

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

---

ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΤΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗΣ  
ΚΥΤΤΑΡΙΝΗΣ ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΕΤΑΙ ΜΕ ΧΡΗΣΗ  
ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΑΡΑΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ  
ΤΗΣ ΣΤΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

*ΒΑΣΙΛΙΚΗ-ΑΝΤΙΓΟΝΗ Α. ΑΝΔΡΙΤΣΟΥ*

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Κουτίνας Αποστόλης

ΑΘΗΝΑ 2016

## **ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**

### **ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΤΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΝΗΣ ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΕΤΑΙ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΑΡΑΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΣΤΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**Επιβλέπων καθηγητής:** Κουτίνας Αποστόλης

**Εξεταστική επιτροπή:** Κουτίνας Αποστόλης

Μπριασούλης Δημήτρης

Μαντάλα Ιωάννα

Βασιλική-Αντιγόνη Α. Ανδρίτσου

## Περίληψη

Η κυτταρίνη αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος των κυτταρικών τοιχωμάτων των φυτών. Αποτελεί την πιο άφθονη οργανική ένωση στη Γη και παράλληλα μπορεί να παραχθεί μέσω μικροβιακής ζύμωσης. Η βακτηριακή κυτταρίνη η οποία είναι στο επίκεντρο του ερευνητικού ενδιαφέροντος λόγω της υψηλής της καθαρότητας και των ειδικών φυσικοχημικών χαρακτηριστικών της, βρίσκει εφαρμογή σε πολλαπλούς τομείς όπως στην ιατρική, στη βιομηχανία τροφίμων καθώς και σε άλλα εμπορικά και βιομηχανικά προϊόντα.

Στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκε αρχικά η δυνατότητα παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης μέσω ζυμώσεων διαλείποντος έργου, αξιοποιώντας ως θρεπτικά υποστρώματα ανανεώσιμες πρώτες ύλες οι οποίες προήλθαν από παραπροϊόντα της βιομηχανίας τροφίμων και της βιομηχανίας βιοντίζελ. Η βάση για όλες τις ζυμώσεις, ήταν το μέσο καλλιέργειας Hestrin-Schramm (HS-γλυκόζη) στο οποίο γινόταν κάθε φορά αντικατάσταση της πηγής άνθρακα ή/και αζώτου. Οι βακτηριακές ζυμώσεις διήρκησαν 15 ημέρες και το μικροβιακό στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM 15973. Πιο συγκεκριμένα εξετάστηκε η προοπτική χρήσης:

- υδρολυμάτων από φλοιούς πορτοκαλιού ως πηγή άνθρακα
- υδρολυμάτων αλεύρων από το ενδοσπέρμιο του φοινικόκαρπου (Palm Kernel Cake-PKC) ως πηγή αζώτου σε συνδιασμό με ακατέργαστη γλυκερόλη καθαρότητας 92,4 % ως πηγή άνθρακα.

Σύμφωνα με τα πειραματικά αποτελέσματα, η αξιοποίηση υδρολύματος από φλοιούς πορτοκαλιού οδήγησε σε υψηλή παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης με τιμή 6,84 g/L ενώ με την χρήση θρεπτικού υποστρώματος PKC και ακατέργαστης γλυκερόλης η συγκέντρωση της βακτηριακής κυτταρίνης μειώθηκε κατά 70 %.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάλυση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων δειγμάτων βακτηριακής κυτταρίνης που προέκυψαν κατά την 2<sup>η</sup>, 5<sup>η</sup>, και 8<sup>η</sup> ημέρα της μικροβιακής ζύμωσης σε υπόστρωμα που περιέχει υδρόλυμα από φλοιούς πορτοκαλιού και φυτικής κυτταρίνης που απομονώθηκε από φλοιούς πορτοκαλιού. Τα δείγματα αξιολογήθηκαν ως προς την καθαρότητα, την ικανότητα συγκράτησης νερού, τον βαθμό πολυμερισμού, τον δείκτη κρυσταλλικότητας και την μικροσκοπική μορφολογία τους. Τα πειραματικά δεδομένα από την σύγκριση βακτηριακής και

φυτικής κυτταρίνης έδειξαν ότι η πρώτη χαρακτηρίζεται από υψηλή καθαρότητα καθώς τα κυτταρινούχα υπολείμματα που προέκυψαν ύστερα από επεξεργασία των φλοιών πορτοκαλιού με συμβατική όξινη εκχύλιση και εκχυλίσαι σε αντιδραστήρες μικροκυμάτων περιείχαν ημικυτταρίνη, λιγνίνη και πηκτίνη. Η παρουσία κορυφών στα  $3240\text{ cm}^{-1}$  και  $3270\text{ cm}^{-1}$  στο φάσμα IR της βακτηριακής κυτταρίνης αποδεικνύουν ότι το βακτήριο συνθέτει και τους δύο τύπους κυτταρίνης,  $I_{\alpha}$  και  $I_{\beta}$ , κατά την διαδικασία της ζύμωσης, ενώ τα φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR, φανερώνουν ότι στα δείγματα κυριαρχεί ο τύπος κυτταρίνης  $I_{\alpha}$ . Χρησιμοποιώντας IR, XRD και  $^{13}\text{C}$  NMR προσδιορίστηκε η κρυσταλλικότητα των δειγμάτων της βακτηριακής κυτταρίνης ως  $\approx 88\%$ , τιμή η οποία είναι μεγαλύτερη σε σχέση με τα δείγματα της φυτικής κυτταρίνης. Ο μέγιστος βαθμός πολυμερισμού που εντοπίστηκε ήταν αυτός των δειγμάτων BC (1752 μονάδες άνυδρης γλυκόζης), ενώ τα αποτελέσματα των δειγμάτων φυτικής κυτταρίνης δεν είναι ξεκάθαρα διότι αυτή είναι συνδεδεμένη με ημικυτταρίνη και λιγνίνη. Τέλος, τα δείγματα BC εμφάνισαν μεγαλύτερη ικανότητα συγκράτησης νερού (26,50 g/g) σε σύγκριση με τα δείγματα κυτταρινούχων υπολειμμάτων από τους φλοιούς πορτοκαλιού ( $\approx 7\text{ g/g}$ ) λόγω του καθαρού δικτύου ινών που ενισχύει τη σύνδεση με τα μόρια του νερού.

Τέλος, η βακτηριακή κυτταρίνη που παράχθηκε σε υπόστρωμα HS-γλυκόζη προστέθηκε ως σταθεροποιητικός παράγοντας σε φρέσκα ζυμαρικά ελεύθερα γλουτένης με ρυζάλευρο σε ποσοστά 0,1, 0,5 και 1 %, ξηρή ή προενυδατωμένη σε αυγό. Εν συνεχεία αξιολογήθηκαν οι ρεολογικές ιδιότητες της ζύμης αλλά και η ποιότητα μαγειρέματος, η υφή και οι θερμορεολογικές ιδιότητες των ζυμαρικών που παρασκευάστηκαν. Η χρήση βακτηριακής κυτταρίνης έδειξε ότι δεν επηρέασε τα ποιοτικά χαρακτηριστικά όταν αυτή προστέθηκε σε διαφορετικά ποσοστά ή όταν προηγήθηκε διαδικασία προενυδάτωσης. Η απευθείας προσθήκη βακτηριακής κυτταρίνης οδήγησε σε ενίσχυση της ελαστικότητας της ζύμης, ενώ σε γενικές γραμμές όλα τα δείγματα εμφάνισαν ιξωδοελαστική συμπεριφορά γέλης με την τιμή του συντελεστή αποθήκευσης  $G'$  να είναι πάντα υψηλότερη από την τιμή του συντελεστή απώλειας  $G''$  σε όλο το φάσμα συχνοτήτων που μελετήθηκαν για κάθε δείγμα. Κατά συνέπεια η BC θα μπορούσε να αποτελέσει ένα πολλά υποσχόμενο υλικό για την αύξηση της περιεκτικότητας σε διαιτητικές ίνες των ζυμαρικών χωρίς γλουτένη, χωρίς να επηρεάζονται τα φυσικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος.

Λέξεις κλειδιά: *Komagataeibacter sucrofermentans*, βακτηριακή κυτταρίνη, ανανεώσιμες πρώτες ύλες, φυσικοχημικές ιδιότητες, ζυμαρικά χωρίς γλουτένη

## ***Abstract***

Cellulose constitutes the major part of the plant cell walls. It is the most abundant organic compound on Earth and can be also produced via microbial fermentation. Nowadays, research is focused on bacterial cellulose due to its high purity and specific physico-chemical characteristics. Bacterial cellulose can be applied in numerous sectors namely medicine, food industry as well as commercial and industrial products.

The initial objective of this study was the evaluation of bacterial cellulose production via batch fermentations, utilizing as nutrient substrates renewable raw materials derived from by-products of the food industry and biodiesel industry. The basis for all fermentations was the Hestrin-Schramm medium (HS-glucose) in which the carbon and/or nitrogen source was replaced when needed. Bacterial fermentations lasted 15 days and the microbial strain used was *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM 15973. Specifically, it was evaluated the prospect of utilizing:

- orange peel hydrolysates as a carbon source,
- palm kernel cake hydrolysates (PKC) as a nitrogen source in combination with crude glycerol (92.4 %, w/w) as a carbon source.

According to the experimental data, the utilisation of orange peel hydrolysates resulted in high bacterial cellulose production with a value of 6.84 g/L, while using PKC hydrolysates in combination with raw glycerol in the fermentation media led to a 70 % reduction on bacterial cellulose concentration.

The next stage of this investigation comprised the physicochemical properties determination of bacterial cellulose samples. These samples were taken after 2, 5 and 8 days of microbial fermentation and derived from nutrient medium containing orange peel hydrolysates as well as plant-based cellulose extracted from orange peels. The samples were examined for their purity, water holding capacity, degree of polymerization, crystallinity index and their microscopic morphology. It was demonstrated that BC showed higher purity than plant-based cellulose due to the fact that plant-based cellulose obtained after treatment of orange peels with conventional acidic extraction and extraction in microwave reactors, was found to contain hemicellulose, lignin and pectin. Regarding bacterial cellulose, the presence of absorption bands at 3240 cm<sup>-1</sup> and 3270 cm<sup>-1</sup> in the IR spectrum showed that the

bacteria synthesize both I<sub>a</sub> and I<sub>b</sub> cellulose types during the fermentation process, while the peaks in <sup>13</sup>C NMR spectra, showed that the I<sub>a</sub> cellulose was the predominant type. IR, XRD, <sup>13</sup>C NMR analysis were applied to estimate the crystallinity of bacterial cellulose samples. The determined value of around 88 % was higher than the crystallinity values of the plant-based cellulose. BC samples (1752 anhydroglucose units) exhibited the maximum degree of polymerization, in contrast with the plant-based cellulose which degree of polymerization is not well-defined since cellulose is linked to hemicellulose and lignin. Finally, BC samples showed higher water holding capacity (26.50 g/g) compared to the cellulosic residues derived from orange peels (≈ 7 g/g) due to the fact that BC possesses an extra-pure fiber network that enhances binding to water molecules.

As a final step in the current research, bacterial cellulose produced in HS-glucose medium was added as a stabilizing factor in fresh gluten-free pasta with rice flour at percentages of 0.1, 0.5 and 1 %, in a dry form or prehydrated in egg. Subsequently, the rheological properties of the dough as well as the cooking quality, texture and thermorheological properties of the produced pasta were evaluated. The addition of bacterial cellulose at different rates or its prehydration did not affect the quality characteristics of the pasta. The direct addition of bacterial cellulose resulted in enhanced dough elasticity. In general all samples presented viscoelastic gel behavior and the value of storage modulus G' was always higher than the value of the loss modulus G'' across the frequency spectrum studied for each sample. BC can be a promising material for increasing the dietary fiber content of gluten free pasta, without affecting the physical characteristics of the final product.

**Key words:** *Komagataeibacter sucrofermentans*, bacterial cellulose, renewable raw materials, physicochemical properties, gluten-free pasta

## Περιεχόμενα

1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	10
1.1	Βιοσύνθεση της βακτηριακής κυτταρίνης .....	11
1.1.1	Μηχανισμός της βιοσύνθεσης .....	12
1.2	Δομή βακτηριακής κυτταρίνης.....	14
1.3	Φυσική αιτία σύνθεσης βακτηριακής κυτταρίνης από μικροοργανισμό .....	16
1.4	Ιδιότητες Βακτηριακής Κυτταρίνης .....	17
1.5	Εφαρμογές βακτηριακής κυτταρίνης.....	17
1.5.1	Εφαρμογή στη βιομηχανία τροφίμων.....	18
1.5.2	Φαρμακευτικές και ιατρικές εφαρμογές .....	20
1.5.3	Λοιπές εφαρμογές.....	21
1.6	Επίδραση συνθηκών ζύμωσης στην παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης.....	22
1.7	Χρήση γεωργικών υπολειμμάτων και βιομηχανικών παραπροϊόντων στην παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης .....	23
1.7.1	Υπολείμματα γεωργίας και αλυσίδας τροφίμων .....	23
1.7.2	Βιομηχανικά απόβλητα και παραπροϊόντα .....	24
1.7.2.1	Απόβλητα της βιομηχανίας βιοντίζελ .....	24
1.7.2.2	Απόβλητα της γραμμής παραγωγής φοινικελαίου .....	25
1.7.2.3	Απόβλητα εσπεριδοειδών στη γραμμή παραγωγής χυμών .....	27
1.8	Εκχύλιση συστατικών από φλοιούς πορτοκαλιού .....	28
1.8.1	Εκχύλιση συστατικών με αντιδραστήρες μικροκυμάτων .....	29
1.8.2	Συμβατική εκχύλιση πηκτίνης.....	30
1.9	Ζυμαρικά ελεύθερα γλουτένης.....	31
1.9.1	Η νόσος της κοιλιοκάκης.....	31
1.9.2	Συστατικά φρέσκων ζυμαρικών και ο ρόλος τους.....	32
1.9.3	Υδροκολλοειδή σε προϊόντα ελεύθερα γλουτένης.....	34
1.9.4	Ρεολογικά χαρακτηριστικά ζύμης .....	35
1.9.5	Μηχανικές ιδιότητες ζύμης και υφή .....	37
2.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	39
2.1	Υγρές ζυμώσεις διαλείποντος έργου για την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης ..	39
2.1.1	Βιολογικό υλικό.....	39
2.1.2	Θρεπτικά υποστρώματα .....	40
2.1.2.1	Συνθετικό υπόστρωμα ζύμωσης .....	40



2.1.2.2	Υπόστρωμα με υδρόλυμα από φλούδες πορτοκαλιού .....	40
2.1.2.3	Υπόστρωμα με υδρόλυμα από άλευρα του ενδοσπερμίου του φοινικόκαρπου (Palm Kernel Cake-PKC) και ακατέργαστη γλυκερόλη .....	41
2.1.3	Συνθήκες Ανάπτυξης .....	43
2.1.4	Παραλαβή και καθαρισμός της βακτηριακής κυτταρίνης .....	43
2.1.5	Εργαστηριακές αναλύσεις.....	44
2.1.5.1	Προσδιορισμός Αζώτου των Ελεύθερων Αμινομάδων (FAN analysis) .....	44
2.1.5.2	Μέθοδος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης.....	45
2.2	Μέθοδοι καθαρισμού λιγνοκυτταρινούχου κλάσματος από φλοιούς πορτοκαλιού	46
2.2.1	Συμβατική όξινη εκχύλιση πηκτίνης .....	46
2.2.2	Διεργασία OPEC.....	47
2.2.2.1	Εκχύλιση D-λιμονένιου.....	48
2.2.2.2	Εκχύλιση πηκτίνης.....	48
2.3	Χαρακτηρισμός δειγμάτων και εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε.....	49
2.3.1	Υπέρυθρη φασματοσκοπία (ATR-IR).....	49
2.3.2	Θερμοσταθμική ανάλυση (TGA) .....	50
2.3.3	Φασματοσκοπία μαγνητικού πυρηνικού συντονισμού στερεής κατάστασης ( <sup>13</sup> C Solid state NMR).....	50
2.3.4	Περιθλασιμετρία ακτίνων-X (XRD).....	50
2.3.5	Βαθμός πολυμερισμού.....	51
2.3.6	Δείκτης κρυσταλλικότητας (Crystallinity Index).....	52
2.3.7	Ικανότητα συγκράτησης νερού (Water Holding Capacity).....	53
2.3.8	Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (Scanning Electron Microscopy).....	53
2.4	Ζυμαρικά με βακτηριακή κυτταρίνη .....	53
2.4.1	Παρασκευή φρέσκων ζυμαρικών χωρίς γλουτένη .....	54
2.4.2	Στατιστική επεξεργασία .....	54
2.4.3	Χαρακτηρισμός δειγμάτων .....	55
2.4.3.1	Ρεολογικά χαρακτηριστικά ζύμης .....	55
2.4.3.2	Θερμορεολογικές ιδιότητες δειγμάτων .....	55
2.4.3.3	Ανάλυση υφής.....	56
2.4.3.4	Βέλτιστος χρόνος βρασμού .....	57
2.4.3.5	Απώλειες κατά το βρασμό .....	57
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	58
3.1	Αξιολόγηση υποστρωμάτων προς παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης.....	58

3.1.1	Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης σε υπόστρωμα ζύμωσης συνθετικής σακχαρόζης .....	58
3.1.2	Υπόστρωμα με υδρόλυμα από φλούδες πορτοκαλιού .....	60
3.1.3	Υπόστρωμα με υδρόλυμα ΡΚC και ακατέργαστη γλυκερόλη .....	63
3.1.4	Παραγωγικότητα και αποδοτικότητα ζυμώσεων .....	65
3.2	Σύγκριση δειγμάτων βακτηριακής κυτταρίνης και κυτταρινούχας μάζας από φλοιούς πορτοκαλιού.....	66
3.2.1	Υπέρυθρη φασματοσκοπία .....	66
3.2.2	Θερμοσταθμική ανάλυση .....	68
3.2.3	Φασματοσκοπία μαγνητικού πυρηνικού συντονισμού στερεής κατάστασης .....	72
3.2.4	Περιθλασιμετρία ακτίνων-Χ.....	74
3.2.5	Βαθμός πολυμερισμού.....	76
3.2.6	Δείκτης κρυσταλλικότητας .....	77
3.2.7	Ικανότητα συγκράτησης νερού .....	78
3.2.8	Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης.....	79
3.3	Ανάπτυξη ζυμαρικών ελεύθερων γλουτένης με βακτηριακή κυτταρίνη.....	82
3.3.1	Ρεολογικά χαρακτηριστικά ζύμης .....	83
3.3.2	Θερμορεολογικές ιδιότητες ζυμαρικών.....	85
3.3.3	Ποιότητα μαγειρέματος .....	87
3.3.4	Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων .....	90
4.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	91
5.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	93

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η κυτταρίνη είναι η ουσία που αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος των κυτταρικών τοιχωμάτων των φυτών, αποτελώντας ίσως την πιο άφθονη οργανική ένωση στη Γη. Είναι το γραμμικό πολυμερές των μονάδων γλυκόζης που συνδέονται μεταξύ τους με β-(1,4) γλυκοσιδικό δεσμό. Η φυτική κυτταρίνη δεν είναι καθαρή, διότι συνδέεται με πολυσακχαρίτες, όπως ημικυτταρίνη και λιγνίνη. Το γεγονός αυτό, καθιστά απαραίτητο να βρεθούν άλλες εναλλακτικές πηγές κυτταρίνης υψηλής καθαρότητας (Lestari *et al.*, 2014).

Η βακτηριακή κυτταρίνη (BC) είναι ένας εξωκυτταρικός πολυσακχαρίτης που παράγεται από μύκητες, φύκη και βακτήρια. Ο μικροοργανισμός *A. xylinum* ανήκει στα αρνητικά κατά Gram, οξικά βακτήρια και έχει καθιερωθεί ως μικροοργανισμός-πρότυπο για τη βασική και εφαρμοσμένη έρευνα στην παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης λόγω της ικανότητάς του να παράγει σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις του πολυμερούς χρησιμοποιώντας ποικίλες πηγές άνθρακα και αζώτου. Η κυτταρίνη ανήκει στην κατηγορία των προϊόντων του πρωτογενούς μεταβολισμού του, λειτουργώντας ως προστατευτική μεμβράνη. Άλλα στελέχη βακτηρίων από τα οποία δύναται να παραχθεί κυτταρίνη είναι του γένους *Gluconacetobacter* (πρώην *Acinetobacter*), *Agrobacterium*, *Enterobacter*, *Achromobacter*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Sarcina*, και *Salmonella* (Shoda *et al.*, 2005).

Η βακτηριακή κυτταρίνη έχει ίδιο μοριακό τύπο με την φυτική,  $(C_6H_{10}O_5)_n$ , αλλά διαφέρει ως προς τα φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά της. Η πρώτη υπερτερεί έναντι της δεύτερης, δεδομένου ότι χαρακτηρίζεται από απόλυτη χημική καθαρότητα, υψηλότερο βαθμό πολυμερισμού, πορώδες όπως επίσης και δείκτη κρυσταλλικότητας. Επιπλέον διαθέτει μεγαλύτερη αντοχή σε δυνάμεις εφελκυσμού και υψηλότερη ικανότητα συγκράτησης νερού. Οι παραπάνω ιδιότητες καθιστούν την βακτηριακή κυτταρίνη μια πολλά υποσχόμενη πρώτη ύλη που μπορεί να αξιοποιηθεί στην παραγωγή ακουστικών ηχείων, στην παραγωγή χάρτου υψηλής ποιότητας, στην βιομηχανία τροφίμων, καλλυντικών καθώς και στην επεξεργασία αποβλήτων (Jonas *et al.*, 1998). Τα ινίδια βακτηριακής κυτταρίνης είναι περίπου 100 φορές λεπτότερα από εκείνα της φυτικής, καθιστώντας την ένα εξαιρετικά πορώδες υλικό για την επούλωση πληγών, επιτρέποντας τη μεταφορά φαρμάκων εντός των τραυμάτων και

δημιουργώντας φραγμό ενάντια σε οποιαδήποτε εξωτερική μόλυνση (Esa *et al.*, 2014).

Η πρώτη αναφορά στην βακτηριακή κυτταρίνη ως ένα εξωκυτταρικό ζελατινώδες στρώμα, έγινε από τον A. J. Brown το 1886. Αρκετές δεκαετίες αργότερα ο C. A. Browne (1906) επιβεβαίωσε τα αποτελέσματα του Brown και πιο εντατικές μελέτες συνεχίστηκαν τον 20<sup>ο</sup> αιώνα. Το 1931, οι Tarr και Hibbert δημοσίευσαν λεπτομερή μελέτη παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης από το βακτηριακό στέλεχος *A. xylinum* και λίγο αργότερα στα μέσα της δεκαετίας του '90 οι Hestrin και Schramm (1954) χρησιμοποιώντας τον ίδιο μικροοργανισμό, απέδειξαν ότι αυτός συνθέτει κυτταρίνη παρουσία γλυκόζης και οξυγόνου υπό στατικές συνθήκες και σε λυοφιλωμένη μορφή. Στη συνέχεια, οι Colvin και Beer (1960) ανίχνευσαν δημιουργία κυτταρίνης σε δείγματα που περιείχαν εκχύλισμα ελεύθερων κυττάρων του *A. xylinum*, γλυκόζη, και ATP. Η έρευνα συνεχίζεται να διεξάγεται μέχρι και σήμερα με σκοπό την ελεγχόμενη παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης και την απόδοση επιθυμητών ιδιοτήτων ανάλογα με την εφαρμογή για την οποία προορίζεται κάθε φορά η BC (Tarr *et al.*, 1931).

## 1.1 Βιοσύνθεση της βακτηριακής κυτταρίνης

Η σύνθεση της κυτταρίνης από το βακτήριο *A. xylinum* είναι μια διαδικασία πολλαπλών σταδίων που πραγματοποιείται κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης του μικροοργανισμού (Freitas *et al.*, 2011). Η διαδικασία παραγωγής της κυτταρίνης ρυθμίζεται από ένζυμα και 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), ενός πρόδρομου μορίου της κυτταρίνης, ακολουθούμενη από τον πολυμερισμό της γλυκόζης σε μακριές και μη διακλαδισμένες, β-(1→4) αλυσίδες γλυκάνης και σύνδεσή τους σε μια πλεγματοειδή δομή (Brown *et al.*, 1987). Το βακτήριο *A. xylinum* για να συνθέσει κυτταρίνη λαμβάνει ενώσεις άνθρακα όπως εξόζες, γλυκερόλη, διυδροξυακετόνη, πυροσταφυλικό, και δικαρβοξυλικά οξέα, οι οποίες εισέρχονται και αφομοιώνονται στον κύκλο του Krebs, τη γλυκονεογένεση, ή τον κύκλο των φωσφορικών πεντοζών. Έτσι, ανάλογα με την πηγή άνθρακα που

υπάρχει διαθέσιμη και μέσω της κατάλληλης μεταβολικής οδού, οι παραπάνω ενώσεις μετατρέπονται σε κυτταρίνη με απόδοση συνήθως 50 % (Delmer *et al.*, 1995).

Το κρίσιμο ένζυμο κατά την διαδικασία σύνθεσης της κυτταρίνης είναι η πυροφωσφορυλάση (UGP), αφού κάποια μη κυτταρινοπαραγωγά κύτταρα (Cel-) εκδηλώνουν ανεπάρκεια αυτού του ενζύμου, αν και εμφανίζουν ενεργότητα του ενζύμου συνθάση της κυτταρίνης (CS) (Valla *et al.*, 1989). Επιπλέον, η ενεργότητα της πυροφωσφορυλάσης ποικίλει 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 εξαρτούμενο από το φωσφο-ενολο-πυροσταφυλικό.

Τα οξικο-παραγωγά βακτήρια, δεν μπορούν να συνθέσουν το ένζυμο φωσφοφρουκτο-κινάση, συνεπώς τα σάκχαρα δεν μπορούν να διασπαστούν μέσω του μεταβολικού μονοπατιού της γλυκόλυσης. Στο βακτήριο *A. xylinum* η σύνθεση της κυτταρίνης είναι στενά συνδεδεμένη με καταβολικές διεργασίες οξειδωσης ενώ δεν εμπλέκεται με άλλες αναβολικές διεργασίες, όπως η πρωτεΐνοσύνθεση. Κατά την σύνθεση της BC καταναλώνεται το 10 % της ενέργειας που προέρχεται από τις καταβολικές αντιδράσεις (De Iannino *et al.*, 1988).

### 1.1.1 Μηχανισμός της βιοσύνθεσης

Η σύνθεση της κυτταρίνης ανεξαρτήτως του μικροοργανισμού που την παράγει, ακολουθεί δύο στάδια :

- 1ο στάδιο: σχηματισμός β-(1→4) αλυσίδων γλυκάνης και πολυμερισμός τους.

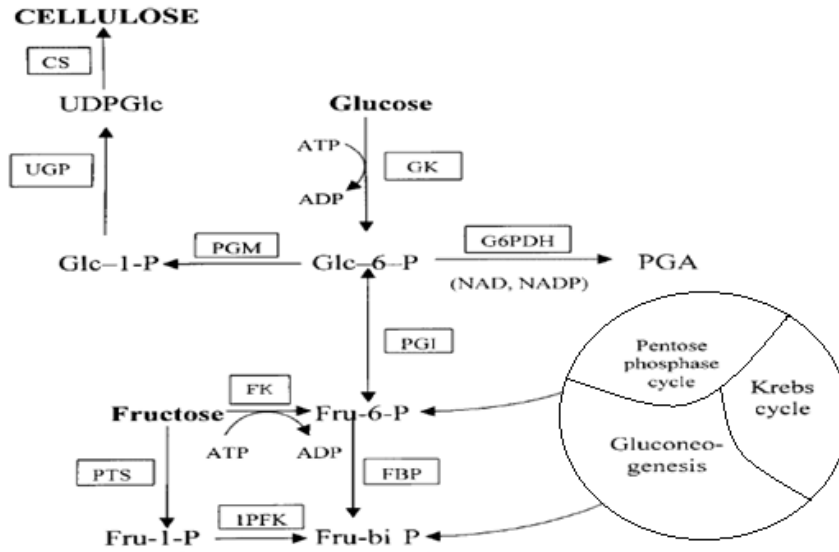
Το ένζυμο συνθάση της κυτταρίνης καταλύει τον πολυμερισμό της γλυκόζης σε β(1→4) μονάδες γλυκάνης. Η γωνία στρέψης μεταξύ των δύο γειτονικών υπολειμμάτων γλυκόζης στο μόριο της κυτταρίνης είναι 180°. Στο στάδιο του πολυμερισμού μπορεί είτε να συμπεριλαμβάνεται λιπιδικό ενδιάμεσο είτε όχι. Στην δεύτερη περίπτωση, ένα βακτηριακό κύτταρο μπορεί να πολυμερίσει έως και 108 μόρια γλυκόζης ανά ώρα τα οποία συσσωματώνονται σε υποϊνίδια (προ-κυτταρινικό πολυμερές) (De Iannino *et al.*, 1988). 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 (Brown *et al.*, 1987)

- 2ο στάδιο: σχηματισμός της αλυσίδας κυτταρίνης.

Τα μόρια του προ-κυτταρινικού πολυμερούς εξωθούνται στο εξωκυτταρικό περιβάλλον σχηματίζοντας πρωτοϊνίδια διαμέτρου 2-4 nm. Για το σχηματισμό κρυσταλλικών μικροϊνιδίων απαιτείται συσσωμάτωση περίπου 10-100 υποϊνιδίων, τα οποία φαίνεται να είναι η αρχική μορφή του κυτταρινικού προϊόντος. Τα μικροϊνίδια κρυσταλλοποιούνται σε ταινίες κυτταρίνης, με διαστάσεις  $3-4 \times 70-80$  nm (Zaar *et al.*, 1977),  $3.2 \times 133$  nm (Brown *et al.*, 1976) ή  $4.1 \times 117$  nm (Yamanaka *et al.*, 2000). Αυτές οι ταινίες αλληλεπιδρούν με άλλες από γειτονικά κύτταρα, σχηματίζοντας ένα διδιάστατο επίπεδο, ενώ στη συνέχεια 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 *et al.*, 2000). Κάθε στοιβάδα βακτηριακής κυτταρίνης περιέχει νερό το οποίο όταν αφαιρεθεί, χημικές ομάδες διατίθενται προς δημιουργία νέων δεσμών υδρογόνου μεταξύ γειτονικών αλυσίδων κυτταρίνης, αυξάνοντας την κρυσταλλικότητα (Colvin *et al.*, 1960).

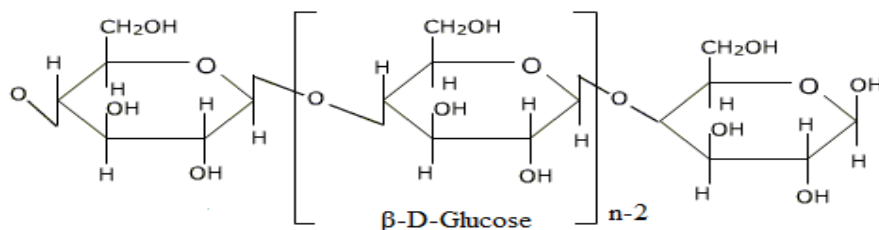
Η παραπάνω διαδικασία παρόλο που συμβαίνει εξωκυτταρικά, χαρακτηρίζεται ως κυτταρικά κατευθυνόμενη γιατί ο αμοιβαίος προσανατολισμός και σύνδεση των αλυσίδων γλυκάνης, ο σχηματισμός των ινιδίων, και ταινιών κυτταρίνης προφανώς διέπονται από την αρχική διάταξη των πόρων εξώθησης του κυττάρου (50 έως 80 θέσεις γραμμικά διατεταγμένες κατά μήκος του μεγάλου άξονα του κυττάρου και σε εμφανή συνδυασμό με την εξωκυτταρική κυτταρινική ταινία) (Chawla *et al.*, 2009).



**Εικόνα 1:** Μεταβολικό μονοπάτι του βακτηρίου *A. xylinum* για την βιοσύνθεση της BC (CS: συνθάση της κυτταρίνης, FBP: φρουκτόζη-1,6-διφωσφορική φωσφατάση, FK: γλυκοκινάση, G6PDH: γλυκόζη-6-φωσφορική αφυδρογονάση, IPFK: φρουκτόζη-1-φωσφορική κινάση, PGI: φωσφο-γλυκο-ισομεράση, PMG: φωσφο-γλυκο-μουτάση, PTS: σύστημα φωσφο-τρανσφερασών, UGP: πυροφωσφορυλάση, Fru-bi-P: 1,6-διφωσφορική φρουκτόζη, Fru-6-P: 6-φωσφορική φρουκτόζη, GLC-6(1)-P: 6(1)-φωσφορική γλυκόζη, PGA: φωσφο-γλουκονικόοξύ, UDPGlc: ουριδίνη διφωσφο-γλυκόζης.

## 1.2 Δομή βακτηριακής κυτταρίνης

Η βακτηριακή κυτταρίνη είναι το γραμμικό πολυμερές μονομερών μονάδων D-γλυκόζης που είναι συνδεδεμένα με  $\beta(1 \rightarrow 4)$  γλυκοζιτικούς δεσμούς.



**Εικόνα 2:** Η δομή της κυτταρίνης.

Τα βακτήρια συσσωρεύονται εντός του παραγόμενου πολυσακχαρίτη, του οποίου η μακροσκοπική μορφολογία διαφέρει όταν παράγεται υπό στατικές ή από συνθήκες ανάδευσης (Yamanaka *et al.*, 2000).

Στην πρώτη περίπτωση στην επιφάνεια του θρεπτικού μέσου σχηματίζεται μια κυτταρινούχος μεμβράνη. Αυτή η μεμβράνη είναι αποτέλεσμα σχηματισμού παράλληλων αλλά αποδιοργανωμένων επιπέδων αποτελούμενα από μικροϊνίδια (Huber *et al.*, 2012). Στην δεύτερη περίπτωση, σχηματίζονται ακανόνιστοι κόκκοι διεσπαρμένοι στο θρεπτικό μέσο (Vandamme *et al.*, 1998). Οι κλώνοι που δημιουργούνται διασυνδέονται σχηματίζοντας μια πυκνή πλεγματική δομή, με σχεδόν κάθετες και παράλληλες κατευθύνσεις. Η λιγότερο οργανωμένη μορφή της, προκύπτει από διατμητικές τάσεις κατά τη διάρκεια της ανάδευσης. Οι κλώνοι της βακτηριακής κυτταρίνης που παράγεται υπό στατικές συνθήκες διασυνδέονται λιγότερο συχνά από αυτούς σε συνθήκες ανάδευσης.

Στην τρισδιάστατη δομή της βακτηριακής κυτταρίνης που παράγεται υπό στατικές συνθήκες καλλιέργειας τα ινίδια είναι πιο εκτεταμένα και συσσωρευμένα και διασταυωμένα το ένα πάνω από το άλλο, με πλάτος διατομής 0.05 - 0.1  $\mu\text{m}$ , όπως αυτό μπορεί να διαπιστωθεί με χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης. Σε συνθήκες ανάδευσης, οι άξονες ινιδίων είναι μπλεγμένοι μεταξύ τους και κυρτοί και τα ινίδια είναι μεγαλύτερα από τα προηγούμενα, με πλάτος διατομής 0.1 - 0.2  $\mu\text{m}$  (Watanabe *et al.*, 1998).

Οι δύο κρυσταλλικές μορφές της κυτταρίνης ορίζονται ως I και II. Η φυσική κυτταρίνη είναι η κυτταρίνη I, με δομές τις I $\alpha$  και I $\beta$ . Η κυτταρίνη I, συντίθεται από τα περισσότερα φυτά και από το βακτήριο *A. xylinum* σε στατικές καλλιέργειες και αποτελείται από  $\beta(1\rightarrow4)$  αλυσίδες γλυκάνης, διατεταγμένες παράλληλα και ομοαξονικά. Η κυτταρίνη II παράγεται από ορισμένα φύκη, μύκητες και βακτήρια, όπως το είδος *Sarcina ventriculi*, με  $\beta(1\rightarrow4)$  αλυσίδες γλυκάνης να διατάσσονται τυχαία και αντιπαράλληλα (άμορφο πολυμερές), να συνδέονται με περισσότερους δεσμούς υδρογόνου και συνεπώς να αποκτούν μεγαλύτερη θερμοδυναμική σταθερότητα (Iguchi *et al.*, 2000). Αυτή που παράγεται από βακτήρια και άγλη περιέχει κυρίως τον τύπο I $\alpha$  ενώ των ανώτερων φυτών αποτελείται κυρίως από I $\beta$ . Η αναλογία των δύο μορφών σε ένα δείγμα εξαρτάται από την προέλευση της κυτταρίνης και μπορούν να διακριθούν με ακτίνες X, φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), φασματοσκοπία Raman και υπέρυθη ανάλυση. Άλλη μορφή κυτταρίνης (III) μπορεί να προκύψει είτε από κυτταρίνη I ή από



κυτταρίνη II μετά από επεξεργασία με υγρή αμμωνία. Τέλος, μετά από θέρμανση σε γλυκερόλη κυτταρίνης III προκύπτει η κυτταρίνη IV (Driemier *et al.*, 2014).

Αν και σχηματίζεται μια διακριτή κρυσταλλική δομή, οι ίνες κυτταρίνης στη φύση δεν είναι εντελώς κρυσταλλικές. Εκτός από την κρυσταλλική και τις άμορφες περιοχές, οι ίνες κυτταρίνης περιέχουν και συστροφές ή συστροφές των μικροϊνιδίων, ή κενά όπως μικροπόρους στην επιφάνεια. Έτσι, η συνολική επιφάνεια μιας ίνας κυτταρίνης στην πραγματικότητα, είναι πολύ μεγαλύτερη από το εμβαδόν μίας ιδανικής λείας ίνας της ίδιας διάστασης. Το καθαρό αποτέλεσμα της δομικής ετερογένειας εντός της ίνας είναι ότι αυτές είναι τουλάχιστον, εν μέρει, ενυδατωμένες από το νερό όταν εμβαπτίζεται σε υδατικά μέσα, και οι μικροπόροι είναι επαρκώς μεγάλοι ώστε να επιτρέπουν τη διείσδυση (Lynd *et al.*, 2002).

### 1.3 Φυσική αιτία σύνθεσης βακτηριακής κυτταρίνης από μικροοργανισμό

Η παραγόμενη κυτταρίνη από το εκάστοτε μικροβιακό στέλεχος, το βοηθά στην προσκόλληση και την παγίδευσή του σε αυτήν, ώστε να μπορέσει να αντλήσει τα θρεπτικά συστατικά του υποστρώματος ή λειτουργεί ως αποταμιευτικό συστατικό, σε περίπτωση που εξαλειφθούν τα θρεπτικά συστατικά από αυτό. Η αποσύνθεση της καταλύεται από εξω- και ενδογλυκανάσες η παρουσία των οποίων ανιχνεύτηκε στο μέσο καλλιέργειας κάποιων κυτταρινοπαραγωγών στελεχών *A. xylinum* (Jonas *et al.*, 1998).

Ακόμη, η παραγόμενη κυτταρίνη διαδραματίζει προστατευτικό ρόλο για τους μικροοργανισμούς που έχουν εγκλωβιστεί στο εσωτερικό της έναντι δυσμενών μεταβολών όπως, μείωση περιεχόμενου νερού, διακυμάνσεις της τιμής του pH, εμφάνιση τοξικών ουσιών και παθογόνων οργανισμών, υπερϊώδης ακτινοβολία. Λόγω του υδρόφιλου χαρακτήρα της, αυξάνεται η αντίσταση των βακτηριακών κυττάρων και συνεπώς εξασφαλίζεται με αυτό τον τρόπο η επιβίωση τους στο εσωτερικό της μεμβράνης (Ross *et al.*, 1991).

## 1.4 Ιδιότητες Βακτηριακής Κυτταρίνης

Τα τελευταία χρόνια η βακτηριακή κυτταρίνη είναι στο επίκεντρο του ερευνητικού ενδιαφέροντος λόγω των μοναδικών φυσικών και μηχανικών ιδιοτήτων που την χαρακτηρίζουν. Στην φυσική της κατάσταση, η μεμβράνη χαρακτηρίζεται ως ένα υδατο-διογκωμένο δίκτυο ινιδίων κυτταρίνης με υψηλό προσανατολισμό και ενιαία δομή, των οποίων οι μηχανικές ιδιότητες εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τις συνθήκες και το μέσο καλλιέργειας.

Ενδιαφέρουσα είναι η σύγκριση δειγμάτων BC που παράγονται χρησιμοποιώντας διαφορετική πηγή άνθρακα ή αζώτου αφού αυτό επηρεάζει την δομή και κατ' επέκταση και τις ιδιότητές τους (Krystynowicz *et al.*, 2002). Συγκρίνοντας την κυτταρίνη που παράγεται υπό στατικές συνθήκες και εκείνη υπό συνθήκες ανάδευσης, η δεύτερη εμφανίζει μειωμένη μηχανική αντοχή και μέτρο ελαστικότητας (Young's modulus), χαμηλότερο βαθμό πολυμερισμού και δείκτη κρυσταλλικότητας αλλά υψηλότερη ικανότητα συγκράτησης νερού και υψηλότερο ιξώδες (Shi *et al.*, 2013).

Γενικά, η BC παρουσιάζει μεγάλη βιοσυμβατότητα και είναι 100 % βιοαποικοδομήσιμη. Η ικανότητα συγκράτησης νερού είναι μεγαλύτερη του 95 % του βάρους της και ο δείκτης κρυσταλλικότητας κυμαίνεται μεταξύ 60-90 % υπολογιζόμενος από τα φάσματα υπερύθρου, περιθλασιμετρίας ακτίνων-X και μαγνητικού πυρηνικού συντονισμού. Ο βαθμός πολυμερισμού κυμαίνεται μεταξύ 2000 – 6000, ύστερα από μέτρηση του ιξώδους διαλύματος κυτταρίνης σε διαλύτη Copper(II) ethylenediamine. Το μέτρο ελαστικότητας (Young's modulus) της βακτηριακής κυτταρίνης κυμαίνεται από 16-35 GPa, η αντοχή σε εφέλκυσμό 200-300 MPa και η επιμήκυνση μεταξύ 1.5–2 % επί του αρχικού μήκους της χρησιμοποιώντας την πρότυπη μέθοδο ASTM D 882 της Αμερικανικής εταιρείας δοκιμών και υλικών (Jonas *et al.*, 1998), (Watanabe *et al.*, 1998), (Klemm *et al.*, 2001), (Klemm *et al.*, 2011), (Iguchi *et al.*, 2000).

## 1.5 Εφαρμογές βακτηριακής κυτταρίνης

Το βιοπολυμερές, λόγω της υψηλής καθαρότητας και των ειδικών φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του βρίσκει εφαρμογή σε στον τομέα της ιατρικής, στη βιομηχανία τροφίμων καθώς και σε άλλα εμπορικά και βιομηχανικά προϊόντα.

### 1.5.1 Εφαρμογή στη βιομηχανία τροφίμων

Η βακτηριακή κυτταρίνη αποτελώντας πηγή διαιτητικών ινών, ταυτοποιήθηκε ως «γενικά αναγνωρισμένη ως ασφαλής» (GRAS) και έγινε δεκτή από τον Αμερικανικό Οργανισμό Τροφίμων και Ποτών (FDA) το 1992. Συγκρίνοντας την με άλλες φυτικές ίνες, παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα. Αποτελεί μια εξαιρετικά καθαρή μορφή κυτταρίνης και δεν απαιτούνται σκληρές χημικές επεξεργασίες για απομόνωση και καθαρισμό ανεπιθύμητων συστατικών, όπως είναι απαραίτητο για την φυτικής προέλευσης κυτταρίνη. Τέλος, η παραγωγή της σε διάφορα Διάγραμματα (ταινίες, νήματα, σφαιρίδια), το μέγεθος των ινών της που είναι εντός της νανοκλίμακας και η τρισδιάστατη δομή του δικτύου της, ευνοούν την χρήση της σε νέες διαδικασίες παραγωγής τροφίμων (Shi *et al.*, 2014).

Η παλαιότερη χρήση της BC είναι ως πρώτη ύλη για την παραγωγή του nata de coco, ένα παραδοσιακό επιδόρπιο των Φιλιππίνων. Αυτό έγινε δημοφιλές και εξαπλώθηκε γρήγορα στον κόσμο λόγω των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών της και της απλής διαδικασίας παραγωγής κατά την οποία ο μικροοργανισμός *G. xylinus* επωάζεται σε γάλα καρύδας (Jagannath *et al.*, 2008).

Σύμφωνα με μελέτες έχει αποδειχθεί ότι η βακτηριακή κυτταρίνη μπορεί να δράσει ως πολυλειτουργικό συστατικό τροφίμων, βελτιώνοντας τα ρεολογικά τους χαρακτηριστικά (Keshk *et al.*, 2014). Οι ιδιότητες και η δομή της ως πρόσθετο σε σκευάσματα τροφίμων, επιτρέπουν, ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις, να ενισχύεται η σταθερότητα των προϊόντων σε ένα ευρύ φάσμα pH, θερμοκρασίας ακόμα και σε συνθήκες ψύξης-απόψυξης του τροφίμου.

Σύμφωνα με τους Okiyama *et al.*, (1993) ως σταθεροποιητής και πηκτικός παράγοντας είχε θετική επίδραση κατά την προσθήκη σε καρυκεύματα σε μορφή πάστας και σε παγωτά. Τα προϊόντα που περιείχαν BC μπορούσαν να διατηρήσουν την υγρασία τους για τουλάχιστον ένα μήνα αποθήκευσης. Όσο για το Διάγραμμα του παγωτού που περιείχε βακτηριακή κυτταρίνη, αυτό παρέμεινε αναλλοίωτο για

τουλάχιστον 60 λεπτά μετά την αφαίρεσή του από τον καταψύκτη. Ένα συμβατικό παγωτό θα είχε λιώσει τελείως κατά την ίδια χρονική περίοδο. Όταν κυτταρίνη προστέθηκε σε Tofu (προϊόν από γάλα σόγιας) σε ποσοστό 0.2-0.3 %, η συνεκτικότητα του πηκτώματος αυξήθηκε σημαντικά, προσδίδοντας καλύτερη υφή και σταθερότητα στο προϊόν. Τα ίδια αποτελέσματα λήφθηκαν και με χρήση της στο προϊόν Kamaboko (πουρές λευκών ψαριών, ιαπωνικής προέλευσης) και σε ζυμαρικά από μαύρο σιτάρι. Ακόμα, η προσθήκη της βακτηριακής κυτταρίνης σε αιωρήματα που πρόκειται να υποστούν θέρμανση όπως είναι τα ροφήματα σοκολάτας, εμπόδισε την καθίζηση των κόκκων του κακάο, επειδή το πλέγμα της BC μπόρεσε να τους διατηρήσει. Επιπλέον, το προϊόν παρουσίασε μεγάλη θερμική σταθερότητα, με αμετάβλητη την τιμή του ιξώδους μετά από θερμική αποστείρωση. Τα ίδια αποτελέσματα σημειώθηκαν και με την προσθήκη της BC σε σούπες, όπου η χρήση της αποδείχθηκε πιο αποτελεσματική σε σύγκριση με δείγματα που περιείχαν κόμμι ξανθάνης. Μη αποδεκτά είναι τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από την προσθήκη της BC σε ψωμί, ενδεχομένως επειδή η γλουτένη δεν ενυδατώνεται αρκετά, λόγω της υψηλότερης ικανότητας συγκράτησης νερού της κυτταρίνης.

Στις μέρες μας υπάρχει ανάγκη για νέα, φυσικά πρόσθετα τροφίμων χωρίς λιπαρά ή με χαμηλά λιπαρά. Κατά συνέπεια, εφαρμογές της βακτηριακής κυτταρίνης σε τρόφιμα με σκοπό την μείωση της θερμιδικής τους αξίας χρήζουν εξαιρετικού ενδιαφέροντος. Τη δεκαετία του 1960 το ενδιαφέρον στράφηκε στην χρήση της φυτικής κυτταρίνης ως ρυθμιστής υφής, διογκωτικό μέσο και ως ένα φυσικό συστατικό με χαμηλά λιπαρά. Από την άλλη, λόγω του γεγονότος ότι η βακτηριακή κυτταρίνη δεν είναι από τη φύση της κρεμώδης, η προσθήκη της σε ελαιώδη προϊόντα όπως μαργαρίνη και μαγιονέζα δεν είχε θετική επίδραση. Όταν όμως η βακτηριακή κυτταρίνη προστέθηκε σε προϊόντα κρέατος όπως λουκάνικα (Akoğlu *et al.*, (2015), κεφτεδάκια (Lin *et al.*, 2004) και μπιφτέκια για χαμπουργκερ (Okiyama *et al.*, 1993) με σκοπό την αντικατάσταση ενός μέρους του λίπους, τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των προϊόντων ήταν αποδεκτά και η θερμιδική τους αξία μειώθηκε σε ποσοστό σχεδόν 25 %. Εν συνεχεία, η βακτηριακή κυτταρίνη χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς ως πρόσθετο μηδενικής θερμιδικής αξίας σε γιαπωνέζικα γλυκά τα οποία είναι πλούσια σε ζάχαρη και χαμηλά σε λιπαρά. Πιο συγκεκριμένα, όταν στην παραδοσιακή γιαπωνέζικη μαρμελάδα An, η οποία φτιάχνεται από πουρέ κόκκινων φασολιών και ζάχαρη, προστέθηκε βακτηριακή κυτταρίνη και η ζάχαρη αντικαταστάθηκε με ασπαρτάμη η θερμιδική αξία του προϊόντος μειώθηκε κατά 30

%, διατηρώντας παράλληλα τα χαρακτηριστικά που του προσδίδουν την χαρακτηριστική του γεύση (Esa *et al.*, 2014).

Σύμφωνα με τους Shi *et al.*, (2014) η χρήση της καθαρής BC μπορεί να οδηγήσει σε παρασκευή τροφίμων που συμβάλλουν στη μείωση της χοληστερίνης. Πιο συγκεκριμένα, η διεξαγωγή *in vitro* πειραμάτων έδειξε ότι υπάρχει σημαντική μείωση του ορού των τριγλυκεριδίων, της ολικής χοληστερόλης, και της χοληστερόλης στο ήπαρ, με κατανάλωση δειγμάτων που περιείχαν ίνες κυτταρίνης, με την βακτηριακή να υπερτερεί έναντι της φυτικής λόγω της ανώτερης συγκράτησης νερού και ανταλλαγής κατιόντων. Επιπλέον μελέτες αξιολογούν τον συνδιασμό βακτηριακής κυτταρίνης με το Monascus (Ng *et al.*, 2004), ένα φυσικό εκχύλισμα κόκκινης χρωστικής ουσίας και γεύση παρόμοια με αυτή του κρέατος. Το σύμπλεγμα Monascus-BC είναι σταθερό τόσο στη μορφολογία όσο και στο χρώμα και μπορεί να αποτελέσει ιδανικό μέσο αντικατάστασης του κρέατος και των θαλασσινών για τους χορτοφάγους. Ο συνδιασμός Monascus και Nata de coco συμβάλλει στη μείωση της χοληστερόλης παρέχοντας τα επιπλέον οφέλη των φυτικών ινών όπως η καλή λειτουργία του εντέρου και η μείωση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα.

### 1.5.2 Φαρμακευτικές και ιατρικές εφαρμογές

Η θεραπεία των χρόνιων πληγών που είναι δύσκολο να επουλωθούν, όπως τα φλεβικά έλκη ποδιών και τα έλκη των διαβητικών, περιλαμβάνει την εφαρμογή διαφόρων υλικών όπως υδροκολλοειδή, υδρογέλες, βιολογικές ή συνθετικές μεμβράνες. Τα υλικά αυτά δημιουργούν το επιθυμητό περιβάλλον επούλωσης διατηρώντας το κατάλληλο επίπεδο υγρασίας στην περιοχή, οδηγώντας σε βέλτιστη επούλωση. Σύμφωνα με τις τελευταίες προσεγγίσεις σε αυτόν τον τομέα, το ιδανικό επίθεμα πρέπει να είναι όμοιο με το τεχνητό δέρμα τόσο στα δομικά όσο και στα λειτουργικά του χαρακτηριστικά. Έτσι λοιπόν, θα πρέπει να μην είναι τοξικό και πυρογενές αλλά βιοσυμβατό δημιουργώντας μέγιστο φραγμό ενάντια σε μολύνσεις. Άλλες ιδιότητες αυτών των υλικών είναι η ικανότητα ελέγχου της απώλειας υγρών, η ικανότητα μείωσης του πόνου κατά τη διάρκεια της θεραπείας, η δημιουργία και η διατήρηση υγρασίας στην περιοχή του τραύματος, η εύκολη και πλησιέστερη κάλυψη στην επιθυμητή περιοχή, η εισαγωγή και η μεταφορά φαρμάκων και η απορρόφηση

εκκριμάτων κατά την περίοδο της φλεγμονώδους φάσης. Επιπλέον, η υψηλή μηχανική αντοχή, η ελαστικότητα και η προσαρμοστικότητα του επιθέματος θα επιτρέπουν την εύκολη και ανώδυνη επούλωση του τραύματος (Chawla *et al.*, 2008).

Λόγω της υψηλής ικανότητας απορρόφησης νερού, η ενυδατωμένη βακτηριακή κυτταρίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως προσωρινό τεχνητό δέρμα για τη θεραπεία σοβαρών εγκαυμάτων, αφού σύμφωνα με μελέτες μπορεί να ενισχύσει την ανάπτυξη των κυττάρων του δέρματος (Czaja *et al.*, 2006). Επιπλέον, επειδή είναι από τη φύση του εξαιρετικά πορώδες υλικό, επιτρέπει την μεταφορά αντιβιοτικών ή άλλων φαρμάκων εντός του τραύματος συνιστώντας παράλληλα έναν αποτελεσματικό φυσικό φραγμό ενάντια σε οποιαδήποτε εξωτερική μόλυνση. Η χρήση της βακτηριακής κυτταρίνης στον τομέα της μηχανικής ιστών αιμοφόρων αγγείων είναι επίσης πολλά υποσχόμενη, αφού αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ικρίωμα για την αντιμετώπιση προβλημάτων που σχετίζονται με αγγειακές ασθένειες (Chawla *et al.*, 2008).

Η χρήση της βακτηριακής κυτταρίνης ως προσωρινό δέρμα διατίθενται ήδη στην αγορά από την βραζιλιάνικη εταιρεία Fibrocel, και τα ονόματα των προϊόντων είναι BioProcess™, Dermafill™, BioFill™ και NexFill™. Ένα πέμπτο εμπορικό προϊόν είναι το Prima Cel™ από την Xylos Corporation, που έχει εφαρμοστεί σε κλινικές δοκιμές προς επούλωση πληγών από φλεβικά έλκη. Άλλες χρήσεις της στον τομέα της ιατρικής που έχουν κατοχυρωθεί με διεθνείς πατέντες είναι αυτές σε οστικά μοσχεύματα, στην αναγέννηση ιστών και σε γάζες όπου η ενίσχυσή τους με BC σε συνδιασμό με κολλαγόνο και υδροξυαπατίτη βελτιστοποιεί τις ιδιότητές τους. Τέλος, η βακτηριακή κυτταρίνη έχει εφαρμοσθεί σε σκευάσματα όπως μάσκες προσώπου που παρέχουν προστασία ενάντια σε ιούς και ως παγοκύστη (Fu *et al.*, 2013).

### 1.5.3 Λοιπές εφαρμογές

Όταν η βακτηριακή κυτταρίνη βρίσκεται σε ξηρή μορφή οι λεπτές μεμβράνες της παρουσιάζουν ομοιόμορφη κατανομή ιών και υψηλή αντοχή σε εφελκυσμό χρησιμεύοντας έτσι ως ακουστικές ή αγωγίμες μεμβράνες. Ήδη, η Sony Corporation έχει χρησιμοποιήσει την βακτηριακή κυτταρίνη ως φίλτρο μεμβράνης σε ηχεία

υψηλής πιστότητας και ακουστικά που διατίθενται στο εμπόριο. Επιπλέον, η παραγωγή της BC σε μεγάλη κλίμακα από τις εταιρίες Weyerhaeuser Co. (Tacoma, Washington, USA) και Cetus Co. (Emeryville, California, USA) οδήγησε στην ανάπτυξη του προϊόντος Cellulon<sup>®</sup>, ένα διογκωτικό μέσο που χρησιμοποιείται ως υλικό σύνδεσης και επικάλυψης. Τέλος, αξιόλογα ήταν τα αποτελέσματα χρήσης της ως υλικό συσκευασίας σε συνδιασμό με PLA (πολυγαλακτικό οξύ). Αυτό το σύνθετο υλικό χαρακτηρίστηκε ως βιοσυμβατό, με καλές μηχανικές ιδιότητες (Tarr *et al.*, 1931), (Keshk *et al.*, 2014), (Esa *et al.*, 2014).

## 1.6 Επίδραση συνθηκών ζύμωσης στην παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης

Γενικά, το μέσο ζύμωσης πρέπει να περιέχει άνθρακα, άζωτο και άλλα μακρο- και μικροθρεπτικά συστατικά που απαιτούνται για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Οι αλλαγές στα συστατικά του μέσου και οι περιβαλλοντικές συνθήκες μπορούν να επηρεάσουν άμεσα ή έμμεσα την ανάπτυξη του μικροοργανισμού, τον σχηματισμό των προϊόντων ζύμωσης και κατ' επέκταση της μικροβιακής κυτταρίνης.

Η έκκριση εξωπολυσακχαριτών είναι συνήθως πιο εμφανής όταν παρέχεται στα βακτήρια άφθονη πηγή άνθρακα και ελάχιστη πηγή αζώτου (Ramana *et al.*, 2000). Συνήθως, ως πηγή άνθρακα για την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης, χρησιμοποιείται γλυκόζη και σακχαρόζη, ενώ έχουν χρησιμοποιηθεί και άλλοι υδατάνθρακες όπως φρουκτόζη, μαλτόζη, ξυλόζη άμυλο και γλυκερόλη. Προσοχή πρέπει να δίδεται στην αρχική συγκέντρωση γλυκόζης στο μέσο, γιατί αν αυτή είναι αυξημένη, μπορεί να οδηγήσει σε παραγωγή γλυκονικού οξέος (ως παραπροϊόν), μείωση του pH του μέσου και τελικά μείωση της ποσότητας παραγόμενης κυτταρίνης. Σε μελέτη που χρησιμοποιήθηκε γλυκόζη σε συγκέντρωση 6, 12, 24 και 48 g/L, αυτή καταναλώθηκε σε ποσοστά 100, 100, 68 και 28 % αντίστοιχα (Chawla *et al.*, 2009).

Το άζωτο είναι το κύριο συστατικό των πρωτεϊνών και είναι απαραίτητο στον κυτταρικό μεταβολισμό, αποτελώντας το 8-14 % της ξηρής μάζας του βακτηριακού κυττάρου. Σύμφωνα με τους Hestrin και Schramm (1954) η αρχική συγκέντρωση

αζώτου στο μέσο καλλιέργειας πρέπει να είναι 1 % και πιο συγκεκριμένα 0,5 % yeast extract και 0,5 % βακτηριακή πεπτόνη. Η επιπλέον προσθήκη αζώτου ευνοεί την παραγωγή βιομάζας αλλά οδηγεί σε μείωση της παραγόμενης κυτταρίνης (Embuscado *et al.*, 1994).

Η ρύθμιση της θερμοκρασίας επώασης και της αρχικής τιμής του pH στο μέσο καλλιέργειας αποτελούν κρίσιμες παραμέτρους που επηρεάζουν τόσο την ανάπτυξη του μικροοργανισμού όσο και την παραγωγή κυτταρίνης. Σύμφωνα με μελέτες, η μέγιστη παραγωγή κυτταρίνης παρατηρείται μεταξύ 28 και 30 °C σε pH 4 έως 6 (Hestin and Schramm 1954). Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης το pH του μέσου μειώνεται λόγω παραγωγής γλυκονικού ή γαλακτικού οξέος (Masaoka *et al.*, 1993).

## **1.7 Χρήση γεωργικών υπολειμμάτων και βιομηχανικών παραπροϊόντων στην παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης**

Το ενεργειακό πρόβλημα που αντιμετωπίζουν σήμερα οι περισσότερες χώρες του κόσμου, γίνεται ακόμη πιο έντονο, καθιστώντας αναγκαία τη σταδιακή μετάβαση σε μια οικονομία με βάση τα ανανεώσιμα υλικά (βιομάζα) και απόβλητα βιομηχανίας ως πρώτη ύλη για την παραγωγή χημικών προϊόντων, καυσίμων και ενέργειας στο πλαίσιο των βιοδυλιστηρίων. Η εκμετάλλευση των ορυκτών πόρων τις περασμένες δεκαετίες οδήγησε στην εξάντλησή τους αλλά και σε περιβαλλοντική ρύπανση δημιουργώντας παράλληλα και πολλά οικονομικά προβλήματα. Στόχος λοιπόν των σημερινών ερευνών είναι η αναβάθμιση της ανανεώσιμης βιομάζας και των αποβλήτων με θετικό αντίκτυπο τόσο στην αντίστοιχη βιομηχανία όσο και στις τοπικές και εθνικές οικονομίες.

### **1.7.1 Υπολείμματα γεωργίας και αλυσίδας τροφίμων**

Όσον αφορά τον τομέα της γεωργίας, ένα μεγάλο μέρος των υπολειμμάτων χρησιμοποιείται ως ζωοτροφή στην κτηνοτροφία λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε φυτικές ίνες. Ένα άλλο μέρος οδηγείται προς κομποστοποίηση, ενώ μια μεγάλη



ποσότητα βιομάζας ενσωματώνεται στους αγρούς ή καίγεται προκαλώντας δυσμενείς επιπτώσεις στο περιβάλλον (Tilman *et al.*, 2002).

Σημαντική στο παραπάνω πρόβλημα είναι και η συνεισφορά των απωλειών και υπολλειμάτων της αλυσίδας τροφίμων. Τεράστιες ποσότητες τροφίμων κατά μήκος όλων των κρίκων της εφοδιαστικής αλυσίδας, από την παραγωγή μέχρι την τελική κατανάλωση των νοικοκυριών, χάνεται και καταλήγει στα σκουπίδια. Το 1/3 της παγκόσμιας παραγωγής τροφίμων, που αντιστοιχεί σε 1,3 δισ. τόνους, αξίας περίπου 750 εκατ. δολαρίων σε όλη τη διατροφική αλυσίδα πετιούνται στα σκουπίδια. Από την αποσύνθεση των τροφίμων αυτών παράγονται 3,3 δισεκατομμύρια τόνοι αερίων ιδιαίτερα επιβαρυντικών για την ατμόσφαιρα και το φαινόμενο του θερμοκηπίου, λόγω του εκλυόμενου μεθανίου (Tsouko *et al.*, 2015).

## **1.7.2 Βιομηχανικά απόβλητα και παραπροϊόντα**

Τα βιομηχανικά απόβλητα αποτελούν μια από τις κυριότερες πηγές ρύπανσης του περιβάλλοντος, ιδιαίτερα στις αναπτυσσόμενες χώρες. Η βιομηχανική δραστηριότητα παράγει υγρά απόβλητα (με αποδέκτη πολλές φορές επιφανειακά νερά και θάλασσες), ρυπογόνα αέρια και στερεά απόβλητα (Houk *et al.*, 1992).

### **1.7.2.1 Απόβλητα της βιομηχανίας βιοντίζελ**

Η μετατροπή ανανεώσιμων πηγών ενέργειας όπως φυτικά έλαια, ζωϊκά λίπη και μαγειρικά έλαια μέσω της διαδικασίας μετεστεροποίησης (κυρίως με μεθανόλη) οδηγεί στην παραγωγή βιοντίζελ. Η αυξανόμενη ζήτηση για παραγωγή βιοντίζελ από ελαιούχους σπόρους (π.χ. ηλίανθος), οδηγεί και σε αυξημένες ποσότητες παραπροϊόντων, όπως είναι η ακατέργαστη γλυκερόλη αλλά και τα στερεά υπολείμματα των ελαιούχων σπόρων. Η γλυκερόλη αποτελεί το πιο σημαντικό παραπροϊόν της διεργασίας μιας και παράγεται σε μεγάλες ποσότητες, 10 % του βάρους του παραγόμενου βιοντίζελ.

Τα τελευταία χρόνια λόγω της μεγάλης παραγωγής του βιοντίζελ υπήρξε μια υπερπαραγωγή και πλεόνασμα γλυκερίνης με αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της

αγοραστικής της αξίας. Επίσης, η βιομηχανία στοχεύει στην ανάπτυξη λύσεων και νέων προϊόντων για την αξιοποίηση της. Οι συγκεκριμένοι τομείς είναι η παραγωγή βιοκαυσίμων όπως βιοαερίου και υδρογόνου. Επιπλέον, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η γλυκερόλη έχει ήδη αποτελέσει πηγή ενέργειας και άνθρακα σε πολλές μικροβιακές βιομετατροπές για την παραγωγή διάφορων χημικών ουσιών, όπως 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).

### 1.7.2.2 Απόβλητα της γραμμής παραγωγής φοινικελαίου

Η καλλιέργεια του φοινικόδεντρου (*Elaeis guineensis*) ανήλθε σε παγκόσμιο επίπεδο (2015/2016) σε 19,8 εκατομμύρια εκτάρια καλλιεργήσιμης γης σύμφωνα με το USDA (United States Department of Agriculture). Τα δύο κύρια προϊόντα που παράγονται από τον καρπό του φοινικόδεντρου είναι το φοινικέλαιο και το φοινικοκυρηνέλαιο. Το φοινικέλαιο εξάγεται από το μεσοκάρπιο του φρούτου, δημιουργώντας παράλληλα υπολείμματα πεπιεσμένων ινών (palm pressed fiber residues-PPF) και το δεύτερο από το ενδοσπέρμιο, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό αλεύρων από το ενδοσπέρμιο του φοινικόκαρπου (Palm kernel cake-PKC). Σύμφωνα με το USDA, η παγκόσμια παραγωγή φοινικελαίου και φοινικοκυρηνελαίου για το 2015/2016 εκτιμάται σε 62 εκατομμύρια τόνους και 7 εκατομμύρια τόνους, αντίστοιχα. Βασισμένο σε ισοζύγια μάζας (Yusoff *et al.*, 2006), οι κατά προσέγγιση ποσότητες των PPF και PKC είναι 53 εκατομμύρια τόνοι και 9,9 εκατομμύρια τόνοι, αντίστοιχα. Οι συμβατικές χρήσεις των στερεών υπο-προϊόντων περιλαμβάνουν την αποτέφρωση, την διάθεση στον τομέα της γεωργίας, την παραγωγή ατμού και ηλεκτρικής ενέργειας (Prasertsan *et al.*, 1996), την παραγωγή ζωοτροφών (Agunbiade *et al.*, 1999) ή την εφαρμογή ως υπόστρωμα στην καλλιέργεια μυκήτων (Tabi *et al.*, 2008). Η ανάπτυξη ολοκληρωμένων βιοδιύλιστηρίων στις ήδη υπάρχουσες εγκαταστάσεις παραγωγής φοινικελαίου θα οδηγήσει στην αποτελεσματική αξιοποίηση αυτών των ρευμάτων αποβλήτων και υπο-προϊόντων.



**Εικόνα 3:** Καρπός φοινικόδεντρου (αριστερά) και ΡΚΚ (δεξιά).

Η σύσταση του ΡΚΚ διαφέρει ανάλογα με την προέλευση, την μεθοδολογία που χρησιμοποιείται για την αφαίρεση του ελαίου και την ποσότητα ενδοσπερμίου που απομένει (Adesehinwa *et al.*, 2007). Η κύρια σύστασή του περιγράφεται στον παρακάτω Πίνακα 1.

**Πίνακας 1:** Σύσταση του ΡΚΚ.

Σύσταση	Ποσοστό βάσει βιβλιογραφίας (% ξηρού βάρους)	Βιβλιογραφία
Τέφρα	3-6	Amal <i>et.al.</i> , 2008, Sundu <i>et.al.</i> , 2006
Υγρασία	4-14	Sundu <i>et.al.</i> , 2006, Ofori <i>et.al.</i> , 2013, Abdullah <i>et.al.</i> , 1991
Πρωτεΐνη	12-21	Sundu <i>et.al.</i> , 2006, Ofori <i>et.al.</i> , 2013, Abdullah <i>et.al.</i> , 1991
Λιπίδια	5-10	Jørgensen <i>et.al.</i> , 2010
ADF	45.7-52.4	Chanjula <i>et.al.</i> , 2011
ADL	14-27.7	Jørgensen <i>et.al.</i> , 2010, Lawal <i>et.al.</i> , 2010
NDF	43-85	Chanjula <i>et.al.</i> , 2011,

		Lawal <i>et.al.</i> , 2010
Κυτταρίνη	16.6-30	Lawal <i>et.al.</i> , 2010, Ofori <i>et.al.</i> , 2013
Ημικυτταρίνη	24	Lawal <i>et.al.</i> , 2010. Ofori <i>et.al.</i> , 2013

Όπου: ADF (acid-detergent fibre) είναι τα κλάσματα κυτταρίνης, λιγνίνης και Si, NDF (neutral-detergent fibre) τα κλάσματα κυτταρίνης, ημικυτταρίνης και λιγνίνης και ADL (acid-detergent lignin) το κλάσμα λιγνίνης που προκύπτουν από τις μεθόδους προσδιορισμού ινωδών ουσιών.

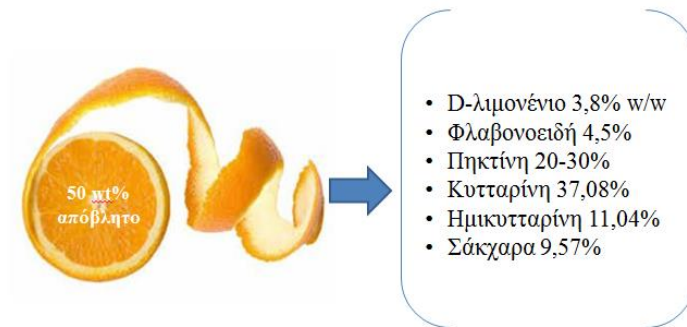
### 1.7.2.3 Απόβλητα εσπεριδοειδών στη γραμμή παραγωγής χυμών

Τα εσπεριδοειδή, όπως πορτοκάλια, λεμόνια, λάιμ και γκρέιπφρουτ καλλιεργούνται παγκοσμίως με το 40 % αυτών να χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία παραγωγής χυμών. Αποτέλεσμα της παραγωγικής διαδικασίας χυμού είναι η δημιουργία στερεών ρευμάτων παραπροϊόντων (φλοιός, σπόροι, λοιπός πολτός) τα οποία αποτελούν το 50-60 % του συνολικού φρούτου, ποσοστό το οποίο αντιστοιχεί περίπου σε 15,6 εκατ. τόνους αποβλήτων ετησίως (Pfaltzgraff *et al.*, 2013).

#### *Συστατικά φλοιού πορτοκαλιού και αξιοποίησή τους*

Ο φλοιός του πορτοκαλιού παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω των ποικίλων συστατικών που περιλαμβάνει. Αποτελεί πηγή διαιτητικών ινών, φυσικών αντιξειδωτικών, χρωστικών και αρωματικών συστατικών, τα οποία μπορούν να προστεθούν σε τρόφιμα. Η φλούδα του πορτοκαλιού περιέχει περισσότερο από 80% νερό. Η πηκτίνη και το D-λιμονένιο τα οποία περιέχονται στον φλοιό του πορτοκαλιού βρίσκουν εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων, στον τομέα της ιατρικής και των καλλυντικών (Pfaltzgraff *et al.*, 2013), στην παραγωγή βιοκαυσίμων και βιοπλαστικών, ενώ τα περιεχόμενα σε αυτόν σάκχαρα μπορούν να αξιοποιηθούν ως πηγή άνθρακα σε μικροβιακές μετατροπές προς παραγωγή προϊόντων υψηλής

προστιθέμενης αξίας όπως είναι η βακτηριακή κυτταρίνη (Kumbhar *et al.*, 2015). Η κυτταρίνη και τα παράγωγα κυτταρίνης βρίσκουν εφαρμογή στην παραγωγή χαρτιού, ως βιοϋλικά και φαρμακευτικά προϊόντα, καθώς και ως πολύ-λειτουργικά συστατικά τροφίμων. Τέλος, ενδιαφέρον παρουσιάζει και η χρήση της ως απορροφητικό φίλτρο λόγω του σπογγώδη χαρακτήρα της (Lin *et al.*, 2013).



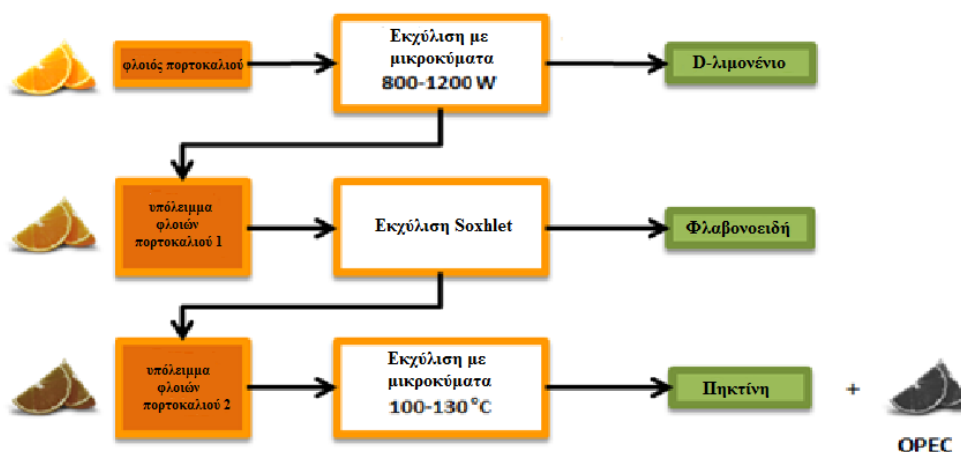
**Εικόνα 4:** Κύρια συστατικά του φλοιού πορτοκαλιού σε ποσοστό επί της ξηρής μάζας του.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον λοιπόν θα πρέπει να δοθεί στην αξιοποίηση των παραπάνω υπολειμμάτων, όχι μόνο για την ελαχιστοποίηση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων αλλά και για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας (Pfaltzgraff *et al.*, 2013).

## 1.8 Εκχύλιση συστατικών από φλοιούς πορτοκαλιού

Το πρόγραμμα Orange Peel Exploitation (OPEC) εστιάζει στην αξιοποίηση των φλοιών πορτοκαλιού προς παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας, στοχεύοντας τόσο στην εκχύλιση διαφόρων συστατικών όσο και στη βελτιστοποίηση της διαδικασίας. Οι ερευνητές που συνεργάζονται στο πρόγραμμα αυτό προέρχονται από το Πανεπιστήμιο του Γιόρκ, το Πανεπιστήμιο του Σάο Πάολο και το Πανεπιστήμιο της Κόρδοβα. Στόχος τους είναι η δημιουργία βιοδιυλιστηρίων με "μηδενικά απόβλητα" χρησιμοποιώντας φούρνους μικροκυμάτων υψηλής έντασης και χαμηλής θερμοκρασίας για το διαχωρισμό των υγρών συστατικών από την

κυτταρινούχα μάζα στις φλούδες πορτοκαλιών. Παρακάτω φαίνεται διαγραμματικά η μεθοδολογία που ακολουθείται για την εκχύλιση των διαφόρων συστατικών από τις φλούδες πορτοκαλιού ώστε το υπόλειμμα στο τέλος της διεργασίας να περιέχει στο μεγαλύτερο ποσοστό του κυτταρίνη, σε συνδιασμό με ημικυτταρίνη και λιγνίνη (Διάγραμμα 1).



**Διάγραμμα 1:** Γενική μεθοδολογία προγράμματος OPEC.

### 1.8.1 Εκχύλιση συστατικών με αντιδραστήρες μικροκυμάτων

Η εκχύλιση με χρήση μικροκυμάτων αποτελεί μια νέα μέθοδο συνδιάζοντας τη νέα τεχνολογία μικροκυμάτων με την παραδοσιακή εκχύλιση με χρήση διαλύτη. Η εφαρμογή των μικροκυμάτων αποσκοπεί στην θέρμανση του διαλύτη και του δείγματος (φυτικού ιστού στην προκειμένη περίπτωση), αύξηση του ρυθμού μεταφοράς μάζας των διαλυμένων ουσιών από τη μήτρα του δείγματος εντός του διαλύτη με σκοπό την εκχύλιση των επιθυμητών συστατικών. Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου έναντι των παραδοσιακών τεχνικών είναι ο μικρότερος χρόνος εκχύλισης, η μικρότερη ποσότητα διαλύτη που απαιτείται, το χαμηλό κόστος αλλά και το υψηλότερο ποσοστό εκχύλισης. Η χρήση των μικροκυμάτων ξεκίνησε στα τέλη της δεκαετίας του 1980 και μέσα από τις τεχνολογικές εξελίξεις έχει γίνει πλέον μία από

τις δημοφιλέστερες και οικονομικά αποδοτικότερες μεθόδους εκχύλισης που είναι σήμερα διαθέσιμες (Delazar *et al.*, 2012).

Τα συστατικά που απομονώνονται με χρήση μικροκυμάτων κατά την μέθοδο OPEC είναι το D-λιμονένιο και η πηκτίνη. Η εκχύλιση του πρώτου χωρίς διαλύτη είναι το πρώτο βήμα της παραπάνω διαδικασίας. Η διαδικασία αυτή είναι πιο αποτελεσματική σε σύγκριση με τις συμβατικές μεθόδους λόγω της μεγαλύτερης εκλεκτικότητας στο επιθυμητό συστατικό. Ο χρόνος που διαρκεί η εκχύλιση είναι μειωμένος και η τελική απόδοση σε D-λιμονένιο υψηλότερη. Στο στάδιο απομόνωσης της πηκτίνης, σημειώνεται ελάττωση του χρόνου εκχύλισης, βελτίωση των ιδιοτήτων της πηκτίνης συμπεριλαμβανομένου και του βαθμού εστεροποίησης, του μοριακού βάρους, του ιξώδους, της αντοχής του τζέλ και του περιεχόμενου γαλακτουρονικού οξέος. Πρέπει να σημειωθεί ότι οι παραπάνω διαδικασίες είναι φιλικές προς το περιβάλλον αφού δεν χρησιμοποιούνται χημικά (π.χ. οξέα) (Pfaltzgraff, 2014).

### 1.8.2 Συμβατική εκχύλιση πηκτίνης

Η εκχύλιση της πηκτίνης συμβατικά πραγματοποιείται με όξινη υδρόλυση που συνεπάγεται την δημιουργία όξινων υγρών αποβλήτων. Στη συγκεκριμένη τεχνική υδρόλυσης η επεξεργασία της πρώτης ύλης πραγματοποιείται υπό όξινες συνθήκες με την χρήση οργανικών οξέων υπο υψηλή θερμοκρασία για 3 έως 12 ώρες. Τα αδιάλυτα σωματίδια (αλεσμένοι φλοιοί πορτοκαλιού) απομακρύνονται από το μίγμα και η διαλυμένη πρωτοπηκτίνη συμπυκνώνεται στο 3-5 % με εξάτμιση υπό κενό. Η πηκτίνη επανακτάται με κατακρίμνηση χρησιμοποιώντας αλκοόλη ή άλατα αργιλίου. Στη συνέχεια καθαρίζεται με όξινη αλκοόλη και ξηραίνεται μέχρι να επιτευχθεί τελική υγρασία 6-10 %. Η ξηρή πηκτίνη μπορεί να ληφθεί με απόδοση 25-30 % επί του ξηρού βάρους του φλοιού πορτοκαλιού. Τα πολλά στάδια καθαρισμού δημιουργούν πολλά ρεύματα αποβλήτων, καθένα από τα οποία απαιτεί ειδικό χειρισμό (Pfaltzgraff, 2014).

## 1.9 Ζυμαρικά ελεύθερα γλουτένης

Τα ζυμαρικά αποτελούν ένα βασικό είδος της παραδοσιακής ιταλικής κουζίνας, με πρώτη χρονολογική αναφορά το 1154 στη Σικελία. Τυπικά, τα ζυμαρικά προκύπτουν από ζύμη που περιέχει σκληρό αλεύρι σίτου αναμεμιγμένο με νερό ή αυγά και διαμορφώνεται σε φύλλα ή διάφορα Διάγραμματα, που μαγειρεύονται με βρασμό ή ψήσιμο. Μια μεγάλη ποικιλία αλεύρων από άλλα δημητριακά ή σιτηρά μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή τους. Τα ζυμαρικά μπορούν να χωριστούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τα ξηρά και τα φρέσκα. Τα περισσότερα ξηρά ζυμαρικά παράγονται εμπορικά μέσω μιας διαδικασίας εξώθησης, ενώ τα φρέσκα παράγονται παραδοσιακά με το χέρι, μερικές φορές με τη βοήθεια απλών μηχανών. Σήμερα, πολλές ποικιλίες νωπών ζυμαρικών παράγονται εμπορικά από μηχανές μεγάλης κλίμακας και τα προϊόντα είναι ευρέως διαθέσιμα στην αγορά.

Τα φρέσκα ζυμαρικά είναι συνήθως τοπικής παραγωγής και περιέχουν φρέσκα υλικά εκτός εάν προορίζονται για συσκευασία και πώληση οπότε στην περίπτωση αυτή δίνεται προσοχή στους ρυθμούς αλλοίωσης των συστατικών με προσθήκη συντηρητικών. Επίσης, φρέσκα ζυμαρικά παράγονται συνήθως με μείγμα αυγών και αλεύρου για όλες τις χρήσεις ή αλεύρι ελεύθερο γλουτένης. Δεδομένου ότι το προϊόν περιέχει αβγά, είναι πιο μαλακό σε σύγκριση με τα ξηρά ζυμαρικά και η διάρκεια μαγειρέματός του είναι η μισή (The classic pasta cookbook, 1993).

### 1.9.1 Η νόσος της κοιλιοκάκης

Η νόσος της κοιλιοκάκης χαρακτηρίζεται ως αυτοάνοση εντεροπάθεια που προκαλείται σε άτομα με γενετική προδιάθεση από μόνιμη δυσανεξία στη γλουτένη, ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών (προλαμίνες και γλουτελίνες) που βρίσκεται στο σιτάρι, τη σίκαλη και το κριθάρι (Tompson *et al.*, 2000). Οι ασθενείς που πάσχουν από την συγκεκριμένη νόσο παρουσιάζουν συμπτώματα δυσπεψίας και δυσαπορρόφησης των θρεπτικών ουσιών, των βιταμινών και μετάλλων στο γαστρεντερικό σωλήνα. Η μοναδική αποτελεσματική θεραπεία σήμερα θεωρείται η κατανάλωση προϊόντων διατροφής απουσία γλουτένης. Σύμφωνα με τους Fasano και Catassi (2001) 1 στα 100



άτομα του γενικού πληθυσμού της Ευρώπης και των Ηνωμένων Πολιτειών πάσχουν από την συγκεκριμένη νόσο.

Κύρια συστατικά για την παραγωγή προϊόντων χωρίς γλουτένη είναι τα άμυλα και τα άλευρα φυτικής προέλευσης όπως άμυλο/ άλευρο ρυζιού, ταπιόκας, καλαμποκιού και πατάτας. Σύμφωνα με τους Korus *et al.*, (2006) η διατροφική αξία αυτών των προϊόντων είναι χαμηλότερη από αυτή των πρώτων υλών από τις οποίες παρασκευάζονται. Επιπλέον τα ποσοστά διαιτητικών ινών, βιταμινών, σιδήρου και φυλλικού οξέος είναι επίσης μειωμένα σε σχέση με τα αντίστοιχα προϊόντα σίτου (Thompson, 2000). Τέλος, η απουσία γλουτένης δημιουργεί τεχνολογικά προβλήματα στη διαδικασία παρασκευής των προϊόντων όπως απουσία ιξωδοελαστικότητας στο ζυμάρι, μέτρια γεύση και υφή στο στόμα και εμφάνιση.



**Εικόνα 5:** Αναγνωριστικό σύμβολο των προϊόντων ελεύθερων γλουτένης.

### 1.9.2 Συστατικά φρέσκων ζυμαρικών και ο ρόλος τους

Τα βασικά συστατικά των ζυμαρικών είναι το σιμιγδάλι (αλεύρι) και το νερό. Όλα τα άλλα συστατικά που προστίθενται είναι προαιρετικά και δύναται να συνεισφέρουν ανάλογα με την ποσότητα που προστίθενται στην ποιότητα του τελικού προϊόντος. Το σιμιγδάλι προκύπτει από την άλεση σκληρού σιταριού και παράγει ισχυρή και ελαστική ζύμη λόγω του υψηλού επιπέδου περιεχόμενης γλουτένης.

#### *Αλεύρι*

Αρκετοί τύποι αλεύρων μπορούν να χρησιμοποιηθούν κατά την παρασκευή ζυμαρικών. Κάθε ένα επηρεάζει το χρώμα, τη γεύση, την υφή με διαφορετικό τρόπο.

Το ρυζάλευρο συνιστάται ως ασφαλές για ασθενείς με κοιλιοκάκη, δεδομένου ότι δεν διαθέτει γλουτένη και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή ζυμαρικών. Κατά την παραγωγή των ζυμαρικών από ρύζι, μπορεί να προκύψουν κάποια τεχνολογικά προβλήματα λόγω της έλλειψης γλουτένης. Αυτή εκτελεί τεχνολογικά θεμελιώδεις λειτουργίες, μεταξύ των οποίων η απορρόφηση του νερού που είναι πολύ σημαντική. Όταν προστίθεται στο σιμιγδάλι νερό και η ζύμη αναμιγνύεται μηχανικά, η γλουτένη, σχηματίζει ένα είδος πλέγματος στη δομή της ζύμης, παγιδεύει τους κόκκους του αμύλου και ουσιαστικά προλαμβάνει την διάλυση των ζυμαρικών κατά το μαγείρεμα (Matsuo *et al.*, 1970). Όταν το ρύζι είναι το μόνο υλικό που χρησιμοποιείται στην παραγωγή ζυμαρικών, τότε απαιτεί ζελατινοποίηση του αμύλου ώστε αυτό να δράσει ως συνδετικό υλικό, δεδομένου ότι η πρωτεΐνη που εμπεριέχεται στο ρύζι στερείται της λειτουργικότητας της γλουτένης σίτου με αποτέλεσμα την μην δημιουργείται ζύμη με συνεκτική δομή. Γαλακτοκομικά, πρωτεΐνες και υδροκολλοειδή μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να μιμηθούν τις ιξωδοελαστικές ιδιότητες της γλουτένης και να οδηγήσουν σε βελτιωμένη δομή, οργανοληπτική αποδοχή και μεγαλύτερη διάρκεια ζωής του προϊόντος (Lazaridou *et al.*, 2007).

### *Αυγό*

Η προσθήκη αυγού στα ζυμαρικά προσδίδει πιο έντονο κίτρινο χρώμα και ενισχύει την θρεπτική αξία του προϊόντος. Η υφή των ζυμαρικών με αυγό είναι βελτιωμένη σε σύγκριση με τα απλά ζυμαρικά και η αίσθηση στο στόμα είναι αρκετά διαφορετική. Το αυγό μπορεί να προστεθεί είτε σε υγρή είτε σε ξηρή μορφή. Αν και τα αυγά σε υγρή μορφή θεωρούνται ανώτερης ποιότητας, τίθενται θέματα διασφάλισης μικροβιολογικής ποιότητας. Αντιθέτως, το αυγό σε ξηρή μορφή, δίνει μεγαλύτερη διάρκεια ζωής και αποθήκευσης και λιγότερους κινδύνους (Cassia *et al.*, 2004).

### *Αλάτι*

Η ποσότητα του προστιθέμενου αλατιού είναι περίπου 1-3 % του βάρους του αλεύρου. Η προσθήκη αλατιού βελτιώνει τις ιξωδοελαστικές ιδιότητες, ενυψώνει την ελαστικότητα, την υφή και την γεύση του ζυμαριού. Παράλληλα, παρεμποδίζει την ενζυμική δραστηριότητα και την ανάπτυξη μικροοργανισμών (Dexter *et al.*, 1979).

### *Λάδι*

Το λάδι δεν είναι απαραίτητο συστατικό για τη διασφάλιση καλής ποιότητας ζυμαρικών, αλλά όταν προστίθεται, η υφή του προϊόντος είναι πιο ομαλή και η γεύση ενισχυμένη. Επιπλέον, η εξώθηση της ζύμης από το μηχάνημα ζυμαρικών είναι ευκολότερη.

### 1.9.3 Υδροκολλοειδή σε προϊόντα ελεύθερα γλουτένης

Ο όρος διαιτητικές ίνες χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1953 από τον Hipsley αλλά με ευρύτερο ορισμό το 1976. Τελικά, το 2001 υπό την αιγίδα της AACC (American Association for Clinical Chemistry) ορίστηκαν ως «εδώδιμα μέρη φυτών ή ανάλογοι υδρογονάνθρακες που είναι ανθεκτικά στην πέψη και την απορρόφηση στο λεπτό έντερο του ανθρώπου, με πλήρη ή μερική ζύμωση στο παχύ έντερο. Οι διαιτητικές ίνες περιλαμβάνουν πολυσακχαρίτες, ολιγοσακχαρίτες, λιγνίνη και συνδεδεμένες με αυτά φυτικές ουσίες. Οι διαιτητικές ίνες προωθούν ευεργετικές φυσιολογικές δράσεις, συμπεριλαμβανομένων της καλής λειτουργίας του εντέρου, και/ή μετρίασης της χοληστερόλης του αίματος, και/ή μετρίασης της γλυκόζης του αίματος».

Στην κατηγορία των διαιτητικών ινών που μπορούν να προστεθούν σε προϊόντα ελεύθερα γλουτένης (αρτοσκευάσματα, ζυμαρικά κλπ.) έχουν μελετηθεί ίνες από δημητριακά αλλά και ίνες με πηκτικές ιδιότητες, όπως τα κόμμεα (υδροκολλοειδή). Σύμφωνα με τους Lazaridou *et al.*, (2007), τα κόμμεα είναι υδρόφιλοι πολυσακχαρίτες μακράς αλυσίδας και μπορούν να ταξινομηθούν ανάλογα με την πηγή προέλευσής τους στις παρακάτω κατηγορίες:

- από θαλάσσια φύκη, όπως το άγαρ, η καρραγενάνη και τα αλγινικά άλατα,
- από εκχυλίσματα φυτών όπως η πηκτίνη και η β-γλυκάνη,
- από εκκρίματα φυτών όπως το αραβικό κόμμι,
- από σπόρους, όπως το κόμμι χαρουπιού, το κόμμι γκουάρ και το ψύλλιο,
- τροποποιημένοι φυσικοί πολυσακχαρίτες όπως παράγωγα κυτταρινών (μεθυλοκυτταρίνη- MC, υδροξυπροπυλομεθυλοκυτταρίνη- HPMC και καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη- CMC και

- κόμμεα παραγόμενα από μικροοργανισμούς. Ο σπουδαιότερος αντιπρόσωπος αυτών είναι το κόμμι ξανθάνης. Το κόμμι αυτό παράγεται από ζύμωση της γλυκόζης στην οποία προστίθεται ιχνοστοιχεία, πηγή αζώτου και φωσφορικό δικάλιο. Για τη ζύμωση χρησιμοποιείται καλλιέργεια του μικροοργανισμού *Xanthomonas campestris* (Garcia-Ochoa *et al.*, 2000). Η παραγωγή αυτού του προϊόντος παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με την βακτηριακή κυτταρίνη.

Ο ρόλος των υδροκολλοειδών, στο συγκεκριμένο τομέα, είναι να μεταβάλλουν τις ιδιότητες του ζυμαριού και να βελτιώνουν την δομή, την υφή, τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και την δειάρκεια ζωής των προϊόντων στα οποία προστίθενται (Houben *et al.*, 2012).

#### 1.9.4 Ρεολογικά χαρακτηριστικά ζύμης

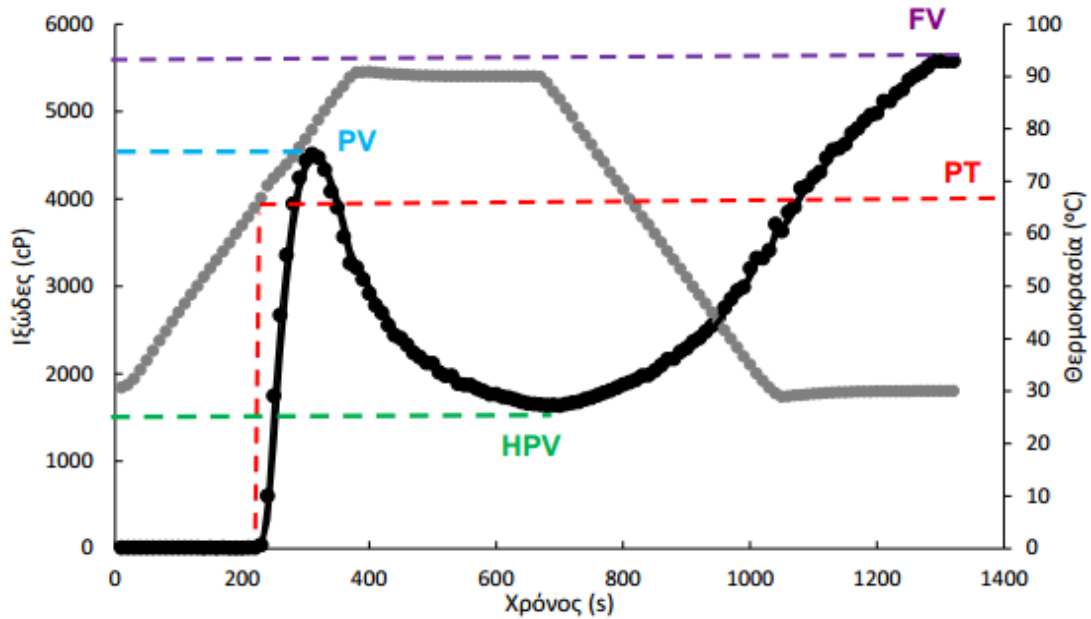
Η ρεολογία μελετά την παραμόρφωση των αντικειμένων υπό την επίδραση δύναμης. Οι βασικοί τύποι δυνάμεων που μπορούν να ασκηθούν να ασκηθούν είναι οι δυνάμεις συμπίεσης (κάθετες στο επίπεδο παραμόρφωσης), οι δυνάμεις εφελκυσμού (κάθετες στο επίπεδο παραμόρφωσης με αντίθετη φορά) και οι δυνάμεις διάτμησης (εφαπτόμενες στο επίπεδο συμπίεσης). Ανάλογα με τη συμπεριφορά τους τα υλικά μπορούν να χωριστούν σε αυτά που ρέουν (ρευστά) και σε αυτά που παραμορφώνονται (στερεά).

Η ρεολογία συνεισφέρει στην κατανόηση των φυσικών ιδιοτήτων των ζυμαριών τα οποία χαρακτηρίζονται ως ιξωδοελαστικά υλικά τα οποία συνδιάζουν ταυτόχρονα ιδιότητες ρευστών και στερεών. Οι βασικοί τύποι δοκιμών που χρησιμοποιούνται για την μελέτη των ρεολογικών ιδιοτήτων της ζύμης είναι τα δυναμικά ταλαντωτικά πειράματα, τα πειράματα ερπυσμού χαλάρωσης, τα πειράματα εφελκυσμού και τα πειράματα μέτρησης ιξώδους. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε περιστροφικό ρεόμετρο για δυναμικά ταλαντωτικά πειράματα (oscillatory tests). Το τεστ είναι μη καταστροφικό και εκτελείται εντός της ιξωδοελαστικής περιοχής του δείγματος επιτρέποντας τη μέτρηση του ελαστικού και ιξώδους χαρακτήρα του. Επιπλέον, το

δείγμα υπόκειται σε ημιτονοειδή ταλάντωση με μεταβολή τάσης ή παραμόρφωσης αρμονικά με το χρόνο.

Οι θερμορεολογικές ιδιότητες μιγμάτων αξιολογούνται μέσω των διαδικασιών ζελατινοποίησης και ζελοποίησης του αμύλου των αλεύρων. Με την προσθήκη διαφόρων συστατικών στα άλευρα η θερμορασία ζελατινοποίησης μεταβάλλεται με αποτέλεσμα να μεταβάλλεται και η ποιότητα του τελικού προϊόντος. Για την μέτρηση των θερμορεολογικών ιδιοτήτων του αμύλου το δείγμα υποβάλλεται σε θερμοκρασιακό κύκλο υπό την επίδραση ανάμιξης (διάτμηση) και παράλληλα καταγράφεται η μεταβολή του ιξώδους σε συνάρτηση με το χρόνο και τη θερμοκρασία. Τα κύρια χαρακτηριστικά γνωρίσματα της καμπύλης μεταβολής ιξώδους του αμύλου με το χρόνο και την θερμοκρασία που είναι σημαντικά για την ποιότητα των προϊόντων είναι :

- η θερμοκρασία σχηματισμού πάστας (pasting temperature), η οποία δεν πρέπει να είναι χαμηλή γιατί αυτό θα έχει ως αποτέλεσμα την γρήγορη σταθεροποίηση της δομής του προϊόντος,
- το μέγιστο ιξώδες (Peak viscosity- PV) το οποίο υποδηλώνει την ικανότητα συγκράτησης νερού και την ικανότητα των αμυλοκόκκων να διογκώνονται. Χαμηλή τιμή μέγιστου ιξώδους συνεπάγεται μειωμένο ποσοστό εκλυόμενης αμυλόζης, της ουσίας που είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό ισχυρής πηκτής μέσω δεσμών υδρογόνου κατά την ψύξη και
- το τελικό ιξώδες (Final viscosity-FV) το οποίο υποδηλώνει την ικανότητα του αμύλου να σχηματίσει ισχυρή πηκτή κατά την ψύξη. Χαμηλό τελικό ιξώδες συνεπάγεται σχηματισμό αδύναμης πηκτής και μειωμένη σκληρότητα προϊόντος (Collar *et al.*, 2006).



**Διάγραμμα 2:** Τυπικό διάγραμμα μεταβολής του ιξώδους αμύλου με την θερμοκρασία και τον χρόνο θέρμανσης (Τσαγκαράκου, 2015)

### 1.9.5 Μηχανικές ιδιότητες ζύμης και υφή

Η υφή του εκάστοτε προϊόντος αποτελεί σημαντικό παράγοντα αποδοχής από το καταναλωτικό κοινό. Μία βασική δοκιμή που είναι πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενη είναι η δοκιμή συμπίεσης κατά την οποία μπορούν να προσδιοριστούν η τάση διάρρηξης (collapse stress) και ο δείκτης ελαστικότητας του υλικού (Young's modulus). Η τάση διάρρηξης, που είναι μια εμπειρική μέτρηση, μετράται σε παραμόρφωση 40 % και σχετίζεται με την σκληρότητα του προϊόντος. Ο δείκτης ελαστικότητας ορίζεται ως η κλίση του αρχικού γραμμικού τμήματος και εκφράζει την ακαμψία (Liu and Scanlon, 2003). Κατά τη δοκιμή συμπίεσης το δείγμα τοποθετείται μεταξύ παράλληλων πλακών και υφίσταται ομοαξονική πίεση. Σύμφωνα με τους Brady *et al.*, (1985) η μέτρηση των μηχανικών ιδιοτήτων μέσω της δοκιμής συμπίεσης σχετίζεται ανάλογα με την οργανοληπτική αξιολόγηση των προϊόντων μέσω αφής και αίσθησης στο στόμα.

## Σκοπός

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν σε πρώτο στάδιο η παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης από ανανεώσιμες πρώτες ύλες προερχόμενες από διάφορα αγροβιομηχανικά υπολείμματα και από παραπροϊόντα ή υποπροϊόντα της βιομηχανίας τροφίμων καθώς και της βιομηχανίας παραγωγής βιοντίζελ. Οι ζυμώσεις διαλείποντος έργου πραγματοποιήθηκαν με το βακτηριακό στέλεχος *Komagateibacter sucrofermentans* DSM 15973 και διήρκησαν 15 ημέρες. Η βάση για όλες τις ζυμώσεις ήταν το μέσο καλλιέργειας Hestrin-Schramm (HS-γλυκόζη) στο οποίο γινόταν κάθε φορά αντικατάσταση της πηγής άνθρακα ή/και αζώτου. Πιο συγκεκριμένα εξετάστηκε η προοπτική χρήσης:

- υδρολυμάτων από φλοιούς πορτοκαλιού ως πηγή άνθρακα
- υδρολυμάτων αλεύρων από το ενδοσπέρμιο του φοινικόκαρπου (Palm Kernel Cake-PKC) ως πηγή αζώτου σε συνδιασμό με ακατέργαστη γλυκερόλη καθαρότητας 92,4 % ως πηγή άνθρακα.

Σε δεύτερο στάδιο πραγματοποιήθηκε σύγκριση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων δειγμάτων βακτηριακής (BC) που προέκυψαν από διαφορετικές χρονικές στιγμές της μικροβιακής ζύμωσης (2, 5 και 8 ημέρες) σε υπόστρωμα που περιέχει υδρόλυμα από φλοιούς πορτοκαλιού και φυτικής κυτταρίνης (PC) που απομονώθηκε από φλοιούς πορτοκαλιού. Τα δείγματα αξιολογήθηκαν ως προς την καθαρότητα, την ικανότητα συγκράτησης νερού, τον βαθμό πολυμερισμού, τον δείκτη κρυσταλλικότητας και τέλος, την μικροσκοπική μορφολογία τους.

Τέλος, βακτηριακή κυτταρίνη που παράχθηκε σε υπόστρωμα Hestrin-Schramm προστέθηκε ως σταθεροποιητικός παράγοντας σε φρέσκα ζυμαρικά χωρίς γλουτένη σε ποσοστά 0,1, 0,5 και 1%, ξηρή ή προενυδατωμένη σε αυγό. Τέλος αξιολογήθηκαν οι ρεολογικές ιδιότητες της ζύμης αλλά και η ποιότητα μαγειρέματος, η υφή και οι θερμορεολογικές ιδιότητες των ζυμαρικών που παρασκευάστηκαν.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Υγρές ζυμώσεις διαλείποντος έργου για την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης

Οι υγρές ζυμώσεις διαλείποντος έργου πραγματοποιήθηκαν υπό μικροαερόβιες συνθήκες με σκοπό την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης. Τα υποστώματα που παρασκευάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν διέφεραν μεταξύ τους ως προς την πηγή άνθρακα και αζώτου.

#### 2.1.1 Βιολογικό υλικό

Το βακτηριακό στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη ήταν το *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM 15973 (Toyosaki *et al.*, 1995). Ο μικροοργανισμός απομονώθηκε από μαυροκέρασο και προμηθεύτηκε από το Ινστιτούτο Leibniz-DSMZ της Γερμανίας (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures).

##### *Παρασκευή εμβολίου*

Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή εμβολίου ήταν το Hestrin-Schramm (HS-γλυκόζη) το οποίο περιέχει: (ανά 1 L απιονισμένου νερού): γλυκόζη 20 g, yeast extract 5 g, βακτηριακή πεπτόνη 5 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  2,7 g, κιτρικό οξύ 1,15 g. Το pH του μέσου ρυθμίστηκε αρχικά στο 6 με προσθήκη 5 M NaOH. Η ζύμωση διήρκησε 2 ημέρες, κατά την οποία κωνικές φιάλες των 250 mL τοποθετήθηκαν σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο στους 30 °C με ρυθμό 180 rpm.

##### *Συνθήκες αποθήκευσης*

Σε φιαλίδια ειδικού τύπου (2 mL) προστέθηκαν 1 mL γλυκερόλη και 1 mL εμβολίου- HS-γλυκόζη και συντηρήθηκαν στους -80 °C (Hestrin and Schramm, 1954).



## 2.1.2 Θρεπτικά υποστρώματα

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκαν μικροβιακές ζυμώσεις σε τρία υποστρώματα που διέφεραν μεταξύ τους ως προς τις πηγές άνθρακα και αζώτου και μελετήθηκε η επίδρασή τους στην παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης. Η βάση για όλες τις ζυμώσεις ήταν το μέσο καλλιέργειας Hestrin–Schramm (HS-γλυκόζη). Οι αρχικές συγκεντρώσεις, σακχάρων και αζώτου ελεύθερων αμινομάδων και πεπτιδίων (FAN) διατηρήθηκαν σταθερές, 20 g/L και 350 mg FAN/L αντίστοιχα.

### 2.1.2.1 Συνθετικό υπόστρωμα ζύμωσης

Στο συνθετικό υπόστρωμα ζύμωσης η γλυκόζη αντικαταστάθηκε με εμπορική σακχαρόζη και τα υπόλοιπα συστατικά παρέμειναν σταθερά. Όλα τα υλικά, σκέυη και διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν, αποστειρώθηκαν προηγουμένως σε αυτόκαυστο στους 121 °C για 20 min. Επίσης, όλοι οι χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες, σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής.

### 2.1.2.2 Υπόστρωμα με υδρόλυμα από φλούδες πορτοκαλιού

Στο συγκεκριμένο υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα από φλούδες πορτοκαλιών ως πηγή άνθρακα. Πιο συγκεκριμένα, σε νερό βρύσης προστέθηκαν φλούδες πορτοκαλιού που προμηθεύτηκαν από το εστιατόριο του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών σε αναλογία υγρού:στερεού 3:1 ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή αρχική συγκέντρωση σακχάρων (20 g/L) για την παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης. Το μίγμα έβρασε για 1 ώρα και στη συνέχεια το εκχύλισμα διαχωρίστηκε από τα στερεά υπολείμματα με διηθητικό χαρτί. Το εκχύλισμα αποστειρώθηκε με φίλτρο διαμέτρου οπών 0,2 μm (Polycap 36 AS, Fisher). Σε αυτό προστέθηκε yeast extract και βακτηριακή πεπτόνη. Το εκχύλισμα πορτοκαλιού είναι

πλούσιο σε κιτρικό οξύ και ιχνοστοιχεία που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού.

Όλα τα υλικά, σκέυη και διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν, αποστειρώθηκαν προηγουμένως σε αυτόκαυστο στους 121 °C για 20 min. Επίσης όλοι οι χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες, σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής.

### **2.1.2.3 Υπόστρωμα με υδρόλυμα από άλευρα του ενδοσπερμίου του φοινικόκαρπου (Palm Kernel Cake-PKC) και ακατέργαστη γλυκερόλη**

Σε αυτό το υπόστρωμα η πηγή άνθρακα του μέσου Hestrin–Schramm αντικαταστάθηκε με ακατέργαστη γλυκερόλη καθαρότητας 92,4 % (w/w) η οποία χορηγήθηκε από τη βιομηχανία παραγωγής βιοντίζελ Π.Ν. Πέττας Α.Β.Ε.Ε. (Πάτρα, Ελλάδα). Το PKC που χρησιμοποιήθηκε ως πηγή αζώτου έπειτα από ενζυμική υδρόλυση, αποτελεί παραπροϊόν της γραμμής παραγωγής φοινικελαίου και χορηγήθηκε από την εταιρεία Agrapalma (Para, Brazil).

Το υδρόλυμα PKC παρασκευάστηκε μέσω ζύμωσης στερεής κατάστασης του μύκητα *Aspergillus oryzae*, ο οποίος δύναται να παράξει πρωτεολυτικά ένζυμα (πρωτεάσες) που θα υδρολύσουν τις πρωτεΐνες του PKC.

#### ***Βιολογικό υλικό***

Για την υδρόλυση χρησιμοποιήθηκε ο μύκητας *Aspergillus oryzae*. Το στέλεχος διατηρείται 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 το στέλεχος, ενυδατώθηκε και απομονώθηκε (με τη μέθοδο streaking) για να εξασφαλιστεί η καθαρότητά του. Έπειτα, αποθηκεύτηκε στους 4 °C σε κεκλιμένους δοκιμαστικούς σωλήνες πληρωμένους με 2 % w/v nutrient άγαρ, 2 % w/v πίτυρο σίτου και 3 % w/v PKC (Kachrimanidou *et al.*, 2013).

#### ***Εμβόλιο για τις ζυμώσεις στερεής κατάστασης (Solid State Fermentation)***

Για τις SSF χρησιμοποιήθηκαν ως εμβόλιο σπόρια του *A.oryzae*, ποσότητα που αντιστοιχεί σε  $6 \cdot 10^6$  cfu. Το εμβόλιο αποτελούταν από 2 mL εναιωρήματος σπορίων το οποίο προέκυψε από την προσθήκη 10 mL απιονισμένου νερού, με Tween 80 (0,01 %, v/v) στους δοκιμαστικούς σωλήνες με τον ανεπτυγμένο μύκητα. Στη συνέχεια, σε κωνικές φιάλες των 250 mL ίδιας σύνθεσης με αυτή των δοκιμαστικών σωλήνων προστέθηκαν 50 mL αποσταγμένου νερού με 2-3 σταγόνες 0,01 % (v/v) Tween 80 και 2 mL εναιωρήματος σπορίων. Αυτές τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο για περίπου 4 ημέρες στους 30 °C ώστε να επιτευχθεί πλήρης ανάπτυξη του μύκητα.

#### *Ζύμωση στερεάς κατάστασης του μύκητα Aspergillus oryzae*

Η ζύμωση στερεάς κατάστασης με τον συγκεκριμένο μύκητα πραγματοποιήθηκε σε κωνικές φιάλες των 250 mL, στις οποίες προστέθηκαν 5 g επί ξηρού PKC. Ακολούθησε ο εμβολιασμός των κωνικών με εναιώρημα σπορίων του μύκητα (65 % υγρασία) προσέχοντας να διαβραχεί ομοιόμορφα όλη η επιφάνειά τους, ώστε να επιτευχθεί ομοιόμορφη ανάπτυξη του μύκητα. 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 επωαστικό θάλαμο στους 30 °C για 2 ημέρες.

#### *Υδρόλυση PKC για την παραγωγή μέσου καλλιέργειας πλούσιο σε άζωτο*

Το στερεό υπόστρωμα της ζύμωσης που περιέχει τον ανεπτυγμένο μύκητα, αναμίχθηκε χρησιμοποιώντας μπλέντερ, με 500 mL απεσταγμένο νερό και μεταφέρθηκε σε φιάλη Duran του 1 L που περιείχε 50 g/L ξηρό PKC. Με αυτό τον τρόπο έγινε εκχύλιση του παραγόμενου συμπλέγματος ενζύμων για περαιτέρω υδρόλυση των μακρομορίων του. 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 πραγματοποιήθηκε 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. Τέλος, το υδρόλυμα αποστειρώθηκε με φίλτρο διαμέτρου σπών 0,2 μm (Polycap 36 AS, Fisher), ενώ όλα τα υλικά, σκεύη και

διαλύματα, αποστειρώθηκαν πριν την χρήση τους στους 120 °C για 20 min σε αυτόκαυστο. Τέλος, όλοι οι χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες, σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής.

### 2.1.3 Συνθήκες Ανάπτυξης

Οι ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν υπό μικροαερόβιες συνθήκες, διήρκησαν 15 ημέρες. Χρησιμοποιήθηκαν κωνικές φιάλες των 250 mL με ενεργό όγκο 50 mL. Ο όγκος του εμβολίου ήταν 10 % v/v και το αρχικό pH ρυθμίστηκε στο 6 με 5 M NaOH. Οι κωνικές φιάλες τοποθετήθηκαν αρχικά σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο με θερμοκρασία 30 °C και 180 rpm για 1-2 ημέρες και στη συνέχεια επικράτησαν στατικές συνθήκες.

Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης σε υπόστρωμα που περιείχε υδρόλυμα από φλούδες πορτοκαλιού (παράγραφος 2.1.2.2) πραγματοποιήθηκε σε πλαστικό δοχείο με επιφάνεια 70x30 cm<sup>2</sup>. Το εμβόλιο που χρησιμοποιήθηκε ήταν μεμβράνες βακτηριακής κυτταρίνης που παράχθηκαν σε κωνικές φιάλες όπως περιγράφεται στην προηγούμενη παράγραφο.

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 όπου ήταν απαραίτητο το yeast extract και η πεπτόνη αποστειρώθηκαν ξεχωριστά.

### 2.1.4 Παραλαβή και καθαρισμός της βακτηριακής κυτταρίνης

Η βακτηριακή κυτταρίνη που είχε την μορφή ενυδατωμένων μεμβρανών 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

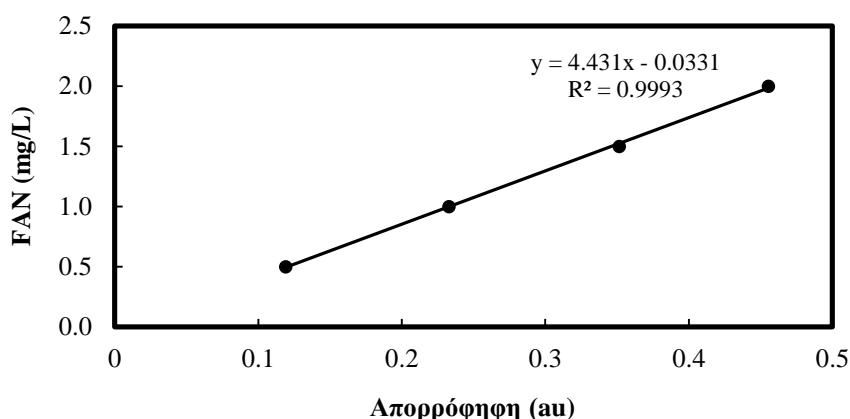
μέσω αντίστροφης ώσμωσης. Τέλος, τοποθετήθηκε σε φούρνο στους 30 °C μέχρι να επιτευχθεί σταθερό βάρος.

## 2.1.5 Εργαστηριακές αναλύσεις

Οι παράμετροι που εξετάστηκαν στα πειράματα των υγρών ζυμώσεων διαλείποντος έργου ήταν η κατανάλωση της πηγής αζώτου και των σακχάρων κατά τη διάρκεια της μικροβιακής ζύμωσης. Αυτό επιτεύχθηκε προσδιορίζοντας το άζωτο ελεύθερων αμινομάδων με τη φωτομετρική μέθοδο της νινυδρίνης και χρησιμοποιώντας την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης για ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των σακχάρων.

### 2.1.5.1 Προσδιορισμός Αζώτου των Ελεύθερων Αμινομάδων (FAN analysis)

Με τη φωτομετρική μέθοδο νινυδρίνης προσδιορίστηκε το άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων (FAN, Free Amino Nitrogen) (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, προσθήκη 2,5 mL αντιδραστηρίου αραιώσης (dilution reagent) και ανάδευση μέχρι αλλαγής χρώματος (20 sec). Τέλος, μετρήθηκε η απορρόφηση σε φασματοφωτόμετρο τύπου Hitachi U-2000 στα 570 nm. Το τυφλό δείγμα για το μηδενισμό του φασματοφωτόμετρου, περιείχε 1 mL απιονισμένο νερό αντί του αραιωμένου δείγματος. Η συγκέντρωση του δείγματος σε FAN υπολογίστηκε από την πρότυπη καμπύλη αναφοράς εκφρασμένη σε mg/L όπως φαίνεται στο διάγραμμα 3. 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 3 .



**Διάγραμμα 3:** Καμπύλη αναφοράς της γλυκίνης με τη μέθοδο FAN.

**Πίνακας 2:** Σύσταση αντιδραστηρίων για την μέτρηση FAN.

Αντιδραστήρια για τη μέτρηση FAN	Σύσταση
Colour reagent	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 49,71 g όξινο φωσφορικό δινάτριο (<math>\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}</math>), 5 g νινυδρίνη, 3 g φρουκτόζη και περίπου 60 g όξινο διφωσφορικό κάλιο (<math>\text{KH}_2\text{PO}_4</math>) διαλυμένα σε 1 L αποσταγμένο νερό.</li> <li>• pH: 6,6-6,8</li> <li>• Αποθήκευση: 4 °C</li> </ul>
Dilution reagent	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2 g ιωδικού καλίου (<math>\text{KIO}_3</math>) σε 616 mL αποσταγμένο νερό και προσθήκη 384 mL αιθανόλης (καθαρότητας 100 %).</li> </ul>
Αποθεματικό διάλυμα γλυκίνης	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,1072 g γλυκίνης σε 100 mL αποσταγμένο νερό</li> <li>• Αποθήκευση: 4 °C</li> </ul>
Πρότυπο διάλυμα γλυκίνης	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 mL διαλύματος γλυκίνης σε 100 mL αποστειρωμένο νερό</li> <li>• 2mL από το παραπάνω διάλυμα περιέχει 2mg/L FAN.</li> </ul>

### 2.1.5.2 Μέθοδος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των σακχάρων πραγματοποιήθηκε με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid

Chromatography). Όλα τα δείγματα αρχικά φυγοκεντρήθηκαν και στην συνέχεια φιλτραρίστηκαν μέσω φίλτρων whatman με μεμβράνη διαμέτρου οπών 0,2 μm. Ο απαιτούμενος όγκος κάθε ένεσης ήταν 20 μL.

**Πίνακας 3:** Χαρακτηριστικά υγρού χρωματογράφου.

Όργανο	Waters 600E
Στήλη (στατική φάση)	Aminex HPX-87H (Bio-rad, Richmond, USA) (30 cm x 7,8 mL)
Κινητή φάση	5 mM H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> σε απιονισμένο, απεσταγμένο και φιλτραρισμένο νερό
Ανιχνευτής	RI (410 Waters)
Ροή διαλυτών (κινητής φάσης)	0,6 mL/min
Όγκος ένεσης	50μl

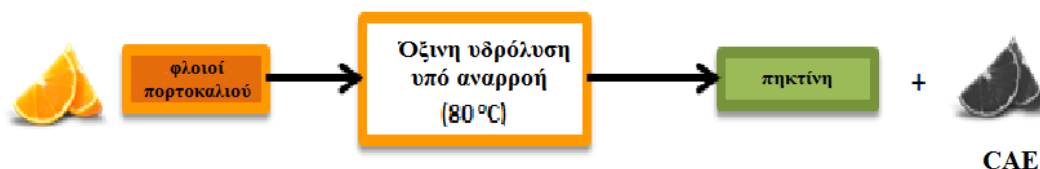
## 2.2 Μέθοδοι καθαρισμού λιγνοκυτταρινούχου κλάσματος από φλοιούς πορτοκαλιού

Αρχικά, οι φλούδες πορτοκαλιών αλέστηκαν χρησιμοποιώντας τη συσκευή Retsch™ Knife Mill Grindomix GM300 ώστε να μειωθεί το μέγεθος των σωματιδίων (< 5 mm). Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές μέθοδοι για την εκχύλιση πολύτιμων συστατικών από τους φλοιούς πορτοκαλιών. Στο τέλος κάθε διεργασίας, το στερεό υπόλειμμα που προέκυπτε αποτελούταν κυρίως από κυτταρίνη και σε μικρότερα ποσοστά ημικυτταρίνη και λιγνίνη.

### 2.2.1 Συμβατική όξινη εκχύλιση πηκτίνης

Περίπου 80 g αλεσμένων φλοιών πορτοκαλιών προστέθηκαν σε 250 mL απιονισμένο νερό και το pH ρυθμίστηκε στο 1,5 χρησιμοποιώντας HCl 0,5 M. Το

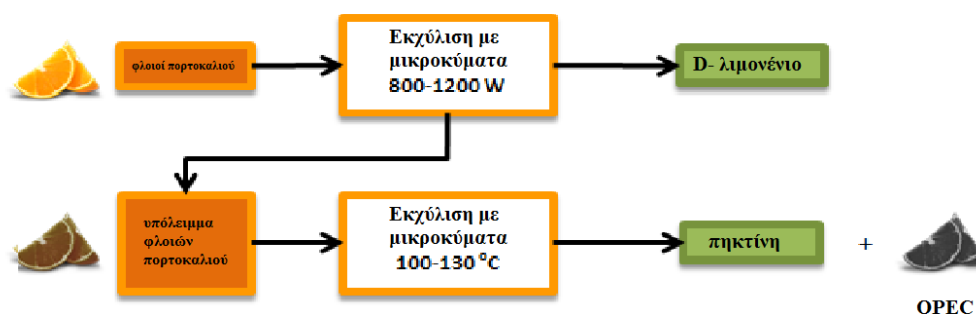
μίγμα θερμάνθηκε υπο αναρροή στους 80-90 °C για μία ώρα και στη συνέχεια διαχωρίστηκε η υγρή φάση που περιείχε πηκτίνη από την κυτταρινούχα μάζα, με διήθηση υπό κενό. Το στερεό υπόλειμμα συλλέχθηκε, ξηράνθηκε για 1 ημέρα στους 30 °C, ζυγίστηκε και ονομάστηκε ως CAE για μετέπειτα ανάλυση.



**Διάγραμμα 4:** Διάγραμμα συμβατική όξινη εκχύλιση πηκτίνης.

### 2.2.2 Διεργασία OPEC

Αυτή η διεργασία περιελάμβανε δύο στάδια. Το πρώτο στάδιο ήταν η εκχύλιση d-λιμονένιου με χρήση αντιδραστήρα μικροκυμάτων τύπου Milestone ROTOSYNTH σε ανοιχτό δοχείο, χωρίς τη χρήση διαλύτη. Το δεύτερο στάδιο ήταν η εκχύλιση πηκτίνης χρησιμοποιώντας αντιδραστήρα μικροκυμάτων τύπου CEM MARS 6. Το υπόλειμμα φλούδων πορτοκαλιού μετά την εκχύλιση d-λιμονένιου και πηκτίνης αποθηκεύτηκε και ονομάστηκε ως OPEC για μετέπειτα ανάλυση.



**Διάγραμμα 5:** Διάγραμμα μεθοδολογίας OPEC.



### 2.2.2.1 Εκχύλιση D-λιμονένιου

Περίπου 150 g φλοιών πορτοκαλιού προστέθηκαν σε σκεύος 2 L Pyrex<sup>®</sup>. Για τα πρώτα 6min η ισχύς του αντιδραστήρα μικροκυμάτων ρυθμίστηκε στα 1200W και στη συνέχεια στα 800 W για 19 min. Το βάρος του υπολείμματος στο τέλος της διεργασίας ήταν περίπου 34 % του αρχικού.



**Εικόνα 6:** Εξοπλισμός Milestone ROTOSYNTH που περιέχει αλεσμένες φλούδες πορτοκαλιού για εκχύλιση D-λιμονένιου (αριστερά) και σκεύος 2 L Pyrex<sup>®</sup> (δεξιά).

### 2.2.2.2 Εκχύλιση πηκτίνης

Η εκχύλιση πηκτίνης πραγματοποιήθηκε σε αντιδραστήρα μικροκυμάτων τύπου CEM MARS 6, One Touch<sup>™</sup> Technology, χρησιμοποιώντας κλειστά δοχεία EasyPrep<sup>™</sup> Plus Easy Prep Teflon των 100 mL. Σε κάθε εκτέλεση χρησιμοποιήθηκαν 6 δοχεία πληρωμένα με 4 g δείγματος και 70 mL απιονισμένο νερό. Ο εξοπλισμός χρησιμοποιήθηκε σε δυναμική λειτουργία, υψηλή ανάδευση, για 15min σε θερμοκρασία 120 °C. Με το πέρας της εκχύλισης, το μίγμα φιλτραρίστηκε υπό κενό. Το στερεό υπόλειμμα συλλέχθηκε, ξηράνθηκε για 1 ημέρα στους 30 °C και ζυγίστηκε.



**Εικόνα 7:** Εξοπλισμός CEM MARS 6 (αριστερά) και δοχείο δείγματος control (δεξιά).

## 2.3 Χαρακτηρισμός δειγμάτων και εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε

Μια σειρά αναλυτικών τεχνικών χρησιμοποιήθηκαν για τον χαρακτηρισμό των παραγόμενων, διαφορετικών τύπων, δειγμάτων κυτταρίνης. Πιο συγκεκριμένα δείγματα βακτηριακής κυτταρίνης που παράχθηκαν σε διαφορετικό χρόνο ζύμωσης (2, 5 και 8 ημέρες ζύμωσης) χρησιμοποιώντας υδρόλυμα φλοιών πορτοκαλιού, συγκρίθηκαν με δείγματα φυτικής κυτταρίνης από φλοιούς πορτοκαλιού απ'τους οποίους προηγουμένως εκχυλίστηκαν διάφορα συστατικά χρησιμοποιώντας τις μεθόδους που περιγράφονται στις παραγράφους 2.2.1 και 2.2.2. Για την παραγωγή αυτών των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε πλαστικό δοχείο επιφάνειας  $70 \times 30 \text{cm}^2$  στο οποίο προστέθηκαν το θρεπτικό μέσο και το εμβόλιο. Η μικροβιακή ζύμωση πραγματοποιήθηκε υπό στατικές συνθήκες στους  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . Τα δείγματα αναλύθηκαν ως προς την καθαρότητα, την ικανότητα συγκράτησης νερού, τον βαθμό πολυμερισμού, τον δείκτη κρυσταλλικότητας και τέλος, την μικροσκοπική μορφολογία τους.

### 2.3.1 Υπέρυθρη φασματοσκοπία (ATR-IR)

Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε φασματόμετρο τύπου Bruker Vertex 70. Εμπορική μικροκρυσταλλική κυτταρίνη χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο. Τα φάσματα

ελήφθησαν στο εύρος 3600 έως 600  $\text{cm}^{-1}$ , με 16 σαρώσεις και φασματική ανάλυση 4  $\text{cm}^{-1}$ .

### 2.3.2 Θερμοσταθμική ανάλυση (TGA)

Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε όργανο τύπου NETZSCH STA 409. Περίπου 50 mg δείγματος ζυγίστηκαν με ακρίβεια σε ειδικό δοχείο και θερμάνθηκαν υπό τη ροή αζώτου (50 m/min) για να αποτραπεί οξείδωση του δείγματος. Η μεταβολή της θερμοκρασίας έγινε με ρυθμό 10 K/min ξεκινώντας από θερμοκρασία δωματίου έως 700 °C.

### 2.3.3 Φασματοσκοπία μαγνητικού πυρηνικού συντονισμού στερεής κατάστασης ( $^{13}\text{C}$ Solid state NMR)

Τα φάσμα  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  σταυροπόλωσης με περιστροφή δείγματος υπό μαγική γωνία (CP/MAS-Cross-Polarization Magic Angle Spinning) ελήφθησαν χρησιμοποιώντας φασματόμετρο τύπου 400 MHz Bruker Avance III HD εξοπλισμένο με Bruker 4 mm H(F)/X/Y ανιχνευτή τριπλού συντονισμού και 9,4 T Ascend<sup>®</sup> υπεραγωγίμο μαγνήτη. Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων CP χρησιμοποιήθηκε 1 ms ηλεκτρομαγνητικός παλμός γραμμικά στοιχισμένος, συχνότητας συντονισμού 12000 Hz, καθυστερήσεις ανακύκλωσης 5 sec και ετεροπυρηνικές συζεύξεις με συχνότητα 85 kHz. Οι χημικές μετατοπίσεις καταγράφηκαν αναφορικά με TMS και ποσότητα 29,5 ppm αδαμαντάνης χρησιμοποιήθηκε ως εξωτερική δευτερεύουσα αναφορά.

### 2.3.4 Περιθλασιμετρία ακτίνων-X (XRD)

Διαθλασίμετρο σκόνης τύπου Bruker D8 εξοπλισμένο με πηγή Cu source και ανιχνευτή PSD Lynxeye χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση XRD. Τα δείγματα αναλύθηκαν υπό γωνία  $2\theta$  5-90 και γωνία  $\theta$  2,5 έως 45 μοιρών για περίπου 8 λεπτά

και 38 δευτερόλεπτα με κάθε βήμα να καταγράφεται σε διαστήματα 0,1 s. Η τάση και η ισχύς της γεννήτριας ρυθμίστηκαν στα 40 kV και 40 mA αντίστοιχα.

### 2.3.5 Βαθμός πολυμερισμού

Ακριβώς 0,2500g δείγματος ζυγίστηκαν και διαλύθηκαν σε 50mL διαλύτη Copper(II)-ethylenediamine (CED) 0.5M. Το σχετικό ιξώδες ( $\eta_r$ ) και το ειδικό ιξώδες ( $\eta_{sp}$ ) κάθε διαλύματος μετρήθηκαν χρησιμοποιώντας ιξωδόμετρο τύπου Cannon-Fenske Routine Viscometer που βρισκόταν βυθισμένο σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 25 °C και στη συνέχεια υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τις παρακάτω εξισώσεις:

$$\eta_r = \frac{t}{t_0} \quad (1)$$

$$\eta_{sp} = \eta_r - 1 \quad (2)$$

Όπου  $t_0$  είναι ο χρόνος εκκροής του διαλύτη και  $t$  ο χρόνος εκκροής του διαλύματος. Το εγγενές ιξώδες ( $\eta$ ) υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας την παρακάτω εξίσωση:

$$\eta = \frac{\sqrt{2(\eta_{sp} - \ln \eta_r)}}{c} \quad (3)$$

Όπου  $c = 0,5$  g/dL.

Το μέσο μοριακό βάρος ( $M$ ) υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας την παρακάτω εξίσωση:

$$\eta = K \cdot M^\alpha \quad (4)$$

Όπου  $\alpha = 0,905$  και  $K = 1,33 \cdot 10^{-4}$  dL/g. Οι τιμές των παραμέτρων Mark-Houwink  $\alpha$  και  $K$  για το συγκεκριμένο σύστημα πολυμερούς-διαλύτη λήφθηκαν από το Polymer Data Handbook (1999). Τελικά ο βαθμός πολυμερισμού (DP) υπολογίστηκε ως ο

λόγος του μέσου μοριακού βάρους (M) προς το μοριακό βάρος της μονομερούς μονάδας άνυδρης γλυκόζης:

$$DP = \frac{M}{162} \quad (5)$$

### 2.3.6 Δείκτης κρυσταλλικότητας (Crystallinity Index)

Ο δείκτης κρυσταλλικότητας των δειγμάτων υπολογίστηκε μέσω 3 διαφορετικών αναλυτικών μεθόδων:

- ATR-IR

Ο δείκτης κρυσταλλικότητας υπολογίστηκε ως ο λόγος των εντάσεων των απορροφήσεων στα 1427 and 895  $\text{cm}^{-1}$ , που αντιστοιχούν στην δόνηση κάμψης της ομάδας  $\text{CH}_2$  και στην παραμόρφωση του CH αντίστοιχα.

- Solid-state  $^{13}\text{C}$  NMR

Ο δείκτης κρυσταλλικότητας καθορίστηκε με διαχωρισμό της περιοχής C4 του φάσματος κυτταρίνης σε κρυσταλλική και άμορφη περιοχή και υπολογίστηκε ως ο λόγος της κρυσταλλικής περιοχής (87 έως 93ppm ) προς την συνολική επιφάνεια της κορυφής C4 (80 έως 93 ppm ) επί τις %.

- XRD

Η κρυσταλλικότητα (%) των δειγμάτων υπολογίστηκε από τον λόγο των εντάσεων της κορυφής που αντιστοιχεί στην κρυσταλλική μορφή προς την συνολική ένταση της κορυφής χρησιμοποιώντας την παρακάτω εξίσωση:

$$C = 100 \cdot \frac{I_{200} - I_{non-cr}}{I_{200}} [\%] \quad (6)$$

Όπου  $I_{200}$  είναι η μέγιστη ένταση του πλέγματος περίθλασης και  $I_{non-cr}$  η ένταση του σήματος που αντιστοιχεί στην άμορφη περιοχή.

### 2.3.7 Ικανότητα συγκράτησης νερού (Water Holding Capacity)

Περίπου 0,25 g ξηρού δείγματος προστέθηκαν σε 25 mL απιονισμένο νερό, αναδεύτηκαν και αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 1 h. Ακολούθησε φυγοκέντρωση σε 3000 rpm για 20 min και τα ενυδατωμένα δείγματα ζυγίστηκαν.

Η ικανότητα συγκράτησης νερού υπολογίστηκε από τον ακόλουθη εξίσωση:

$$\text{WHC} = \frac{g \text{ νερού}}{g \text{ ξηρού δείγματος}} \quad (7)$$

### 2.3.8 Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (Scanning Electron Microscopy)

Η επιφάνεια και η μορφολογία του δειγμάτων μελετήθηκαν σε εξοπλισμό τύπου JEOL JSM-6490 (U.S.). Τα δείγματα αφού επικαλύφθηκαν με χρυσό, εξετάστηκαν με επιταχυνόμενη τάση 5 kV και μεγέθυνση 7 k και 15 k.

## 2.4 Ζυμαρικά με βακτηριακή κυτταρίνη

Φρέσκα ζυμαρικά χωρίς γλουτένη που περιείχαν διάφορα ποσοστά βακτηριακής κυτταρίνης παρασκευάστηκαν και αξιολογήθηκαν ως προς τις ρεολογικές και μηχανικές τους ιδιότητες. Η παρασκευή επιτυχημένων σκευασμάτων ελεύθερων γλουτένης αποτελεί πρόκληση για την βιομηχανία τροφίμων, γιατί μέχρι στιγμής τα προϊόντα χαρακτηρίζονται από φτωχή γεύση, εύθρυπτη υφή, μειωμένη διάρκεια ζωής και χαμηλή διατροφική αξία επειδή έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε άμυλο.

### 2.4.1 Παρασκευή φρέσκων ζυμαρικών χωρίς γλουτένη

Τα συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή της ζύμης ήταν: ρυζάλευρο (48,8 – 49,6 %), άμυλο (12,2 – 12,4 %), αυγό (37 %), αλάτι (1 %) και BC (0,1 – 1 %). Οι αναλογίες των υλικών επιλέχθηκαν με βάση τη βιβλιογραφία (Largosa *et al.*, 2013, Sabbatini *et al.*, 2014). Συνολικά παρασκευάστηκαν 6 δείγματα που διαχωρίζονται σε 2 κατηγορίες. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν τα δείγματα στα οποία η BC προστέθηκε ξηρή σε μορφή σκόνης ενώ στην δεύτερη κατηγορία αυτά που η ξηρή σκόνη BC προ-ενυδατώθηκε για 24 ώρες στο αυγό το οποίο αποτελούσε το μοναδικό υγρό συστατικό. Και για τις δύο κατηγορίες παρασκευάστηκαν δείγματα με 0,1 %, 0,5 % και 1 % (επί του παρασκευάσματος) BC καθώς και ένα δείγμα control, χωρίς βακτηριακή κυτταρίνη, για λόγους σύγκρισης. Μετά την ανάμιξη των υλικών, χρησιμοποιήθηκε παρασκευαστής ζυμαρικών οικιακής χρήσης για τον σχηματισμό του τελικού προϊόντος.

### 2.4.2 Στατιστική επεξεργασία

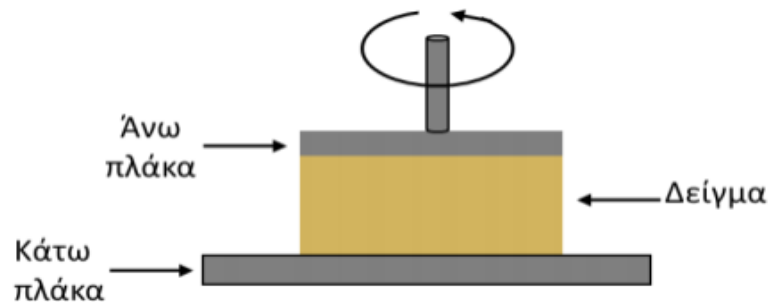
Για την επεξεργασία των πειραματικών αποτελεσμάτων εφαρμόστηκαν στατιστικά εργαλεία παραμετρικής ανάλυσης (ANOVA), με σκοπό να ελεγχθεί η σημαντικότητα της επίδρασης των σχεδιαστικών παραμέτρων, δηλαδή της περιεκτικότητας των παρασκευασμάτων σε βακτηριακή κυτταρίνη και της προενυδάτωσης της ξηρής βακτηριακής κυτταρίνης. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε μέσω του προγράμματος Statgraphics Statistical Graphics System, Centurion XV.II (Statgraphics, Rockville, Md., USA). Τα δεδομένα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας ανάλυση διακύμανσης διπλής κατεύθυνσης (two-way ANOVA) με διάστημα εμπιστοσύνης 95 % ώστε να αξιολογηθεί αν οι ανεξάρτητες μεταβλητές διαφέρουν στατιστικά σημαντικά. Στις περιπτώσεις όπου παρατηρήθηκαν σημαντικές επιδράσεις των σχεδιαστικών παραμέτρων εφαρμόστηκε το κριτήριο Fisher's LSD για τον έλεγχο των διαφορών των μέσων όρων των ιδιοτήτων. Οι στατιστικά σημαντικές σημειώνονται για  $p\text{-value} < 0,05$ .

### 2.4.3 Χαρακτηρισμός δειγμάτων

Τα δείγματα αξιολογήθηκαν ως προς τις ρεολογικές τους ιδιότητες αλλά και ως προς την ποιότητα μαγειρέματος.

#### 2.4.3.1 Ρεολογικά χαρακτηριστικά ζύμης

Οι ρεολογικές ιδιότητες της ζύμης χωρίς γλουτένη που προορίζεται για παρασκευή ζυμαρικών, μελετήθηκαν με τη χρήση περιστροφικού ρεόμετρου (DHR3, TA Instruments, Η.Π.Α), γεωμετρία παράλληλων πλακών και κενό 1 mm σε θερμοκρασία 25 °C. Το δείγμα τοποθετήθηκε μεταξύ των πλακών και αφέθηκε για 2 min, ώστε να χαλαρώσουν οι εναπομείνουσες τάσεις από την μηχανική καταπόνηση της ζύμης κατά το στάδιο της ανάμιξης. Τα τεστ που πραγματοποιήθηκαν αφορούν το δυναμικό ταλαντωτικό πείραμα με εύρος συχνοτήτων από 0,01 έως 10 Hz σε 0,1 % παραμόρφωση και μέτρηση ιξώδους ως συνάρτηση του ρυθμού διάτμησης με εύρος 0,1-100 s<sup>-1</sup>. Επιπλέον προσδιορίστηκαν ο ελαστικός (G') και ο ιξώδης (G'') χαρακτήρας του ζυμαριού.



**Εικόνα 8:** Γραφική αναπαράσταση γεωμετρίας παράλληλων πλακών.

#### 2.4.3.2 Θερμορεολογικές ιδιότητες δειγμάτων

Οι θερμορεολογικές ιδιότητες προσδιορίστηκαν με χρήση ρεόμετρου (DHR3, TA Instruments, Η.Π.Α), με γεωμετρία μέτρησης θερμορεολογικών ιδιοτήτων (Starch Pasting Cell). Η γεωμετρία μέτρησης των ιδιοτήτων pasting των αλεύρων αποτελείται



από ένα έμβολο περωτής και ένα κυλινδρικό δοχείο (3,6 cm πλάτος και 6,4 cm ύψος). Το έμβολο είναι σχεδιασμένο να εφαρμόζει πλήρως στο δοχείο αποτρέποντας την απώλεια θερμότητας. Η θέρμανση του δείγματος γίνεται μέσω ηλεκτρικού κυκλώματος, το οποίο περιβάλλει το δοχείο, ενώ η ψύξη, μέσω κυκλοφορίας νερού.



**Εικόνα 9:** Γεωμετρία μέτρησης θερμορρολογικών ιδιοτήτων – Starch Pasting Cell.

Ένα μέρος των διαφορετικών δειγμάτων που παρασκευάστηκαν, ξηράνθηκαν για 1 ημέρα στους 60 °C και αλέστηκαν σε μορφή σκόνης. Στο κυλινδρικό δοχείο αναμίχθηκαν 2 g δείγματος με 18 mL νερό σε θερμοκρασία 30 °C. Αρχικά, έγινε έντονη ανάδευση του δείγματος ( $100 \text{ s}^{-1}$ ) για 10 s και στη συνέχεια ο ρυθμός διάτμησης ρυθμίστηκε στα  $10 \text{ s}^{-1}$  μέχρι το τέλος του πειράματος. Το δείγμα θερμάνθηκε από τους 30 °C έως τους 95 °C με ρυθμό  $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ . Τέλος, καταγράφηκαν τα δεδομένα του ιξώδους ως προς τον χρόνο και υπολογίστηκαν οι παράμετροι της θερμοκρασίας σχηματισμού πάστας (pasting temperature), το μέγιστο ιξώδες (PV), το ιξώδες θερμής πάστας (HPV-ιξώδες στο τέλος της ισοθερμοκρασιακής περιόδου θέρμανσης των 95 °C), το τελικό ιξώδες (FV) και ο σχετικός δείκτης αναδιάταξης του αμύλου (FV-HPV/HPV). Κάθε δοκιμή διεξήχθη εις διπλούν.

### 2.4.3.3 Ανάλυση υφής

Για την αξιολόγηση της σκληρότητας των δειγμάτων τέσσερα δείγματα, βρασμένα στον βέλτιστο χρόνο, τοποθετήθηκαν το ένα δίπλα στο άλλο κεντρικά

κάτω από την πλάκα συμπίεσης του ρεόμετρου (DHR3, TA Instruments, Η.Π.Α), χρησιμοποιώντας γεωμετρία παράλληλων πλακών. Το βάθος συμπίεσης αντιστοιχούσε στο 40 % του πάχους του δείγματος και η αξονική δύναμη δεν υπερέβη τα 60 N. Η δοκιμή αποτελεί προσομοίωση της δράσης της γνάθου κατά το δάγκωμα του τροφίμου. Κάθε δοκιμή διεξήχθη εις διπλούν.

#### **2.4.3.4 Βέλτιστος χρόνος βρασμού**

Σε ποτήρι ζέσεως των 500 mL θερμάνθηκαν μέχρι βρασμού 300 mL νερού και στην συνέχεια προστέθηκαν περίπου 25 g ζυμαρικών, χωρίς προσθήκη άλατος και χωρίς να σταματήσει ο βρασμός. Κάθε 30 s, απομακρυνόταν ένα δείγμα και πιεζόταν μεταξύ δύο πλακών. Ο χρόνος στον οποίο δεν ήταν πλέον ορατός ένας λευκός πυρήνας, ήταν ο βέλτιστος χρόνος βρασμού. Όλες οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

#### **2.4.3.5 Απώλειες κατά το βρασμό**

Κατά τη διάρκεια του βρασμού των δειγμάτων, ορισμένα μέρη των ζυμαρικών διαλύονταν στο νερό. Όσο καλύτερο είναι το πρωτεϊνικό δίκτυο που έχει αναπτυχθεί, τόσο μικρότερη είναι αυτή η απώλεια. Σε δοκιμαστικούς σωλήνες πληρωμένους με 9 mL νερό, προστέθηκε δείγμα βάρους 10 g και ακολούθησε βρασμός σε υδατόλουτρο στους 100 °C στον βέλτιστο χρόνο βρασμού κάθε δείγματος (αφού είχε προηγηθεί η διαδικασία (2.4.3.2)). Ακολούθησε ξήρανση στους 105 °C για 24 h και τα δείγματα ξαναζυγίστηκαν. Οι απώλειες κατά το βρασμό προσδιορίστηκαν βαρομετρικά και κάθε δοκιμή πραγματοποιήθηκε τέσσερις φορές.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

#### 3.1 Αξιολόγηση υποστρωμάτων προς παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης

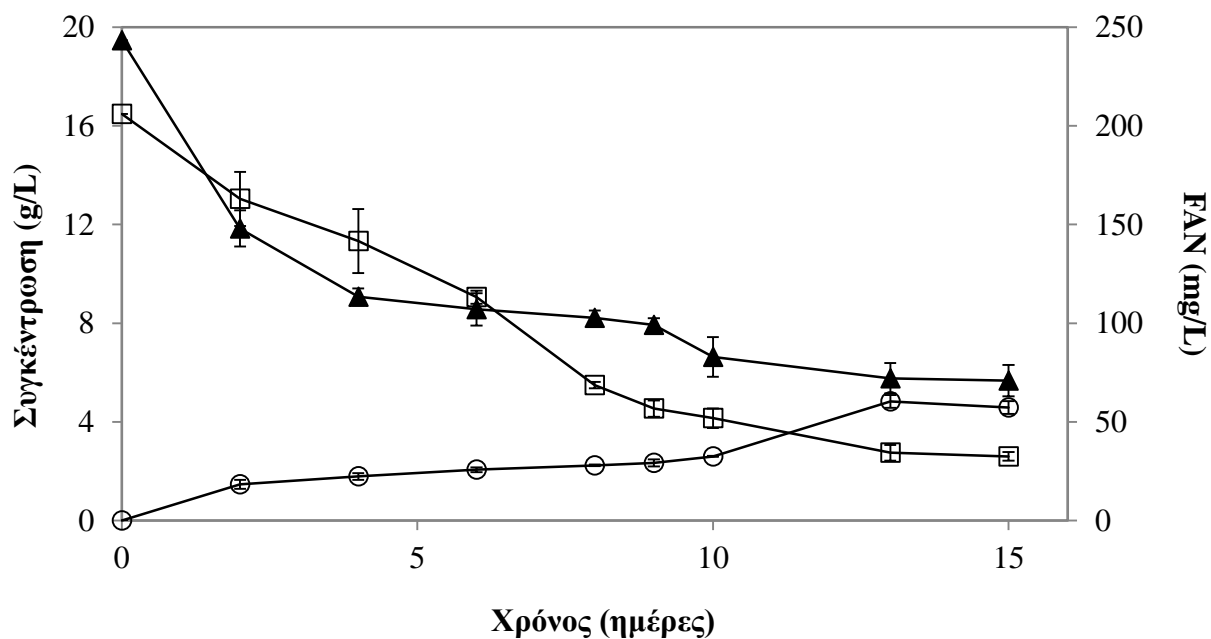
Πρωταρχικός στόχος της παρούσας πειραματικής μελέτης ήταν η παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης από ανανεώσιμες πρώτες ύλες και ο καθορισμός του πιο αποδοτικού υποστρώματος προς παραγωγή του πολυμερούς. Οι ζυμώσεις διαλείποντος έργου που πραγματοποιήθηκαν με το βακτηριακό στέλεχος *Komagateibacter sucrofermentans* DSM 15973, διήρκησαν 15 ημέρες και μελετήθηκε η παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης και η κατανάλωση των πηγών αζώτου και άνθρακα κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.

Στις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν, οι ποσότητες των συστατικών στο μέσο καλλιέργειας διατηρήθηκαν ίδια με αυτή του μέσου καλλιέργειας Hestrin-Schramm (HS-γλυκόζη) με μόνη διαφοροποίηση την αντικατάσταση της πηγής άνθρακα ή/και αζώτου.

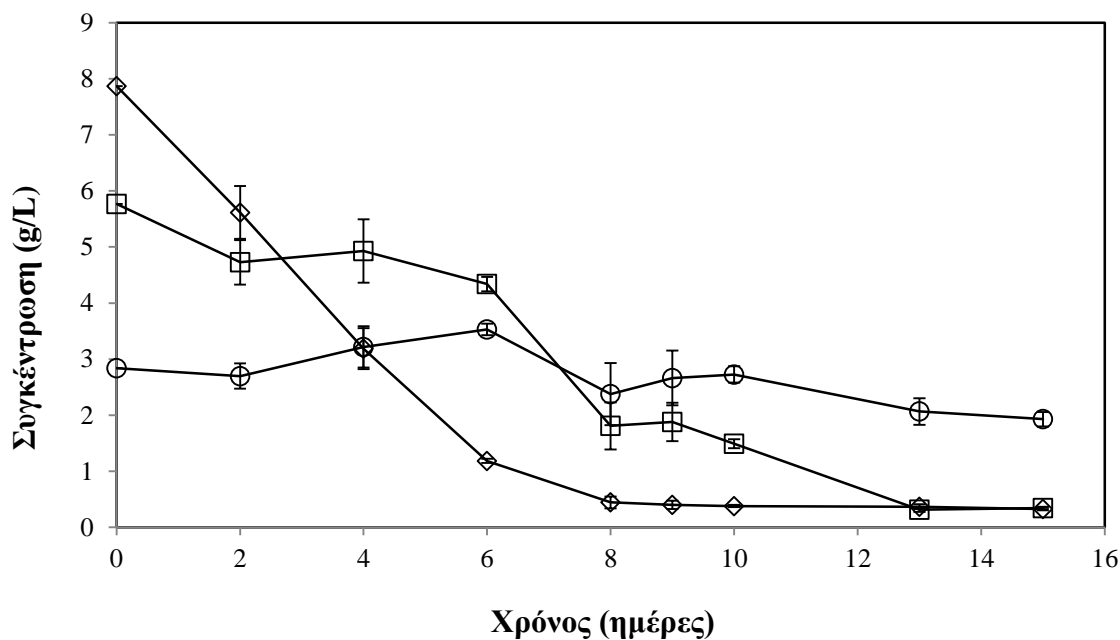
##### 3.1.1 Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης σε υπόστρωμα ζύμωσης συνθετικής σακχαρόζης

Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις σε υπόστρωμα συνθετικής σακχαρόζης προς παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης. Το διάγραμμα 6 απεικονίζει το προφίλ της ζύμωσης που διήρκησε 15 ημέρες ως προς την κατανάλωση σακχάρων, αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN) και την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης από το *Komagateibacter sucrofermentans*. Η συγκέντρωση της βακτηριακής κυτταρίνης που επιτεύχθηκε ήταν 4,58 g/L με απόδοση 0,35 g/g. Η παραγωγικότητα της ζύμωσης ήταν 0,37 g/L/d. Σύμφωνα με το Διάγραμμα 6, η 13<sup>η</sup> ημέρα ζύμωσης μπορεί να θεωρηθεί και ως η τελευταία ημέρα της ζύμωσης διότι η παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης ήταν η μέγιστη (4,83 g/L) με ελαφρώς πτωτική τάση μέχρι την 15<sup>η</sup> ημέρα και επιπλέον το βακτηριακό στέλεχος σταμάτησε να μεταβολίζει την

διαθέσιμη πηγή άνθρακα μετά την 13<sup>η</sup> ημέρα ζύμωσης. Η κατανάλωση των σακχάρων και FAN σε αυτό το χρονικό διάστημα ήταν ομαλή με ρυθμούς κατανάλωσης 1,06 g/L/d και 13,17 g/L/d, αντίστοιχα.



**Διάγραμμα 6:** Παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης (○), κατανάλωση της πηγής άνθρακα-συνθετική σακχαρόζη (□) και κατανάλωση αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (▲) κατά τη διάρκεια (15 ημέρες) καλλιέργειας του μικροοργανισμού σε συνθετικό υπόστρωμα ζύμωσης.



**Διάγραμμα 7:** Διάγραμμα κατανάλωσης σακχάρων: σακχαρόζη (◇), γλυκόζη (□) και φρουκτόζη (○) στο συνθετικό υπόστρωμα ζύμωσης κατά τη διάρκεια 15 ημερών της μικροβιακής ζύμωσης.

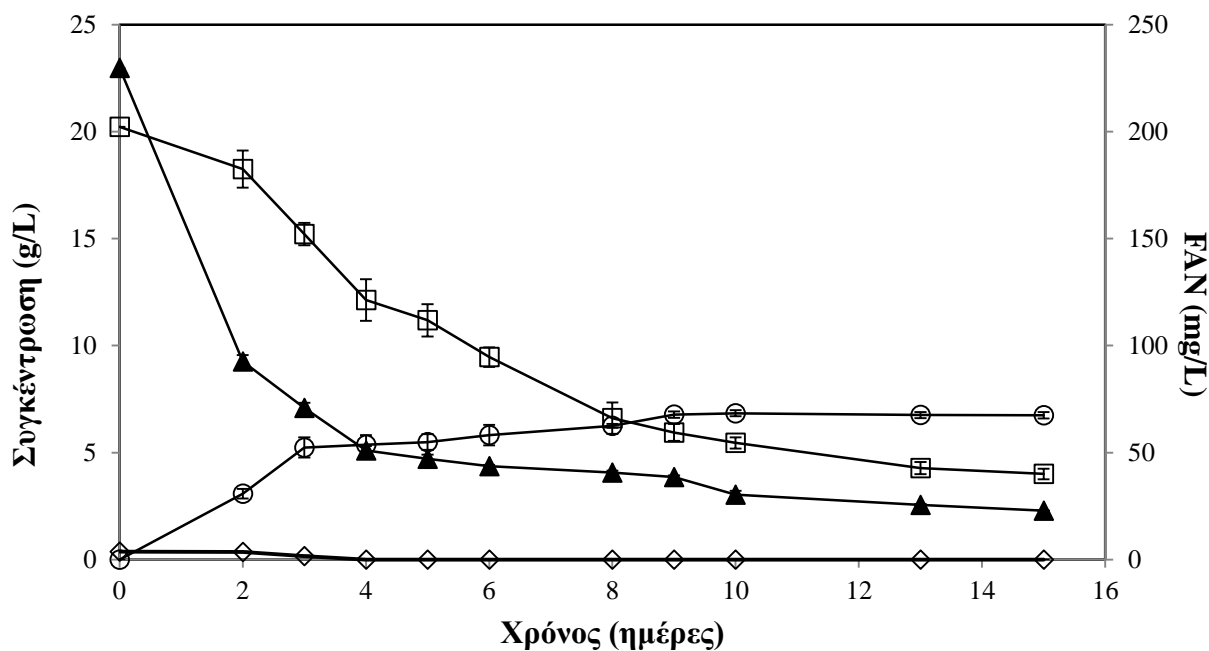
Σύμφωνα με το διάγραμμα 7 στο οποίο απεικονίζεται η κατανάλωση της συνθετικής σακχαρόζης και των μονομερών της (γλυκόζη και φρουκτόζη) παρατηρείται ότι μέχρι την 6<sup>η</sup> ημέρα ζύμωσης καταναλώθηκαν περίπου 6,7 g/L σακχαρόζης. Όσον αφορά τους δύο μονοσακχαρίτες, γλυκόζη και φρουκτόζη, η γλυκόζη καταναλώθηκε πιο γρήγορα σε αντίθεση με την φρουκτόζη η οποία μεταβολίστηκε λιγότερο από τον μικροοργανισμό. Αυτό το αποτέλεσμα συμβαδίζει με την μελέτη των Sherif *et al.*, (2005), οι οποίοι έδειξαν ότι η γλυκόζη που χρησιμοποιήθηκε στο μέσο ζύμωσης προς παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης καταναλώθηκε κατά 94,7 % ενώ η φρουκτόζη καταναλώθηκε σε ποσοστό μικρότερο του 50%.

### 3.1.2 Υπόστρωμα με υδρόλυμα από φλούδες πορτοκαλιού

Σε αυτό το στάδιο της παρούσας έρευνας αξιολογήθηκε η παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης σε υπόστρωμα που περιείχε ως πηγή άνθρακα υδρόλυμα από φλοιούς πορτοκαλιού.

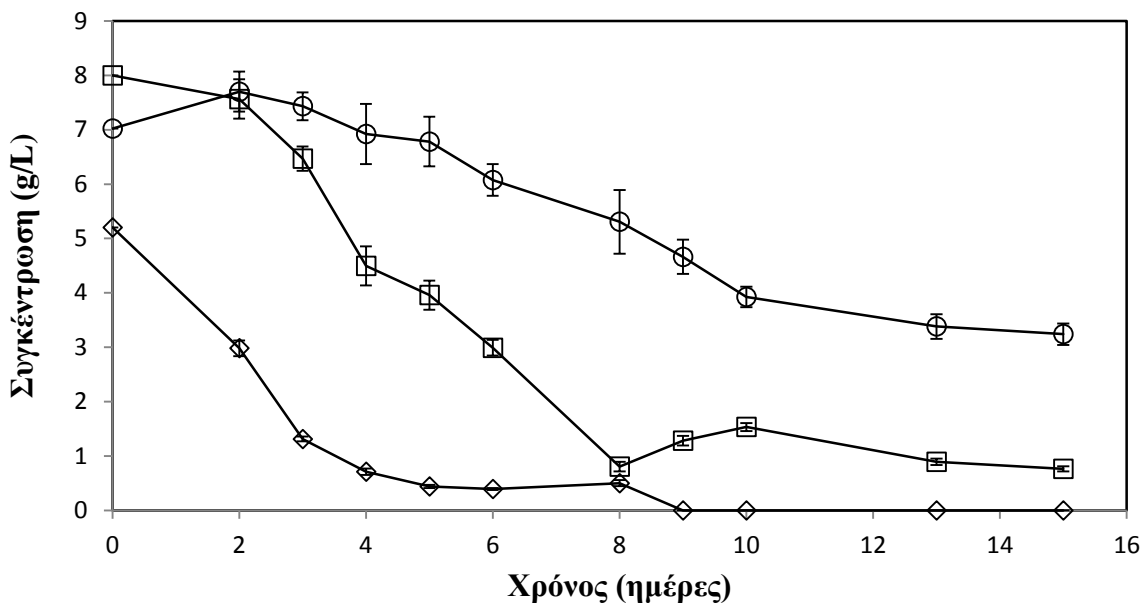
Το διάγραμμα 8 παρουσιάζει το προφίλ της ζύμωσης ως προς την κατανάλωση σακχάρων, αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN) και την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης από το *Komagateibacter sucrofermentans*. Η συνολική ποσότητα των σακχάρων που καταναλώθηκε από το μικροβιακό στέλεχος ήταν 16,22 g/L και παρήχθησαν 6,74 g/L βακτηριακής κυτταρίνης με απόδοση 0,46 g/g. Η παραγωγικότητα της ζύμωσης ήταν 0,68 g/L/d. Σύμφωνα με το Διάγραμμα 8, η 10<sup>η</sup> ημέρα ζύμωσης μπορεί να θεωρηθεί και ως η τελευταία ημέρα της ζύμωσης διότι η παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης ήταν η μέγιστη (6,84 g/L) με ελαφρώς πτωτική τάση μέχρι την 15<sup>η</sup> ημέρα και επιπλέον το βακτηριακό στέλεχος σταμάτησε να μεταβολίζει την διαθέσιμη πηγή άνθρακα μετά την 10<sup>η</sup> ημέρα ζύμωσης αφήνοντας διαθέσιμα περίπου 5 g/L σακχάρου. Τις τρεις πρώτες ημέρες το άζωτο του θρεπτικού υποστρώματος ζύμωσης καταναλώθηκε με ρυθμό 52,93 mg/L/d πιθανότατα λόγω στροφής του μεταβολισμού προς παραγωγή βιομάζας, ενώ στη συνέχεια ο ρυθμός κατανάλωσης μειώθηκε (3,44 mg/L/d).

Σε παρόμοια μελέτη των Kurosumi *et al.*, (2009) όταν στο μέσο ζύμωσης χρησιμοποιήθηκε σακχαρωμένο διάλυμα από φλοιούς πορτοκαλιού με ποσοστό γλυκόζης 20,7 %, η παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης έφτασε τα 0,13 g. Αρκετά υψηλότερη ήταν η ποσότητα κυτταρίνης που παράχθηκε σε θρεπτικό μέσο που περιείχε χυμό πορτοκαλιού (0,48 g) ενώ αμεληταία μπορεί να θεωρηθεί η ποσότητα του πολυμερούς (0,04 g) που παράχθηκε από σακχαρωμένο διάλυμα πούλπας πορτοκαλιού μετά την εξαγωγή του χυμού (ποσοστό γλυκόζης 16,5 %).



**Διάγραμμα 8:** Παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης (○), κατανάλωση της πηγής άνθρακα-υδρόλυμα φλοιών πορτοκαλιού (□) κατανάλωση αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (▲) και κατανάλωση οξικού οξέος (◇) κατά τη διάρκεια (15 ημέρες) καλλιέργειας του μικροοργανισμού σε υπόστρωμα ζύμωσης που περιέχει υδρόλυμα από φλοιούς πορτοκαλιού.

Αξιοσημείωτη είναι η ύπαρξη οξικού οξέος στο υπόστρωμα ζύμωσης που περιεχόταν στο υδρόλυμα από τις φλούδες πορτοκαλιού. Όπως φαίνεται στο παραπάνω διάγραμμα η μικρή ποσότητα οξικού οξέος καταναλώθηκε κατά τις τρεις πρώτες ημέρες ζύμωσης όπου και η παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης ήταν έντονη. Σύμφωνα με τους Toda *et al.*, (1997) η προσθήκη οργανικών οξέων και ιδιαίτερα οξικού οξέος οδηγεί σε υψηλότερη απόδοση παραγωγής κυτταρίνης.



**Διάγραμμα 9:** Διάγραμμα κατανάλωσης των σακχάρων: σακχαρόζη (◇), γλυκόζη (□) και φρουκτόζη (○) στο υπόστρωμα ζύμωσης που περιέχει υδρόλυμα από φλούδες πορτοκαλιού κατά τη διάρκεια της μικροβιακής ζύμωσης.

Το υδρόλυμα από φλούδες πορτοκαλιού, αρχικά, περιείχε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις γλυκόζης και φρουκτόζης (8 g/L και 7,02 g/L αντίστοιχα). Την 2<sup>η</sup> ημέρα ζύμωσης παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης φρουκτόζης λόγω διάσπασης της σακχαρόζης η οποία όμως στην συνέχεια δεν μεταβολίστηκε ικανοποιητικά από τα βακτηριακά κύτταρα συγκριτικά με τα υπόλοιπα σάκχαρα και τελικά παρέμεινε σε μεγαλύτερη συγκέντρωση (3,24 g/L) στο υπόστρωμα στο τέλος της ζύμωσης. Την 9<sup>η</sup> ημέρα μικροβιακής ζύμωσης η συγκέντρωση της σακχαρόζης μηδενίστηκε λόγω διάσπασής της στους δύο μονοσακχαρίτες.

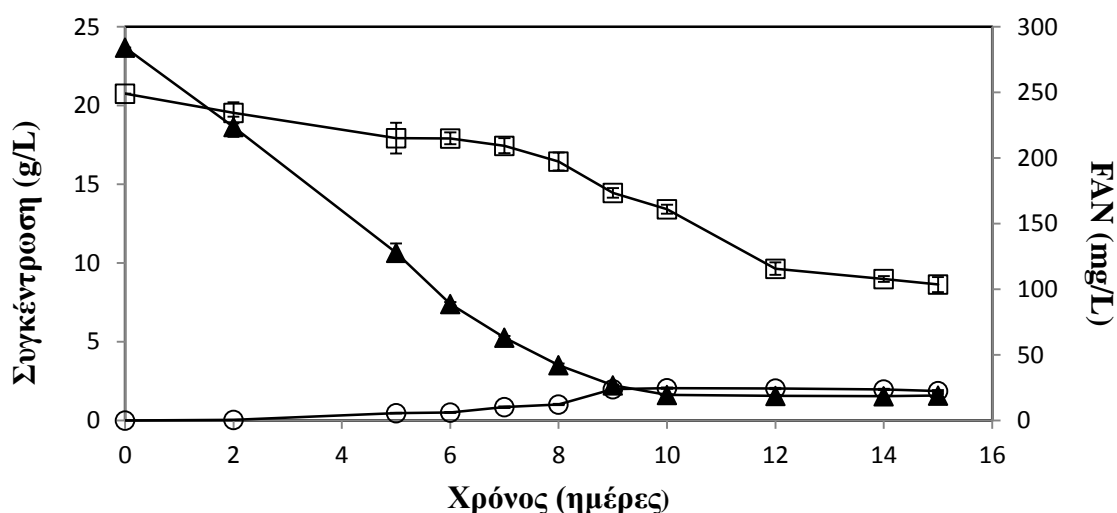
### 3.1.3 Υπόστρωμα με υδρόλυμα ΡΚC και ακατέργαστη γλυκερόλη

Σε αυτό το πείραμα αξιοποιήθηκε υδρόλυμα από άλευρα ενδοσπερμίου του φοινικόκαρπου (ΡΚC) και ακατέργαστη γλυκερόλη προς παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης. Το διάγραμμα 10 δείχνει το προφίλ της ζύμωσης ως προς την



κατανάλωση γλυκερόλης, αζώτου ελεύθερων αμινομάδων και πεπτιδίων (FAN) και την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης από το *Komagateibacter sucrofermentans*. Κατά το χρονικό διάστημα των 15 ημερών που διήρκεσε η ζύμωση καταναλώθηκε συνολική ποσότητα σακχάρων 12,14 g/L και η μέγιστη συγκέντρωση βακτηριακής κυτταρίνης που σημειώθηκε την 10<sup>η</sup> ημέρα ανήλθε στα 2,04 g/L. Η παραγωγικότητα του πειράματος ήταν 0,20 g/L/d. Σύμφωνα και με την μικρή παραγωγή κυτταρίνης που σημειώθηκε μέχρι την 8<sup>η</sup> ημέρα ζύμωσης μπορούμε να υποθέσουμε ότι πιθανόν ο κυτταρικός μεταβολισμός στράφηκε περισσότερο προς παραγωγή βιομάζας και λιγότερο προς παραγωγή του επιθυμητού προϊόντος, δηλαδή κυτταρίνης.

Σε πρόσφατες μελέτες όπως αυτή των Carreira *et al.*, (2011) η χρήση ακατέργαστης γλυκερόλης οδήγησε σε παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης που ανέρχεται στα 0,1 g/L την 4<sup>η</sup> ημέρα ζύμωσης. Σε αντίθεση με αυτά τα αποτελέσματα, τα πειραματικά δεδομένα των Vazquez *et al.*, (2015) δείχνουν ότι ο συνδιασμός ακατέργαστης γλυκερόλης με υγρό εκχύλισμα καλαμποκιού (corn steep liquor) οδηγούν σε πολύ αυξημένη παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης που ανέρχεται στα 10 g/L. Σύμφωνα με τους Tsouko *et al.*, (2015) ο συνδιασμός ακατέργαστης γλυκερόλης ως πηγή άνθρακα και ηλιόπιτας ως πηγή αζώτου στο υπόστρωμα ζύμωσης οδήγησε σε παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης 13,34 g/L. Μέχρι σήμερα δεν έχει σημειωθεί βιβλιογραφικά η χρήση του PKC σε υπόστρωμα ζύμωσης προς παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης.

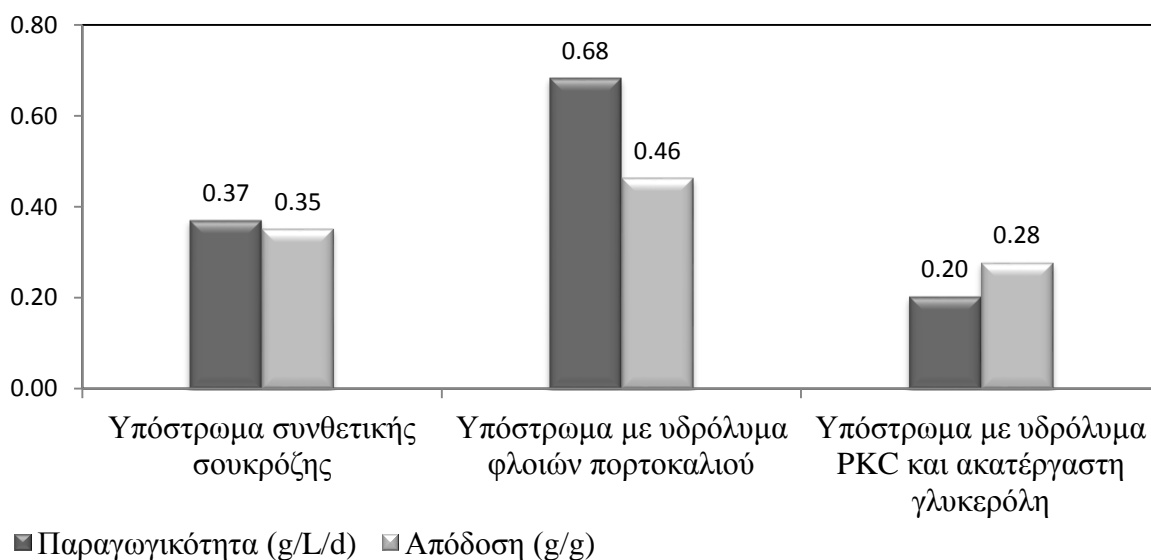


**Διάγραμμα 10:** Παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης (○), κατανάλωση της πηγής άνθρακα-ακατέργαστη γλυκερόλη (□) και κατανάλωση αζώτου ελεύθερων

αμινομάδων (▲) κατά τη διάρκεια (15 ημέρες) καλλιέργειας του μικροοργανισμού σε υπόστρωμα ζύμωσης που περιέχει υδρόλυμα από ΡΚΚ και ακατέργαστη γλυκερόλη.

### 3.1.4 Παραγωγικότητα και αποδοτικότητα ζυμώσεων

Σύμφωνα με το ακόλουθο διάγραμμα (Διάγραμμα 11) η χρήση υδrolύματος από φλούδες πορτοκαλιού ως θρεπτικό μέσο ζύμωσης, ευνόησε την παραγωγή μικροβιακής κυτταρίνης από το βακτηριακό στέλεχος *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM 15973 το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη. Στη συγκεκριμένη περίπτωση και η παραγωγικότητα (0,68 g/L/d) αλλά και η απόδοση (0,46 g/g) της βακτηριακής ζύμωσης ήταν μεγαλύτερη σε σύγκριση με τα άλλα δύο πειράματα κατά τα οποία χρησιμοποιήθηκαν συνθετικό υπόστρωμα σακχαρόζης και ΡΚΚ σε συνδιασμό με ακατέργαστη γλυκερόλη.

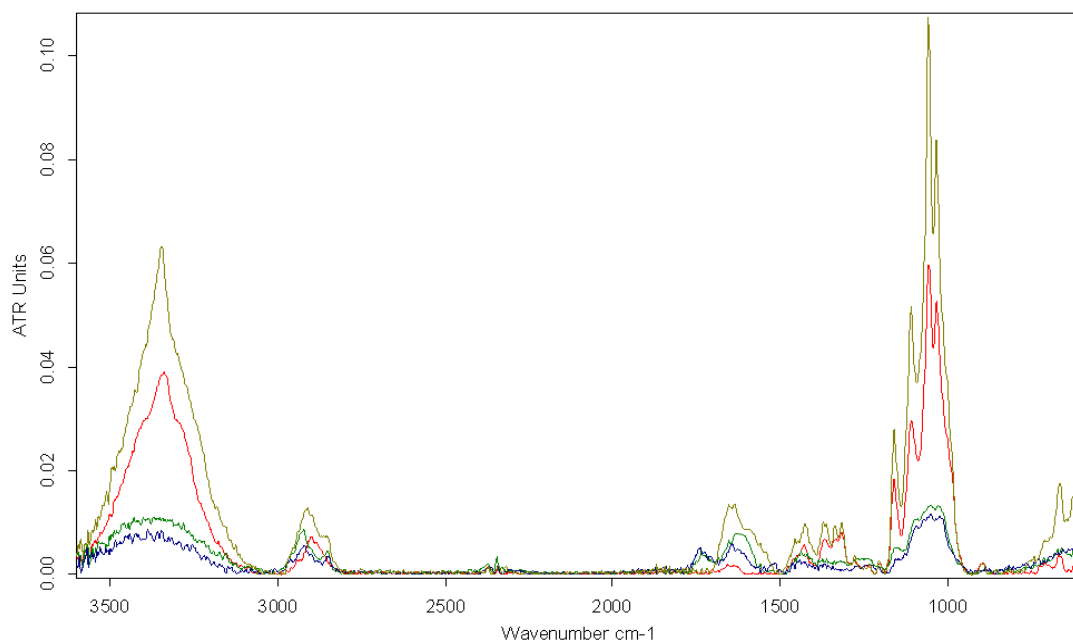


**Διάγραμμα 11:** Μέγιστη παραγωγικότητα και απόδοση βακτηριακής κυτταρίνης στα τρία διαφορετικά υποστρώματα ζύμωσης που χρησιμοποιήθηκαν.

## 3.2 Σύγκριση δειγμάτων βακτηριακής κυτταρίνης και κυτταρινούχας μάζας από φλοιούς πορτοκαλιού

### 3.2.1 Υπέρυθρη φασματοσκοπία

Στο Διάγραμμα 12 παρουσιάζεται το ATR-IR φάσμα των ξηρών δειγμάτων CAE (κυτταρινούχα μάζα από φλοιούς πορτοκαλιού ύστερα από συμβατική εκχύλιση πηκτίνης) και OPEC (κυτταρινούχα μάζα από φλοιούς πορτοκαλιού ύστερα από διεργασία OPEC) της εμπορικής μικροκρυσταλλικής κυτταρίνης (MCC) και της βακτηριακής κυτταρίνης. τα δείγματα CAE και OPEC περιλαμβάνουν τρία κύρια συστατικά: κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και πηκτίνη αλλά και πολύ μικρά ποσοστά λιγνίνης. Το φάσμα της BC παρουσιάζει τις ίδιες απορροφήσεις με την MCC αφού δεν περιέχει καθόλου ημικυτταρίνη και λιγνίνη.



C:\OPUS-old\Data\VA\BC8 NEW.0	BC8 NEW	ATR	19/05/2016
C:\OPUS-old\Data\VA\CAE1 12_4.0	CAE1 12_4	ATR	12/04/2016
C:\OPUS-old\Data\VA\OPEC1 12_4.0	OPEC1 12_4	ATR	12/04/2016
C:\OPUS-old\Data\EMM\STANDARDS\CELLULOSE MC-ALDRICH.0	CELLULOSE-ALDRICH	ATR	17/11/2015

**Διάγραμμα 12:** Φάσμα ATR-IR της μικροκρυσταλλικής κυτταρίνης (MCC), της βακτηριακής κυτταρίνης (BC) και της κυτταρινούχας μάζας ύστερα από την

συμβατική εκχύλιση πηκτίνης (CAE) και την διεργασία OPEC (OPEC) στους φλοιούς πορτοκαλιού.

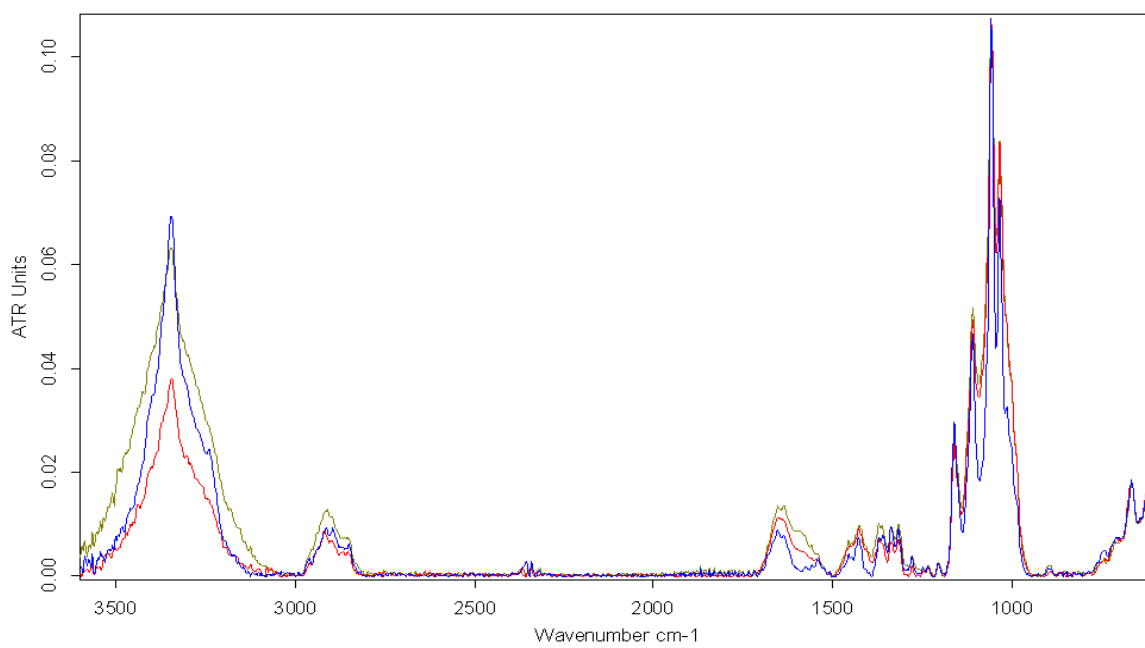
Οι κύριες απορροφήσεις που είναι κοινές και για τα 4 δείγματα συνοψίζονται στον πίνακα 5. Οι δύο κορυφές στα 1540 και 1640  $\text{cm}^{-1}$  στο φάσμα της BC αντιστοιχούν σε αμιδικό δεσμό και μπορούν να συσχετιστούν με πρωτεΐνη από υπολείμματα βακτηριακής βιομάζας πιθανόν από μη αποτελεσματικό καθαρισμό της μεμβράνης. Σύμφωνα με τους Sugiyama *et al.* (1991), οι απορροφήσεις στα 750 και 3240  $\text{cm}^{-1}$  φανερώνουν την ύπαρξη κρυσταλλικής κυτταρίνης τύπου I $\alpha$  και οι απορροφήσεις στα 710 και 3270  $\text{cm}^{-1}$  την ύπαρξη άμορφης κυτταρίνης τύπου I $\beta$ .

**Πίνακας 4:** Χαρακτηριστικές απορροφήσεις που είναι κοινές για τα φάσματα μικροκρυσταλλικής κυτταρίνης (MCC), βακτηριακής κυτταρίνης (BC) και της κυτταρινούχας μάζας ύστερα από την συμβατική εκχύλιση πηκτίνης (CAE) και την διεργασία OPEC (OPEC) στους φλοιούς πορτοκαλιού.

Συχνότητα ( $\text{cm}^{-1}$ )	Δόνηση ομάδας
3600-3000	Δόνηση ομάδας O-H
2895	Δόνηση ομάδας C-H στον σκελετό της κυτταρίνης
1740-1700	Δόνηση ομάδας -C=O
1694-1581	Απορροφημένη υγρασία
1493-1396	Κάμψη ομάδων H-C-H, O-C-H εντός του επιπέδου
1315	Δόνηση ομάδας CH <sub>2</sub> στον C6
1296-1219	Δόνηση ομάδας C-O-H στον C6 εκτός του επιπέδου
1205	Συμμετρική δόνηση ομάδας C-O-C
1162	Ασύμμετρη δόνηση ομάδας C-O-C
1140-926	Δόνηση ομάδων C-C, C-OH, C-H στους δακτυλίους και στις πλευρικές ομάδες
1107	C-O-C (1-4) γλυκοσιδικοί δεσμοί
898	Παραμόρφωση και δόνηση ομάδων C-O-C, CC-O, C-C-H

Όλα τα φάσματα ATR-IR δειγμάτων βακτηριακής κυτταρίνης που παράχθηκαν σε διαφορετικούς χρόνους ζύμωσης συνοψίζονται στο Διάγραμμα 13.

Όλες οι απορροφήσεις είναι κοινές για τα δείγματα και δεν μπορούν να εντοπιστούν διαφορές. Η παρουσία κορυφών στα  $3240\text{ cm}^{-1}$  και  $3270\text{ cm}^{-1}$  είναι χαρακτηριστικές των τύπων κυτταρίνης I<sub>α</sub> και I<sub>β</sub> αντίστοιχα, και αποδεικνύουν ότι το βακτήριο συνθέτει και τους δύο τύπους κατά την διαδικασία της ζύμωσης.



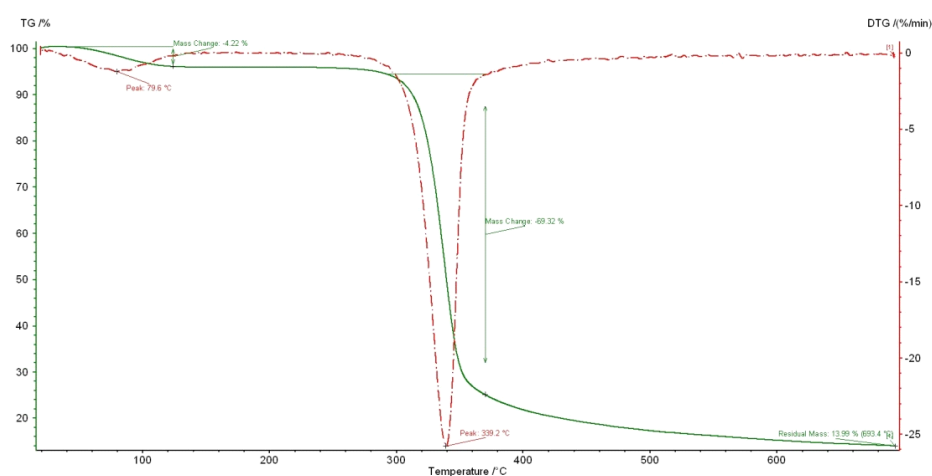
C:\OPUS-old\Data\VA\BC2 NEW.D	BC2 NEW	ATR	19/05/2016
C:\OPUS-old\Data\VA\BC5 NEW.D	BC5 NEW	ATR	19/05/2016
C:\OPUS-old\Data\VA\BC8 NEW.D	BC8 NEW	ATR	19/05/2016

**Διάγραμμα 13:** Φάσμα ATR-IR δειγμάτων βακτηριακής κυτταρίνης όπου παράχθηκαν σε 2, 5 και 8 ημέρες ζύμωσης.

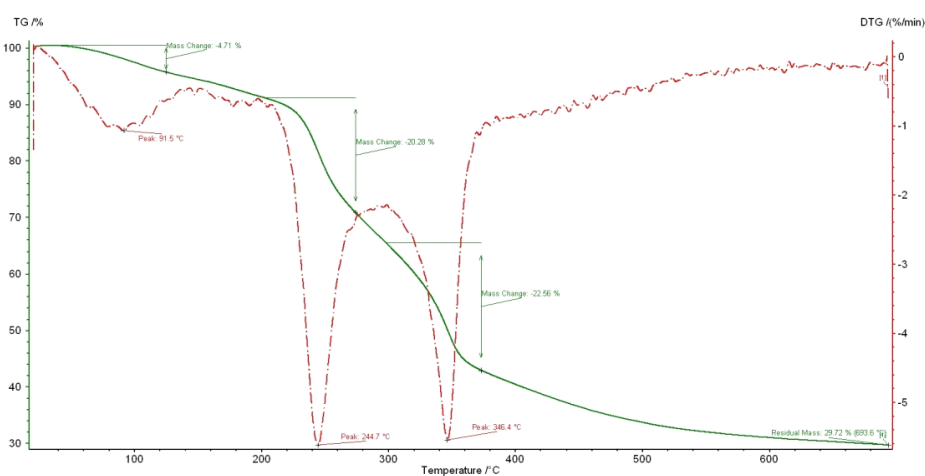
### 3.2.2 Θερμοσταθμική ανάλυση

Σύμφωνα με όλα τα δεδομένα της ανάλυσης TGA μπορούμε να συμπεράνουμε ότι όλα τα δείγματα κυτταρίνης είναι πολύ σταθερά από θερμική άποψη, επειδή αποσυντίθενται περίπου στους  $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Τα δείγματα CAE και OPEC δείχνουν τρία διαστήματα αποσύνθεσης. Το πρώτο αντιστοιχεί στην απομάκρυνση νερού κάτω από τους  $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ , το δεύτερο στην διάσπαση της πηκτικής στους  $220\text{-}260\text{ }^{\circ}\text{C}$  και πιθανώς σε μικρές ποσότητες ημικυτταρίνης και το τρίτο στην αποσύνθεση

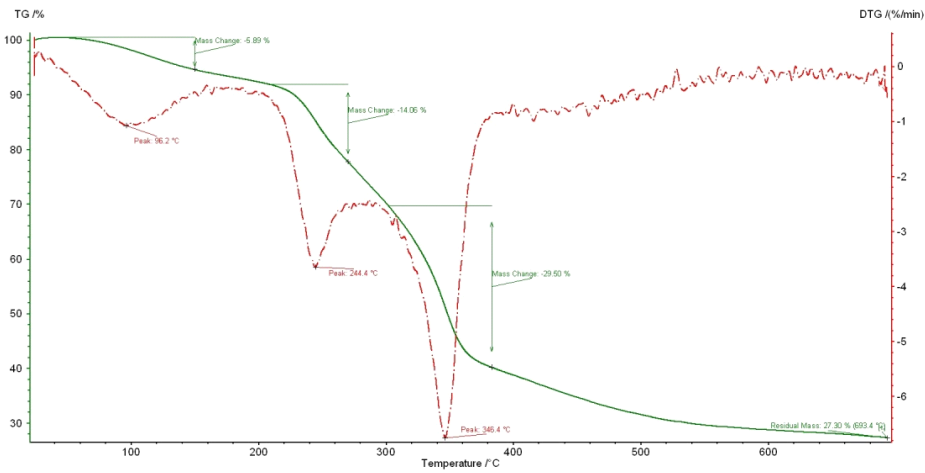
της κυτταρίνης στους 310 έως 380 °C. Σε αντίθεση με τα προηγούμενα δείγματα, η MCC και η BC δείχνουν διαστήματα αποσύνθεσης περίπου στους 180 °C και στους 290-340 °C που αντιστοιχούν μόνο στην εξάλειψη του νερού και την αποσύνθεση της κυτταρίνης αντίστοιχα. Επιπλέον στα δείγματα βακτηριακής κυτταρίνης εμφανίζεται επιπλέον διάστημα αποσύνθεσης περίπου στους 400 °C που πιθανόν οφείλεται στην πυρόλυση του δείγματος λόγω της πολύ υψηλής θερμοκρασίας. Τελος, μια διαφορά μεταξύ των δειγμάτων CAE και OPEC είναι ότι το δείγμα CAE περιέχει μεγαλύτερο ποσοστό πηκτίνης και αυτό φαίνεται από την υψηλότερη απώλεια μάζας στο διάγραμμα.



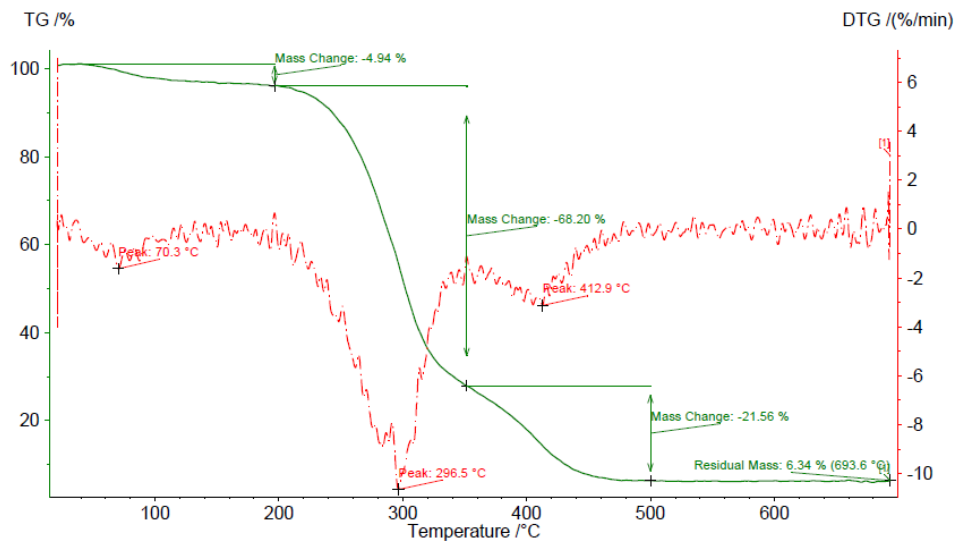
**Διάγραμμα 14:** Διάγραμμα θερμοσταθμικής ανάλυσης μικροκρυσταλλικής κυτταρίνης.



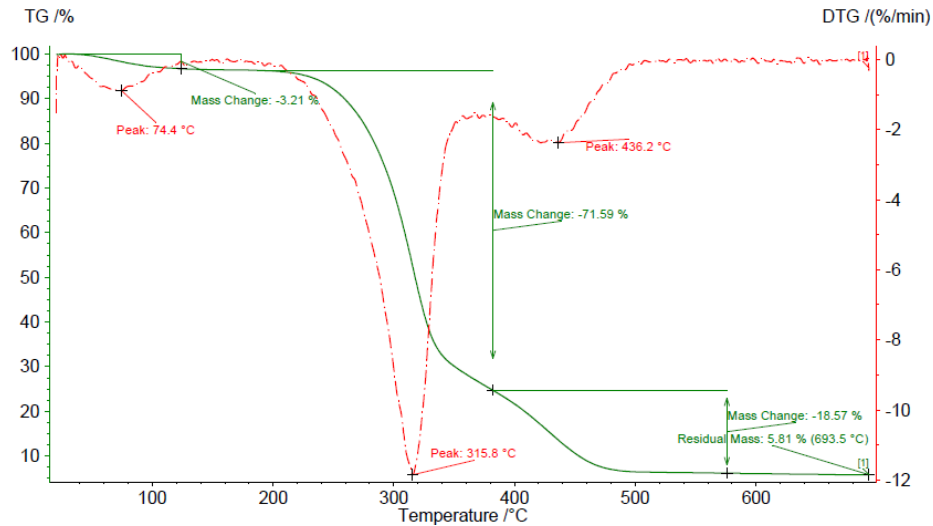
**Διάγραμμα 1:** Διάγραμμα θερμοσταθμικής ανάλυσης κυτταρινούχας μάζας μετά την συμβατική εκχύλιση πηκτίνης από τους φλοιούς πορτοκαλιού.



**Διάγραμμα 2:** Διάγραμμα θερμοσταθμικής ανάλυσης κυτταρινούχας μάζας μετά την διεργασία OPEC στους φλοιούς προτοκαλιού.



**Διάγραμμα 3:** Διάγραμμα θερμοσταθμικής ανάλυσης βακτηριακής κυτταρίνης που παράχθηκε μετά από 5 ημέρες ζύμωσης.



**Διάγραμμα 4:** Διάγραμμα θερμοσταθμικής ανάλυσης βακτηριακής κυτταρίνης που παράχθηκε μετά από 8 ημέρες ζύμωσης.

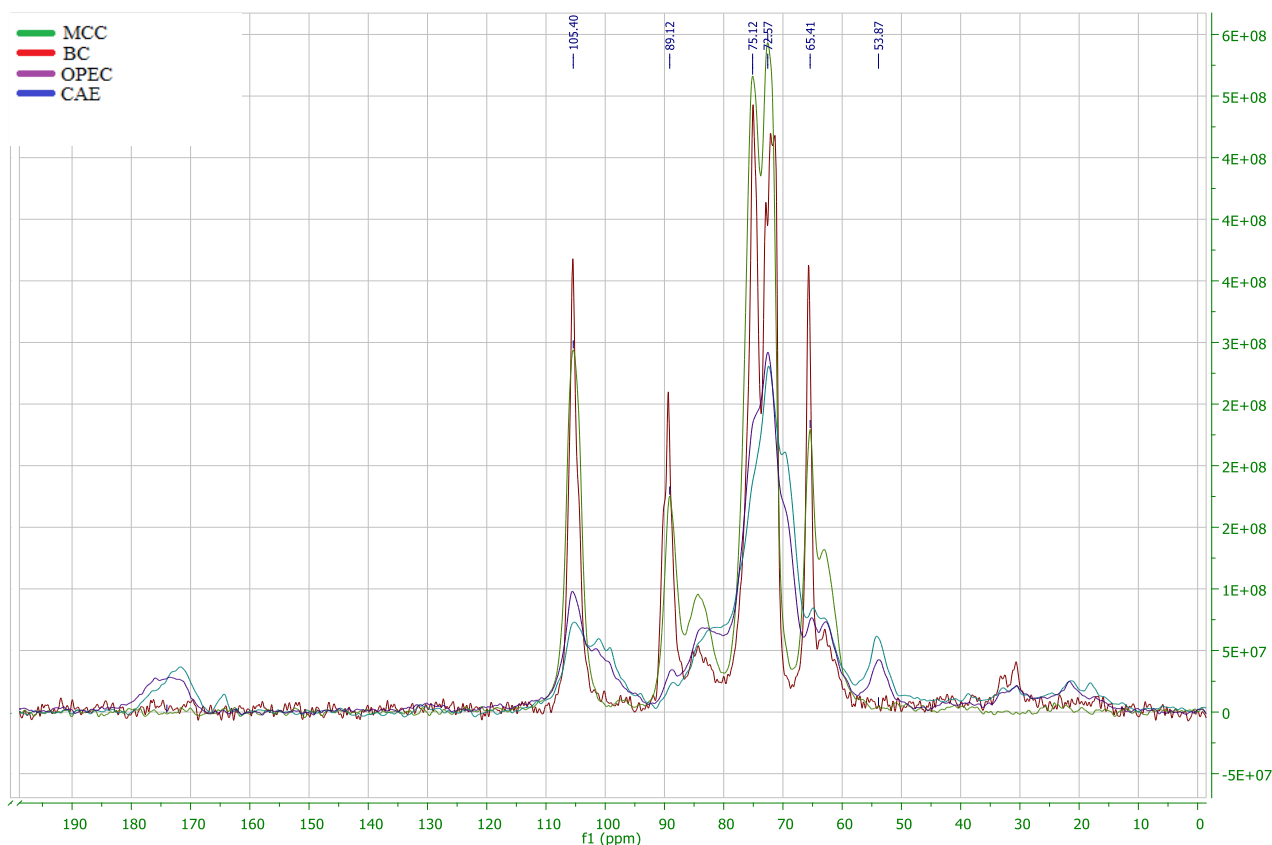
**Πίνακας 5:** Θερμοκρασία αποσύνθεσης κυτταρίνης των δειγμάτων μικροκρυσταλλική κυτταρίνη (MCC), βακτηριακή κυτταρίνη (BC) 5 και 8 ημερών ζύμωσης και κυτταρινούχας μάζας ύστερα από την συμβατική εκχύλιση πηκτίνης (CAE) και την διεργασία OPEC (OPEC) στους φλοιούς πορτοκαλιού.

Δείγμα	Θερμοκρασία αποσύνθεσης κυτταρίνης (°C)
MCC	339,2
CAE	346,6±0,2
OPEC	346,8±0,5
BC 5 ημέρες	296,5
BC 8 ημέρες	315,8



### 3.2.3 Φασματοσκοπία μαγνητικού πυρηνικού συντονισμού στερεής κατάστασης

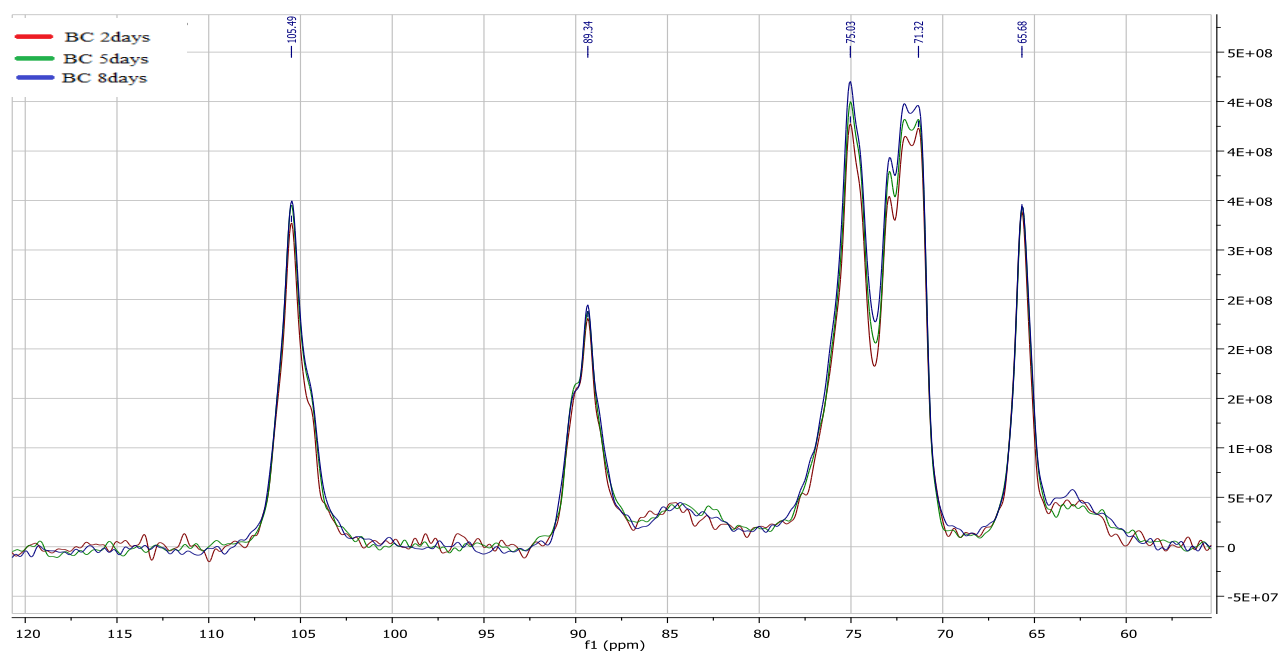
Από το φάσμα CPMAS  $^{13}\text{C}$  NMR (Διάγραμμα 19), μπορούν να ταυτοποιηθούν οι κορυφές που αντιστοιχούν στους έξι άνθρακες των μονομερών γλυκόζης που συνθέτουν το μόριο κυτταρίνης. Ο άνθρακας C1 αντιστοιχεί στην κορυφή στα 105 ppm, ο C4 στα 89 ppm, ο C3 στα 75 ppm, οι C2,5 στα 72 ppm και ο C6 στα 65 ppm. Τα δείγματα CAE και OPEC εμφανίζουν περισσότερες κορυφές απορρόφησης επειδή περιέχουν περισσότερα συστατικά (ημικυτταρίνη, λιγνίνη, πηκτίνη κ.α.). Πιο συγκεκριμένα οι δύο κορυφές που εμφανίζουν περίπου στα 174 και 53 ppm ανήκουν στον άνθρακα C6 και στην μεθυλεστέρο-ομάδα στο μόριο της πηκτίνης αντίστοιχα. Σύμφωνα με τους Liitiä *et al.*, (2003) και Bernardinelli *et al.*, (2015), η ημικυτταρίνη και η λιγνίνη που συνυπάρχει με την κυτταρίνη εντοπίζονται στην άμορφη περιοχή του φάσματος, παρεμποδίζοντας την αξιολόγηση της κρυσταλλικότητας του δείγματος. Έτσι είναι δύσκολο να υπολογιστεί ο πραγματικός δείκτης κρυσταλλικότητας αυτών των δειγμάτων αφού όσο υψηλότερο είναι το περιεχόμενο του κυτταρινούχου κλάσματος της βιομάζας σε ημικυτταρίνη, τόσο χαμηλότερος είναι ο δείκτης κρυσταλλικότητας.



**Διάγραμμα 5:** <sup>13</sup>C στερεής κατάστασης των δειγμάτων μικροκρυσταλλική κυτταρίνη (MCC), βακτηριακή κυτταρίνη (BC) και κυτταρινούχας μάζας ύστερα από την συμβατική εκχύλιση πηκτίνης (CAE) και την διεργασία OPEC (OPEC) στους φλοιούς πορτοκαλιού.

Στο παρακάτω Διάγραμμα (Διάγραμμα 20) παρουσιάζεται το CPMAS <sup>13</sup>C NMR φάσμα των δειγμάτων βακτηριακής κυτταρίνης που παράχθηκαν σε διαφορετικούς χρόνους ζύμωσης. Είναι φανερό ότι η BC που έχει παραχθεί σε 8 ημέρες ζύμωσης εμφανίζει πιο ενισχυμένες εντάσεις σε όλες τις απορροφήσεις συγκριτικά με τα άλλα δύο δείγματα. Η BC που έχει παραχθεί ύστερα από 2 ημέρες ζύμωσης εμφανίζει ελάχιστα αυξημένες απορροφήσεις που αντιστοιχούν στους άνθρακες C3 και C2,5 στα 75 και 72 ppm και μειωμένες απορροφήσεις στους άνθρακες C1 και C6 στα 105 και 65 ppm, συγκριτικά με το δείγμα BC που έχει παραχθεί ύστερα από 5 ημέρες ζύμωσης. Η ένταση της κορυφής που αντιστοιχεί στον άνθρακα C4 στα 89 ppm είναι ίδια για όλα τα δείγματα. Σύμφωνα με τους Watanabe *et al.* (1997) η ισχυρή γραμμή συντονισμού του άνθρακα C1 και η μειωμένη ένταση

της γραμμής συντονισμού του άνθρακα C4 φανερώνουν ότι στα δείγματα αυτά κυριαρχεί ο τύπος κυτταρίνης I<sub>α</sub>.

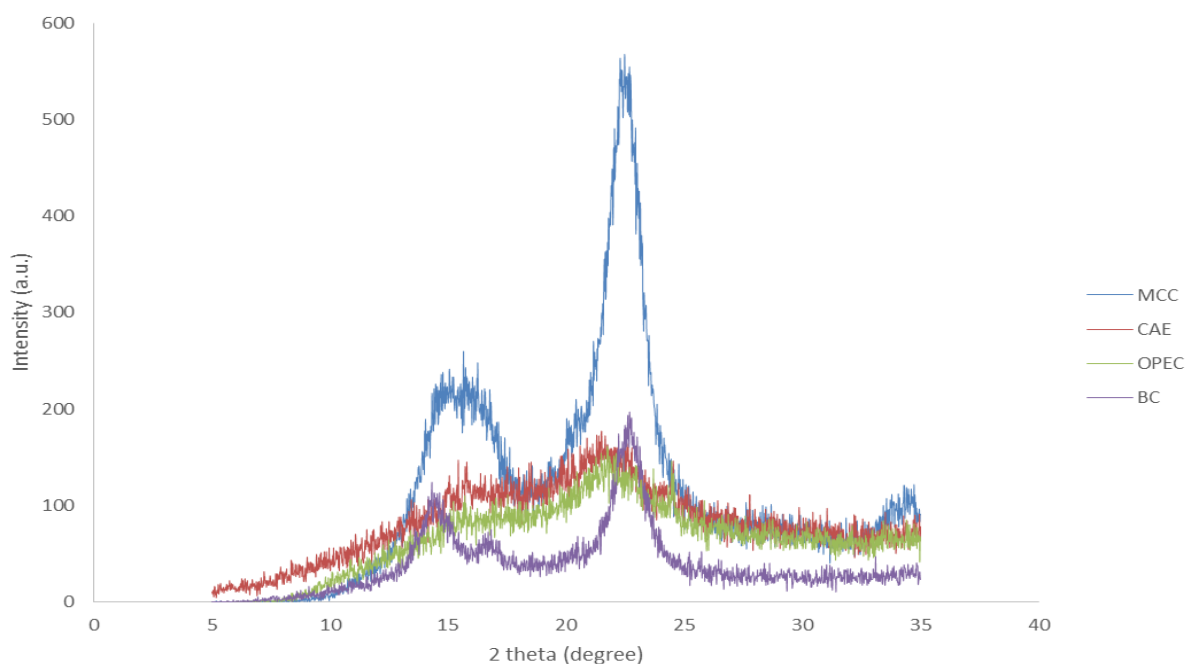


**Διάγραμμα 6:** <sup>13</sup>C στερεής κατάστασης των δειγμάτων BC, η κόκκινη γραμμή αντιστοιχεί σε BC που έχει παραχθεί σε 2 ημέρες ζύμωσης, η πράσινη σε 5 ημέρες ζύμωσης και η μπλέ σε 8 ημέρες ζύμωσης.

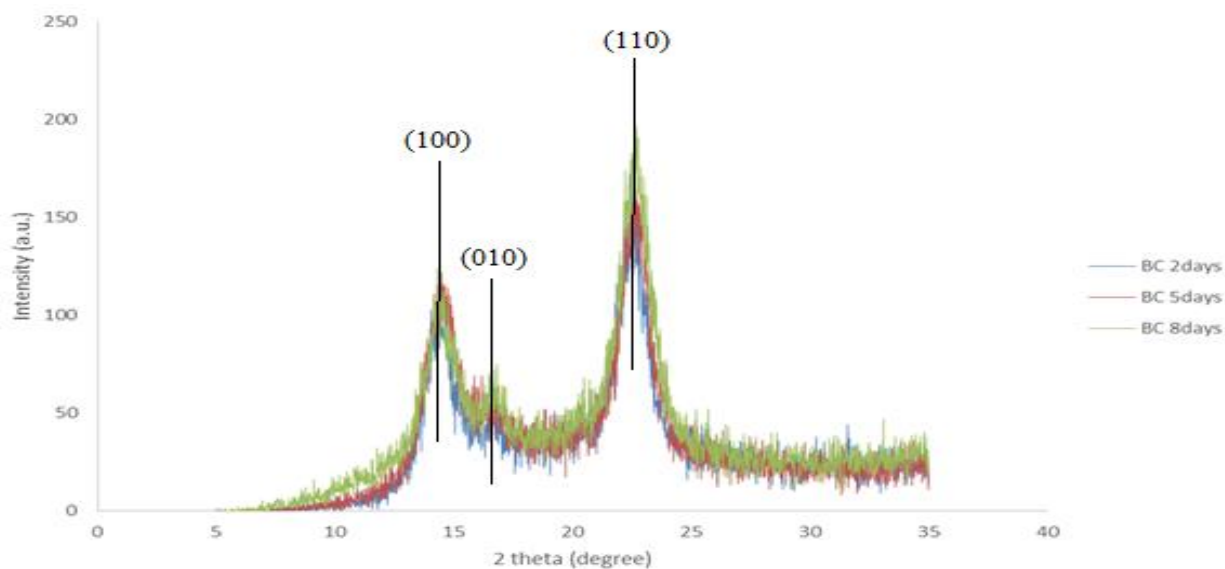
### 3.2.4 Περιθλασιμετρία ακτίνων-X

Από το φάσμα περίθλασης ακτίνων-X (Διάγραμμα 21) μπορούν να προσδιοριστούν τρεις κορυφές περίθλασης στις  $2\theta = 14,5^\circ$ ,  $16,6^\circ$  και  $22,6^\circ$  για τα δείγματα βακτηριακής και μικροκρυσταλλικής κυτταρίνης. Αυτές οι κορυφές μπορούν να αποδοθούν στα (1 0 0), (0 1 0) και (1 1 0) επίπεδα της κυτταρίνης I<sub>α</sub> ή στα (1<sup>-</sup>1 0), (1 1 0), και (2 0 0) επίπεδα της κυτταρίνης I<sub>β</sub> (Wada *et al.*, 1993). Δεν είναι εύκολη η διάκριση των δύο αλληλόμορφων μόνο με βάση τις θέσεις των κορυφών από το φάσμα XRD, επειδή είναι πολύ κοντά η μία στην άλλη (Lee *et al.*, 2015). Όπως παρατηρείται η ένταση της κορυφής στις  $14,5^\circ$  είναι μεγαλύτερη από εκείνη της κορυφής στις  $16,6^\circ$ , και αυτό είναι τυπικό χαρακτηριστικό των δειγμάτων κυτταρίνης που παράγονται από τον *G. xylinus* και περιέχουν ως επί το πλείστον I<sub>α</sub>

τύπο κυτταρίνης (Tokoh, *et al.*, 1998). Παρόλο που τα δείγματα CAE και ο OPEC δεν έχουν σαφείς κορυφές περίθλασης, μπορεί να φανεί ότι υπάρχουν δύο ευρείες κορυφές γύρω στις 15.7° και 22.5° που αντιστοιχούν σε κυτταρίνη, αλλά δεν μπορεί να ταυτοποιηθεί με σιγουριά ο τύπος του αλληλόμορφου που επικρατεί. Η άμορφη περιοχή που παρατηρείται στο φάσμα XRD των δειγμάτων CAE και OPEC, αναφέρεται στο συνολικό άμορφο κλάσμα του δείγματος και όχι στην ταυτότητα του άμορφου υλικού δηλαδή κυτταρίνη, ημικυτταρίνη ή λιγνίνη. Στο Διάγραμμα 22 δεν υπάρχει σαφής διαφορά του πλάτους κορυφής ή των σχετικών εντάσεων μεταξύ των τριών δειγμάτων βακτηριακής κυτταρίνης που παράχθηκαν σε διαφορετικούς χρόνους ζύμωσης.



**Διάγραμμα 7:** Φάσμα περίθλασης ακτίνων-X των δειγμάτων μικροκρυσταλλική κυτταρίνη (MCC), βακτηριακή κυτταρίνη (BC) και κυτταρινούχας μάζας ύστερα από την συμβατική εκχύλιση πηκτίνης (CAE) και την διεργασία OPEC (OPEC) στους φλοιούς πορτοκαλιού.



**Διάγραμμα 8:** Φάσμα περίθλασης ακτίνων-X των δειγμάτων βακτηριακής κυτταρίνης (BC) που παράχθηκαν σε 2, 5 και 8 ημέρες ζύμωσης. Οι κορυφές περίθλασης της κυτταρίνης  $I_{\alpha}$  έχουν επισημανθεί.

### 3.2.5 Βαθμός πολυμερισμού

**Πίνακας 6:** Βαθμός πολυμερισμού της μικροκρυσταλλικής κυτταρίνης (MCC), της κυτταρινούχας μάζας ύστερα από την συμβατική εκχύλιση πηκτίνης (CAE) και την διεργασία OPEC (OPEC) στους φλοιούς πορτοκαλιού και των δειγμάτων βακτηριακής κυτταρίνης που παράχθηκαν σε 2,5 και 8 ημέρες ζύμωσης.

Δείγμα	Βαθμός πολυμερισμού
MCC	$134 \pm 26,63$
CAE	$1250 \pm 0,69$
OPEC	$269 \pm 16,35$
BC 2d	$1752 \pm 4,12$
BC 5d	$1685 \pm 0,99$
BC 8d	$1620 \pm 1,35$

Σύμφωνα με τον πίνακα 7, η BC που παράχθηκε σε 2 ημέρες ζύμωσης εμφανίζει τον υψηλότερο βαθμό πολυμερισμού. Ωστόσο με την πάροδο των ημερών μικροβιακής ζύμωσης το πολυμερές που παράγεται εμφανίζει πολύ μικρή μείωση του

βαθμού πολυμερισμού. Σύμφωνα με τους Keshk *et al.* (2014) αυτό ενδεχομένως συμβαίνει λόγω της παρουσίας ασκορβικού οξέος στο υδρόλυμα των φλοιών πορτοκαλιού που χρησιμοποιείται στο μέσο ζύμωσης και πιθανώς επιρρεάζει την δημιουργία δεσμών υδρογόνου στο εσωτερικό των δειγμάτων. Η μικροκρυσταλλική κυτταρίνη εμφανίζει τον μικρότερο βαθμό πολυμερισμού. Τα αποτελέσματα των δειγμάτων CAE και OPEC δεν είναι ξεκάθαρα διότι η κυτταρίνη είναι συνδεδεμένη με ημικυτταρίνη και λιγνίνη. Η κυτταρινούχα μάζα που προέκυψε από την διεργασία OPEC δείχνει να έχει σχεδόν τον 5πλάσιο βαθμό πολυμερισμού συγκριτικά με το δείγμα CAE, χωρίς να μπορούμε να πούμε με σιγουριά ότι αυτή η τιμή είναι πραγματική και αντιπροσωπευτική των δειγμάτων. Ωστόσο, μπορούμε να υποθέσουμε ότι η εκχύλιση των συστατικών από τους φλοιούς πορτοκαλιού με χρήση μικροκυμάτων καταστρέφει λιγότερο την δομή της κυτταρίνης στο υπόλειμμα συγκριτικά με μεθόδους στις οποίες χρησιμοποιούνται οξέα ή άλλα χημικά.

### 3.2.6 Δείκτης κρυσταλλικότητας

**Πίνακας 7:** Δείκτης κρυσταλλικότητας της μικροκρυσταλλικής κυτταρίνης (MCC), της κυτταρινούχας μάζας ύστερα από την συμβατική εκχύλιση πηκτίνης (CAE) και την διεργασία OPEC (OPEC) στους φλοιούς πορτοκαλιού και των δειγμάτων βακτηριακής κυτταρίνης που παράχθηκαν σε 2,5 και 8 ημέρες ζύμωσης, με τις μεθόδους XRD, IR και  $^{13}\text{C}$  NMR στερεής κατάστασης.

Δείγμα	Δείκτης κρυσταλλικότητας		
	XRD (%)	IR	NMR (%)
<b>MCC</b>	83,98	2,55	50
<b>CAE</b>	53,345±3,01	1,29±0,01	16,07±1,29
<b>OPEC</b>	56,39±4,89	1,48±0,01	22,25±1,06
<b>BC 2 ημέρες</b>	86,05	4,83	68
<b>BC 5 ημέρες</b>	86,86	9,72	69
<b>BC 8 ημέρες</b>	86,73	4,53	71

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων του δείκτη κρυσταλλικότητας εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την επιλογή της μεθόδου που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί. Σε αυτή τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές μέθοδοι: φασματοσκοπία υπερύθρου,  $^{13}\text{C}$  NMR στερεάς κατάστασης και περίθλαση ακτίνων-X (XRD). Σύμφωνα με τους Park *et al.*, (2010), ο προσδιορισμός του δείκτη κρυσταλλικότητας με τη χρήση φασματοσκοπίας ATR-IR είναι η πιο απλή μέθοδος, αλλά δίνει μόνο σχετικές τιμές, επειδή το φάσμα περιέχει πάντα συνεισφορές τόσο από κρυσταλλικές όσο και από άμορφες περιοχές. Η περίθλαση ακτίνων-X (XRD) και η μέθοδος NMR παρέχουν πιο ακριβείς μετρήσεις κρυσταλλικότητας των δειγμάτων κυτταρίνης. Επιπλέον, υπάρχουν διάφορες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της κρυσταλλικότητας, ιδιαίτερα χρησιμοποιώντας το φάσμα XRD. Η μέθοδος που χρησιμοποιείται στην παρούσα μελέτη ήταν η μέθοδος υπολογισμού ύψους κορυφής που περιγράφεται από τους Segal *et al.*, (1959). Σε προηγούμενες μελέτες τα αποτελέσματα που λαμβάνονται από τις μεθόδους XRD και στερεάς κατάστασης NMR για δείγματα κυτταρίνης τείνουν να συμφωνήσουν, σημειώνοντας ότι η μέθοδος XRD τείνει να υπερεκτιμά το κρυσταλλικό κλάσμα (Bernardinelli *et al.*, 2015). Σύμφωνα με τον πίνακα 8, η βακτηριακή κυτταρίνη έχει το μεγαλύτερο δείκτη κρυσταλλικότητας, χρησιμοποιώντας και τις τρεις διαφορετικές μεθόδους ανάλυσης, και ακολουθείται από την MCC. Τα δείγματα OPEC και CAE εμφανίζουν τις χαμηλότερες τιμές και αυτό είναι λογικό επειδή οι εντάσεις των κορυφών τους είναι πάντα χαμηλότερες και οι κορυφές που σχετίζονται με την κρυσταλλικότητα επικαλύπτονται με τις κορυφές των άλλων ενώσεων που είναι συνδεδεμένες με την κυτταρίνη. Ωστόσο, το δείγμα OPEC έχει ελάχιστα υψηλότερες τιμές και αυτό πιθανόν σχετίζεται με την χρήση μικροκυμάτων για εκχύλιση των συστατικών που ενδέχεται να καταστρέφει λιγότερο τη δομή της κυτταρίνης ή να την μετατρέπει σε άμορφη δεδομένου ότι δεν χρησιμοποιούνται οξέα ή άλλες χημικές ουσίες.

### 3.2.7 Ικανότητα συγκράτησης νερού

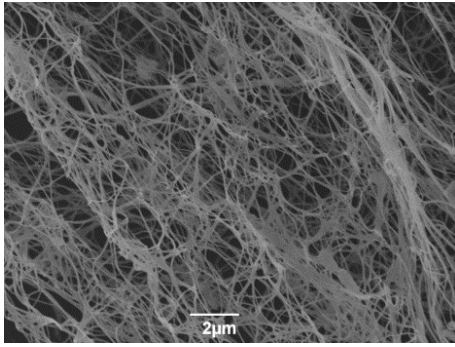
**Πίνακας 8:** Ικανότητα συγκράτησης νερού κυτταρινούχας μάζας ύστερα από την συμβατική εκχύλιση πηκτίνης (CAE) και την διεργασία OPEC (OPEC) στους φλοιούς πορτοκαλιού και της βακτηριακής κυτταρίνης.

Δείγμα	WHC (g/g)
CAE	7,63±0,34
OPEC	7,88±0,36
BC	26,50±0,29

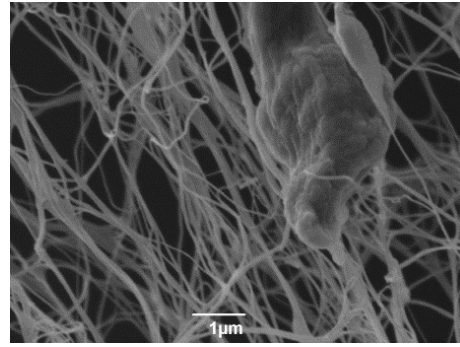
Η ικανότητα συγκράτησης νερού της BC είναι ενισχυμένη σε σύγκριση με αυτή των φλοιών πορτοκαλιού. Αυτό οφείλεται στο καθαρό δίκτυο ινών της BC, που συμβάλει στην πιο αποτελεσματική σύνδεση με τα μόρια του νερού. Τα αποτελέσματα για τα υπολείμματα φλούδων πορτοκαλιού είναι συγκρίσιμα με αυτά από τις μελέτες των Wachirasiri *et al.*, (2009) και Zenab *et el.*, (2015) που χρησιμοποιούν την ίδια μέθοδο. Στην πρώτη μελέτη, η ικανότητα συγκράτησης νερού των διαιτητικών ινών κυμαίνεται από 7 έως 11 g/g και στη δεύτερη όπου χρησιμοποιήθηκαν φλοιοί πορτοκαλιού, η ικανότητα συγκράτησης νερού (περίπου 7,5 g/g) είναι πολύ κοντά με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. Καμία σύγκριση δεν μπορεί να γίνει για τα δείγματα BC, επειδή στη βιβλιογραφία η ικανότητα συγκράτησης νερού μετριέται χρησιμοποιώντας τον αντίστροφο τρόπο. Σύμφωνα με τους Schrecker και Gostomski, (2005) κάθε ενυδατωμένο δείγμα βακτηριακής κυτταρίνης ζυγίζεται και στη συνέχεια ζυγίζεται ξανά μετά από ξήρανση μέχρι σταθερού βάρους. Σε αυτή την περίπτωση η ικανότητα συγκράτησης νερού είναι μεγαλύτερη από 100 g/g.

### 3.2.8 Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης



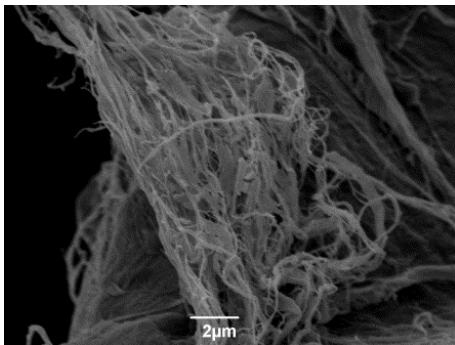


[α]

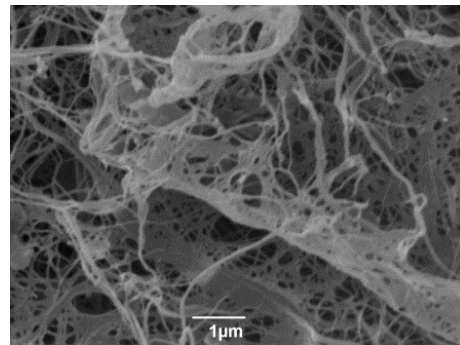


[β]

**Εικόνα 10:** Φωτογραφίες από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης δείγματος βακτηριακής κυτταρίνης ύστερα από 2 ημέρες ζύμωσης με εστίαση 2μm [α] και 1 μm [β].

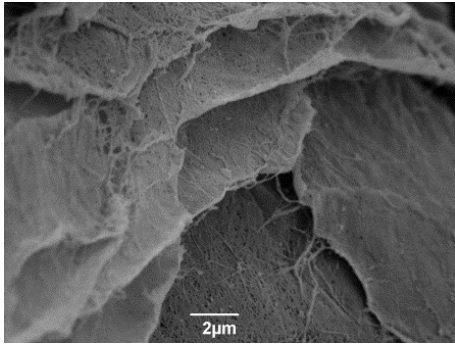


[α]

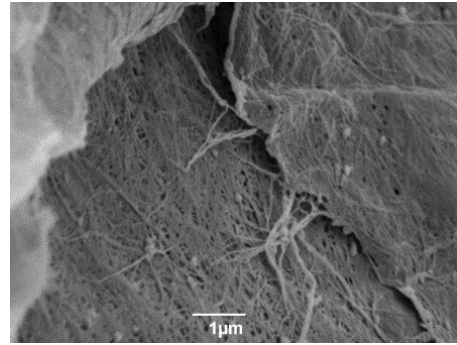


[β]

**Εικόνα 11:** Φωτογραφίες από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης δείγματος βακτηριακής κυτταρίνης ύστερα από 5 ημέρες ζύμωσης με εστίαση 2μm [α] και 1 μm [β].

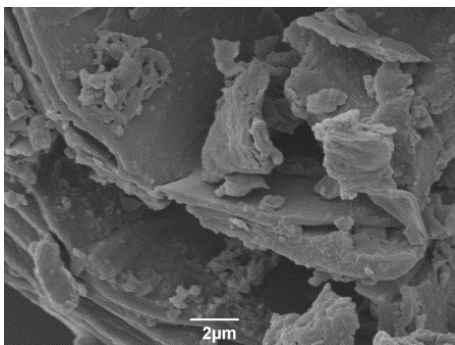


[α]

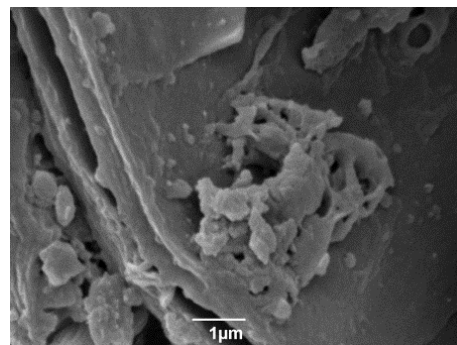


[β]

**Εικόνα 12:** Φωτογραφίες από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης δείγματος βακτηριακής κυτταρίνης ύστερα από 8 ημέρες ζύμωσης με εστίαση 2μm [α] και 1 μm [β].

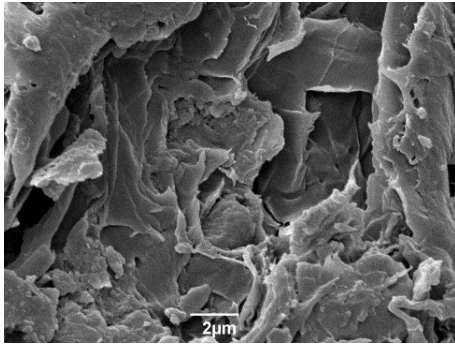


[α]

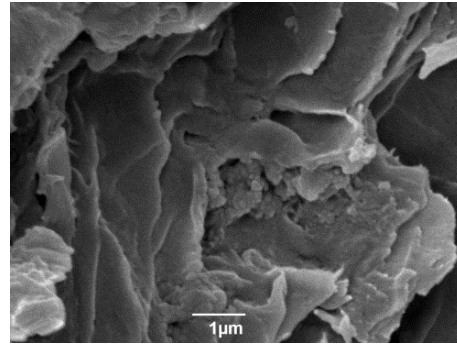


[β]

**Εικόνα 13:** Φωτογραφίες από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης κυτταρινούχας μάζας ύστερα από την συμβατική εκχύλιση πηκτίνης από φλοιούς πορτοκαλιού με εστίαση 2μm [α] και 1 μm [β].



[α]



[β]

**Εικόνα 14:** Φωτογραφίες από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης κυτταρινούχας μάζας ύστερα από την διεργασία OPEC σε φλοιούς πορτοκαλιού με εστίαση 2μm [α] και 1 μm [β].

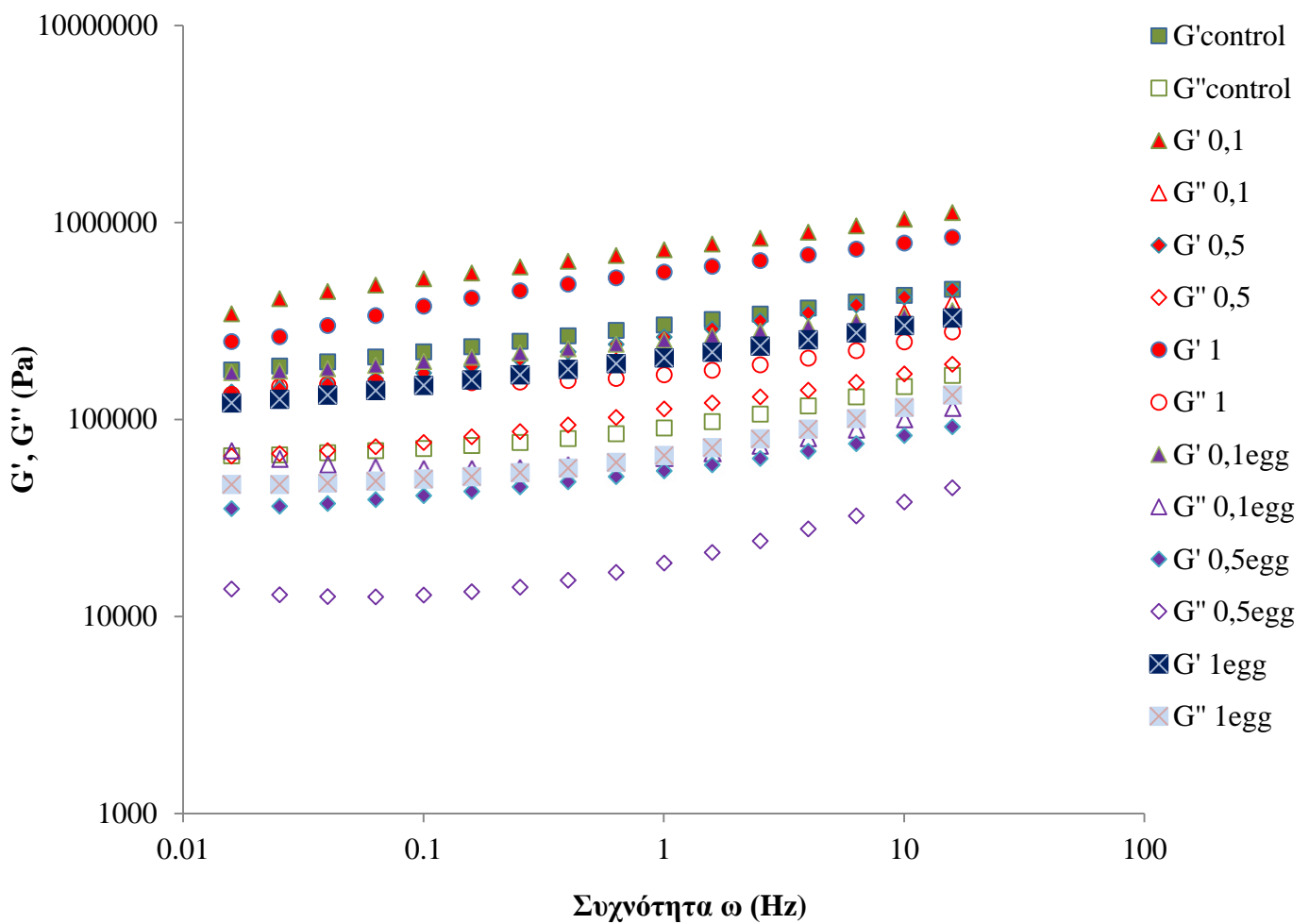
Οι διαφορές των δειγμάτων βακτηριακής κυτταρίνης σε σύγκριση με τα δείγματα κυτταρινούχας μάζας που προκύπτει από τους φλοιούς πορτοκαλιού ύστερα από την συμβατική εκχύλιση πηκτίνης και την εκχύλιση D-λιμονένιου και πηκτίνης με χρήση μικροκυμάτων είναι εμφανείς, χρησιμοποιώντας το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης. Πιο συγκεκριμένα, στις μικρογραφίες των δειγμάτων BC μπορούμε να διακρίνουμε τα ινίδια κυτταρίνης, τον προσανατολισμό τους αλλά και το πλέγμα που δημιουργείται, κάτι που δεν συμβαίνει στα άλλα δύο δείγματα. Αυτό, οφείλεται στο γεγονός ότι η σύσταση των δειγμάτων CAE και OPEC περιλαμβάνει ημικυτταρίνη και λιγνίνη καθιστώντας δυσδιάκριτα τα ινίδια κυτταρίνης.

### 3.3 Ανάπτυξη ζυμαρικών ελεύθερων γλουτένης με βακτηριακή κυτταρίνη

Το ρυζάλευρο αποτελεί βασικό συστατικό για την ανάπτυξη προϊόντων χωρίς γλουτένη. Παρόλο που η γεύση του είναι ήπια και έχει υποαλλεργικές ιδιότητες (Gujral and Rosell, 2004), οι πρωτεΐνες που περιέχει δεν δημιουργούν ιξωδοελαστικό δίκτυο στο ζυμάρι με αποτέλεσμα να είναι απαραίτητη η χρήση δομικών παραγόντων όπως οι διαιτητικές ίνες.

### 3.3.1 Ρεολογικά χαρακτηριστικά ζύμης

Στην παρούσα μελέτη τα τεστ που πραγματοποιήθηκαν αφορούν το δυναμικό ταλαντωτικό πείραμα με εύρος συχνοτήτων από 0,01 έως 10 Hz σε 0,1 % παραμόρφωση και μέτρηση ιξώδους ως συνάρτηση του ρυθμού διάτμησης με εύρος 0,1 - 100 s<sup>-1</sup>. Επιπλέον προσδιορίστηκαν ο ελαστικός (G') και ο ιξώδης (G'') χαρακτήρας του ζυμαριού. Το υλικό, εμφάνισε ιξωδοελαστική συμπεριφορά γέλης, ιδιότητα που χαρακτηρίζει εκαιρετικά δομημένα υλικά. Η τιμή του συντελεστή αποθήκευσης G' ήταν πάντα υψηλότερη από την τιμή του συντελεστή απώλειας G'' σε όλο το φάσμα συχνοτήτων που μελετήθηκαν για κάθε δείγμα.



**Διάγραμμα 9:** Επίδραση διαφορετικών ποσοστών βακτηριακής κυτταρίνης και προενυδάτωσης στον συντελεστή αποθήκευσης ( $G'$ ) και απωλειών ( $G''$ ) της ζύμης.

Η προσθήκη της βακτηριακής κυτταρίνης απευθείας στο μίγμα της ζύμης από το οποίο προκύπτουν τα ζυμαρικά ενίσχυσε την ελαστικότητα της, κάτι που μπορεί να φανεί από την αύξηση του μέτρου ελαστικότητας  $G'$ . Ίδια αποτελέσματα λαμβάνονται και από τους Sozer *et al.*, (2009) που αφορούν ζύμη (ζυμαρικού) που περιέχει ρυζάλευρο ενισχυμένο με κομμι γκουαρ. Σύμφωνα με τους Larrosa *et al.*, (2013) το κόμμι οδήγησε τόσο στην αύξηση της ποσότητας των πολυμερών στο σύστημα όσο και σε αυξημένη ελαστικότητα. Στην περίπτωση της προ-ενυδατωμένης βακτηριακής κυτταρίνης στο αυγό, οι τιμές και των δύο συντελεστών ήταν χαμηλότερες σε σχέση με το δείγμα control. Μια αύξηση στην ποσότητα της BC οδήγησε σε μείωση των τιμών των συντελεστών. Επιπλέον, υπήρξε μια τάση των

συντελεστών  $G''$  να παρουσιάσουν ελάχιστα, γεγονός που οφείλεται στο σχηματισμό δεσμών μεταξύ των πολυμερών που οδήγησε σε τρισδιάστατο δίκτυο ή μπλεγμένα μόρια (Ferry *et al.*, 1980).

Η διαφορετική ρεολογική συμπεριφορά της ζύμης που περιείχε ξηρή BC σε σύγκριση με αυτή που περιείχε προ ενυδατωμένη, θα μπορούσε να αποδοθεί στο επίπεδο διόγκωσης του αμύλου. Ενδεχομένως, στο σύστημα ζύμης που εμπεριέχεται ξηρή BC, η προσθήκη του υγρού (ολόκληρο αυγό) προκάλεσε ταχεία διόγκωση των κόκκων αμύλου, αφού το ρυζάλευρο έχει ικανότητα συγκράτησης νερού της τάξης των 2g νερού/ g δείγματος, σε αντίθεση με την BC που είχε περίπου 0,82g νερού/ g δείγματος. Ως αποτέλεσμα αυτής της διόγκωσης, το σύστημα ζύμης μπορεί να θεωρηθεί ως ένα υλικό στο οποίο οι κόκκοι αμύλου και τα σωματίδια της BC είναι στενά πακεταρισμένα. Στο δεύτερο σύστημα, η προ ενυδάτωση της BC στο αυγό, οδήγησε στο σχηματισμό ζελατινοποιημένης μήτρας με διεσπαρμένα σωματίδια αλεύρου. Ο συντελεστής του πρώτου συστήματος καθορίζεται από τις μηχανικές ιδιότητες των σωματιδίων, ενώ στο δεύτερο σύστημα, ο συντελεστής επηρεάζεται κυρίως από τις μηχανικές ιδιότητες της μήτρας του τζελ (Silva *et al.*, 2013, Walstra *et al.*, 2003).

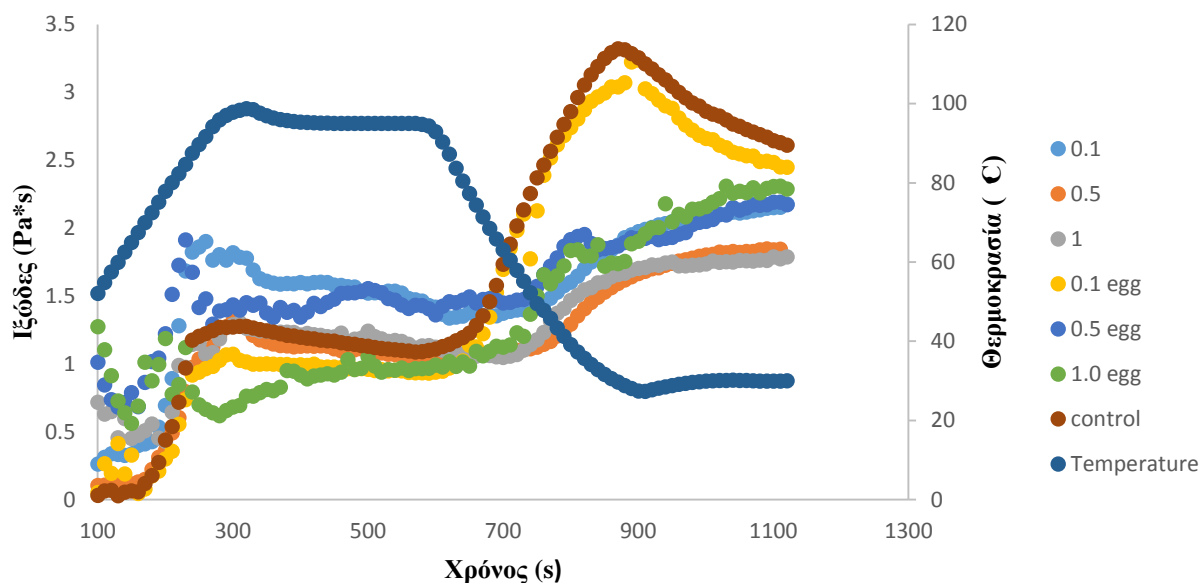
### 3.3.2 Θερμορεολογικές ιδιότητες ζυμαρικών

Οι θερμορεολογικές ιδιότητες μιγμάτων αξιολογούνται μέσω των διαδικασιών ζελατινοποίησης και ζελοποίησης του αμύλου των αλεύρων, οι οποίες επηρεάζονται από την προσθήκη διαφόρων συστατικών στα άλευρα με αποτέλεσμα να μεταβάλλεται και η ποιότητα του τελικού προϊόντος. Για την μέτρηση των θερμορεολογικών ιδιοτήτων του αμύλου τα δείγματα υποβλήθηκαν σε θερμοκρασιακό κύκλο υπό την επίδραση ανάμιξης (διάτμηση) με παράλληλη καταγραφή της μεταβολής του ιξώδους σε συνάρτηση με το χρόνο και τη θερμοκρασία. Το μέγιστο ιξώδες (Peak viscosity- PV) υποδηλώνει την ικανότητα συγκράτησης νερού και την ικανότητα των αμυλοκόκκων να διογκώνονται. Όταν η τιμή μέγιστου ιξώδους είναι χαμηλή αυτό συνεπάγεται μειωμένο ποσοστό εκλυόμενης αμυλόζης, της ουσίας που είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό ισχυρής πηκτής μέσω δεσμών υδρογόνου κατά την ψύξη (Caperuto *et al.*, 2001). Το τελικό

ιξώδες (Final viscosity-FV) υποδηλώνει την ικανότητα του αμύλου να σχηματίζει ισχυρή πηκτή κατά την ψύξη. Στην περίπτωση που η τιμή του τελικού ιξώδους είναι χαμηλή αυτό συνεπάγεται σχηματισμό αδύναμης πηκτής και μειωμένη σκληρότητα προϊόντος (Collar *et al.*, 2006).

Η προσθήκη της βακτηριακής κυτταρίνης και η διαδικασία προενυδάτωσης δεν επηρέασε σημαντικά τις τιμές PV σύμφωνα με την στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε (πίνακας 10). Η τιμή του μέγιστου ιξώδους σε ζυμαρικά με 0,1 % BC χωρίς προενυδάτωση αυξήθηκε κατά 42 % και των ζυμαρικών με 0,5 % ποσοστό προενυδατωμένης BC κατά 13 % συγκριτικά με την τιμή του δείγματος control. Αυξάνοντας την προσθήκη BC στις συνταγές μειώθηκε σημαντικά το τελικό ιξώδες των δειγμάτων. Η απώλεια θερμότητας οδηγεί σε μοριακή αναδιάταξη ή αναδιαμόρφωση, και αυτό σχετίζεται άμεσα με τη συνολική περιεκτικότητα σε αμυλόζη, το μέγεθος του πολυμερούς και την ποσότητα της ελεύθερης αμυλόζης στο άμυλο (Caperuto *et al.*, 2001). Η διαδικασία προενυδάτωσης, διατηρώντας σταθερό το περιεχόμενο σε BC, οδήγησαν σε δείγματα με αυξημένες τιμές τελικού ιξώδους. Πιο συγκεκριμένα η τιμή τελικού ιξώδους ζυμαρικών με 1 % BC χωρίς προενυδάτωση ήταν 1,79 Pa·s, δηλαδή μικρότερη από την τιμή, 2,29 Pa·s, των δειγμάτων με 1 % προενυδατωμένη BC. Σύμφωνα με τους Caperuto *et al.*, (2001), χαμηλά τελικά ιξώδη είναι επιθυμητά για υψηλής ποιότητας μακαρόνια. Στο πλαίσιο αυτό, η χρήση BC σε επίπεδο 1 % , προενυδατωμένη σε αυγό, θα μπορούσε να δώσει ζυμαρικά υψηλής ποιότητας.

Η μεταβολή του ιξώδους ως προς το χρόνο και το θερμοκρασιακό κύκλο που ακολούθησε για τη μελέτη θερμορεολογικών ιδιοτήτων των δειγμάτων παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 24 και οι παράμετροι μέγιστο ιξώδες (PV) και τελικό ιξώδες (FV) που υπολογίστηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα 10.



**Διάγραμμα 10:** Διάγραμμα μεταβολής ιξώδους ως προς το χρόνο και τη θερμοκρασία των δειγμάτων με ή χωρίς προενυδάτωση της κυτταρίνης σε ποσοστά 0,1, 0,5 και 1 % και του δείγματος control.

### 3.3.3 Ποιότητα μαγειρέματος

Ο βέλτιστος χρόνος μαγειρέματος (OCT) για το πρώτο σύστημα ζύμης που περιείχε ξηρή BC παρουσίασε πτωτική τάση (πίνακας 10) σε σχέση με το δείγμα control, ενώ για τη ζύμη που περιέχει προ-ενυδατωμένη BC δεν υπάρχει σαφής σύδεση του OCT. Σύμφωνα με τους Lucisano *et al.*, (2012), ο σχηματισμός της ζύμης και η μακρομοριακή οργάνωση που προκαλείται από τη διαδικασία παραγωγής ζυμαρικών έπαιξε σημαντικό ρόλο στην προσβασιμότητα του νερού μέσα στο προϊόν κατά το μαγείρεμα και ως εκ τούτου και στον OCT. Φάνηκε ότι η προσθήκη ξηρής BC διευκολύνει την διάχυση του νερού μέσω της μήτρας των μακαρονιών, μειώνοντας το χρόνο που χρειάζεται το νερό για να φτάσει στο κέντρο τους και να προκαλέσει ζελατινοποίηση του αμύλου κατά τη διάρκεια της διαδικασίας μαγειρέματος. Ο OCT των ζυμαρικών που περιέχουν προ-ενυδατωμένη BC ήταν υψηλότερος σε σύγκριση με το δείγμα control. Αυτό πιθανόν οφείλεται στο σχηματισμό ενός πηγματος κατά την προ ενυδάτωση της ξηρής BC ή σε πιθανές



αλληλεπιδράσεις μεταξύ της BC και των πρωτεϊνών του αυγού που καθυστερούν τη διάχυση νερού διαμέσου του ζυμαρικού, με αποτέλεσμα την αύξηση του OCT.



**Εικόνα 15:** Ζυμαρικά πριν (αριστερά) και μετά (δεξιά) τον βρασμό στον βέλτιστο χρόνο.

Απώλεια κατά το μαγείρεμα, είναι η ποσότητα των στερεών που μένουν στο νερό κατά το μαγείρεμα των ζυμαρικών και αποτελεί έναν καθοριστικό παράγοντα για την ποιότητα των μακαρονιών, γιατί εκφράζει την αντοχή τους στην αποσύνθεση κατά το βρασμό. Χαμηλές ποσότητες στερεών στο νερό μαγειρέματος δείχνουν ζυμαρικά υψηλής ποιότητας μαγειρέματος (Pagani *et al.*, 2007). Στα ζυμαρικά χωρίς γλουτένη, οι απώλειες των στερεών κατά το μαγείρεμα οφείλονται κυρίως στην διαλυτοποίηση του χαλαρά δεσμευμένου ζελατινοποιημένου αμύλου από την επιφάνεια του προϊόντος. Το φαινόμενο αυτό εξαρτάται κυρίως από το βαθμό της ζελατινοποίησης του αμύλου και τη δύναμη του εκφυλισμένου δικτύου αμύλου που περιβάλλει το ζελατινοποιημένο άμυλο. Κατά τη διάρκεια του μαγειρέματος, μια ασθενές ή ασυνεχής πρωτεϊνική μήτρα οδηγεί σε ένα δίκτυο πρωτεΐνης το οποίο είναι πολύ χαλαρό και επιτρέπει μεγαλύτερη έκπλυση των κόκκων του αμύλου κατά την διάρκεια ζελατινοποίησης (Resmini and Pagani, 1983), οδηγώντας σε αυξημένη απώλεια κατά το μαγείρεμα. Οι Wood *et al.*, (2009) πρότειναν ότι η σύνδεση πρωτεΐνης-πολυσακχαρίτη μπορεί να είναι υπεύθυνη για τη διατήρηση της περιεκτικότητας σε αμυλόζη κατά τη διάρκεια του μαγειρέματος των ζυμαρικών. Η προσθήκη του αυγού σε ζυμαρικά χωρίς γλουτένη οδηγεί σε μείωση των απωλειών κατά το μαγείρεμα, αφού η αλβουμίνη συμβάλλει στο σχηματισμό δικτύου πρωτεΐνης και βελτιώνει τη συγκράτηση του αμύλου από το δίκτυο, και ελαχιστοποιείται η έκπλυση του αμύλου στο νερό μαγειρέματος (Da Silva Fernandes *et al.*, 2013). Όσον

αφορά αυτό το χαρακτηριστικό, όλα τα ζυμαρικά που παράχθησαν δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές και έδειξαν καλή ποιότητα μαγειρέματος αφού παρουσίασαν απώλειες των διαλυτών στερεών μικρότερη από 6% (πίνακας 10). Σύμφωνα με τους Hummel *et al.*, (1966), και Kruger *et al.*, (1996), τα ζυμαρικά που χάνουν έως και 6 % στερεά μπορεί να θεωρηθούν πολύ καλά, έως 8 %, κανονικά, και πάνω από 10 %, κακά. Σύμφωνα με τους Donnelly *et al.*, (1979) το 8 % θεωρείται ως μέγιστη αποδεκτή τιμή για την απώλεια στερεών στο νερό του μαγειρέματος.

Η απορρόφηση νερού από τα ζυμαρικά είναι ένας δείκτης, του νερού που απορροφάται από το άμυλο και τις πρωτεΐνες κατά το μαγείρεμα, και χρησιμοποιείται για τη ζελατινοποίηση του αμύλου και την ενυδάτωση των πρωτεϊνών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του πίνακα 10 συμπεραίνουμε ότι η συγκέντρωση της BC δεν επηρέασε σημαντικά την απορρόφηση του νερού. Οι Silva *et al.*, (2013), ανέφεραν ότι η προσθήκη υδροκολλοειδών με υψηλή ικανότητα συγκράτησης νερού θα μπορούσε να επηρεάζει το βαθμό διόγκωσης των σωματιδίων λαχανικών και των κόκκοι αμύλου και κατ' επέκταση και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των ζυμαρικών. Στην παρούσα μελέτη για όλα τα παρασκευάσματα που περιέχουν BC η ικανότητα συγκράτησης νερού ήταν χαμηλή, κοντά στο 0,8 g H<sub>2</sub>O/g στερεού, σε αντίθεση με τα υδροκολλοειδή που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη των Silva *et al.*, (2013), που οι τιμές τους κυμαίνονται μεταξύ 8 έως 25 gH<sub>2</sub>O/g στερεού. Κατά συνέπεια, η χαμηλή ικανότητα συγκράτησης νερού του BC ίσως δεν επηρέασε τις ιδιότητες ενυδάτωσης των παραγόμενων ζυμαρικών. Ομοίως, η υφή των μαγειρεμένων δειγμάτων δεν επηρεάστηκε από τη συγκέντρωση της BC. Επιπλέον, υπάρχουν διάφορες μελέτες που αναφέρονται στην αύξηση της σκληρότητας των ζυμαρικών κατά την αύξηση της συγκέντρωσης των υδροκολλοειδών ίσως λόγω της δέσμευσης του υδατοδιαλυτού αμύλου από τα υδροκολλοειδή (Raina *et al.*, 2005). Ωστόσο, στη παρούσα μελέτη, η BC παρέμεινε άθικτη κατά τη διάρκεια της διαδικασίας μαγειρέματος (σε αντίθεση με άλλα είδη υδροκολλοειδών, τα οποία διαλύονται στο νερό), με αποτέλεσμα να παραμείνουν ανεπηρέαστες οι οργανοληπτικές ιδιότητες των ζυμαρικών.

### 3.3.4 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Στον πίνακα 10 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των δοκιμών στα ζυμαρικά που αφορούν την ποιότητα μαγειρέματος και τις θερμορρολογικές ιδιότητες. Χρησιμοποιώντας στατιστικά εργαλεία παραμετρικής ανάλυσης (ANOVA), ελέγχθηκε η σημαντικότητα της επίδρασης των σχεδιαστικών παραμέτρων, δηλαδή της περιεκτικότητας των παρασκευασμάτων σε βακτηριακή κυτταρίνη και της προενυδάτωσης της ξηρής βακτηριακής κυτταρίνης. Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιώντας ανάλυση διακύμανσης διπλής κατεύθυνσης (two-way ANOVA) με διάστημα εμπιστοσύνης 95 % αξιολογήθηκε αν οι ανεξάρτητες μεταβλητές διαφέρουν στατιστικά σημαντικά και όπου παρατηρήθηκαν σημαντικές επιδράσεις των σχεδιαστικών παραμέτρων εφαρμόστηκε το κριτήριο Fisher's LSD για τον έλεγχο των διαφορών των μέσων όρων των ιδιοτήτων. Οι στατιστικά σημαντικές σημειώνονται για  $p\text{-value} < 0,05$ .

**Πίνακας 9:** Αποτελέσματα δοκιμών απωλειών κατά το μαγείρεμα, απορρόφησης νερού, σκληρότητας, βέλτιστου χρόνου βρασμού, μέγιστου ιξώδους και τελικού ιξώδους για όλα τα δείγματα και στατιστική ανάλυση.

Προενυδάτωση	Ποσοστό BC (%)	Απώλεια κατά το μαγείρεμα (g/g*%)	Απορρόφηση νερού (g/g*%)	Σκληρότητα (N)	Βέλτιστος χρόνος βρασμού (min)	Μέγιστο ιξώδες – PV (Pa·s)	Τελικό ιξώδες-FV (Pa·s)
0 (no control)	0	2,2322	47,8693	48,3145	10	1,27652	2,60939
0	0,1	1,8956	48,8318	49,1913	13	1,81934	2,17626
0	0,5	1,3506	44,093	47,9616	9	1,31560	1,84351
0	1	1,6731	43,6273	48,896	8	1,30359	1,78758
1 (yes in egg)	0,1	2,4331	45,7689	39,5683	13	1,07179	2,44811
1	0,5	1,4906	39,2792	44,2543	7	1,45033	2,17165
1	1	1,9626	44,7888	49,4409	12	0,81212	2,28762
<b>p-value (προενυδάτωση)</b>		0,1087	0,3341	0,2852		0,2953	0,0333
<b>p-value (ποσοστό BC)</b>		0,0697	0,2961	0,6723		0,6488	0,0450

## 4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι το βακτηριακό στέλεχος *Komagateibacter sucrofermentas* DSM 15973 μεταβόλισε ικανοποιητικά όλα τα θρεπτικά υποστρώματα στα οποία καλλιεργήθηκε. Η χρήση υδρολύματος από φλούδες πορτοκαλιού οδήγησε σε αυξημένη παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης (6,84 g/L) συγκριτικά με το συνθετικό υπόστρωμα σακχαρόζης και το υπόστρωμα που περιείχε υδρόλυμα από ενδοσπέρμιο φοινικόκαρπου (PKC) και ακατέργαστη γλυκερόλη.

Με μια προσεκτική αναζήτηση της βιβλιογραφίας ο συνδιασμός υδρολύματος PKC και ακατέργαστης γλυκερόλης αποτελεί ένα καινοτόμο υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης.

Τα πειραματικά δεδομένα από την σύγκριση βακτηριακής και φυτικής κυτταρίνης έδειξαν ότι η πρώτη χαρακτηρίζεται από υψηλή καθαρότητα και αυτό αποδεικνύεται από τα φάσματα IR, XRD,  $^{13}\text{C}$  NMR, από την ανάλυση TGA και από τις μικρογραφίες που λήφθηκαν από το SEM. Αντιθέτως, τα κυτταρινούχα υπολείμματα που προέκυψαν ύστερα από επεξεργασία των φλοιών πορτοκαλιού με συμβατική όξινη εκχύλιση και εκχυλίσσεις σε αντιδραστήρες μικροκυμάτων περιείχαν ημικυτταρίνη, λιγνίνη και πηκτίνη.

Η θερμοσταθμική ανάλυση έδειξε ότι όλα τα δείγματα είναι σταθερά από θερμική άποψη και ότι το κυτταρινούχο υπόλειμμα της διεργασίας CAE περιείχε μεγαλύτερη ποσότητα πηκτίνης από αυτό της διεργασίας OPEC.

Η παρουσία κορυφών στα  $3240\text{ cm}^{-1}$  και  $3270\text{ cm}^{-1}$  στο φάσμα IR αποδεικνύουν ότι το βακτήριο συνθέτει και τους δύο τύπους κυτταρίνης,  $I_{\alpha}$  και  $I_{\beta}$ , κατά την διαδικασία της ζύμωσης, ενώ η ισχυρή γραμμή συντονισμού του άνθρακα C1 και η μειωμένη ένταση της γραμμής συντονισμού του άνθρακα C4 στο φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR, φανερώνουν ότι στα δείγματα κυριαρχεί ο τύπος κυτταρίνης  $I_{\alpha}$ .

Τα δείγματα CAE και OPEC εμφανίζουν περισσότερες κορυφές απορρόφησης σε όλα τα φάσματα (IR, XRD,  $^{13}\text{C}$  NMR) επειδή περιέχουν περισσότερα συστατικά, καθιστώντας δύσκολο να υπολογιστεί ο πραγματικός δείκτης κρυσταλλικότητας. Χρησιμοποιώντας και τις τρεις παραπάνω αναλυτικές μεθόδους, τα δείγματα βακτηριακής κυτταρίνης εμφάνισαν την μεγαλύτερη κρυσταλλικότητα ( $\approx 88\%$ ), με πιο αξιόπιστα αποτελέσματα να προκύπτουν από την ανάλυση με χρήση ακτίνων-X.

Ο μέγιστος βαθμός πολυμερισμού που εντοπίστηκε ήταν αυτός των δειγμάτων BC (1752 μονάδες άνυδρης γλυκόζης), ενώ τα αποτελέσματα των δειγμάτων CAE και OPEC δεν είναι ξεκάθαρα διότι η κυτταρίνη είναι συνδεδεμένη με ημικυτταρίνη και λιγνίνη και η μέθοδος αφορά την μέτρηση του βαθμού πολυμερισμού αποκλειστικά της κυτταρίνης.

Τέλος, τα δείγματα BC εμφανίζουν μεγαλύτερη ικανότητα συγκράτησης νερού (26,50 g/g) σε σύγκριση με τα δείγματα κυτταρινούχων υπολειμμάτων από τους φλοιούς πορτοκαλιού ( $\approx 7$  g/g) και αυτό οφείλεται στο καθαρό δίκτυο ινών της, που συμβάλει στην πιο αποτελεσματική σύνδεση με τα μόρια του νερού.

Η σύγκριση των δειγμάτων βακτηριακής κυτταρίνης που παράχθηκαν σε διαφορετικούς χρόνους ζύμωσης μέσω των φασμάτων IR,  $^{13}\text{C}$  solid state NMR, XRD, των φωτογραφιών που λήφθηκαν από το SEM και τα δεδομένα της ανάλυσης TGA και του βαθμού πολυμερισμού οδήγησε στο συμπέρασμα πως ο χρόνος ζύμωσης δεν επηρεάζει τη μορφολογία και η δομή του πολυμερούς.

Με βάση τα αποτελέσματα των πειραμάτων που αφορούσαν τα ρεολογικά χαρακτηριστικά και την ποιότητα μαγειρέματος ζυμαρικών ελεύθερων γλουτένης με χρήση ρυζάλευρου και βακτηριακής κυτταρίνης, τα περισσότερα από τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των ζυμαρικών που μετρήθηκαν δεν επηρεάστηκαν σημαντικά από την περιεκτικότητα σε βακτηριακή κυτταρίνη ή τη διαδικασία προενυδάτωσης. Κατά συνέπεια η BC θα μπορούσε να αποτελέσει ένα πολλά υποσχόμενο υλικό για την αύξηση της περιεκτικότητας σε διαιτητικές ίνες των ζυμαρικών χωρίς γλουτένη, χωρίς να επηρεάζονται τα φυσικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος. Ωστόσο, θα πρέπει να διεξαχθεί περαιτέρω έρευνα ώστε να αξιολογηθεί η επίδραση της προσθήκης υψηλότερων ποσοστών BC και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των ενισχυμένων με BC ζυμαρικών χωρίς γλουτένη.

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abdullah, N., Hanita, H., Ho, Y.W., Kudo, H., Julaludin, S. and Ivan, M., 1995. The effects of bentonite on rumen protozoal population and rumen fluid characteristics of sheep fed palm kernel cake. *Asian-Aust. J. Anim. Sci*, 8(3), pp.249-254.

Adesehinwa, A. O. K. (2007). Utilization of palm kernel cake as a replacement for maize in diets of growing pigs: effects on performance, serum metabolites, nutrient digestibility and cost of feed conversion. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 13(5), 591.

Akoğlu, A., Çakır, İ., Akoğlu, İ. T., Karahan, A. G., & Çakmakçı, M. L. (2015). Effect of bacterial cellulose as a fat replacer on some quality characteristics of fat reduced sucuk. *Gıda /The Journal of FOOD*, 40(3).

Algar, I., Fernandes, S., Mondragon, G., Castro, C., Garcia-Astrain, C., Gabilondo, N., & Eceiza, A. (2015). Pineapple agroindustrial residues for the production of high value bacterial cellulose with different morphologies. *Journal of Applied Polymer Science*, 132(1).

Alimon, A. R. (2004). The nutritive value of palm kernel cake for animal feed. *Palm Oil Dev*, 40(1), 12-14.

Angenent, L. T., Karim, K., Al-Dahhan, M. H., Wrenn, B. A., & Domínguez-Espinosa, R. (2004). Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. *TRENDS in Biotechnology*, 22(9), 477-485.

Ashby, R. D., Solaiman, D. K., & Foglia, T. A. (2004). Bacterial poly (hydroxyalkanoate) polymer production from the biodiesel co-product stream. *Journal of Polymers and the Environment*, 12(3), 105-112.

Bagaria, A. (2014). Isolation and characterization of mesoporous cellulose from citrus and mango waste (Doctoral dissertation, University of York).

Brady P.L., Mayer S.M. 1985. Correlations of sensory and instrumental measures of bread texture, *Cereal Chemistry*, 62, 70-72.

Brett, C. T. (2000). Cellulose microfibrils in plants: biosynthesis, deposition, and integration into the cell wall. *International review of cytology*, 199, 161-199.

Brown, A. J. (1886). XLIII.—On an acetic ferment which forms cellulose. *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 49, 432-439.

Brown, R. M. (1987). The biosynthesis of cellulose. *Food Hydrocolloids*, 1(5), 345-351.

Brown, R. M., Willison, J. H., & Richardson, C. L. (1976). Cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: visualization of the site of synthesis and direct measurement of the in vivo process. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(12), 4565-4569.

Browne Jr, C. A. (1906). The fermentation of sugar-cane products. 1. *Journal of the American Chemical Society*, 28(4), 453-469.

C.S. Raina, S. Singh, A.S. Bawa and D.C. Saxena. Textural characteristics of pasta made from rice flour supplemented with proteins and hydrocolloids. *Journal of Texture Studies* 36 (2005) 402–420.

Carreira, P., Mendes, J. A., Trovatti, E., Serafim, L. S., Freire, C. S., Silvestre, A. J., & Neto, C. P. (2011). Utilization of residues from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose. *Bioresource technology*, 102(15), 7354-7360.

Carreira, P., Mendes, J.A., Trovatti, E., Serafim, L.S., Freire, C.S., Silvestre, A.J. and Neto, C.P., 2011. Utilization of residues from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose. *Bioresource technology*, 102(15), pp.7354-7360.

Chanjula, P., Siriwithananukul, Y. and Lawpetchara, A., 2011. Effect of feeding rubber seed kernel and palm kernel cake in combination on nutrient utilization, rumen fermentation characteristics, and microbial populations in goats fed on *Briachiararia humidicola* hay-based diets. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 24(1), pp.73-81.

Chatzifragkou, A., Papanikolaou, S., Dietz, D., Doulgeraki, A. I., Nychas, G. J. E., & Zeng, A. P. (2011). Production of 1, 3-propanediol by *Clostridium butyricum* growing

on biodiesel-derived crude glycerol through a non-sterilized fermentation process. *Applied microbiology and biotechnology*,91(1), 101-112.

Chawla, P. R., Bajaj, I. B., Survase, S. A., & Singhal, R. S. (2009). Microbial cellulose: fermentative production and applications. *Food Technology and Biotechnology*, 47(2), 107-124.

Chen, L., Hong, F., Yang, X. X., & Han, S. F. (2013). Biotransformation of wheat straw to bacterial cellulose and its mechanism. *Bioresource technology*, 135, 464-468.

Cleenwerck, I., De Vos, P., & De Vuyst, L. (2010). 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. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*,60(10), 2277-2283.

Collar C., Santos E., Rosell C. M. 2006. Significance of Dietary Fiber on the Viscosimetric Pattern of Pasted and Gelled Flour-Fiber Blends. *American Association of Cereal Chemists*, 83, (4), 370-376.

Colvin, J. R., & Beer, M. (1960). The formation of cellulose microfibrils in suspensions of *Acetobacter xylinum*. *Canadian journal of microbiology*, 6(6), 631-637.

Czaja, W., Krystynowicz, A., Bielecki, S., & Brown, R. M. (2006). Microbial cellulose—the natural power to heal wounds. *Biomaterials*, 27(2), 145-151.

Czaja, W., Romanovicz, D., & Malcolm Brown, R. (2004). Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture. *Cellulose*, 11(3-4), 403-411.

De Iannino, N. I., Couso, R. O., & Dankert, M. A. (1988). Lipid-linked intermediates and the synthesis of acetan in *Acetobacter xylinum*. *Microbiology*, 134(6), 1731-1736.

Delazar, A., Nahar, L., Hamedeyazdan, S., & Sarker, S. D. (2012). Microwave-assisted extraction in natural products isolation. *Natural products isolation*, 89-115.

Delmer, D. P., & Amor, Y. (1995). Cellulose biosynthesis. *The Plant Cell*,7(7), 987.



Donnelly, B.J. (1979). Pasta products: Raw material, Technology, Evaluation. *The Macaroni Journal*, 61, 6–18.

Driemeier, C., & Francisco, L. H. (2014). X-ray diffraction from faulted cellulose I constructed with mixed I $\alpha$ –I $\beta$  stacking. *Cellulose*, 21(5), 3161-3169.

E. Silva, M. Birkenhake, E. Scholten, L.M.C. Sagis\*, E. van der Linden. 2013. Controlling rheology and structure of sweet potato starch noodles with high broccoli powder content by hydrocolloids. *Food Hydrocolloids* 30, 42-52.

Embuscado, M. E., Marks, J. S., & Bemiller, J. N. (1994). Bacterial cellulose. I. Factors affecting the production of cellulose by *Acetobacter xylinum*. *Food Hydrocolloids*, 8(5), 407-418.

Esa, F., Tasirin, S. M., & Rahman, N. A. (2014). Overview of bacterial cellulose production and application. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 2, 113-119.

Fasano A., Catassi, C. 2001. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. *Gastroenterology* 120, 636-651.

Ferry, J.D., 1980. *Viscoelastic Properties of Polymers*. John Wiley & Sons, New York.

Freitas, F., Alves, V. D., & Reis, M. A. (2011). Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. *Trends in biotechnology*, 29(8), 388-398.

Garcia-Ochoa, F., Santos, V. E., Casas, J. A., & Gomez, E. (2000). Xanthan gum: production, recovery, and properties. *Biotechnology advances*, 18(7), 549-579.

Guo, X., Cavka, A., Jönsson, L. J., & Hong, F. (2013). Comparison of methods for detoxification of spruce hydrolysate for bacterial cellulose production. *Microbial cell factories*, 12(1), 1.

Ha, J. H., Shehzad, O., Khan, S., Lee, S. Y., Park, J. W., Khan, T., & Park, J. K. (2008). Production of bacterial cellulose by a static cultivation using the waste from beer culture broth. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 25(4), 812-815.

Haigler, C.H., Weimer P.J. "Biosynthesis and Biodegradation of Cellulose" CRC Press. 1991. p. 100.

Hestrin, S., & Schramm, M. (1954). Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *Biochemical Journal*, 58(2), 345.

Hong, F., & Qiu, K. (2008). 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. *Carbohydrate Polymers*, 72(3), 545-549.

Hong, F., Guo, X., Zhang, S., Han, S. F., Yang, G., & Jönsson, L. J. (2012). Bacterial cellulose production from cotton-based waste textiles: enzymatic saccharification enhanced by ionic liquid pretreatment. *Bioresource Technology*, 104, 503-508.

Houben, A., Höchstätter, A., & Becker, T. (2012). Possibilities to increase the quality in gluten-free bread production: an overview. *European food research and technology*, 235(2), 195-208.

Houk, V. S. (1992). The genotoxicity of industrial wastes and effluents: a review. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 277(2), 91-138.

Huang, C., Yang, X. Y., Xiong, L., Guo, H. J., Luo, J., Wang, B., ... & Chen, X. D. (2015). Evaluating the possibility of using acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation wastewater for bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus*. *Letters in applied microbiology*, 60(5), 491-496.

Huber, T., Müssig, J., Curnow, O., Pang, S., Bickerton, S., & Staiger, M. P. (2012). A critical review of all-cellulose composites. *Journal of Materials Science*, 47(3), 1171-1186.

Hummel, C. (1966). *Macaroni Products: Manufacture Processing and Packing*. London, UK: Food Trade.

Iguchi, M., Yamanaka, S., & Budhiono, A. (2000). Bacterial cellulose—a masterpiece of nature's arts. *Journal of Materials Science*, 35(2), 261-270.

Ito, T., Nakashimada, Y., Senba, K., Matsui, T., & Nishio, N. (2005). Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. *Journal of bioscience and bioengineering*, 100(3), 260-265.

Johnson, D. C., & Neogi, A. N. (1989). U.S. Patent No. 4,863,565. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Jonas, R., & Farah, L. F. (1998). Production and application of microbial cellulose. *Polymer Degradation and Stability*, 59(1), 101-106.

Jørgensen, H., Sanadi, A.R., Felby, C., Lange, N.E.K., Fischer, M. and Ernst, S., 2010. Production of ethanol and feed by high dry matter hydrolysis and fermentation of palm kernel press cake. *Applied biochemistry and biotechnology*, 161(1-8), pp.318-332.

Kachrimanidou, V., Kopsahelis, N., Chatzifragkou, A., Papanikolaou, S., Yanniotis, S., Kookos, I., & Koutinas, A. A. (2013). Utilisation of by-products from sunflower-based biodiesel production processes for the production of fermentation feedstock. *Waste and Biomass Valorization*, 4(3), 529-537.

Keshk, S. M. (2014). Bacterial cellulose production and its industrial applications. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, 4(2), 1.

Klemm, D., Kramer, F., Moritz, S., Lindström, T., Ankerfors, M., Gray, D., & Dorris, A. (2011). Nanocelluloses: A New Family of Nature-Based Materials. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(24), 5438-5466.

Klemm, D., Schumann, D., Udhardt, U., & Marsch, S. (2001). Bacterial synthesized cellulose—artificial blood vessels for microsurgery. *Progress in Polymer Science*, 26(9), 1561-1603.

Kongruang, S. (2008). Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* strains from agricultural waste products. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 148(1-3), 245-256.

Korus J., Grzelak K., Achremowicz K., Sabat R. 2006. Influence of Prebiotic Additions on the Quality of Gluten-free bread and on the Content of Inulin and Fructooligosaccharides. *Food Science and Technology International* 12 (6), 489-495.

- Koutinas, A., Belafi-Bako, K., Kabiri-Badr, A., Toth, A., Gubicza, L., & Webb, C. (2001). Enzymatic hydrolysis of polysaccharides: hydrolysis of starch by an enzyme complex from fermentation by *Aspergillus awamori*. *Food and bioproducts processing*, 79(1), 41-45.
- Kruger, J.E., Matsuo, R.B. & Dick, J.W. (1996). *Pasta and Noodle Technology*. St. Paul, MN: American Association of Cereal Chemists.
- Krystynowicz, A., Czaja, W., Wiktorowska-Jeziarska, A., Gonçaves-Miśkiewicz, M., Turkiewicz, M., & Bielecki, S. (2002). Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 29(4), 189-195.
- Kumbhar, J. V., Rajwade, J. M., & Paknikar, K. M. (2015). Fruit peels support higher yield and superior quality bacterial cellulose production. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(16), 6677-6691.
- Kurosumi, A., Sasaki, C., Yamashita, Y. and Nakamura, Y., 2009. Utilization of various fruit juices as carbon source for production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* NBRC 13693. *Carbohydrate Polymers*, 76(2), pp.333-335.
- Kurosumi, A., Sasaki, C., Yamashita, Y., & Nakamura, Y. (2009). Utilization of various fruit juices as carbon source for production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* NBRC 13693. *Carbohydrate Polymers*, 76(2), 333-335.
- Larrosa, V., Lorenzo, G., Zaritzky, N., & Califano, A. (2013). Optimization of rheological properties of gluten-free pasta dough using mixture design. *Journal of Cereal Science*, 57(3), 520-526.
- Lawal, T.E., Iyayi, E.A., Adeniyi, B.A. and Adaramoye, O.A., 2010. Biodegradation of palm kernel cake with multienzyme complexes from fungi and its feeding value for broilers. *Int. J. Poult. Sci*, 9(7), pp.695-701.
- Lazaridou, A., Duta, D., Papageorgiou, M., Belc, N., & Biliaderis, C. G. (2007). Effects of hydrocolloids on dough rheology and bread quality parameters in gluten-free formulations. *Journal of food engineering*, 79(3), 1033-1047.

Lee, P. C., Lee, W. G., Lee, S. Y., & Chang, H. N. (2001). Succinic acid production with reduced by-product formation in the fermentation of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* using glycerol as a carbon source. *Biotechnology and Bioengineering*, 72(1), 41-48.

Lestari, P., Elfrida, N., Suryani, A., & Suryadi, Y. (2014). Study on the production of bacterial cellulose from *Acetobacter xylinum* using agro-waste. *Jordan J Biol Sci*, 7, 75-80.

Li, Z., Wang, L., Hua, J., Jia, S., Zhang, J., & Liu, H. (2015). Production of nano bacterial cellulose from waste water of candied jujube-processing industry using *Acetobacter xylinum*. *Carbohydrate polymers*, 120, 115-119.

Lie, S. (1973). The ebc-ninhydrin method for determination of free alpha amino nitrogen. *Journal of the Institute of Brewing*, 79(1), 37-41.

Lin, C. S. K., Pfaltzgraff, L. A., Herrero-Davila, L., Mubofu, E. B., Abderrahim, S., Clark, J. H., ... & Thankappan, S. (2013). Food waste as a valuable resource for the production of chemicals, materials and fuels. Current situation and global perspective. *Energy & Environmental Science*, 6(2), 426-464.

Lin, D., Lopez-Sanchez, P., Li, R., & Li, Z. (2014). Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* CGMCC 3917 using only waste beer yeast as nutrient source. *Bioresource technology*, 151, 113-119.

Lin, K. W., & Lin, H. Y. (2004). Quality Characteristics of Chinese-style Meatball Containing Bacterial Cellulose (Nata). *Journal of food science*, 69(3), SNQ107-SNQ111.

Liu Z., Scanlon M. G. 2003. Predicting mechanical properties of bread crumb. *Food and bioproducts Processing*, 81 (3), 224-238.

Luciana C Caperuto, Jaime Amaya-Farfan and Celina RO Camargo. 2001. Performance of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) flour in the manufacture of gluten-free spaghetti. *Journal of the Science of Food and Agriculture* Volume 81, Issue 1, pages 95–101.

Lynd, L. R., Weimer, P. J., Van Zyl, W. H., & Pretorius, I. S. (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and molecular biology reviews*, 66(3), 506-577.

Mansencal, R. *Polymer Data Handbook*, 2nd ed.; Mark, J.E., Ed.; Oxford University Press: New York, NY, USA, 1999; pp. 3–48.

Masaoka, S., Ohe, T., & Sakota, N. (1993). Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum*. *Journal of fermentation and bioengineering*, 75(1), 18-22.

Matsuo, R. R., et al. "The role of lipids in determining spaghetti cooking quality." *Cereal Chem* 63.6 (1986): 484-489.

Meg da Silva Fernandes\*; Georgia Ane Raquel Sehn; Maria Gabriela Vernaza Leoro; Yoon Kil Chang; Caroline Joy Steel. 2013. Effect of adding unconventional raw materials on the technological properties of rice fresh pasta. *Food Sci. Technol, Campinas*, 33(2): 257-264

Moon, S. H., Park, J. M., Chun, H. Y., & Kim, S. J. (2006). Comparisons of physical properties of bacterial celluloses produced in different culture conditions using saccharified food wastes. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 11(1), 26-31.

Ng, C. C., & Shyu, Y. T. (2004). Development and production of cholesterol-lowering *Monascus-nata* complex. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(9), 875-879.

Ofori-Boateng, C. and Lee, K.T., 2013. Sustainable utilization of oil palm wastes for bioactive phytochemicals for the benefit of the oil palm and nutraceutical industries. *Phytochemistry reviews*, 12(1), pp.173-190.

Okiyama, A., Motoki, M., & Yamanaka, S. (1993). Bacterial cellulose IV. Application to processed foods. *Food hydrocolloids*, 6(6), 503-511.

O'Neill Skinner, P., & Cannon, R. E. (2000). *Acetobacter xylinum*: An inquiry into cellulose biosynthesis. *The American Biology Teacher*, 62(6), 442-444.

Pagani, M.A., Lucisano, M., Mariotti, M., 2007. Traditional Italian products from wheat and other starchy flours. In: Hui, Y.H. (Ed.), *Handbook of Food Products Manufacturing*. John Wiley-Interscience of New York.

- Pfaltzgraff, L. (2014). The study & development of an integrated & additive-free waste orange peel biorefinery (Doctoral dissertation, University of York).
- Pfaltzgraff, L. A., Cooper, E. C., Budarin, V., & Clark, J. H. (2013). Food waste biomass: a resource for high-value chemicals. *Green Chemistry*, 15(2), 307-314.
- Puppi, D., Chiellini, F., Piras, A. M., & Chiellini, E. (2010). Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Progress in Polymer Science*, 35(4), 403-440.
- Ramana, K. V., Tomar, A., & Singh, L. (2000). Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by *Acetobacter xylinum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(3), 245-248.
- Resmini, P., & Pagani, M. A. (1983). Ultrastructure studies of pasta. *Food Microstructure*, 2, 1.
- Richmond, P. A. (1991). Occurrence and functions of native cellulose. *Biosynthesis and biodegradation of cellulose*, 5-23.
- Ross, P., Mayer, R., & Benziman, M. (1991). Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiological reviews*, 55(1), 35-58.
- Sabbatini, S., Sanchez, H. D., de la Torre, M. A., & Osella, C. A. (2014). Design of a premix for making gluten free noodles. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*, 3, 488-492.
- Schrecker, S. T., & Gostomski, P. A. (2005). Determining the water holding capacity of microbial cellulose. *Biotechnology letters*, 27(19), 1435-1438.
- Sherif, M.A.S., 2005. Evaluation of different carbon sources for bacterial cellulose production. *African Journal of Biotechnology*, 4(6), p.478.
- Shi, Q. S., Feng, J., Li, W. R., Zhou, G., Chen, A. M., Ouyang, Y. S., & Chen, Y. B. (2013). Effect of different conditions on the average degree of polymerization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter intermedius* BC-41. *Cell. Chem. Technol*, 47, 503-508.
- Shi, Z., Zhang, Y., Phillips, G. O., & Yang, G. (2014). Utilization of bacterial cellulose in food. *Food hydrocolloids*, 35, 539-545.

Shoda, M., & Sugano, Y. (2005). Recent advances in bacterial cellulose production. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 10(1), 1-8.

Son, H. J., Kim, H. G., Kim, K. K., Kim, H. S., Kim, Y. G., & Lee, S. J. (2003). Increased production of bacterial cellulose by *Acetobacter* sp. V6 in synthetic media under shaking culture conditions. *Bioresource Technology*, 86(3), 215-219.

Song, H. J., Li, H., Seo, J. H., Kim, M. J., & Kim, S. J. (2009). Pilot-scale production of bacterial cellulose by a spherical type bubble column bioreactor using saccharified food wastes. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 26(1), 141-146.

Sozer, N., 2009. Rheological properties of rice pasta dough supplemented with proteins and gums. *Food Hydrocolloids* 23 (3), 849-855.

Sozer, N., 2009. Rheological properties of rice pasta dough supplemented with proteins and gums. *Food Hydrocolloids* 23 (3), 849-855.

Sundu, B., Kumar, A. and Dingle, J., 2006. Palm kernel meal in broiler diets: effect on chicken performance and health. *World's Poultry Science Journal*, 62(02), pp.316-325.

Svensson, A., Nicklasson, E., Harrah, T., Panilaitis, B., Kaplan, D. L., Brittberg, M., & Gatenholm, P. (2005). Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. *Biomaterials*, 26(4), 419-431.

Tabi, A.N.M., Zakil, F.A., Fauzai, W.N.F.M., Ali, N. and Hassan, O., 2008. The usage of empty fruit bunch (EFB) and palm pressed fibre (PPF) as substrates for the cultivation of *Pleurotus ostreatus*. *Jurnal Teknologi*, 49, pp.189-196.

Tarr, H. L. A., & Hibbert, H. (1931). Studies on reactions relating to carbohydrates and polysaccharides. XXXV. Polysaccharide synthesis by the action of *Acetobacter xylinus* on carbohydrates and related compounds. *Canadian Journal of Research*, 4(4), 372-388.

Thompson T. 2000. Folate, iron and dietary fiber contents of the gluten free diet. *Journal of the American Dietetic Association*, 100, 1389-1395.



Tilman, D., Cassman, K. G., Matson, P. A., Naylor, R., & Polasky, S. (2002). Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature*, 418(6898), 671-677.

Toda, K., Asakura, T., Fukaya, M., Entani, E. and Kawamura, Y., 1997. Cellulose production by acetic acid-resistant *Acetobacter xylinum*. *Journal of fermentation and bioengineering*, 84(3), pp.228-231.

Tonouchi, N., Yanase, H., Kojima, Y., TSUCHIDA, T., YOSHINAGA, F. and HORINOUCI, S., 1998. Increased cellulose production from sucrose with reduced levan accumulation by an *Acetobacter* strain harboring a recombinant plasmid. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 62(5), pp.833-836.

Toyosaki, H., Kojima, Y., Tsuchida, T., Hoshino, K. I., Yamada, Y., & Yoshinaga, F. (1995). The characterization of an acetic acid bacterium useful for producing bacterial cellulose in agitation cultures: The proposal of *Acetobacter xylinum* subsp. *sucrofermentans* subsp. nov. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 41(4), 307-314.

Toyosaki, H., Naritomi, T., Seto, A., Matsuoka, M., Tsuchida, T. and Yoshinaga, F., 1995. Screening of bacterial cellulose-producing *Acetobacter* strains suitable for agitated culture. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 59(8), pp.1498-1502.

Toyosaki, H., Naritomi, T., Seto, A., Matsuoka, M., Tsuchida, T., & Yoshinaga, F. (1995). Screening of bacterial cellulose-producing *Acetobacter* strains suitable for agitated culture. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 59(8), 1498-1502.

Tsouko, E., Kourmentza, C., Ladakis, D., Kopsahelis, N., Mandala, I., Papanikolaou, S., ... & Koutinas, A. (2015). Bacterial cellulose production from industrial waste and by-product streams. *International journal of molecular sciences*, 16(7), 14832-14849.

Valla, S., Coucheron, D. H., Fjærvik, E., Kjosbakken, J., Weinhouse, H., Ross, P., ... & Benziman, M. (1989). Cloning of a gene involved in cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: complementation of cellulose-negative mutants by the UDPG pyrophosphorylase structural gene. *Molecular and General Genetics MGG*, 217(1), 26-30.

- Vandamme, E. J., De Baets, S., Vanbaelen, A., Joris, K., & De Wulf, P. (1998). Improved production of bacterial cellulose and its application potential. *Polymer Degradation and Stability*, 59(1), 93-99.
- Vazquez, A., Foresti, M. L., Cerrutti, P., & Galvagno, M. (2013). Bacterial cellulose from simple and low cost production media by *Gluconacetobacter xylinus*. *Journal of Polymers and the Environment*, 21(2), 545-554.
- Vazquez, A.; Foresti, M.L.; Cerrutti, P.; Galvagno, M. Bacterial cellulose from simple and low cost production media by *Gluconacetobacter xylinus*. *J. Polym. Environ.* **2013**, 21, 545–554.
- Virginia Larrosa, Gabriel Lorenzo, Noemi Zaritzky , Alicia Califano. 2013. Optimization of rheological properties of gluten-free pasta dough using mixture design. *Journal of Cereal Science* 57 , 520-526.
- Wachirasiri, P., Julakarangka, S., & Wanlapa, S. (2009). The effects of banana peel preparations on the properties of banana peel dietary fibre concentrate. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 31(6), 605-611.
- Walstra, P. (2003). *Physical chemistry of foods*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Watanabe, K., Tabuchi, M., Morinaga, Y., & Yoshinaga, F. (1998). Structural features and properties of bacterial cellulose produced in agitated culture. *Cellulose*, 5(3), 187-200.
- Williams, W. S., & Cannon, R. E. (1989). Alternative environmental roles for cellulose produced by *Acetobacter xylinum*. *Applied and environmental microbiology*, 55(10), 2448-2452.
- Wood, A. 2009. Texture, processing and organoleptic properties of chickpea fortified spaghetti with insights to the underlying mechanisms of traditional durum pasta quality. *Journal of Cereal Science* 49: 128–133.
- Wu, J. M., & Liu, R. H. (2012). Thin stillage supplementation greatly enhances bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus*. *Carbohydrate polymers*, 90(1), 116-121.

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).

Yamanaka, S., & Sugiyama, J. (2000). Structural modification of bacterial cellulose. *Cellulose*, 7(3), 213-225.

Yoshinaga, F., Tonouchi, N., & Watanabe, K. (1997). Research progress in production of bacterial cellulose by aeration and agitation culture and its application as a new industrial material. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 61(2), 219-224.

Zaar, K. (1977). Biogenesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. *Cytobiologie*, 16(1), 1-15.

Zeng, X., Small, D. P., & Wan, W. (2011). Statistical optimization of culture conditions for bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* BPR 2001 from maple syrup. *Carbohydrate Polymers*, 85(3), 506-513.

Μακρυδάκη, Έ. Γ., & Makrydaki, E. G. (2013). Ενζυμική μετεστεροποίηση οξικής κυτταρίνης με στόχο την βιοτεχνολογική της αξιοποίηση.

Τσαγκαράκου, Κ. Δ. (2015). Επίδραση πρωτεϊνών και διαιτητικών ινών φυτικής προέλευσης στην ανάπτυξη προϊόντων ελεύθερων γλουτένης με βελτιωμένα ποιοτικά χαρακτηριστικά.

Τσούκο, Ε. Λ. (2015). Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης από ανανεώσιμες πρώτες ύλες της βιομηχανίας τροφίμων και της βιομηχανίας παραγωγής βιοντίζελ.