδοτικά υποστρώματα που έχει αναφερθεί σε πολλές μελέτες, όπως και στην παρούσα, είναι η γλυκερόλη (Keshk και Sameshima, 2005, Mikkelsen et al., 2009). Εν αντιθέσει με τα δεδομένα που προέκυψαν για τη γλυκόζη, οι Czaja et al. (2004) και οι Son et al. (2003) ανέφεραν ότι ήταν εφικτή η αντίστοιχη παραγωγή 3,33 και 4,16 g/L βακτηριακής κυτταρίνης χρησιμοποιώντας γλυκόζη ως πρώτη ύλη. Οι Mikkelsen et al. (2009) χρησιμοποίησαν γλυκερόλη, μαννιτόλη, γλυκόζη, γαλακτόζη, σακχαρόζη και φρουκτόζη ως πηγές άνθρακα στις ζυμώσεις. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά τους, το υπόστρωμα της γλυκερόλης είχε ως αποτέλεσμα την

παραγωγή 3,75 g/L βακτηριακής κυτταρίνης. Επιπλέον, χαμηλές ποσότητες BC προέκυψαν με λακτόζη και ξυλόζη, σύμφωνα με τη ευρύτερη βιβλιογραφία (Nguyen et al. 2008; Battad-Bernardo et al. 2004; Dahman et al. 2010). Η χαμηλή τιμή που λαμβάνεται με λακτόζη είναι αναμενόμενη, δεδομένου ότι αυτά τα βακτήρια δεν διαθέτουν το γονίδιο που κωδικοποιεί τη β-γαλακτοσιδάση, το ένζυμο που καταλύει την υδρόλυση της λακτόζης (Carreira et al. 2011). Ακόμη, οι Ishihara et al. (2002), ανέφεραν ότι η BC μόλις που σχηματίστηκε σε μέσο που είχε ξυλόζη ως πηγή άνθρακα μετά από τέσσερις εβδομάδες επώασης. Επιπροσθέτως, οι Dahman et al (2010), ανέφεραν ότι η υψηλότερη παραγωγή της BC (5,65 g/L) επιτεύχθηκε σε θρεπτικό μέσο που περιείχε φρουκτόζη, με συνολική κατανάλωση σακχάρου 96% πράγμα που έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα του παρόντος πειράματος για το υπόστρωμα της φρουκτόζης (2.06 g/L, 54%). Στην ίδια δημοσίευση αναφέρετε επίσης ότι με χρήση γλυκόζης και σακχαρόζης προέκυψαν τιμές BC ίσες με 1,75 g/L και 4,7 g/L γεγονός που συμφωνεί με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. Τέλος, υψηλές τιμές BC σε υπόστρωμα σακχαρόζης έχουν αναφερθεί και από τους Pourramezan et al.(2009)

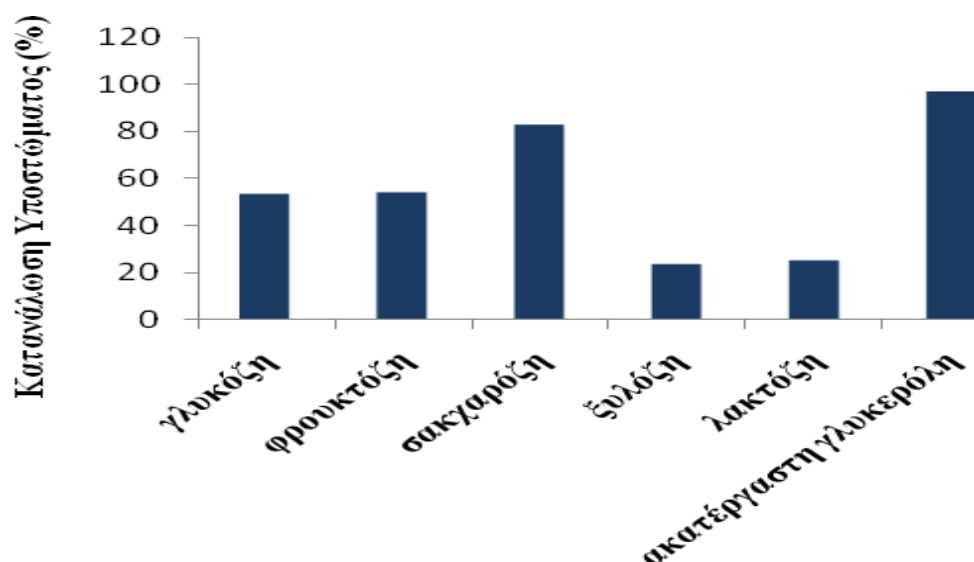


Διάγραμμα 3-4 Συγκριτική μελέτη της επίδρασης της πηγής άνθρακα στην παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης

Παρατηρώντας το Διαγράμμα 3-5 όπου παρουσιάζεται το επί τοις εκατό (%) ποσοστό κατανάλωσης των σακχάρων, διαπιστώνεται ότι μετά το πέρας των ζυμώσεων (15 ημέρες), τα ποσοστά αυτά κυμάνθηκαν μεταξύ 23.41 (ξυλόζη) - 96.68

(γλυκερόλη) % . Τα ποσοστά των υπόλοιπων σακχάρων ανέρχονται σε 53.25 %, 54 %, 82.24 % κι 25.16 % για γλυκόζη, φρουκτόζη, σουκρόζη και λακτόζη αντίστοιχα.

Συμπερασματικά από τα προηγούμενα αποτελέσματα, η σουκρόζη και η ακατέργαστη γλυκερόλη μεταβολίστηκαν καλύτερα και είχαν τις μεγαλύτερες αποδόσεις σε βακτηριακή κυτταρίνη.



Διάγραμμα 3-5 Επί τοις εκατό ποσοστό κατανάλωσης της πηγής άνθρακα μετά από 15 ημέρες ζύμωσης

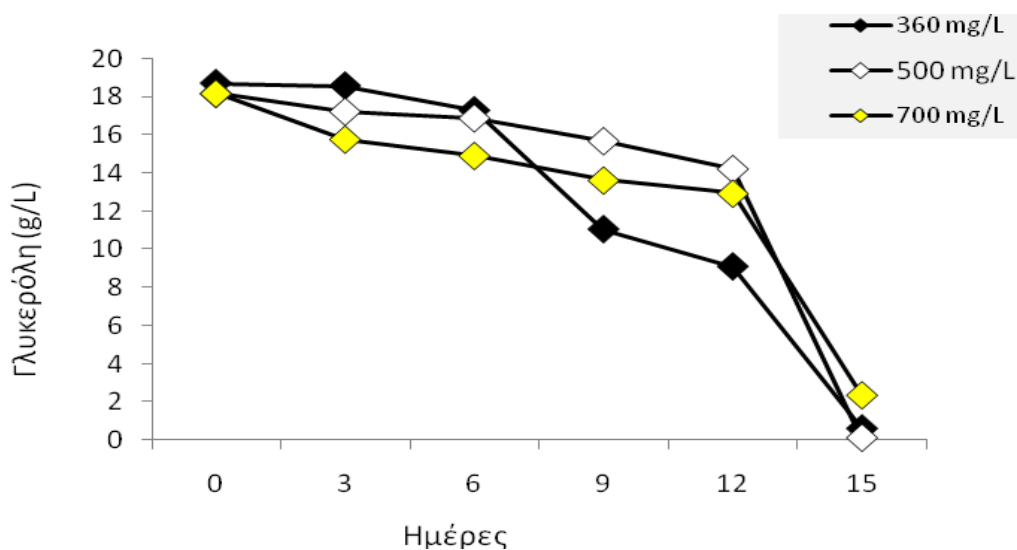
3.2 Αξιολόγηση της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων αζώτου ως προς την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης

Αφού διαπιστώθηκε ποιές πηγές άνθρακα δίνουν τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις βακτηριακής κυτταρίνης, κρίθηκε σκόπιμο να ερευνηθεί η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων αζώτου στην παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης.

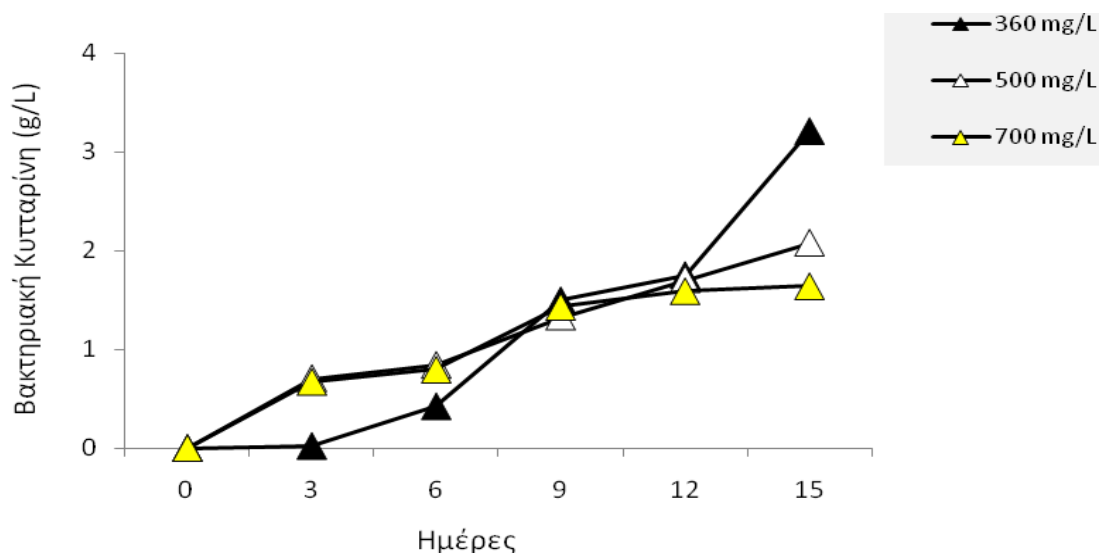
Το άζωτο είναι το δεύτερο πιο σημαντικό θρεπτικό συστατικό σε μικροβιακές ζυμώσεις καθώς είναι απαραίτητο στον κυτταρικό μεταβολισμό. Επιπλέον, αποτελεί το 8-14% της ξηρής μάζας των βακτηρίων.

Πραγματοποιήθηκαν 3 σειρές πειραμάτων με κοινή βάση το θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας HS (Κεφ. 2.5.1) και διάρκεια 15 ημερών. Ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκε η γλυκερόλη καθαρότητας 92,4% (κβ.). Οι ανάγκες του *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM 15973 σε άζωτο καλύφθηκαν από τις εξής ποσότητες yeast extract και βακτηριολογικής πεπτόνης (g/L από το καθένα): 5 (μικρή

συγκέντρωση), 7,5 (μεσαία συγκέντρωση), 10 (μεγάλη συγκέντρωση) για τα τρία πειράματα αντίστοιχα. Με την φωτομετρική μέθοδο της νινυδρίνης (Κεφ 2.6.1) προσδιορίστηκε η αντίστοιχη συγκέντρωση αζώτου που περιέχεται στις ελεύθερες αμινομάδες αμινοξέων και πεπτιδίων σε κάθε συγκέντρωση θρεπτικού μέσου που χρησιμοποιήθηκε και προέκυψαν οι εξής συγκεντρώσεις (mg FAN ανά L): 360, 500, 700 αντίστοιχα. Επιπλέον, στα μέσα καλλιέργειας προσδιορίστηκε και ο ανόργανος φώσφορος (Κεφ 2.6.3) η συγκέντρωση του οποίου προσδιορίστηκε στο εύρος 670-760 mg/L.

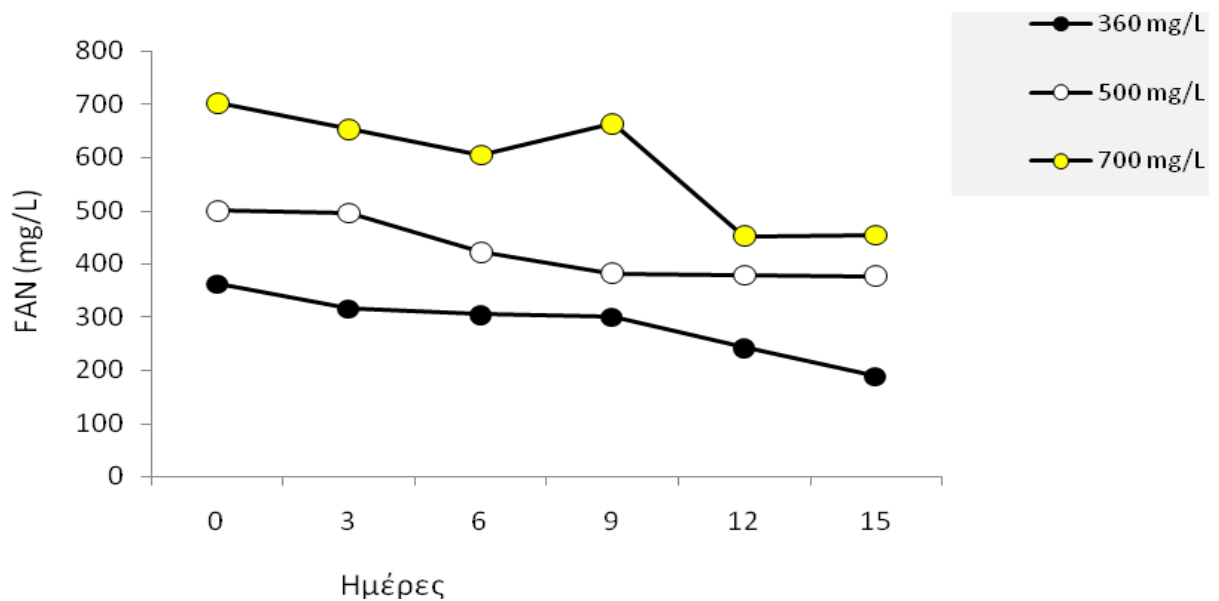


Διάγραμμα 3-6 Κατανάλωση της πηγής άνθρακα κατά την διάρκεια τριών ζυμώσεων που πραγματοποιήθηκαν σε τρεις διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις αζώτου ελεύθερων αμινομάδων: 360, 500 και 700 mg FAN/L



Διάγραμμα 3-7 Παραγωγή της BC κατά την διάρκεια τριών ζυμώσεων που πραγματοποιήθηκαν σε τρεις διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις FAN: 360, 500 και 700 mg/L

Παρατηρήθηκε ότι η γλυκερόλη καταναλώθηκε και στις τρεις συγκεντρώσεις αζώτου με ποσοστό περίπου 96% (Διάγραμμα 3-6). Ωστόσο, η συγκεντρωση της BC μειώθηκε σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις αζώτου (Διάγραμμα 3-7). Η μείωση αυτή ανέρχεται σε 35% (για 500 mg FAN/L) και 48% (για 700 mg FAN/L) σε σχέση με την συγκέντρωση BC (3,2 g/L) που παράχθηκε στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε συγκέντρωση FAN 360 mg/L. Η πτώση θα μπορούσε να οφείλεται στο γεγονός ότι εκτός από την παραγωγή της BC, και άλλες διεργασίες συμβαίνουν στο περιβάλλον της ζύμωσης όπως είναι η ανάπτυξη των κυττάρων. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες (Brown et al. 1976), οι δύο διεργασίες συμβαίνουν ταυτόχρονα και ανταγωνίζονται για την πηγή άνθρακα στον *Gluconacetobacter xylinus*. Συνεπώς, όταν αυξάνεται η συγκέντρωση του αζώτου ευνοείται η κυτταρική ανάπτυξη εις βάρος της παραγωγής BC.



Διάγραμμα 3-8 Κατανάλωση FAN κατά την διάρκεια τριών ζυμώσεων που πραγματοποιήθηκαν σε τρεις διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις FAN: 360, 500 και 700 mg/L

Οι ενδείξεις ότι η μικρότερη συγκέντρωση αζώτου είναι η πιο κατάλληλη για την παραγωγή BC, ενισχύονται από τα αποτελέσματα που ελήφθησαν μελετώντας τις κινητικές κατανάλωσης FAN και στα τρία πειράματα (Διάγραμμα 3-8). Σύμφωνα με αυτά, το άζωτο καναλώθηκε κατά 48% , 24% και 35% για τις τρεις συγκεντρώσεις (μικρή, μεσαία, μεγάλη) του, αντίστοιχα, όμως σε καμία από τις εξεταζόμενες περιπτώσεις δεν μηδενίστηκε.

Γενικά, η έκκριση εξωπολυσακχαριτών ευνοείται συνήθως όταν τα βακτήρια τροφοδοτούνται με μια άφθονη πηγή άνθρακα με ταυτόχρονο περιορισμό κάποιων άλλων θρεπτικών στοιχείων (π.χ αζώτο, οξυγόνο). Στο συγκεκριμένο πείραμα ο περιορισμός σχετίζεται με την ποσότητα του αζώτου (Freitas et al. 2011). Συμπερασματικά, οι υψηλές συγκεντρώσεις αζώτου, θα μπορούσαν να αποτελούν περιοριστικό παράγοντα για την παραγωγή υψηλών συγκεντρώσεων BC δεδομένου ότι κατευθύνουν τον κυτταρικό μεταβολισμό προς την μικροβιακή αύξηση.

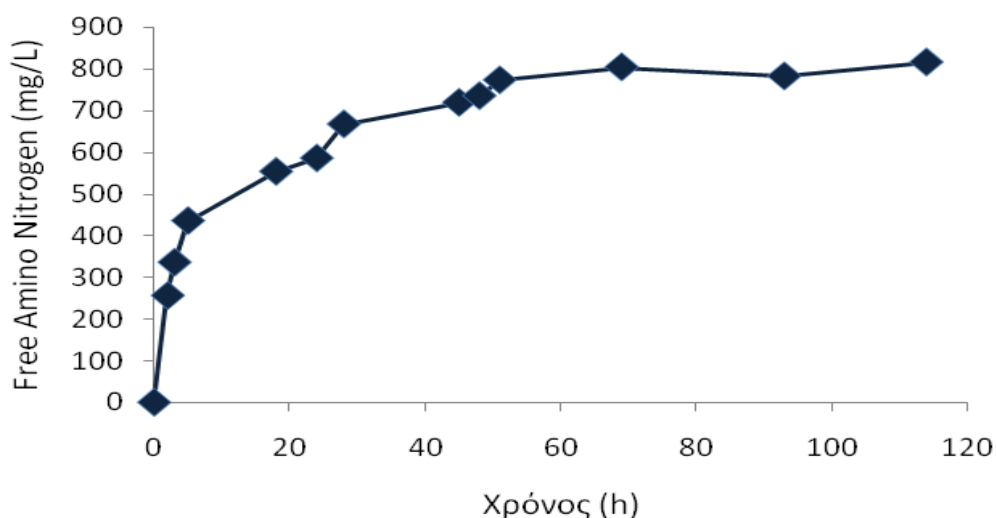
Είναι γνωστό ότι το οξυγόνο είναι μια κρίσιμη παράμετρος στην διαδικασία παραγωγής BC (Li et al. 2011), αλλά τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι το άζωτο μπορεί επίσης να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο και θα πρέπει να ληφθεί υπόψη σε μια επακόλουθη βελτιστοποίηση της διαδικασίας. Ωστόσο, μελλοντικές μελέτες θα πρέπει να επικεντρωθούν στην αξιολόγηση της επίδρασης του οξυγόνου και του

αζώτου στην παραγωγή της BC αφού πρώτα αναπτυχθεί μία αξιόπιστη μέθοδος για την άμεση μέτρηση της ανάπτυξης του στελέχους *Glucanacetobacter xylinus* προκειμένου να πραγματοποιηθεί βελτιστοποίηση της συγκεκριμένης βιοδιεργασίας.

3.3 Αξιοποίηση πρωτεολυτικών ενζύμων για την υδρόλυση ηλιαλεύρων προς παραγωγή θρεπτικού μέσου καλλιέργειας

Σε αυτό το πειραματικό στάδιο πραγματοποιήθηκε υδρόλυση των ηλιαλεύρων με τη χρήση ακατέργαστων (κυρίως πρωτεολυτικών) ενζύμων. Σκοπός ήταν η παραλαβή υγρού μέσου πλούσιο σε άζωτο, ώστε να μπορεί να αξιοποιηθεί για παραγωγή BC.

Τα αποτελέσματα του πειράματος (Διάγραμμα 3-9) αξιολογήθηκαν με βάση την παραγωγή του FAN που προέρχεται από την υδρόλυση των πρωτεϊνών που περιέχονται στα ηλιάλευρα. Κατά την διάρκεια της διεργασίας η παραγωγή FAN αυξάνεται με γρήγορο ρυθμό έως και τις 24 ώρες υδρόλυσης φθάνοντας τα 586 mg FAN/L. Η μέγιστη παραγωγή του FAN (816,3 mg/L), που επιτεύχθη στο τέλος της υδρόλυσης, ήτοι στις 114 ώρες.

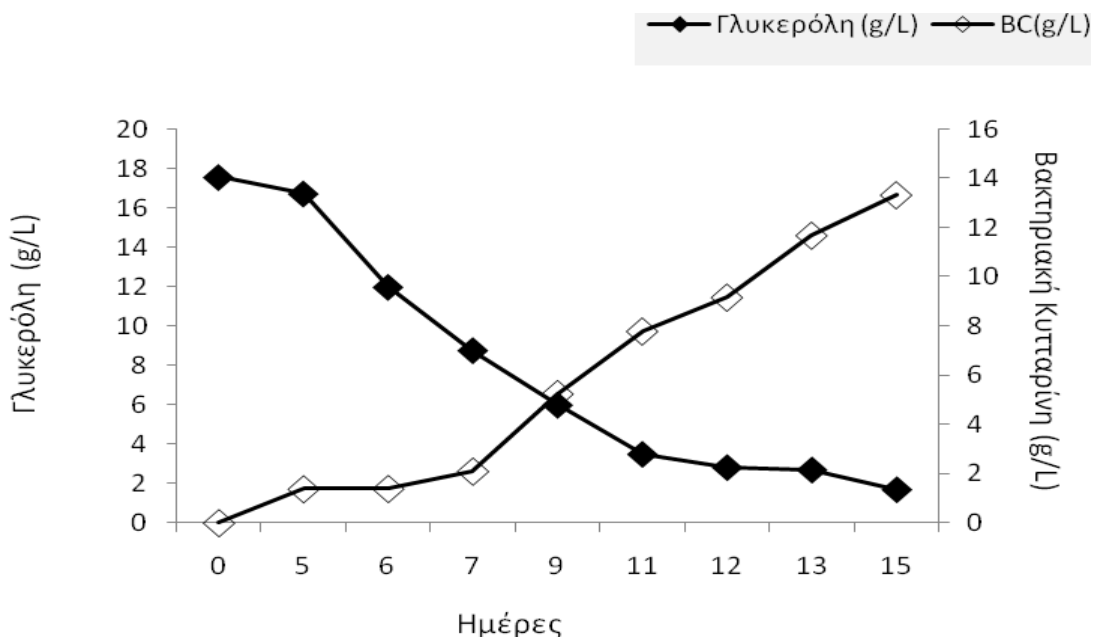


Διάγραμμα 3-9 Παραγωγή αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN, mg/L) κατά την υδρόλυση των ηλιαλεύρων από τον μύκητα *Aspergillus oryzae*.

3.4 Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης αξιοποιώντας ακατέργαστη γλυκερόλη και υδρόλυμα ηλιόλευρου

Σε αυτό το πειραματικό στάδιο, μελετήθηκε η παραγωγή BC σε θρεπτικό υπόστρωμα ακατέργαστης γλυκερόλης και υδρολύματος ηλιόλευρου. Η ζύμωση με το μικροβιακό στέλεχος *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM 15973 διήρκησε 15 ημέρες και σημείο έναρξης ως προς την πηγή άνθρακα και αζώτου ήταν τα 18 g/L γλυκερόλης και 480 mg FAN ανά L υδρολύματος αντίστοιχα. Η τελική και μεγαλύτερη ποσότητα της BC που προσδιορίστηκε ήταν 13,34 g/L. Η απόδοση της ζύμωσης υπολογίστηκε ως 0,8 g BC ανά g καταναλωθέντος υποστρώματος και η παραγωγικότητα ως 0,89 g/L/day. Στο Διάγραμμα 3-10 φαίνεται ότι η γλυκερόλη άρχισε να καταναλώνεται με εκθετικό ρυθμό από το βακτηριακό στέλεχος από της 5^η ημέρα ενώ η παραγωγή της BC σημείωσε αξιωματική αύξηση από την 7^η ημέρα.

Συγκρίνοντας αυτά τα αποτελέσματα με αυτά του πειράματος στο οποίο χρησιμοποιήθηκε ακατέργαστη γλυκερόλη σε συνδυασμό με εμπορικές πηγές αζώτου (πεπτόνη, yeast extract) (Διάγραμμα 3-1) η παραγωγή της BC τετραπλασιάστηκε.



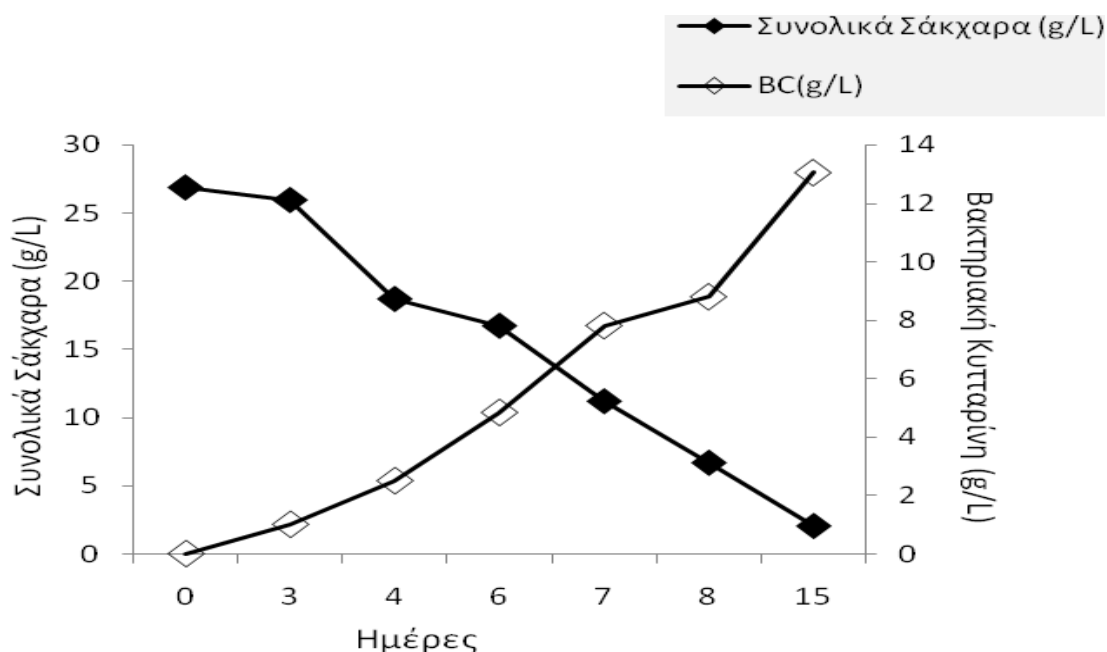
Διάγραμμα 3-10 Κατανάλωση γλυκερόλης και παραγωγή BC κατά την διάρκεια ζύμωσης που πραγματοποιήθηκε σε θρεπτικό μέσο που αποτελείται από ακατέργαστη γλυκερόλη και υδρόλυμα ηλιαλεύρων

3.5 Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης από αμυλούχο υδρόλυμα που προέρχεται από στερεά απόβλητα της εταιρείας ΓΙΩΤΗΣ

Σε αυτό το πείραμα, το υδρόλυμα των στερεών αποβλήτων που προέρχονται από την παραγωγή φρουτόκρεμας που αξιοποιήθηκε για την ζύμωση προς παραγωγή BC ήταν ένα πλήρες θρεπτικό μέσο σε πηγή άνθρακα και αζώτου. Η αρχική σύσταση του θρεπτικού μέσου σε σάκχαρα μετά την υδρόλυση φαίνεται στον Πίνακα 3-1 και αντιπροσωπεύει την αρχική συγκέντρωση σακχάρων κατά την ζύμωση. Το ελεύθερο άζωτο των αμινομάδων και πεπτιδίων υπολογίστηκε ως 450 mg FAN/L υδρολύματος. Η ζύμωση με το μικροβιακό στέλεχος *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM 15973 διήρκησε 15 ημέρες και η παραγωγή της BC έφτασε τα 13,05 g/L. Η παραγωγή αυτή σε σχέση με αυτή που προέκυψε από το πείραμα της εμπορικής σακχαρόζης (Διάγραμμα 3-2) είναι 2,6 φορές μεγαλύτερη. Η απόδοση της παραγωγής BC σε αυτή την ζύμωση είναι 0,51 g BC ανά g καταναλωθέντος υποστρώματος και η παραγωγικότητα 0,87 g/L/day.

Πίνακας 3-1 Ποσοτικοποίηση των σακχάρων του αμυλούχου υδρολύματος

Σάκχαρα	Συγκέντρωση (g/L)
Σακχαρόζη	0,79
Γλυκόζη	18,65
Φρουκτόζη	7,43
ΣΥΝΟΛΟ	26,87



Διάγραμμα 3-11 Κατανάλωση συνολικών σακχάρων και παραγωγή BC κατά την διάρκεια ζύμωσης που πραγματοποιήθηκε σε θρεπτικό μέσο που αποτελείται από υδρολυμένα απόβλητα από γραμμή παραγωγής φρουτόκρεμας.

3.6 Παράθεση βιβλιογραφικών δεδομένων και σύγκριση των αποτελεσμάτων με εκείνα της παρούσας εργασίας

Διάφορα βιομηχανικά απόβλητα και αγρο-βιομηχανικά υπολείμματα έχουν διερευνηθεί για την παραγωγή BC. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι το υδρόλυμα σκόνης από Konjac (αποτελείται από γλυκόζη, μαννόζη) η οποία είναι άφθονη στην Κίνα. Η μέγιστη συγκέντρωση BC που επιτεύχθηκε σε αυτό το θρεπτικό υπόστρωμα ήταν περίπου 2 g/L μετά από 8 ημέρες ζύμωσης και μετά από προεπεξεργασία του αποβλήτου με $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (Hong et al., 2008).

Μελέτες από τους Kurosumi et al. (2009) σε χυμούς φρούτων όπως πορτοκάλι, ανανάς, μήλο, Ιαπωνικό αχλάδι, και σταφύλια έδειξαν ότι η μεγαλύτερη παραγωγή BC επιτεύχθηκε στο υπόστρωμα χυμού πορτοκαλιού (5,9 g/L) και χυμού ανανά (4,1 g/L) μετά από 14 ημέρες ζύμωσης.

Άλλη μελέτη που έγινε σε βιοαντιδραστήρες των 5 L υπό στατικές συνθήκες, έδειξε αξιοσημείωτη παραγωγή BC σε υπόστρωμα χυμού ανανά και καρύδας (Kongruang et al., 2008). Να σημειωθεί εδώ ότι η καρύδα και ο ανανάς είναι δημοφιλή φρούτα που καλλιεργούνται σε πολλές τροπικές χώρες και είναι διαθέσιμα

σχεδόν όλο το χρόνο. Δεδομένου ότι οι χυμοί αυτοί είναι πλούσιοι σε υδατάνθρακες, πρωτεΐνες και ιχνοστοιχεία, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υπόστρωμα για την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης που δύναται να χρησιμοποιηθεί ως πρόσθετο σε τρόφιμα , καθώς και ως πρώτη ύλη για την παραγωγή υψηλής ποιότητας χαρτιού. Παρά το γεγονός ότι αυτά τα δύο υποστρώματα έχουν χρησιμοποιηθεί για την παραδοσιακή καλλιέργεια βακτηριακής κυτταρίνης στη Νοτιοανατολική Ασία, δεν έχει αναφερθεί ποτέ ένα αποτελεσματικό μέσο σύνθεσης.

Η μελάσα (υποπροϊόν της βιομηχανίας ζάχαρης που αποτελείται από γλυκόζη, σουκρόζη, φρουκτόζη και ραφινόζη) είναι ένα θρεπτικό μέσο που έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς για την παραγωγή BC (Keshk et al., 2006). Οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι η θερμική επεξεργασία της μελάσας με χρήση H_2SO_4 οδήγησε στην παραγωγή κυτταρίνης κατά 76 % μεγαλύτερης συγκέντρωσης σε σχέση με την συγκέντρωση που επιτυγχάνεται με τη χρήση μη επεξεργασμένης μελάσας. Η συγκέντρωση της BC που παράγεται αυξάνεται όταν χρησιμοποιηθεί χαμηλή συγκέντρωση μελάσας λόγω της περίπλοκης φύσης του αποβλήτου (Bae και Shoda, 2004). Σύμφωνα με τους Jung et al. (2010) η μέγιστη συγκέντρωση της BC (2-2,5 g/L) από μελάσα παράγεται σε συνδυασμό με Corn Steep Liquor.

Οι Dahman et al. (2010), αξιοποίησαν αγρο-βιομηχανικά υπολείμματα όπως υδρολύματα άχυρου σίτου και ινών καλαμποκιού για παραγωγή BC. Τα υποστρώματα που είχαν εμπλουτιστεί με πλήθος ιχνοστοιχείων περιείχαν γλυκόζη, ξυλόζη, αραβινόζη και γαλακτόζη και κατέληξαν σε συγκεντρώσεις BC της τάξης των 5,2 g/L και 2,4 g/L αντίστοιχα. Το υδρόλυμα από άχυρο σίτου έχει χρησιμοποιηθεί ως πρώτη ύλη και από άλλους μελετητές (Hong et al. 2012) με 8,3 g/L από 12 g/L αναγωγικά σάκχαρα.

Πειραματικό ενδιαφέρον έχουν επίσης τα στερεά υπολείμματα ελαιουργίου (Gomes et al. 2013) ως θρεπτικό μέσο για την παραγωγή BC λόγω της μεγάλης περιβαλλοντικής επιβάρυνσης που προκαλούν αυτά τα βεβαρυμένου οργανικού φορτίου απόβλητα. Τα αποτελέσματα παραγωγής BC από τα απόβλητα αυτά, δεν ήταν πολύ ενθαρρυντικά καθώς η BC έφτασε μόλις στο 1 g/L μετά από 96 ώρες ζύμωσης.

Επιπλέον, η καφεΐνη και άλλες σχετικές ξανθίνες έχουν μελετηθεί ως πιθανοί ενισχυτές στην παραγωγή BC (Fontana et al., 1991). Φυτά με υψηλά επίπεδα των συστατικών αυτών είναι η *Camellia* (εμπορικό τσάι), η *Paulinia* (Guarana), ο καφές, και η *Theobroma* (κακάο). Δεδομένου ότι, μικρές ποσότητες αυτών των ουσιών

απαιτούνται ως πηγές άνθρακα, εκχυλίσματά τους μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φθηνές πρώτες ύλες.

Μεταξύ άλλων, στέμφυλα οινοποιίας, τυρόγαλα, ακατέργαστη γλυκερόλη, αιθανόλη, μεθανόλη, και απόβλητο από την βιομηχανία παραγωγής χαρτοπολτού (spent sulphite liquor-SSL), έχουν μελετηθεί ως χαμηλού κόστους πηγές άνθρακα και άλλων θρεπτικών για την παραγωγή της BC (Gomes et al. 2013).

3.7 Χαρακτηρισμός της BC που προέκυψε από τα διάφορα υποστρώματα

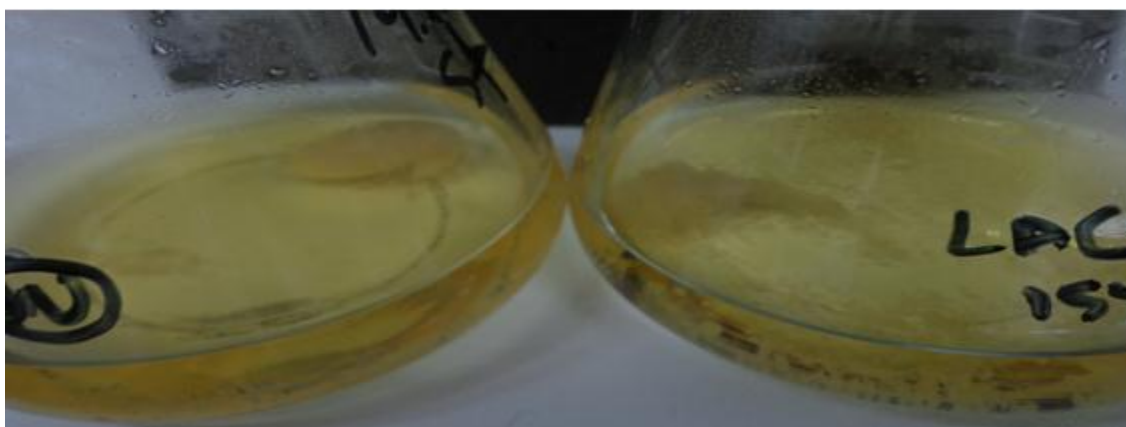
Στο σημείο αυτό θεωρείται ενδιαφέρον να γίνει μια μακροσκοπική περιγραφή της BC που προέκυψε από τα διάφορα υποστρώματα στα οποία αναπτύχθηκε το μικροβιακό στέλεχος. Όπως φαίνεται από τις εικόνες που ακολουθούν η BC είναι ένα συναρπαστικά πολυμορφικό βιοπολυμερές που αλλάζει μορφή ανάλογα με το υπόστρωμα που αναπτύσσεται και ανάλογα με τις συνθήκες ανάδευσης ή στατικής ζύμωσης. Η μακροσκοπική αυτή αλλαγή συνεπάγεται και με μεταβολές στην δομή, τον πολυμερισμό, την ικανότητα συγκράτησης νερού, το μέτρο ελαστικότητας και άλλες φυσικο-μηχανικές ιδιότητες της BC που δεν προσδιορίζονται στην παρούσα μελέτη.

Στην Εικόνα 3-1 φαίνεται η BC που παράγεται σε υπόστρωμα γλυκόζης και ξυλόζης. Παρατηρείται ότι στην γλυκόζη σχηματίζονται μικρά σφαιρίδια κυτταρίνης στον πυθμένα της κωνικής φιάλης. Η δημιουργία τους οφείλεται στις συνθήκες ανάδευσης που προηγήθηκαν (1-2 ημέρες, για ανάπτυξη της βιομάζας) πριν η κωνική τοποθετηθεί σε στατικές συνθήκες καλλιέργειας. Επιπλέον, η ύπαρξη 4 μεμβρανών κυτταρίνης είναι εμφανής. Αιτία αυτού του φαινομένου είναι το μικρό μέγεθος της κωνικής φιάλης (50 mL). Οι μεμβράνες σχηματίζονται γρήγορα λόγω της μικρής διαμέτρου της κωνικής και λόγω της βαρύτητας κατεβαίνουν και στη θέση τους δημιουργούνται άλλες. Σε όλη αυτή την διαδικασία παίζει ζωτικό ρόλο ο μικροοργανισμός ο οποίος βρισκόμενος στην επιφάνεια του σχηματιζόμενου υμενίου συνθέτει βακτηριακή κυτταρίνη. Όσο αφορά την ξυλόζη, η BC έχει πάρει την μορφή κροκιδώσεων και η δημιουργία ενός λεπτού υμενίου είται αργή πολύ είτε δεν πραγματοποιείται.



Εικόνα 3-1 BC σε υπόστρωμα γλυκόζης (αριστερά) και ξυλόζης (δεξιά)

Στην Εικόνα 3-2 διακρίνεται η BC που παράγεται σε υπόστρωμα λακτόζης και παρατηρούνται και σε αυτή την περίπτωση κροκιδώσεις και πάρα πολλοί μικροί κόκκοι.



Εικόνα 3-2 BC που παράγεται σε υπόστρωμα λακτόζης

Στην Εικόνα 3-3 απεικονίζονται οι μορφές κυτταρίνης που ελήφθησαν από τα πειράματα που διεξήχθησαν με τις ανανεώσιμες πρώτες ύλες. Η BC από το υδρόλυμα του αποβλήτου που προκύπτει από την γραμμή παραγωγής φρουτόκρεμας άργησε να πολυμεριστεί (μετά την 7^η ημέρα) σε αντίθεση με αυτή που προέκυψε από την ακατέργαστη γλυκερόλη και το υδρόλυμα ηλιαλεύρων. Επίσης σημαντικό σημείο είναι ότι η πρώτη διαλυόταν πολύ εύκολα και είχε σκούρο χρώμα ενώ η δεύτερη ήταν πολύ γερή και είχε γαλακτερό χρώμα. Συμπερασματικά, υποθέτουμε ότι η μία είχε μικρό μέτρο ελαστικότητας εν αντιθέσει με την άλλη.



Εικόνα 3-3 BC που παράγεται σε υδρόλυμα από απόβλητα που προέρχονται από γραμμές παραγωγής φρουτόκρεμας (αριστερά) και ακατέργαστης γλυκερόλης σε συνδυασμό με υδρόλυμα ηλιαλεύρων (δεξιά)

Η BC της Εικόνας 3-4 προέρχεται από ακατέργαστη γλυκερόλη σε συνδυασμό με εμπορική πηγή αζώτου. Από μακροσκοπική παρατήρηση φαίνεται να έχει μεγαλύτερη ικανότητα συγκράτησης νερού από αυτή που προκύπτει από γλυκερόλη με υδρόλυμα ηλιαλεύρων η οποία είναι πιο συμπαγής.



Εικόνα 3-4 BC σε υπόστρωμα ακατέργαστης γλυκερόλης με εμπορική πηγή αζώτου

Στην Εικόνα 3-5 η BC προήλθε από υπόστρωμα καθαρής γλυκόζης σε συνδυασμό με ακατέργαστη γλυκερόλη και υδρόλυμα ηλιαλεύρων. Το πείραμα με χρήση αυτού του υποστρώματος δεν έχει πραγματοποιηθεί ακόμη αλλά αποτελεί μελλοντικό θέμα διερεύνησης. Όπως φαίνεται η BC έχει ανοιχτό γαλακτερό χρώμα

(επιθυμητή ιδιότητα) και υψηλό βαθμό πολυμερισμού και κρυσταλλικότητας. Η μεμβράνη που σχηματίζεται είναι συμπαγής και μεγάλου πάχους.



Εικόνα 3-5 BC που προήλθε από μέσο καλλιέργειας που περιείχε καθαρή γλυκόζη σε συνδυασμό με θρεπτικό που περιείχε γλυκερόλη και υδρόλυμα ηλιαλεύρων

Στην Εικόνα 3-6 η BC προήλθε από ακατέργαστη γλυκερόλη και ελάχιστη ποσότητα FAN (λιγότερο από 50 mg/L) από εκχύλιση ηλιαλεύρων. Αν και δεν προσδιορίστηκε η συγκέντρωση που παρήχθη, η ποσότητά της φάνηκε αξιόλογη δεδομένου ότι χρησιμοποιήθηκε σχεδόν μηδενική συγκέντρωση πηγής αζώτου. Επίσης, αυτό αποτελεί ένα φαινόμενο που θα διερευνηθεί σε μελλοντική μελέτη



Εικόνα 3-6 BC που παρήχθη με χρήση ακατέργαστης γλυκερόλης και ελάχιστης ποσότητας FAN (λιγότερο από 50 mg/L) από εκχύλιση ηλιαλεύρων



Εικόνα 3-7 Μεμβράνη BC που σχηματίστηκε σε περιέκτη με επιφάνεια $70 \times 30 \text{ cm}^2$ και θρεπτικό υπόστρωμα ακατέργαστης γλυκερόλης σε τελικό όγκο ζύμωσης 2 L υπό μη ασηπτικές συνθήκες

Η Εικόνα 3-7 δείχνει μεμβράνη BC που σχηματίστηκε σε περιέκτη με επιφάνεια $70 \times 30 \text{ cm}^2$ και θρεπτικό υπόστρωμα ακατέργαστης γλυκερόλης με τελικό όγκο ζύμωσης 2 L υπό μη ασηπτικές συνθήκες. Από αυτή την προκαταρκτική μελέτη, φαίνεται πως όταν ο λόγος επιφάνειας προς τον όγκο ζύμωσης είναι μεγάλος, η βιοσύνθεση της μεμβράνης BC ξεκινάει από την πρώτη ημέρα και καταλήγει να καλύψει όλη την επιφάνεια σε τρεις μόλις ημέρες. Στην ίδια προκαταρκτική μελέτη, η μεμβράνη που σχηματίστηκε μετά από τρεις μέρες αφαιρέθηκε υπό μη ασηπτικές συνθήκες και στις επόμενες 24 ώρες σχηματίστηκε καινούρια μικρότερου πάχους αλλά ίδιας επιφάνεια με την αρχική. Η διαδικασία επαναλήφθηκε άλλες 3 φορές με τα ίδια αποτελέσματα. Αυτό το συναρπαστικό δεδομένο θα εξεταστεί μέσω πειραμάτων που θα γίνουν στο μέλλον.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι το βακτηριακό στέλεχος *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM 15973 είναι αρκετά αξιόλογο αφού μεταβόλισε ικανοποιητικά όλα τα θρεπτικά υποστρώματα στα οποία καλλιεργήθηκε. Τα πιο αποδοτικά από τα εμπορικά σάκχαρα ήταν η σακχαρόζη και η ακατέργαστη γλυκερόλη.
- Τα πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι η μικρότερη συγκέντρωση αζώτου είναι η πιο κατάλληλη για την παραγωγή BC αφού μεγάλες συγκεντρώσεις του, FAN αποτελούν περιοριστικό παράγοντα δεδομένου ότι κατευθύνουν τον κυτταρικό μεταβολισμό προς την μικροβιακή αύξηση.
- Προσεκτική αναζήτηση της βιβλιογραφίας έδειξε ότι η παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης έχει δοκιμαστεί σε αρκετά αγρο-βιομηχανικά υπολείμματα και απόβλητα από διαφορετικούς βιομηχανικούς κλάδους με σχετικά χαμηλές αποδόσεις στην πλειοψηφία τους. Όμως η χρήση υδρολυμάτων ηλιάλευρου ως πηγή αζώτου δεν έχει αναφερθεί πουθενά ούτε και ο συνδυασμός τους με ακατέργαστη γλυκερόλη ως πηγή άνθρακα. Ακόμη, τα αποτελέσματα που λήφθηκαν για την παραγωγή BC ήταν από τα μεγαλύτερα που έχουν αναφερθεί βιβλιογραφικά.
- Σε μία μελέτη που έγινε παράλληλα με την παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων με σκοπό την διερεύνηση των σταθεροποιητικών ιδιοτήτων της BC σε γαλακτώματα και στην συνέχεια την σύγκρισή τους με τις ιδιότητες της εμπορικής κυτταρίνης που χρησιμοποιείται σήμερα ως σταθεροποιητικός παράγοντας σε γαλακτώματα. Οι εμπορικές μορφές κυτταρίνης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η HPMC (Hydroxypropyl methylcellulose) και η CMC (Carboxymethylcellulose). Η μελέτη έδειξε ότι η χρήση της BC μείωσε τον ρυθμό απογαλακτωματοποίησης. Αυτή η υψηλότερη σταθερότητα οφείλεται στις κροκιδώσεις των ινιδίων της BC που προσροφώνται στην επιφάνεια της σταγόνας του ελαίου και σχηματίζουν ένα ισχυρό δίκτυο. Επιπλέον διαπιστώθηκε ότι τα γαλακτώματα που περιείχαν BC δεν επηρεάζονται από αλλαγές στο pH, τη θερμοκρασία ή την ιοντική ισχύ σε αντίθεση με τα γαλακτώματα που παρασκευάζονται με τα άλλα είδη της εμπορικής κυτταρίνης. Ως εκ τούτου, μπορεί να συναχθεί το συμπέρασμα ότι η BC είναι ένας χρήσιμος σταθεροποιητής για γαλακτώματα.

- Είναι σαφές ότι διαφορετικών ιδιοτήτων βακτηριακή κυτταρίνη παράγεται όταν χρησιμοποιούνται διαφορετικές πηγές άνθρακα. Το ίδιο συμβαίνει και όταν επικρατούν στατικές συνθήκες ή συνθήκες ανάδευσης. Τα μεταβλητά χαρακτηριστικά είναι το χρώμα, η ικανότητα συγκράτησης νερού, η κρυσταλλικότητα, ο βαθμός πολυμερισμού, η μηχανική αντοχή κ.α.
- Από παρατήρηση, διαπιστώθηκε ότι με ανάμιξη υποστρώματος που περιείχε υδρόλυμα ηλιάλευρου και ακατέργαστη γλυκερόλη και υποστρώματος που αποτελούταν από εμπορική γλυκόζη προέκυψε μεγάλου πάχους μεμβράνη BC, πολύ συμπαγής και δυνατή με ανοιχτό γαλακτερό χρώμα. Αυτά τα χαρακτηριστικά δεν εμφανίζονται σύσσωμα στα υπόλοιπα υποστρώματα που εξετάστηκαν Αυτό αποτελεί ένα φαινόμενο που θα διερευνηθεί εκτενώς σε μελλοντική μελέτη.
- Ακόμα ένα θέμα που προκαλεί ενδιαφέρον και θα αποτελέσει αντικείμενο μελλοντικής μελέτης είναι η παρατήρηση ότι αξιοσημείωτη ποσότητα κυτταρίνης δημιουργήθηκε από ακατέργαστη γλυκερόλη και ελάχιστη ποσότητα FAN (λιγότερο από 50 mg/L) από εκχύλιση ηλιαλεύρων.
- Από προκαταρτικές μελέτες, φαίνεται πως όταν ο λόγος επιφάνειας προς τον όγκο ζύμωσης είναι μεγάλος, η βιοσύνθεση της μεμβράνης BC ξεκινάει πολύ γρηγορότερα σε σχέση με την μεμβράνη που σχηματιζόταν στις κωνικές των πειραμάτων της παρούσας μελέτης. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι η συγκέντρωση της BC που προέκυψε ήταν μεγαλύτερη. Αυτό το συναρπαστικό δεδομένο θα εξεταστεί μέσω πειραμάτων που θα γίνουν στο μέλλον.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ashby, R.D., Solaiman, D.K.Y., Foglia, T.A.: Bacterial poly(hydroxyalkanoate) polymer production from the biodiesel co-product stream, *J. Polym. Environ.* 12(3), 105–112, (2004)
- Bae S, Sugano Y, Shoda M: Improvement of bacterial cellulose production by addition of agar in a jar fermentor, *J Biosci Bioeng* 97(1), 33–38 (2004)
- Bautista, J., Parrado, J., Machado, A.: Composition and fractionation of sunflower meal: Use of the lignocellulosic fraction as substrate in solid state fermentation, *Biol. Waste* 32 (3), 225–233, (1990)
- Benziman M, Haigler C, Brown RM et al: Cellulose biogenesis: polymerization and crystallization are coupled process in *Acetobacter xylinum*, *Proc Natl Acad Sci USA* 77(11), 6678–6682, (1980)
- Brett C.T. Cellulose microfibrils in plants: Biosynthesis, deposition, and integration into the cell wall, *Intl. Rev. Cytol.* 199:161–199, (2000)
- Brown, A.J.: On an acetic ferment which forms cellulose, *J.Chem. Soc.* 49, 432-439 (1886)
- Brown RM, Willison JHM, Richardson CL: Cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: Visualization of the site of synthesis and direct measurement of the in vivo process. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73(12), 4565-9, (1976)
- Carreira P, Mendes JAS, Trovatti E, Serafim LS, Freire CSR, Silvestre AJD, et al. Utilization of residues from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose. *Bioresour Technol*, 102(15), 7354-60, (2011)
- Chawla Prashant R., Ishwar B. Bajaj, Shrikant A. Survase and Rekha S. Singhal : Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications: *Food Technol. Biotechnol.* 47 (2), 107–124, (2009)
- Chatzifragkou, A., Papanikolaou, S., Dietz, D., Doulgeraki, A.I., Nychas, G.J., Zeng, A.P. : Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* growing on biodiesel-derived crude glycerol through a non-sterilised fermentation process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91(1), 101–112, (2011)
- Cleenwerck I, De Vos P, De Vuyst : Phylogeny and differentiation of species of the genus *Gluconacetobacter* and related taxa based on multilocus sequence analyses of housekeeping genes and reclassification of *Acetobacter xylinus* subsp.

- sucrofermentans as *Gluconacetobacter sucrofermentans* (Toyosaki et al. 1996) sp. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 60 (10), 2277-83 (2010)
- Colvin, J. R.: Formation of cellulose microfibrils in a homogenate of *Acetobacter xylinum*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 70, 294-295 (1957).
- Costeron JW: The role of bacterial exopolysaccharides in nature and disease. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology.* 22(4–5), 551–563, (1999)
- Czaja W, Krystynowicz A, Bielecki S, Brown RM. Microbial cellulose: the natural power to heal wounds. *Biomaterials.* 27(2), 145-51, (2006)
- Czaja, W., Romanowicz, D., & Brown, R. M., *Cellulose.* 11, 403–411, (2004)
- Dahman Y. & Kithsiri E. Jayasuriya & Magdalina Kalis Potential of Biocellulose Nanofibers Production from Agricultural Renewable Resources: Preliminary Study *Appl Biochem Biotechnol.* 162, 1647–1659, (2010)
- Dieter Klemm, Brigitte Heublein, Hans-Peter Fink and Andreas Bohn : Cellulose, Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material *Angew. Chem. Int. Ed.* 44, 3358 – 3393, (2005)
- Dominguez H, Núñez MJ, Lema JM : Aqueous processing of sunflower kernels with enzymatic technology. *Food Chem.* 53, 427–434, (1995)
- El-Saied H, El-Diwany AI, Basta AH, Atwa NA, El-Ghwas DE. Production and characterization of economical bacterial cellulose. *Bioresources.* 3(4), 1196-217, (2008)
- Fabio P. Gomes , Nuno H.C.S. Silva, Eliane Trovatti, Luisa S. Serafim, Maria F. Duarte, Armando J.D. Silvestre, Carlos Pascoal Neto, Carmen S.R. Freire : Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter sacchari* using dry olive mill residues : *Biomass and Bioenergy.* 55, 205-211, (2013)
- Fernandes SCM, Oliveira L, Freire CSR, Silvestre AJD, Pascoal Neto C, Gandini A,: Novel transparent nanocomposite films based on chitosan and bacterial cellulose. *Green Chem.* 11(12), 2023-9, (2009)
- Filomena Freitas, Vitor D. Alves and Maria A.M. Reis : Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. *Trends in Biotechnology.* 29(8), (2011)
- Fontana JD, Franco VC, De Souza SJ, Lyra IN and De Souza AM : Nature of plant stimulators in the production of *Acetobacter xylinum* (“tea fungus”) biofilm used in skin therapy. *Appl Biochem Biotechnol.* 28(29), 341–351 , (1991).

- Guhados, G., Wan, W. K., & Hutter, J. L. : Measurement of the elastic modulus of single bacterial cellulose fibers using atomic force microscopy. *Langmuir*. 21(14), 6642–6646, (2005)
- Hirai A, Tsuji M, Yamamoto H : In situ crystallization of bacterial cellulose III. Influence of different polymeric additives on the formation of microfibrils as revealed by transmission electron microscopy. *Cellulose* 5, 201–213, (1998)
- Hong F, Qiu KY. : An alternative carbon source from konjac powder for enhancing production of bacterial cellulose in static cultures by a model strain *Acetobacter acetii* subsp *xylinus* ATCC 23770. *Carbohydr Polym*. 72(3), 545-9, (2008)
- Hong, Chen, L., F., Yang, X-x., Han, S-f., Biotransformation of wheat straw to bacterial cellulose and its mechanism, *Bioresource Technology*, 10-29, (2012)
- Huber Tim , Jorg Mu ssig , Owen Curnow , Shusheng Pang , Simon Bickerton , Mark P. Staiger : A critical review of all-cellulose composites *J Mater Sci*. 47, 1171–1186 , (2012)
- Iguchi M, Yamanaka S, Budhiono A. Bacterial cellulose: a masterpiece of nature's arts. *J Mater Sci*. 35(2), 261-70, (2000)
- Ito, T., Nakashimada, Y., Senba, K., Matsui, T., Nishio, N.: Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. *J. Biosci. Bioeng*. 100(3), 260–265 (2005)
- Ishida T, Mitarai M, Sugano Y : Role of watersoluble polysaccharides in bacterial cellulose production. *Biotechnol Bioeng*. 83(4), 474–478, (2003)
- Ishihara M., M. Matsunaga, N. Hayashi, V. Tiller : Utilization of D-xylose as carbon source for production of bacterial cellulose, *Enzyme Microb. Technol*. 31, 986–991, (2002)
- Jacobs, A., Botha, A., Reddy, J.K., Van Zyl, W.H.: Sunflower press cake as a substrate for eicosipentaenoic acid production by representatives of the genus *Mortierella*. *Bioresources*. 5(2), 1232–1243 , (2010)
- Jadhav, M., Kagalkar, A., Jadhav, S., Govindwar, S.: Isolation, characterization, and antifungal application of a biosurfactant produced by *Enterobacter* sp. MS16. *Eur. J. Lipid Sci. Tech*. 113(11), 1347–1356, (2011)
- Jonas R. and Farab L.F. Production and application of microbial cellulose *Polym. Degrad. Stabil.* 59, 101-106, (1998)
- Johnson D.C and A.M Neogi, US Patent, No.4863565 (1989)

- Jung HI, Lee OM, Jeong JH, Jeon YD, Park KH, Kim HS, et al.: Production and characterization of cellulose by acetobacter sp V6 using a cost-effective molasses-corn steep liquor medium. *Appl Biochem Biotechnol.* 162 (2), 486-97, (2010)
- Kachrimanidou Vasiliki, Nikolaos Kopsahelis, Afroditi Chatzifragkou, Seraphim Papanikolaou, Stavrianos Yanniotis, Ioannis Kookos, Apostolis A. Koutinas : Utilisation of by-products from sunflower-based biodiesel; production processes for the production of fermentation feedstock waste biomass valor. 4, 529–537, (2013)
- Keshk SMAS, Razek TMA, Sameshima K. Bacterial cellulose production from beet molasses. *Afr J Biotechnol.* 5(17), 1519-23, (2006)
- Klemm Dieter, Friederike Kramer, Sebastian Moritz, Tom Lindstr_m, Mikael Ankerfors, Derek Gray, and Annie Dorris Nanocelluloses: A New Family of Nature-Based Materials *Angew. Chem. Int. Ed.* 50, 5438 – 5466, (2011)
- Klemm D, Schumann D, Udhardt U, Marsch S. Bacterial synthesized cellulose e artificial blood vessels for microsurgery. *Prog Polym Sci.* 26(9), 1561-603, (2001)
- Kongruang S.: Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* strains from agricultural waste products. *Appl Biochem Biotechnol.* 148(1-3), 245-56, (2008)
- Koutinas A., Belafi-Bako K., Kabiri-Badr A., Tóth A., Gubicza L. and Webb C.: Enzymatic Hydrolysis of Polysaccharides: Hydrolysis of Starch by an Enzyme Complex from Fermentation by *Aspergillus Awamori*. *Food and Bioproducts Processing.* 79, 41-45, (2001)
- Krawczyk, T.: Biodiesel—alternative fuel makes inroads but hurdles remain. *INFORM.* 7, 801–829, (1996)
- Kuan-Chen Cheng, Z Jeffrey M., Catchmark Z, Ali Demirci : Effect of different additives on bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* and analysis of material property, Springer Science+Business Media B.V. 16, 1033–1045, (2009)
- Kurosumi AS, Yamashita C, Nakamura Y. Utilization of various fruit juices as carbon source for production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* NBRC 13693. *Carbohydr Polym.* 76(2), 333-5, (2009)

- Lee, P.C., Lee, W.G., Chang, H.N.: Succinic acid production with reduced by-product formation in the fermentation of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* using glycerol as a carbon source. *Biotechnol. Bioenerg.* 72(1), 41–48, (2001)
- Li HX, Kim SJ, Lee YW, Kee CD, Oh IK. Determination of the stoichiometry and critical oxygen tension in the production culture of bacterial cellulose using saccharified food wastes. *Korean J Chem Eng.* 28(12), 2306-11, (2011)
- Lie S.: The EBC-ninhydrin method for determination of free alpha amino nitrogen. *Journal of the Institute of Brewing.* 79, 37–41, (1973)
- Lomascolo Anne, Eva Uzan-Boukhris, Jean-Claude Sigoillot, Frédéric Fine : Rapeseed and sunflower meal : a review on biotechnology status and challenges. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95, 1105–1114, (2012)
- Masaoka Satoshi, Tatsuhiko ohe and Naokazu Sakota : Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum*, *Journal of fermentation and bioengineering* Vol. 75(1), 18-22, (1993)
- Mikkelsen, D., Flanagan, B.M., Dykes, G.A., Gidley, M.J.: Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 53524. *J. Appl. Microbiol.* 107, 576–583, (2009)
- Nguyen, V.T., Flanagan, B., Gidley, M.J., Dykes, G.A.: Characterization of Cellulose Production by a *Gluconacetobacter xylinus* Strain from Kombucha. *Curr. Microbiol.* 57, 449–453, (2008)
- Naritomi T., T. Kouda, H. Yano, F. Yoshinaga: Effect of lactate on bacterial cellulose production from fructose in continuous culture, *J. Ferment. Bioeng.* 85, 89–95, (1998)
- Panoutsou C., Namatov, I., Lychnaras, V., Nikolaou, A.: Biodiesel options in Greece. *Biomass Bioenerg.* 32, 473–481 , (2008)
- Parrado J, Bautista J : Protein enrichment of sunflower lignocellulosic fraction by *Trichoderma harzianum* S/G2431 in low moisture content media. *Biosci. Biotec. Biochem.* 57, 317–318, (1993)
- Puppi D, Chiellini F, Piras AM, Chiellini E. : Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Prog Polym Sci.* 35(4), 403-40, (2010)
- Pourramezan G.Z., A.M. Roayaei and Q.R. Qezelbash : Optimization of culture conditions for bacterial cellulose production by *Acetobacter* sp. 4B-2 *Biotechnology.* 8, 150-154, (2009)

- Ross P, Mayer R, Benziman M : Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 55(1), 35–58, (1991)
- Ruka Dianne R., George P. Simon, Katherine M. Deana : Altering the growth conditions of *Gluconacetobacter xylinus* to maximize the yield of bacterial cellulose, *Carbohydrate Polymers*. 89 , 613– 622, (2012)
- Sani Amir and Dahman Yaser : Improvements in the production of bacterial synthesized biocellulose nanofibres using different culture methods *J Chem Technol Biotechnol*. 85, 151–164 , (2010)
- Schramm, M. and Hestrin, S.: Factors affecting production of cellulose at the air/liquid interface of a culture of *Acetobacter xylinum*. *J. Gen. Microbiol*. 11, 123-129, (1954)
- Schramm, M., Gromet, Z., and Hestrin, S.: Role of hexose phosphate in synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*, *Nature*. 179, 28-29 , (1957).
- Seifert M, Hesse S, Kabrelian V : Controlling the water content of never dried and reswollen bacterial cellulose by the addition of water-soluble polymers to the culture medium. *J Poly Sci Part A Polymer Chemistry*. 42, 463–470, (2003)
- Sherif M.A.S. Keshk and Kazuhiko Sameshima : Evaluation of different carbon sources for bacterial cellulose production : *African Journal of Biotechnology*. 4 (6), 478-482, (2005)
- Sircar, A., Sridhar, P., Das, P.K.: Optimization of solid state medium for the production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*. *Process Biochem*. 33(3), 283–289, (1998)
- Son, H. J., Kim, H. G., Kim, K. K., Kim, H. S., Kim, Y. G., & Lee, S. J. : *Bioresource Technology*. 86, 215–219, (2003)
- Svensson A, Nicklasson E, Harrah T, Panilaitis B, Kaplan DL, Brittberg M : Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. *Biomaterials*. 26(4), 419-31, (2005)
- Torres Fernando G., Solene Commeaux , and Omar P. Troncoso: Biocompatibility of Bacterial Cellulose Based Biomaterials *J. Funct. Biomater.*, 3, 864-878 , (2012)
- Toyosaki, H., Kojima, Y., Tsuchida, T., Hoshino, K., Yamada, Y., and Yoshinaga, F. : The characterization of an acetic acid bacterium useful for producing bacterial cellulose in agitation cultures: The proposal of *Acetobacter xylinum* subsp. *sucrofermentans* subsp. nov. *J. Gen. Appl. Microbiol*. 41, 307–314, (1995)

- Valla S., D. H. Coucheron, E. Fjaervik, J. Kjosbakken, H. Weinhouse, P. Ross, D. Amikam, M. Benziman : Cloning of a gene involved in cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: Complementation of cellulose-negative mutant by the UDPG pyrophosphorylase structural gene, *Mol. Gen. Genet.* 217, 26–30, (1989)
- Vojislav V. Banjac, Radmilo R. Čolović, Đuro M. Vukmirović, Slavica A. Sredanović, Dušica S. Čolović, Jovanka D. Lević, Sanja J. Teodosin : Protein enrichment of sunflower meal by air classification. *Food and Feed Research* 40 (2), 77-83, (2013)
- Yamada, Y., Hoshino, K., and Ishikawa, T.: Validation list no. 64. : Validation of publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 327-328, (1998)
- Yamada Yuzo, Pattaraporn Yukphan, Huong Thi Lan Vu, Yuki Muramatsu, Duangjai Ochaikul, Somboon Tanasupawat, and Yasuyoshi Nakagawa : Description of *Komagataeibacter* gen. nov., with proposals of new combinations (Acetobacteraceae). *J. Gen. Appl. Microbiol.* 58, 397–404, (2012)
- Watanabe K., M. Tabuchi, Y. Morinaga, F. Yoshinaga : Structural features and properties of bacterial cellulose produced in agitated culture, *Cellulose.* 5, 187–200, (1998)
- Zaar K.: The biogenesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*, *Cytobiologie*, 16, 1, (1977)
- Zhou LL, Sun DP, Hu LY et al : Effect of addition of sodium alginate on bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum*. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 34(7), 483–489, (2007)