



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

"Μελέτη παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης με χρήση αποβλήτων από διεργασίες επεξεργασίας εσπεριδοειδών και αξιοποίησή της ως μέσο ακινητοποίησης μικροοργανισμών προς παραγωγή ηλεκτρικού οξέος"



Π.Μ.Σ : Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του Ανθρώπου

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: Επεξεργασία και Συντήρηση Τροφίμων

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: Ιωάννα Μαντάλα

ΣΟΦΙΑ Κ. ΜΑΡΑΓΚΟΥΔΑΚΗ

ΑΘΗΝΑ 2017

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

"Μελέτη παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης με χρήση αποβλήτων από διεργασίες επεξεργασίας εσπεριδοειδών και αξιοποίησή της ως μέσο ακινητοποίησης μικροοργανισμών προς παραγωγή ηλεκτρικού οξέος"

Π.Μ.Σ : Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του Ανθρώπου

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: Επεξεργασία και Συντήρηση Τροφίμων

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: Ιωάννα Μαντάλα

Σοφία Κ. Μαραγκουδάκη

Αθήνα 2017

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

"Μελέτη παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης με χρήση αποβλήτων από διεργασίες επεξεργασίας εσπεριδοειδών και αξιοποίησή της ως μέσο ακινητοποίησης μικροοργανισμών προς παραγωγή ηλεκτρικού οξέος"

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ : Ιωάννα Μαντάλα

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ : Ιωάννα Μαντάλα (Αναπληρώτρια Καθηγήτρια)

Αποστόλης Κουτίνης (Επίκουρος Καθηγητής)

Νικόλαος Στοφόρος (Καθηγητής)

Σοφία Κ. Μαραγκουδάκη

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε στα πλαίσια του Π.Μ.Σ «Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του ανθρώπου» του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και έλαβε χώρα στα εργαστήρια «Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων» και «Μηχανικής Τροφίμων, Επεξεργασίας και Συντήρησης Γεωργικών Προϊόντων». Πρωτίστως θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Ιωάννα Μαντάλα και κ. Αποστόλη Κουτίνα για την ανάθεση ενός τόσο ενδιαφέροντος και πρωτότυπου θέματος ως αντικείμενο της μεταπτυχιακής μου μελέτης, την άψογη συνεργασία μας καθώς και για την εμπιστοσύνη που έδειξαν στο πρόσωπό μου. Τις θερμότερες ευχαριστίες μου θα ήθελα να εκφράσω στους υποψήφιους Διδάκτορες κ. Ερμίντα Τσούκο και κ. Δημήτρη Λαδάκη για την πολύτιμη βοήθεια και στήριξη που μου παρείχαν καθ' όλη την διάρκεια της εκπόνησης της μελέτης αυτής. Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην οικογένειά μου και σε όλους όσους ήταν δίπλα μου και με στήριζαν καθ' όλη την διάρκεια του μεταπτυχιακού μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η κυτταρίνη αποτελεί το πιο άφθονο βιοπολυμερές στη γη. Αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος του κυτταρικού τοιχώματος των φυτικών ιστών και παράλληλα μπορεί να παραχθεί μέσω μικροβιακών ζυμώσεων κυρίως από βακτηριακά στελέχη του γένους *Acetobacter*. Το πολυμερές αυτό έχει βρει πλήθος εφαρμογών σε βιομηχανίες τροφίμων, καλλυντικών, χάρτου, κλωστοϋφαντουργίας καθώς και σε τομείς όπως η Ιατρική και η φαρμακευτική.

Στην παρούσα μελέτη, αξιολογήθηκε αρχικά η δυνατότητα παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης από το βακτηριακό στέλεχος *Komogateibacter sucrofermentans* αξιοποιώντας απόβλητα της βιομηχανίας επεξεργασίας εσπεριδοειδών. Οι ανανεώσιμες πρώτες ύλες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν λεμόνια, πορτοκάλια και γκρέιπφρουτ και ο *K. sucrofermentans* αναπτύχθηκε σε χυμούς αυτών όπως και σε εκχυλίσματα που προέκυψαν μετά από κατάλληλη επεξεργασία της φλούδας και της πούλπας ύστερα από την εξαγωγή του χυμού. Η παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης αξιολογήθηκε επιπλέον σε διάφορες συνθετικές πηγές άνθρακα που προέρχονται από την χημική ή ενζυμική υδρόλυση της λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας όπως ξυλόζη, μαννόζη, αραβινόζη και γαλακτόζη.

Η βάση για όλες τις βακτηριακές ζυμώσεις ήταν το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας Hestrin–Schramm (HS-γλυκόζη) όπου η ποσότητα των σακχάρων είναι 20g/L και η ποσότητα του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων 385 mg/L. Η μέγιστη παραγωγή κυτταρίνης επιτεύχθηκε όταν ο *K. sucrofermentans* αναπτύχθηκε σε θρεπτικά υποστρώματα χυμού γκρέιπφρουτ και εκχύλισμα λεμονιού με αντίστοιχες συγκεντρώσεις 6,71 g/L και 5,74 g/L και αποδόσεις 0,61 g/g 0,28 g/g αντίστοιχα. Η ξυλόζη, η μαννόζη και η αραβινόζη δεν μεταβολίστηκαν επαρκώς από το βακτηριακό στέλεχος οδηγώντας σε χαμηλή παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης με αντίστοιχες τιμές 0,81 g/L, 1,13 g/L και 1,58 g/L, στο υπόστρωμα της γαλακτόζης η παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης ήταν η μέγιστη με συγκέντρωση 3,22 g/L.

Επιπλέον, μελετήθηκε η αξιοποίηση της βακτηριακής κυτταρίνης ως φορέας ακινητοποίησης για το βακτηριακό στέλεχος *Actinobacillus succinogenes* προς παραγωγή ηλεκτρικού οξέος. Πραγματοποιήθηκε ζύμωση, ημιδιαλείποντος έργου σε βιοαντιδραστήρα με ελεγχόμενες συνθήκες του pH, της θερμοκρασία και των στροφών του αναδευτήρα, ενώ η παροχή CO₂ ήταν σταθερή. Η τροφοδοσία με θρεπτικό μέσο έγινε με συνεχή τρόπο. Η συγκέντρωση ηλεκτρικού οξέος έφτασε στα 20,11 g/L και η απόδοση της ζύμωσης 0,7 g/g ενώ η παραγωγικότητα 0,33 g/h.

Λέξεις κλειδιά: Βακτηριακή κυτταρίνη, *Komagataeibacter sucrofermentans*, , απόβλητα επεξεργασίας εσπεριδοειδών, ηλεκτρικό οξύ, *Actinobacillus succinogenes*, ακινητοποίηση μικροοργανισμών

ABSTRACT

Cellulose is the most abundant biopolymer on earth. It constitutes the largest part of the cell wall of plant tissues and can also be produced by microbial fermentation. This polymer has a number of commercial applications in food industry, cosmetics, paper, textile and many applications in Medicine and Pharmacy industries. The initial scope of this study was to investigate the ability of Bacterial cellulose production, via batch fermentation, valorizing renewable resources deriving citrus juicing industry and open area markets. The produced BC utilized as an immobilizer matrix for succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes*. The basis for all fermentations was the HS-glucose culture medium in which the carbon and/or nitrogen source was replaced when needed. In particular, the ability to produce cellulose using 3 different citrus fruits (lemons, oranges and grapefruit) using the whole fruit (juice, pulp and peels) as well as commercial sugars (xylose, mannose, arabinose and galactose) was studied.

In the case of grapefruit juice and hydrolysate lemon peels substrates, maximum BC production were achieved, 6,71 g / L and 5,74 g / L and yield was 0,61 g/g 0,28 g/g respectively. Xylose, mannose and arabinose were not adequately metabolized by the bacterial strain by giving only 0,81 g/L for xylose, 1,13 g/L mannose and 1,58 g/L for arabinose. *Komagataeibacter sucrofermentans*, while on the galactose substrate the production reached 3,22 g / L.

Finally, BC utilized for immobilizing *Actinobacillus succinogenes*. To achieve immobilization, a bioreactor was used under controlled conditions of pH, temperature and stirrer rpm, stable supply of CO₂ and continues feeding supply also. The duration was 61 hours and *Actinobacillus succinogenes* reached 20,11 g / L succinic acid and presented a yield of 0,77 g / g. The productivity was 0,33 g / h.

Key words: Bacterial cellulose, *Komagataeibacter sucrofermentans*, citrus wastes, succinic acid, *Actinobacillus succinogenes*, microbial immobilization

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1 Βιοσύνθεση της Βακτηριακής Κυτταρίνης.....	9
1.2 Μηχανισμός της Βιοσύνθεσης- Μεταβολικό Μονοπάτι <i>A. xylinum</i>	10
1.3 Δομή Βακτηριακής Κυτταρίνης.....	11
1.4 Ιδιότητες Βακτηριακής Κυτταρίνης.....	13
1.5 Εφαρμογές Βακτηριακής Κυτταρίνης.....	14
1.6 Παραγωγή Εσπεριδοειδών και Απόβλητα της βιομηχανίας χυμοποίησης	16
1.7 Ακινητοποίηση Μικροοργανισμών.....	18
1.8 Ηλεκτρικό Οξύ.....	20
1.9 Φυσιολογία και Μεταβολικό Μονοπάτι <i>A.succinogenes</i>	21
1.10 Σκοπός της Μελέτης	23
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	23
2.1 Υγρές Ζυμώσεις Διαλείποντος Έργου	23
2.2 Αντιδραστήρια	24
2.3 Βιολογικό Υλικό και Παρασκευή Εμβολίου	24
2.4 Θρεπτικά Υποστρώματα	25
2.4.1. Υποστρώματα ζύμωσης από εμπορικά σάκχαρα.....	25
2.4.2. Υπόστρωμα από χυμούς εσπεριδοειδών	25
2.4.3. Υπόστρωμα Εκχυλισμάτων από Απόβλητα Αποχυμοποίησης Εσπεριδοειδών.....	26
2.5. Συνθήκες Ανάπτυξης	27
2.6. Παραλαβή και Καθαρισμός Βακτηριακής Κυτταρίνης	27
2.7. Ζυμώσεις σε Βιοαντιδραστήρα.....	28
2.7.1 Παραγωγή και Επεξεργασία Βακτηριακής Κυτταρίνης	28
2.7.2 Συνθήκες Ζύμωσης	28
2.7.3 Τεχνικά Χαρακτηριστικά Βιοαντιδραστήρα.....	28
2.8 Θρεπτικό Υπόστρωμα Καλλιέργειας.....	29
2.9 Χημικές Αναλύσεις.....	30
2.9.1 Προσδιορισμός αζώτου των ελευθέρων αμινοομάδων (FAN analysis)	30
2.9.2 Μέθοδος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (hplc)	31
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	32
3.1 Ζυμώσεις διαλείποντος έργου με χρήση εμπορικών σακχάρων	32
3.2 Ζυμώσεις σε θρεπτικά υποστρώματα προερχόμενα από πορτοκάλια	33
3.3 Ζυμώσεις σε θρεπτικά υποστρώματα προερχόμενα από Γκρέιπφρουτ	36
3.4 Ζυμώσεις σε θρεπτικά υποστρώματα προερχόμενα από Λεμόνια.....	40
3.5 Σύγκριση Υποστρωμάτων.....	42
3.6 Βιβλιογραφική Ανασκόπηση Παραγωγής Βακτηριακής Κυτταρίνης από Απόβλητα.....	43
3.7 Ακινητοποίηση <i>A. succinogenes</i> και Παραγωγή Ηλεκτρικού Οξέος	44
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	45
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	47

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η κυτταρίνη αποτελεί το πιο άφθονο βιοπολυμερές στη γη. Αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος του κυτταρικού τοιχώματος των φυτικών ιστών, αλλά και έναν εκπρόσωπο των μικροβιακών εξωκυτταρικών πολυμερών (ομοπολυσακχαρίτης). Εκτός από την φυτική κυτταρίνη, υπάρχει και η βακτηριακή κυτταρίνη (bacterial cellulose-BC) η οποία ανήκει στην κατηγορία των προϊόντων του πρωτογενούς μεταβολισμού βακτηρίων και λειτουργεί ως μια προστατευτική μεμβράνη σε αντίθεση με την φυτική κυτταρίνη που επιτελεί δομικό ρόλο.

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. Λόγω αυτών των ιδιοτήτων, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε διάφορους τομείς, όπως στην βιομηχανία κλωστοϋφαντουργίας, χάρτου, τροφίμων (σταθεροποιητής), ως βιοϋλικό σε καλλυντικά και στην ιατρική, στην επεξεργασία αποβλήτων (πρώτη ύλη), στην τεχνολογία ήχου (μεμβράνη ηχητικής μεταγωγής) και στα ορυχεία (ανάκτηση μετάλλων και πετρελαίου). Τα ινίδια βακτηριακής κυτταρίνης είναι περίπου 100 φορές λεπτότερα από εκείνα της PC καθιστώντας το ένα εξαιρετικά πορώδες υλικό, το οποίο επιτρέπει τη μεταφορά αντιβιοτικών ή άλλων φαρμάκων εντός του τραύματος ενώ ταυτόχρονα χρησιμεύει ως φυσικό εμπόδιο σε εξωτερικές μολύνσεις. Ως εκ τούτου, χρησιμοποιείται εκτενώς για ιατρικές εφαρμογές όπως την επούλωση πηγών. Η πιο γνωστή και παλιά εφαρμογή της την χρήση της ως πρώτη ύλη για την παραγωγή του nata-de-coco, ένα γηγενές επιδόρπιο που παράγεται στις Φιλιππίνες.

Τα πιο αποδοτικά μικροβιακά στελέχη για την παραγωγή της μικροβιακής κυτταρίνης είναι τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια που παράγουν οξικό οξύ, όπως το βακτήριο *Komagataeibacter sucrofermentans* (*Gluconacetobacter xylinus*, Yamada *et al.* 1997; Yamada, 2000), τα οποία έχουν καθιερωθεί ως μικροοργανισμοί-πρότυπα για βασική και εφαρμοσμένη έρευνα στην παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης λόγω της ικανότητάς τους να παράγουν σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις του πολυμερούς από ένα ευρύ φάσμα πηγών άνθρακα και αζώτου. Στη συνέχεια, οι Colvin και Beer (1957) ανέχνευσαν

δημιουργία κυτταρίνης σε δείγματα που περιείχαν εκχύλισμα σε δείγματα που περιείχαν εκχύλισμα ελεύθερων κυττάρων του *K. sacrofermentans* γλυκόζη, και ATP.

1.1 Βιοσύνθεση της Βακτηριακής Κυτταρίνης

Η σύνθεση της κυτταρίνης από το βακτήριο *K. sacrofermentans* 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 \rightarrow 4) αλυσίδες γλυκάνης και σύνδεσή τους σε μια πλεγματοειδή δομή (Brown *et al.*, 1987).

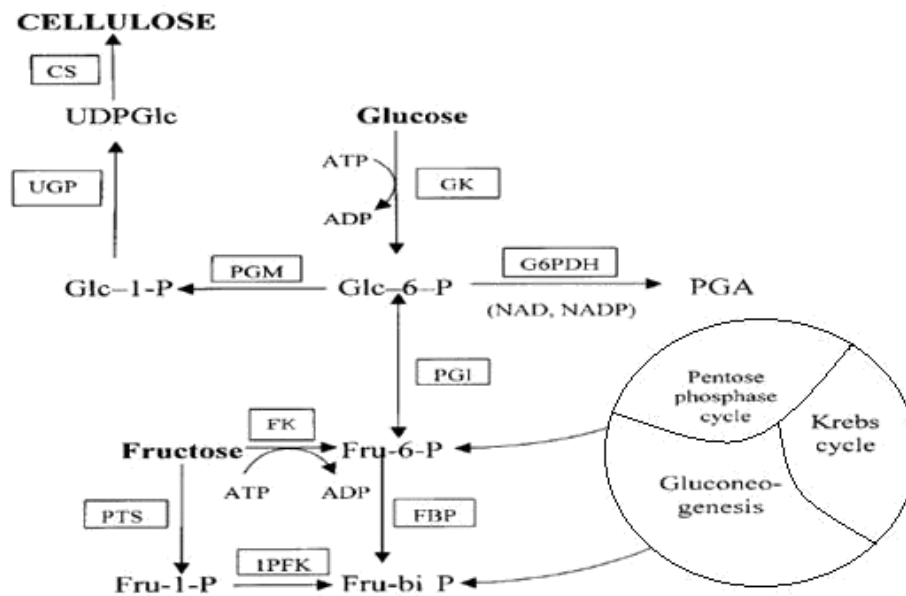
Η γλυκόζη αποτελεί την πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη πηγή άνθρακα για την παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης από το βακτηριακό στέλεχος *K. sacrofermentans*, Ωστόσο, η σύνθεσή της έχει αναφερθεί και σε άλλα υποστρώματα όπως διάφορες πεντόζες, εξόζες, άμυλο, αλκοόλη και οργανικά οξέα (Hestrin S. *et al.*, 1954). Το βακτήριο *K. sacrofermentans* για να συνθέσει κυτταρίνη λαμβάνει αυτές τις ενώσεις άνθρακα, 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 συνήθη απόδοση στο 50 % (Delmer *et al.*, 1995). Το κρίσιμο ένζυμο κατά την διαδικασία σύνθεσης της κυτταρίνης είναι η πυροφωσφορυλάση (UGP), αφού κάποια, αν και εμφανίζουν ενεργότητα του ενζύμου συνθάση της κυτταρίνης (CS) (Valla *et al.*, 1989). Επιπλέον, η ενεργότητα της πυροφωσφορυλάσης ποικίλει μεταξύ διαφορετικών στελεχών του *K. sacrofermentans* και η ψηλότερη τιμή της ανιχνεύθηκε στους πιο αποτελεσματικούς παραγωγούς κυτταρίνης, όπως είναι το *A. xylinum ssp. sacrofermentans* BPR2001. Το στέλεχος αυτό εμφανίζει υψηλή ενεργότητα της φωσφο-γλυκο-ισομεράσης, και κατέχει ένα σύστημα φωσφο-τρανφερασών εξαρτώμενο από το φωσφο-ενολο-πυροσταφυλικό. Τα οξικο-παραγωγά βακτήρια, δεν μπορούν να συνθέσουν το ένζυμο φωσφο-φρουκτο-κινάση, συνεπώς τα σάκχαρα δεν μπορούν να διασπαστούν μέσω του μεταβολικού μονοπατιού της γλυκόλυσης. Στο βακτήριο *K. sacrofermentans* η σύνθεση της κυτταρίνης είναι στενά συνδεδεμένη με καταβολικές διεργασίες οξειδωσης ενώ δεν

εμπλέκεται με άλλες αναβολικές διεργασίες, όπως η πρωτεϊνοσύνθεση. Κατά την σύνθεση της BC καταναλώνεται το 10 % της ενέργειας που προέρχεται από τις καταβολικές αντιδράσεις (De Iannino *et al.*, 1988).

1.2 Μηχανισμός της Βιοσύνθεσης- Μεταβολικό Μονοπάτι *A. xylinum*

Όλοι οι μικροοργανισμοί που παράγουν κυτταρίνη ακολουθούν 2 στάδια προς σχηματισμό του πολυμερούς. Το πρώτο στάδιο αφορά στο σχηματισμό β-(1→4) αλυσίδων γλυκάνης και τον πολυμερισμό 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). Το δεύτερο στάδιο αφορά στο σχηματισμό 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 × 70-80 nm (Zaar *et al.*, 1977), 3,2 × 133 nm (Brown *et al.*, 1976) ή 4,1 × 117 nm (Yamanaka *et al.*, 2000). Αυτές οι ταινίες αλληλεπιδρούν με άλλες από γειτονικά κύτταρα, σχηματίζοντας ένα δισδιάστατο επίπεδο, ενώ στη συνέχεια παράλληλα επίπεδα αλληλοεπιδρούν 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).



Σχήμα 1.1 Μεταβολικό μονοπάτι του άνθρακα στον *K. sacrofermentans*. CS, συνθάση της κυτταρίνης (EC 2.4.2.12); FBP, φρουκτόζη -1,6- διφωσφορική φωσφατάση (EC 3.1.3.11); FK, γλυκοκινάση (EC 2.7.1.2); G6PDH, γλυκόζη-6-φωσφορική αφυδρογονάση (EC 1.1.1.49); IPFK, φρουκτόζη-1-φωσφορική κινάση (EC 2.7.1.56); PGI, φωσφο-γλυκο-ισομεράση; PMG, φωσφο-γλυκο-μουτάση (EC 5.3.1.9); PTS σύστημα φωσφο-τρανσφερασών; UGP, πυροφωσφορυλάση, UDPGlc (EC 2.7.7.9); Fru-bi-P, 1,6-διφωσφορική φρουκτόζη; Fru-6-P, 6- φωσφορική φρουκτόζη; GLC-6 (1)-P, 6 (1)-φωσφορική γλυκόζη; PGA, φωσφο-γλουκονικόοξύ; UDPGlc, ουριδίνη διφωσφογλυκόζης (Shoda *et al.*, 2005).

1.3 Δομή Βακτηριακής Κυτταρίνης

Η βακτηριακή κυτταρίνη είναι το γραμμικό πολυμερές μονομερών μονάδων D-γλυκόζης που είναι συνδεδεμένα με β(1→4) γλυκοζιτικούς δεσμούς. 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 ανάπτυξης. Οι κλώνοι της βακτηριακής κυτταρίνης που παράγεται υπό στατικές συνθήκες διασυνδέονται λιγότερο συχνά από αυτούς σε συνθήκες ανάπτυξης. Στην τρισδιάστατη δομή της βακτηριακής κυτταρίνης που παράγεται υπό στατικές συνθήκες καλλιέργειας τα ινίδια είναι πιο εκτεταμένα και συσσωρευμένα και διασταυρωμένα το ένα πάνω από το άλλο, με πλάτος διατομής 0,05 – 0,1 μm , όπως αυτό μπορεί να διαπιστωθεί με χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης. Σε συνθήκες ανάπτυξης, οι άξονες ινιδίων είναι μπλεγμένοι μεταξύ τους και κυρτοί και τα ινίδια είναι μεγαλύτερα από τα προηγούμενα, με πλάτος διατομής 0,1 – 0,2 μm (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 Ia και Ib. Η κυτταρίνη I, συντίθεται από τα περισσότερα φυτά και από το βακτήριο *K. sacrofermentans* 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 Ia ενώ των ανώτερων φυτών αποτελείται κυρίως από Ib. 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 διείδυση (Lynd *et al.*, 2002).

1.4 Ιδιότητες Βακτηριακής Κυτταρίνης

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

Μερικοί συγγραφείς έχουν αναφέρει ότι η δομή της κυτταρίνης δεν επηρεάζεται αλλάζοντας την πηγή άνθρακα ή αζώτου (Keshk & Sameshima, 2006; Mikkelsen *et al.* 2009), ενώ άλλοι έχουν παρατηρήσει διαφορές. Η χρήση υποστρώματος μελάσσας σε συνδυασμό με Corn Steep Liquor (CSL) οδήγησε σε BC με υψηλότερο βαθμό κρυσταλλοποίησης από αυτή που προκύπτει σε μέσα που περιλαμβάνουν γλυκόζη, μαννιτόλη, yeast extract και πεπτόνη (El-Saied *et al.* 2008). Αντίθετα, άλλοι αναφέρουν μια μείωση στην κρυσταλλικότητα σε θρεπτικό μέσο μελάσσας. Σε μία άλλη μελέτη η χρήση της γλυκερόλης ως πηγή άνθρακα, έδωσε κυτταρίνη με 9% υψηλότερη κρυσταλλικότητα, χαμηλότερη ικανότητα συγκράτησης νερού και χαμηλότερο ιξώδες σε σύγκριση με το μέσο γλυκόζης. Συγκρίνοντας την κυτταρίνη που παράχθηκε υπό στατικές συνθήκες με εκείνη που παράχθηκε υπό συνθήκες ανάδευσης, η δεύτερη χαρακτηρίστηκε από μειωμένη μηχανική αντοχή, μειωμένο βαθμό πολυμερισμού και ελαστικότητας (Young's modulus), χαμηλότερο δείκτη κρυσταλλικότητας, χαμηλότερο ποσοστό της I κυτταρίνης, αλλά υψηλότερη ικανότητα συγκράτησης νερού και υψηλότερο ιξώδες (Ruka *et al.* 2012, 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 εφελκυσμό 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

Η βακτηριακή κυτταρίνη διαθέτει ευρύ φάσμα από τρέχουσες και πιθανές μελλοντικές εφαρμογές. Λόγω των πολλών μοναδικών ιδιοτήτων της, έχει χρησιμοποιηθεί στη βιομηχανία τροφίμων, στον τομέα της ιατρικής, στα εμπορικά και βιομηχανικά προϊόντα και σε άλλους τεχνικούς τομείς. Η βακτηριακή κυτταρίνη είναι ένα ευέλικτο δομικό υλικό, το οποίο επιτρέπει την διαμόρφωσή της με ποικίλους τρόπους ώστε να εξυπηρετεί διαφορετικές χρήσεις. Έχουν εκδοθεί αρκετά διπλώματα ευρεσιτεχνίας για διαδικασίες που την αφορούν πιο συγκεκριμένα πράγματα γράψε εδώ και δώσε και σχετική βιβλιογραφία. Η παλαιότερη και πιο γνωστή εφαρμογή της κυτταρίνης στον τομέα των τροφίμων, είναι ως πρώτη ύλη για την παρασκευή παραδοσιακού γλυκού στις Φιλιπίνες, γνωστό ως nata de coco. Επιπλέον έρευνες έχουν δείξει ότι οι ιδιότητες και η δομή της βακτηριακής κυτταρίνης ως συστατικό σε σκευάσματα τροφίμων, ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις, ευνόησε την αποφυγή της αλληλεπίδρασης των γεύσεων και βελτίωσε την σταθερότητα των τροφίμων σε ένα ευρύ φάσμα συνθηκών όπως pH, θερμοκρασία και σε συνθήκες κατάψυξης και απόψυξης (Shi *et al.*, 2014). Πιθανές εφαρμογές της κυτταρίνης είναι και η χρήση της ως σταθεροποιητικός παράγοντας, ζελατινοποιητής ακόμα και σαν παράγοντας αναστολής εφόσον σύμφωνα με τους Shi *et al.*, 2014 η προσθήκη βακτηριακής κυτταρίνης σε σοκολατούχο ρόφημα, απέτρεψε την καθίζηση του κακάο λόγω της ικανότητας του πλέγματος της κυτταρίνης να συγκρατήσει τα σωματίδια του κακάο (Shi *et al.*, 2014). Ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζει η καθαρότητα και το μέγεθος των ινών της κυτταρίνης. Η προσθήκη 10% κυτταρίνης σε προϊόν κρέατος (κεφτεδάκια) έδωσε παρόμοιες ιδιότητες, γεύση και διάρκεια ζωής γεγονός που οδήγησε στο συμπέρασμα ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως αντικαταστάτης του λίπους σε προϊόντα κρέατος και ως εξωτερικό περίβλημα στα λουκάνικα (Lin & Lin, 2004). Οι ενεργές συσκευασίες τροφίμων είναι ένας τομέας που συνεχώς αναπτύσσεται. Οι συσκευασίες αυτές ενεργούν είτε ως παράγοντες αύξησης της διάρκειας ζωής των προϊόντων είτε συμβάλλουν στην ασφάλειά τους από διάφορους εξωγενείς παράγοντες. Σύμφωνα με τους Xiao *et al.*, ενώ το πολυγαλακτικό οξύ (PLA) είναι βιοδιασπώμενο, θερμοπλαστικό, και παράγεται από ανανεώσιμες πηγές, δεν είναι

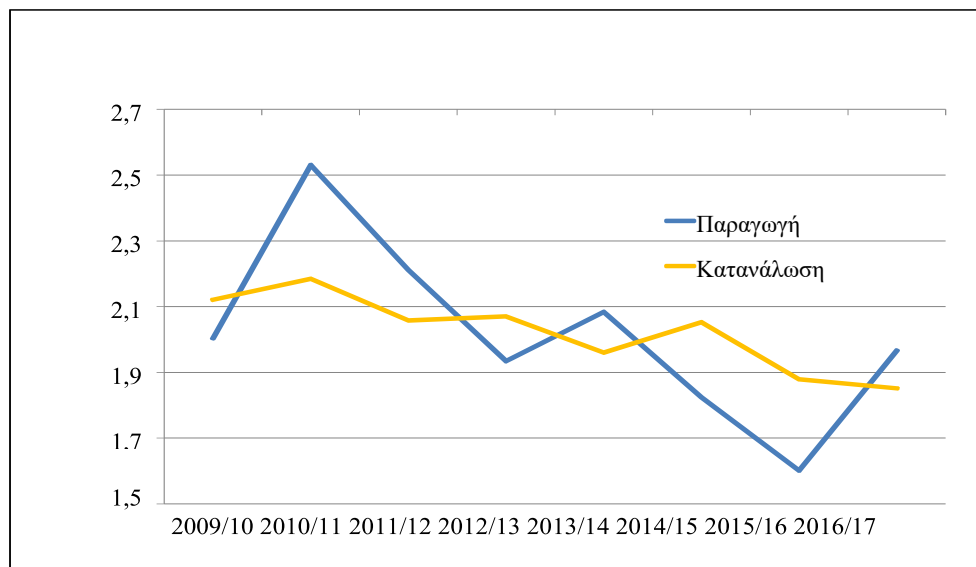
κατάλληλο για ορισμένες εφαρμογές στην συσκευασία τροφίμων. Ωστόσο, συνδυάζοντας το PLA με βακτηριακή κυτταρίνη προκύπτει υλικό με βελτιωμένες ιδιότητες για τη συσκευασία τροφίμων, λόγω των καλύτερων μηχανικών του ιδιοτήτων ενώ παράλληλα διατηρεί την βιοσυμβατότητά του (Xiao *et al.*, 2012). Η βακτηριακή κυτταρίνη βρίσκει πλήθος εφαρμογών, στην ιατρική αλλά και στην φαρμακευτική. 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 εκκρινμάτων 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).

Η υψηλή ικανότητα συγκράτησης νερού που την χαρακτηρίζει, η ενυδατωμένη 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).

1.6 Παραγωγή Εσπεριδοειδών και Απόβλητα της βιομηχανίας χυμοποίησης

Τα εσπεριδοειδή, όπως πορτοκάλια, λεμόνια, λάιμ και γκρέιπφρουτ καλλιεργούνται παγκοσμίως με το 40 % αυτών να χρησιμοποιούνται στις βιομηχανίες παραγωγής χυμών. Αποτέλεσμα της παραγωγικής διαδικασίας χυμού είναι η δημιουργία στερεών παραπροϊόντων όπως είναι ο φλοιός, οι σπόροι και ο 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).

Σύμφωνα με το USDA (United States Department of Agriculture), η παγκόσμια παραγωγή πορτοκαλιών για το 2016/17 προβλέπεται να ανέλθει κατά 2,4 εκατομμύρια μετρικούς τόνους από το προηγούμενο έτος σε 49,6 εκατομμύρια καθώς η αύξηση στην καλλιέργεια της Βραζιλίας αντισταθμίζει τις μειώσεις στις καλλιέργειες της Κίνας και τις Ηνωμένες Πολιτείες. Η παγκόσμια παραγωγή χυμού πορτοκαλιού για το 2016/17 αναμένεται να αυξηθεί ελάχιστα κατά 2 εκατομμύρια τόνους (διάγραμμα 1.1).



Διάγραμμα 1.1: Παγκόσμια παραγωγή χυμού πορτοκαλιού, παγκόσμια κατανάλωση χυμού πορτοκαλιού για τα έτη 2009 έως 2017- (USDA , January 2017)

Για τα γκρέιπφρουτ η παγκόσμια παραγωγή για 2016/17 προβλέπεται να μειωθεί πάνω από 400.000 τόνους και να διαμορφωθεί στα 6 εκατομμύρια τόνους ως αποτέλεσμα των δυσμενών καιρικών συνθηκών στην Κίνα. Στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής, η παραγωγή προβλέπεται να μειωθεί κατά 40.000 τόνους σε 688.000 τόνους. Η συνολική κατανάλωση φρέσκου

γκρέιπφρουτ, αυξάνεται ελαφρώς λόγω της μείωσης των διαθέσιμων προμηθειών που χρησιμοποιούνται για μεταποίηση.

Όσον αφορά στα λεμόνια, η παγκόσμια παραγωγή για το 2016/17 προβλέπεται να αυξηθεί κατά 4% σε 7,3 εκατομμύρια μετρικούς τόνους. Η υψηλότερη παραγωγή της Ευρωπαϊκής Ένωσης (λόγω του ευνοϊκού καιρού) αντισταθμίζει και ξεπερνά τις αντίστοιχες μειώσεις στην Αργεντινή, στην Τουρκία και στις Ηνωμένες Πολιτείες. Τα φρούτα που χρησιμοποιούνται για τη μεταποίηση παρουσιάζουν ελαφρά αύξηση (USDA)

Ο φλοιός του πορτοκαλιού, αλλά και όλων των εσπεριδοειδών, παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω των ποικίλων συστατικών που περιλαμβάνει. Αποτελεί πηγή διαιτητικών ινών, φυσικών αντιοξειδωτικών, 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. Οι φλούδα του λεμονιού είναι πλούσια σε αντιοξειδωτικά όπως βιταμίνη C, κιτρικό, μηλικό και μυρμηγκικό οξύ, εσπεριδίνη (βιοφλαβονοειδές) και πηκτίνη. Η φλούδα από γκρέιπφρουτ είναι επίσης πλούσια σε νερό, με την περιεκτικότητά της να φτάνει στο 75-78%. Περιέχει σημαντικά ποσοστά βιταμινών και ιχνοστοιχείων, ενώ χαρακτηρίζεται από υψηλή περιεκτικότητα υδατανθράκων και αναγωγικών σακχάρων. Επιπλέον, αποτελεί πηγή διαιτητικών ινών και περιέχει μεγάλη ποσότητα υδατοδιαλυτής πηκτίνης, περίπου 8,2% (Huda *et al.*, 2015).

Εδώ και δεκαετίες, το παγκόσμιο ενδιαφέρον έχει στραφεί στη μείωση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων των χημικών αποβλήτων των διεργασιών. Αυτό και σε συνδυασμό με το συνεχώς αυξανόμενο κόστος των πετροχημικών και των ορυκτών πόρων, οδηγεί στην ολοένα αυξανόμενη προσπάθεια εύρεσης αειφόρου ενέργειας αλλά και την εύρεση χημικών ουσιών και υλικών τα οποία προκύπτουν από μετατροπή ευρέως διαθέσιμων και ανανεώσιμων πρώτων υλών.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, οι φλούδες από τα εσπεριδοειδή περιέχουν σημαντικές ποσότητες συστατικών υψηλής προστιθέμενης αξίας. Στην Ελλάδα, μέρος των στερεών αποβλήτων που προκύπτουν από την αποχυμοποίηση, συγκεκριμένα η πούλπα, χρησιμοποιείται, συνήθως από τις βιομηχανίες παραγωγής χυμού, για την παρασκευή παραπροϊόντων που έχουν γεύση φυσικών χυμών. Επιπλέον, ένα μέρος των φλοιών, μετά την παραλαβή των αιθέριων ελαίων,

αποξηραίνεται και αξιοποιείται για την παραγωγή ζωοτροφών, ενώ ένα άλλο μέρος μετά την αποξήρανση πωλείται στο εξωτερικό για την παραγωγή πηκτίνης και εσπεριδίνης. Το κόστος όμως αποξήρανσης των φλοιών είναι πολύ υψηλό και για αυτό το λόγο οι περισσότερες επιχειρήσεις δεν πραγματοποιούν αποξήρανση των φλοιών και επειδή τα στερεά απόβλητα δημιουργούν προβλήματα διάθεσης και ρύπανσης του περιβάλλοντος, τα χορηγούν αυτούσια στους κτηνοτρόφους ως ζωοτροφή (Ισραηλίδης, 2002). Η κομποστοποίηση των φλοιών εσπεριδοειδών για την παραγωγή ζωοτροφών, αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο, λόγω του χαμηλού κόστους και της απλής τεχνολογίας. Η περιεκτικότητα των φλοιών εσπεριδοειδών ως έχει, σε πρωτεΐνες, είναι περίπου 3-6%, δηλαδή αρκετά πτωχή για ζωοτροφή. Μετά την επεξεργασία τους με την διαδικασία της κομποστοποίησης μπορεί να ανέλθει σε 15%, πράγμα που καθιστά δυνατή την αναβάθμιση των στερεών αποβλήτων, σε υψηλής ποιότητας ζωοτροφή. Ο ζυμωμένος φλοιός πορτοκαλιού, μπορεί να υποκαταστήσει τα δημητριακά στο σιτηρέσιο των μηρυκαστικών έως 30% (Fegeros *et al.*, 1995).

Επιπλέον επεξεργασίες των αποβλήτων αυτών αφορούν σε αξιοποίηση ενός μόνο συστατικού, όπως το d-λιμονένιο, η πηκτίνη και η βιοιθανόλη, επομένως μια σημαντική αξιοποίηση τους θα ήταν ο ολικός μετασχηματισμός τους μέσω ενός ολοκληρωμένου συστήματος βιοδιυλιστηρίου, με σκοπό τον ταυτόχρονο μετασχηματισμό της φλούδας σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας (Pourbafrani *et al.*, 2010).

1.7 Ακίνητοποίηση Μικροοργανισμών

Η ακίνητοποίηση μικροοργανισμών, είναι μια νέα τεχνολογία που άρχισε να αναπτύσσεται στα τέλη της δεκαετίας του '60. Αποτελεί τον τρόπο περιορισμού κυττάρων ή ενζύμων σε συγκεκριμένη περιοχή με σκοπό να διατηρήσει ενεργά και με δυνατότητα επανειλημμένης χρήσης τους. Λόγω της μικροβιακής πυκνότητας, της αυξημένης αντοχής σε περιβαλλοντικές επιπτώσεις και το πλεονέκτημα της εύκολης σε έλεγχο διαδικασίας, η ακίνητοποίηση μικροοργανισμών έχει ερευνηθεί ευρέως και εφαρμοστεί στην επεξεργασία λυμάτων (Xiao fan *et al.*, 2015).

Εκτός από την επεξεργασία λυμάτων, οι τεχνικές ακίνητοποίησης μικροοργανισμών έχουν προταθεί και δοκιμαστεί για την παραγωγή λειτουργικών τροφίμων. Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί αφορούν στην ακίνητοποίηση καλλιεργειών προβιοτικών βακτηρίων μέσα σε τρόφιμα με σκοπό την διατήρηση κυτταρικής βιωσιμότητας παρά το όξινο περιβάλλον του στομάχου (Mitropoulou *et al.*, 2013).

1.7.1. Μέθοδοι ακινητοποίησης

Η ακινητοποίηση μικροοργανισμών, είναι μια μέθοδος που βρίσκει πολλές εφαρμογές. Στον τομέα της φαρμακευτικής, έχουν γίνει διάφορες προσπάθειες για την ακινητοποίηση διαφόρων μικροοργανισμών σε διαφορετικά μέσα με σκοπό την παραγωγή αντιβιοτικών. Το πιο ευρέως μελετημένο σύστημα είναι η παραγωγή πενικιλίνης G χρησιμοποιώντας ακινητοποιημένα κύτταρα *Penicillium chrysogenum*. Σε άλλη μελέτη, οι Mahmoud *et al*, προσπάθησαν να παγιδευτούν το *P. chrysogenum* σε αλγινικό ασβέστιο και να χρησιμοποιηθούν σε αντιδραστήρες στήλης με φυσαλίδες με περιορισμένη επιτυχία. Οι Ogaki *et al*, επέδειξαν τη χρήση ακινητοποιημένων κυττάρων *Streptomyces rimosus* για τη συνεχή παραγωγή οξυτετρακυκλίνης. Μεταξύ των διαφόρων μεθόδων ακινητοποίησης, η προσρόφηση σε υδρόφιλο προπολυμερές ουρεθάνης βρέθηκε ότι είναι καλύτερη από τις άλλες μεθόδους. Όμως, οι Farid *et al*, προσπάθησαν να παιδεύσουν τον *S. rimosus* σε gel αλγινικού ασβεστίου και ανέφεραν καλό επίπεδο παραγωγής αντιβιοτικών σε επαναλαμβανόμενες ζυμώσεις για περίοδο 28 ημερών.

Τα οργανικά οξέα είναι σημαντικά μικροβιακά προϊόντα που χρησιμοποιούνται σε ποικίλες εφαρμογές όπως τρόφιμα και φάρμακα. Μεταξύ των διαφόρων οργανικών οξέων, το κιτρικό οξύ καταλαμβάνει κυρίαρχη θέση. Ο *Aspergillus niger* είναι ο πιο διαδεδομένος μικροοργανισμός που χρησιμοποιείται για τη σύνθεση του κιτρικού οξέος. Στις συμβατικές πρακτικές, πραγματοποιούνται ζυμώσεις του *A. Niger*. Οι ζυμώσεις μυκήτων έχουν σοβαρό μειονέκτημα της αύξησης του ιξώδους κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, με αποτέλεσμα την κακή παροχή οξυγόνου στα κύτταρα. Επομένως, είναι απαραίτητο να αερίζουμε τις καλλιέργειες με μεγάλους όγκους αποστειρωμένου αέρα. Στην περίπτωση ακινητοποιημένων κυττάρων, δεδομένου ότι η ανάπτυξη περιορίζεται, είναι δυνατόν να λειτουργήσει ο ζυμοτήρας χωρίς να επηρεάζεται το ιξώδες, διευκολύνοντας έτσι καλές ταχύτητες μεταφοράς οξυγόνου με ελάχιστη αιτία. Υπάρχουν αρκετές έρευνες για την παραγωγή κιτρικού οξέος χρησιμοποιώντας ακινητοποιημένα κύτταρα *A. Niger*. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται ευρύτερα για την ακινητοποίηση κυττάρων *A. Niger* είναι η ακινητοποίησή του σε αλγινικά, αγαρόζη, και πολυακρυλαμίδιο

Οι μικροοργανισμοί είναι οι καλύτερες πηγές για την παραγωγή χρήσιμων ενζύμων. Η τεχνολογία ακινητοποίησης κυττάρων είναι κατάλληλη για την παραγωγή εξωκυτταρικών ενζύμων. Υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον για την εφαρμογή τεχνικών ακινητοποίησης κυττάρων για τη συνεχή παραγωγή ενζύμων. Μεταξύ των μικροβιακών ενζύμων, τα ένζυμα αποικοδόμησης αμύλου α-αμυλάση και γλυκοαμυλάση έχουν μελετηθεί εκτενώς. Αρκετοί

ερευνητές έχουν επιχειρήσει την παραγωγή μιας αμυλάσης από ακινητοποιημένα κύτταρα. Εγκλωβισμός κυττάρων σε πολυακρυλαμίδιο, αλγινικό ασβέστιο, άγαρ και διάφορα άλλα πολυμερή έχουν δοκιμαστεί (Kokubu *et al.*, 1978). Σε μια νέα τεχνική, οι Chevalier και Noue προσπάθησαν την ταυτόχρονη ακινητοποίηση των μικροφυκών *Scenedesmus obliquus* μαζί με ένα στέλεχος *B. Subtilis* που παράγει αμυλάση για να ξεπεραστεί το πρόβλημα διάχυσης οξυγόνου, με αποτέλεσμα την αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας κατά 20%.

Οι μέθοδοι ακινητοποίησης ποικίλουν ανάλογα με το φυσικό μηχανισμό που χρησιμοποιείται. Μπορεί να πραγματοποιηθεί ακινητοποίηση μέσα σε μια πορώδη «μήτρα» λόγω της διείσδυσης των κυττάρων έως ότου η κινητικότητά τους εμποδιστεί από την παρουσία άλλων κυττάρων ή από το σχηματισμό πορώδους υλικού σε *in situ* κυτταρική καλλιέργεια, είτε η προσκόλληση ή προσρόφηση σε επιφάνειες στερεών φορέων με φυσική προσρόφηση λόγω ηλεκτροστατικών δυνάμεων ή με ομοιοπολική σύνδεση μεταξύ της κυτταρικής μεμβράνης και του φορέα. Ένας άλλος τρόπος, είναι η αυτο-συσσωμάτωση με κροκίδωση (φυσική) ή με τεχνητά επαγόμενους παράγοντες σταυρωτής σύνδεσης αλλά και σε μηχανική συγκράτηση πίσω από ένα φράγμα που θα μπορούσε να είναι είτε μια μικροπορώδης μεμβράνη είτε μια μικροκάψουλα (Mitropoulou *et al.*, 2013).

1.8 Ηλεκτρικό Οξύ

Το ηλεκτρικό οξύ (βουτανοδιοϊκό οξύ) είναι ένα δικαρβοξυλικό οξύ που απαντάται φυσιολογικά σε φυτικούς και ζωικούς ιστούς. Όταν ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά, εξήχθη από κεχριμπάρι με κονιοποίηση και απόσταξη. Το ηλεκτρικό οξύ παράγεται από διάφορους μικροοργανισμούς και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρόδρομος ουσία πολλών βιομηχανικών χημικών ουσιών στα τρόφιμα, σε χημικά και φαρμακευτικά προϊόντα. Στα τρόφιμα χρησιμοποιείται ως πρόσθετο (E363) και κυρίως ως βελτιωτικό γεύσης και ρυθμιστής οξύτητας. Στη βιομηχανία παραγωγής χημικών ουσιών χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη για την παρασκευή ενδιάμεσων προϊόντων για χρώματα, αρώματα, φωτογραφικά χημικά, αλκυδικές ρητίνες και πλαστικοποιητές ενώ τα τελευταία χρόνια αυξάνεται η χρήση του για θεραπευτικούς σκοπούς από την βιομηχανία φαρμάκων, ως αντιβιοτικό και αντιοξειδωτικό για την καταπολέμηση των τοξικών ελεύθερων ριζών. Επιπλέον, το ηλεκτρικό οξύ, χρησιμοποιείται και στον τομέα της γεωργίας και συγκεκριμένα στην επεξεργασία των σπόρων και στην ριζοβολία φυτών καθώς δρα ως ρυθμιστής αύξησης. Επίσης το ηλεκτρικό οξύ Αποτελεί περίπου το 8% του ήλεκτρου (κεχριμπάρι), ενώ πέρα από το φυτικό βασίλειο

ανευρίσκεται σε ζωικούς ιστούς και στο αίμα. Έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες και όπως τα περισσότερα δικαρθοξυλικά οξέα, σχηματίζει εύκολα ανυδρίτη κατά την θέρμανση. Κατά την θέρμανση του αμμωνιακού του άλατος ή του διαμιδίου του σχηματίζεται σουκκινιμίδιο (Παπαγεωργίου 1986, Hyohak *et al.*, 2006, Cheng *et al.*, 2012)

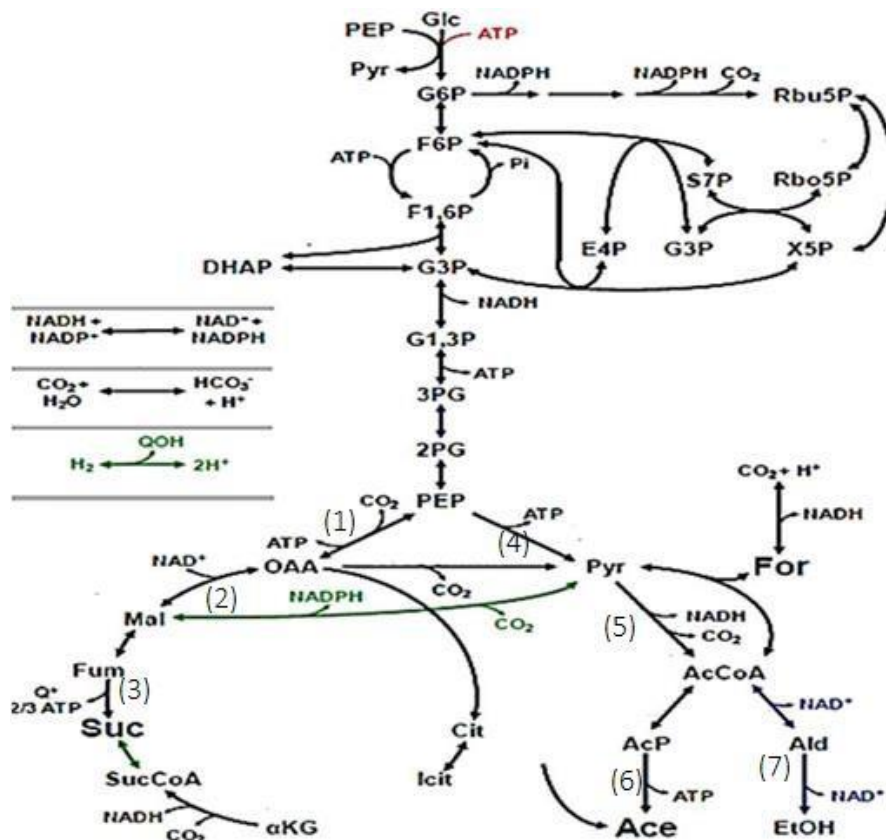
Το ηλεκτρικό οξύ αποτελεί ενδιάμεσο ενός κύκλου μεταβολισμού σακχάρων σε ζώντες οργανισμούς μεγάλης βιολογικής σημασίας όπως ο κύκλος του krebs και ο κύκλος του κιτρικού οξέος, μέρος της διαδικασίας κατά την οποία οι ζωντανοί μικροοργανισμοί μετατρέπουν την τροφή σε ενέργεια.

Σε μορφή άχρωμης κρυσταλλικής σκόνης στους 187 - 189° είναι ευδιάλυτο στο νερό αλλά ελάχιστα διαλυτό στην αιθανόλη, τον αιθέρα και την ακετόνη. Είναι ουσιαστικά αδιάλυτο στο βενζόλιο και τον τετραχλωράνθρακα (Παπαγεωργίου, 1986). Η εκτίμηση του κόστους των πρώτων υλών και η εκτίμηση του δυνητικού μεγέθους της αγοράς δείχνουν σαφώς ότι η τρέχουσα διαδικασία παραγωγής ηλεκτρικού οξέος με βάση το πετρέλαιο θα αντικατασταθεί από συστήματα παραγωγής μέσω ζυμώσεων στο ορατό μέλλον (Hyohak *et al.*, 2006).

1.9 Φυσιολογία και Μεταβολικό Μονοπάτι *A.succinogenes*

Ο *A.succinogenes* είναι ένα πολυμορφικό, σημειο-οργανοτροφικό κατά Gram αρνητικό βακτήριο με μη κινητικά ραβδία διαμέτρου 0,8 x 1 μm. Ο μικροοργανισμός είναι θετικός στα τεστ καταλάσης, οξειδάσης και αλκαλικής φσφατάσης (Guettler *et al.*, 1999 ; Hyohak *et al.*, 2006). Το βακτήριο *A.succinogenes* στερείται του ολοκληρωμένου κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων (TCA) και ακολουθεί αποκλειστικά την μεταβολική οδό της φωσφο-ενολο-πυροσταφυλικής (PEP) καρβοξυκινάσης, χρησιμοποιώντας 4 ένζυμα-κλειδιά (PEP καρβοξυκινάση, μηλική αφυδρογονάση, φουμαράση, και φουμαρική αφυδρογονάση). Το μεταβολικό αυτό μονοπάτι ρυθμίζεται από τα επίπεδα του CO₂ (Samuelon *et al.*, 1991; Vander Werf *et al.*, 1997) και η PEP καρβοξυκινάση δρα καταβολικά για να ρυθμίσει το CO₂ και να συνθέσει οξαλοοξικό. Σε χαμηλά επίπεδα CO₂ (10 mol CO₂/100 mol γλυκόζης), ο *A.succinogenes* παράγει αιθανόλη ως ένα σημαντικό παραπροϊόν ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις CO₂ (100 mol CO₂/100 mol γλυκόζης), το ηλεκτρικό οξύ είναι το κύριο τελικό προϊόν και μόνο ίχνη γαλακτικού οξέος ή αιθανόλης παράγονται. Η συγκέντρωση του CO₂ φαίνεται να ρυθμίζει τα επίπεδα των ενζύμων στο μεταβολικό μονοπάτι της PEP καρβοξυκινάσης. Σε υψηλά επίπεδα CO₂, η PEP καρβοξυκινάση αυξάνεται ενώ η αλκοολική και γαλακτική αφυδρογονάση δεν είναι ανιχνεύσιμες. Κατά συνέπεια, το CO₂ αλλάζει την ροή

του PEP και στην περίπτωση που τα ποσοστά του είναι χαμηλά, το πυροσταφυλικό οξύ μεταβολίζεται σε γαλακτικό οξύ ή αιθανόλη ενώ αν είναι υψηλά παράγεται ηλεκτρικό οξύ. Το υδρογόνο δείχνει να αυξάνει τον λόγο αλάτων ηλεκτρικού/οξικού κατά τη διάρκεια της ζύμωσης της γλυκόζης. Χαμηλού δυναμικού ηλεκτρόνια οξειδοαναγωγής που παράγονται από την οξείδωση πυροσταφυλικού οξέος χρησιμοποιούνται για να μειώσουν το ποσοστό αλάτων φουμαρικού και να αυξήσουν αυτό του ηλεκτρικού. Ο *A. succinogenes*, είναι μέτριας ισχύος οσμόφιλος μικροοργανισμός και έχει υψηλή ανοχή σε άλατα ηλεκτρικού, γεγονός το οποίο είναι κρίσιμο για την παραγωγή υψηλών συγκεντρώσεων ηλεκτρικού οξέος καθώς και στις απαιτήσεις της διεργασίας για ανάκτηση του προϊόντος.



Σχήμα 1.2. Καταβολική οδός της γλυκόζης κατά την ζύμωση της από τον *A. succinogenes*. Ένζυμα: 1) φωσφοενολοπυροσταφυλική καρβοξυ κινάση, 2) μηλική αφυδρογονάση, 3) φουμαρική αναγωγή 4) πυροσταφυλική κινάση, 5) πυροσταφυλική φερρεδοξίνη οξειδοαναγωγής, 6) οξική κινάση, 7) αλκοολική αφυδρογονάση (Samuelon *et al.*, 1991).

1.10 Σκοπός της Μελέτης

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης με χρήση ρευμάτων αποβλήτων και υποπροϊόντων που προέρχονται από διεργασίες χυμοποίησης εσπεριδοειδών. Πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις όπου μελετήθηκε η παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης με χρήση διαφορετικών υποστρωμάτων προερχόμενων από λεμόνια, πορτοκάλια και γκρέιφρουτ, σε χυμό και εκχυλίσματα από τα απόβλητα αποχυμοποίησής τους. Όλα τα υποστρώματα προσαρμόστηκαν σύμφωνα με το θρεπτικό μέσο Hestrin–Schramm (HS-γλυκόζη)

Οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν με την χρήση του βακτηριακού στελέχους *K.sucrofermentans* και διήρκησαν 13 ημέρες. Όλα τα πειράματα μελετήθηκαν ως προς την κατανάλωση των σακχάρων, την κατανάλωση του αζώτου ελεύθερων αμινομάδων και την παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης συναρτήσει του χρόνου της ζύμωσης.

Επιπλέον διεξήχθη μια σειρά πειραμάτων αξιοποιώντας ως πηγή άνθρακα εμπορικά σάκχαρα και πιο συγκεκριμένα γαλακτόζη, μαννόζη, αραβινόζη και ξυλόζη σε συνδυασμό με συνθετική πηγή αζώτου.

Τέλος, βασικό σκοπό της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η αξιοποίηση της παραγόμενης κυτταρίνης. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε μια ζύμωση ημισυνεχούς λειτουργίας σε βιοαντιδραστήρα με σκοπό την ακινητοποίηση του *A.succinogenes*, προς παραγωγή ηλεκτρικού οξέος.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Υγρές Ζυμώσεις Διαλείποντος Έργου

Όλες οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν υπό μικροαερόβιες συνθήκες με σκοπό την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης. Τα υποστρώματα που παρασκευάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν διέφεραν μεταξύ τους ως προς την πηγή άνθρακα και αζώτου.

2.2 Αντιδραστήρια

Στον πίνακα 2.1 αναγράφονται τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή των πειραμάτων καθώς επίσης και η προέλευσή τους.

Πίνακας 2.1 Αντιδραστήρια και προέλευσή

Αντιδραστήρια	Προέλευση
Γλυκόζη, Σουκρόζη, Φρουκτόζη, Μαννόζη, Ξυλόζη, Γαλακτόζη, Αραβινόζη	Penta
Yeast extract, Πεπτόνη, TSB, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Na_2HPO_4 , NaCl, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	Lab M
Κιτρικό Οξύ	Merc

2.3 Βιολογικό Υλικό και Παρασκευή Εμβολίου

Για τις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν για την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης, χρησιμοποιήθηκε το βακτηριακό στέλεχος *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM 15973 (Toyosaki *et al.*, 1995). Ο μικροοργανισμός αυτός, απομονώθηκε από μαυροκέρασο και προμηθεύτηκε από το Ινστιτούτο Leibniz-DSMZ της Γερμανίας (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures). Ως θρεπτικό μέσο για την παρασκευή του εμβολίου χρησιμοποιήθηκε το Hestrin–Schramm (HS-γλυκόζη). Αναλυτικότερα, το θρεπτικό μέσο περιείχε 20 gr/L σάκχαρο, 5 gr/L yeast extract, 5 g/L βακτηριακή πεπτόνη, 2,7 g/L Na_2HPO_4 και 1,15 g/L κιτρικό οξύ. Το pH του μέσου ρυθμίστηκε αρχικά στο 6 με προσθήκη 5 M NaOH. Η ζύμωση διήρκεσε 2 ημέρες, κατά την οποία κωνικές φιάλες των 250 mL τοποθετήθηκαν σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο στους 30 °C με ρυθμό 180 rpm.

Το βακτηριακό στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή ηλεκτρικού οξέος, ήταν ο *Actinobacillus succinogenes* 130Z (DSM 22257). Ο μικροοργανισμός απομονώθηκε από άνω κοιλίες μηρυκαστικών και προμηθεύτηκαν από το ινστιτούτο Leibniz DSMZ στη Γερμανία (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures). Για την ανάπτυξη του εμβολίου χρησιμοποιήθηκε ως θρεπτικό μέσο το Tryptone Soya Broth (TSB) συγκέντρωσης 30 g/L. Η ανάπτυξη του εμβολίου πραγματοποιήθηκε σε κωνικές φιάλες των 250 ml οι οποίες πληρώθηκαν με 100 ml θρεπτικού μέσου και τοποθετήθηκαν σε ανακινούμενο επωαστικό

θάλαμο υπό αναερόβιες συνθήκες, σε θερμοκρασία 37°C και ταχύτητα ανάδευσης 180 rpm για 12-16 h. Για την αποθήκευση των μικροοργανισμών, παρασκευάστηκαν φιαλίδια ειδικού τύπου (2 mL) που περιείχαν 1 mL γλυκερόλη και ποσότητα αποικιών που λήφθηκαν με την χρήση μικροβιακού κρίκου. Τα φιαλίδια αποθηκεύτηκαν στους -80 °C. Άλλος τρόπος αποθήκευσης του μικροοργανισμού ήταν πλήρωση των φιαλιδίων με 1 mL γλυκερόλη και 1 mL εμβολίου και συντήρησή του σε θερμοκρασία -30 °C.

2.4 Θρεπτικά Υποστρώματα

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκαν μικροβιακές ζυμώσεις σε δεκαέξι 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 αμινοομάδων και πεπτιδίων (FAN) διατηρήθηκαν σταθερές, 20 g/L και 350 mg FAN/L αντίστοιχα.

Όλα τα υλικά, σκεύη 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.

2.4.1. Υποστρώματα ζύμωσης από εμπορικά σάκχαρα

Σε αυτό το στάδιο πραγματοποιήθηκε μια σειρά 4 ζυμώσεων όπου η πηγή άνθρακα προήλθε από εμπορικά σάκχαρα, συγκεκριμένα ξυλόζη, μαννόζη, γαλακτόζη και αραβινόζη με σκοπό να μελετηθεί η κατανάλωσή τους από τον μικροοργανισμό αλλά και η επίδρασή τους στην παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης.

2.4.2. Υπόστρωμα από χυμούς εσπεριδοειδών

Στα συγκεκριμένα υποστρώματα η πηγή άνθρακα προήλθε από πορτοκάλια γκρέιπφρουτ και λεμόνια που προμηθεύτηκαν από τα απόβλητα της λαϊκής αγοράς στη περιοχή του Βοτανικού τα οποία μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο όπου τεμαχίστηκαν και στύφτηκαν σε οικιακό στίφτη. Έπειτα ο κάθε χυμός που προέκυψε φυγοκεντρήθηκε ξεχωριστά σε φυγόκεντρο (Thermo Scientific, Sorvall LYNX 6000) για να διαχωριστούν τα στερεά υπολείμματα από το υγρό και ακολούθως διηθήθηκε σε διηθητικό χαρτί για επιπλέον διαχωρισμό των στερεών υπολειμμάτων. Μετά την επεξεργασία αυτή και αφού

αναλύθηκαν για την περιεκτικότητά τους σε σάκχαρα και άζωτο αραιώθηκαν με την κατάλληλη ποσότητα απιονισμένου νερού έτσι ώστε τα σάκχαρα να φτάσουν στην επιθυμητή συγκέντρωση (20 g/L). Στο κάθε ένα υπόστρωμα προστέθηκε yeast extract, βακτηριακή πεπτόνη, κιτρικό οξύ και Na_2HPO_4 εκτός του λεμονιού όπου η αρχική συγκέντρωση σακχάρων ήταν μικρότερη του επιθυμητού με αποτέλεσμα να μην γίνει αραιώση με απιονισμένο αλλά προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας εμπορικών σακχάρων ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή αρχική ποσότητα και δεν προστέθηκε κιτρικό οξύ λόγω της ήδη αυξημένης περιεκτικότητάς του σε αυτό. Το pH ρυθμίστηκε στο 6 έγινε με προσθήκη της απαιτούμενης ποσότητας NaOH 5M. Όλα τα υποστρώματα αποστειρώθηκαν με φίλτρο διαμέτρου σπών 0,2 μm (Polycap 36 AS, Fisher).

2.4.3. Υπόστρωμα Εκχυλισμάτων από Απόβλητα Αποχυμοποίησης Εσπεριδοειδών

Σε αυτό το στάδιο παρασκευάστηκαν 3 διαφορετικά υποστρώματα. Σε αυτά τα υποστρώματα χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα από τα απόβλητα της αποχυμοποίησης, πορτοκαλιών, γκρέιπφρουτ και λεμονιών.

Πιο συγκεκριμένα, σε απιονισμένο νερό προστέθηκαν χωριστά τα απόβλητα από το κάθε φρούτο σε αναλογία υγρού: στερεού 3:1. Τα μίγματα έβρασαν για 1 ώρα και στη συνέχεια τα εκχυλίσματα που προέκυψαν φυγοκεντρήθηκαν ξεχωριστά σε φυγόκεντρο (Thermo Scientific, Sorvall LYNX 6000) για να διαχωριστούν τα στερεά υπολείμματα από το υγρό και ακολούθως διηθήθηκε σε διηθητικό χαρτί για επιπλέον διαχωρισμό των στερεών υπολειμμάτων. Έπειτα από ανάλυση για την περιεκτικότητά τους σε σάκχαρα και άζωτο προστέθηκαν οι απαραίτητες αναλογίες εμπορικών ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή αρχική συγκέντρωση (20 g/L) καθώς επίσης και η αντίστοιχες ποσότητες από yeast extract και βακτηριακή πεπτόνη με σκοπό η αρχική συγκέντρωση αζώτου να ανέρχεται σε 385 mg/L προς παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης καθώς επίσης και η ανάλογη ποσότητα κιτρικού οξέος σύμφωνα με την αναλογία του μέσου καλλιέργειας Hestrin-Schramm (HS-γλυκόζη), εκτός από το εκχύλισμα από φλούδες λεμονιού όπου ήταν ήδη πλούσιο σε αυτό, όπως και ο χυμός του. Τα εκχυλίσματα αποστειρώθηκαν με φίλτρο διαμέτρου σπών 0,2 μm (Polycap 36 AS, Fisher) και το pH ρυθμίστηκε στο 6 με προσθήκη της απαιτούμενης ποσότητας NaOH 5M. Στον πίνακα 2.2 παρουσιάζονται οι αναλογίες σακχάρων και η συγκέντρωση FAN που περιείχαν όλα τα υποστρώματα των εσπεριδοειδών (χυμούς και εκχυλίσματα).

Πίνακας 2.2 Περιεκτικότητα σακχάρων και συγκέντρωση FAN σε χυμούς και εκχυλίσματα εσπεριδοειδών

Μέσο	Σουκρόζη (g/L)	Γλυκόζη (g/L)	Φρουκτόζη (g/L)	Ολικά Σάκχαρα (g/L)	FAN (mg/L)
Χυμοί					
Πορτοκάλι	19,2	39	35,5	93,4	292,4
Γκρέιπφρουτ	15,7	37,9	34,6	88,2	275,3
Εκχυλίσματα					
Πορτοκάλι	2,7	8	7,2	17,9	69,6
Γκρέιπφρουτ	1,4	7,2	7,1	15,7	53,6
Λεμόνι	0,2	2,3	2,1	4,6	49,4

2.5. Συνθήκες Ανάπτυξης

Οι ζυμώσεις έλαβαν χώρο υπό μικροαερόβιες συνθήκες, σε κωνικές φιάλες των 250 mL με ενεργό όγκο 50 mL. Ο όγκος του εμβολίου ήταν 10% v/v και το pH ρυθμίστηκε στο 6 με NaOH 5M. Οι κωνικές φιάλες τοποθετήθηκαν σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο και θερμοκρασία 30 °C όπου ανακινήθηκαν στις 180 rpm για 1 ημέρα και έπειτα μεταφέρθηκαν σε στατικό επωαστικό θάλαμο όπου η θερμοκρασία παρέμεινε στους 30 °C.

2.6. Παραλαβή και Καθαρισμός Βακτηριακής Κυτταρίνης

Η μικροβιακή κυτταρίνη παραλήφθηκε με την μορφή ενυδατωμένων μεμβρανών ή κροκιδώσεων, πλύθηκε με τρεχούμενο νερό βρύσης για να απομακρυνθούν τα υπολείμματα της καλλιέργειας και στη συνέχεια εμβαπτίστηκε σε 2M NaOH για 24 ώρες περίπου ώστε να εξουδετερωθούν τα βακτηριακά κύτταρα. Έπειτα πλύθηκε αρκετές φορές με τρεχούμενο νερό βρύσης και αφέθηκε για μερικές ώρες σε απιονισμένο νερό μέχρι να

επιτευχθεί ουδέτερη τιμή pH. Τέλος, τοποθετήθηκε σε φούρνο στους 30 °C μέχρι να επιτευχθεί η απουσία υγρασίας και να έχει σταθερό βάρος.

2.7. Ζυμώσεις σε Βιοαντιδραστήρα

Σε αυτό το πειραματικό στάδιο, μελετήθηκε η ικανότητα χρήσης της βακτηριακής κυτταρίνης ως φορέας ακινητοποίησης μικροοργανισμών με σκοπό την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε η παραγωγή ηλεκτρικού οξέος από τον μικροοργανισμό *Actinobacillus succinogenes* 130Z (DSM 22257), μετά την ακινητοποίησή του στη κυτταρίνη.

2.7.1 Παραγωγή και Επεξεργασία Βακτηριακής Κυτταρίνης

Η κυτταρίνη που χρησιμοποιήθηκε για την ακινητοποίηση του μικροοργανισμού, παράχθηκε σε περιέκτη με επιφάνεια 70×30 cm² υπό μη ασηπτικές συνθήκες και τελικό όγκο ζύμωσης 2L, παραλήφθηκε με την μορφή ενυδατωμένης μεμβράνης πλύθηκε με τρεχούμενο νερό βρύσης για να απομακρυνθούν τα υπολείμματα της καλλιέργειας και στη συνέχεια εμβαπτίστηκε σε 2M NaOH για 24 ώρες περίπου ώστε να εξουδετερωθούν τα βακτηριακά κύτταρα. Έπειτα πλύθηκε αρκετές φορές με τρεχούμενο νερό βρύσης και αφέθηκε για μερικές ώρες σε απιονισμένο νερό μέχρι να επιτευχθεί ουδέτερη τιμή pH. Στη συνέχεια τεμαχίστηκε σε κομμάτια διαστάσεων 1,5*1,5 cm τα οποία αφέθηκαν για περίπου 1 ώρα σε θερμοκρασία 30 °C, με σκοπό να απομακρυνθεί η περίσσεια υγρασίας έτσι ώστε να μην επηρεαστεί ο τελικός όγκος του βιοαντιδραστήρα.

2.7.2 Συνθήκες Ζύμωσης

Το πείραμα αυτό, διεξήχθη σε βιοαντιδραστήρα infors HT Labfors 4 με ενεργό όγκο 1L, όγκο εμβολίου 10% v/v, θερμοκρασία 37 °C, ταχύτητα ανάδευσης 300 rpm και συνεχή παροχή CO₂ 0,5 vvm. Ο έλεγχος του pH γινόταν με αυτόματη προσθήκη ποσότητας 10M NaOH ώστε διατηρείτε σταθερό στο 6,6.

2.7.3 Τεχνικά Χαρακτηριστικά Βιοαντιδραστήρα

Για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε εργαστηριακός βιοαντιδραστήρας Ελβετικής προέλευσης της εταιρείας infors HT Labfors 4. Η λειτουργία του ρυθμίζεται μέσω του

λογισμικού προγράμματος V.2.0.2. της ίδιας εταιρείας. Οι ζυμώσεις λαμβάνουν χώρα σε δοχείο κατασκευασμένο με διπλό τοίχος από βοριτυρικό γυαλί, όπου μεταξύ των δύο τοιχωμάτων κυκλοφορεί νερό το οποίο απαιτείται για την εναλλαγή θερμότητας με το υγρό της ζύμωσης. Ο βιοαντιδραστήρας αυτός δίνει την δυνατότητα ελέγχου των συνθηκών της ζύμωσης. Πιο συγκεκριμένα έχει την δυνατότητα να ρυθμίζει το pH, την θερμοκρασία, την παροχή οξυγόνου, την παροχή τροφοδοσίας με θρεπτικό μέσο και των αριθμό των στροφών του αναδευτήρα. Όλες οι παραπάνω ρυθμίσεις πραγματοποιούνται μέσω του ειδικού εξοπλισμού που διαθέτει ο βιοαντιδραστήρας και οποίος αποτελείται από πεχάμετρο, θερμόμετρο, οξυγονόμετρο, αναδευτήρα δυο πτερωτών, αισθητήρα αφρισμού καθώς και τέσσερις αντλίες για την παροχή οξέος, βάσεως, θρεπτικού μέσου και αντιαφριστικού παράγοντα.

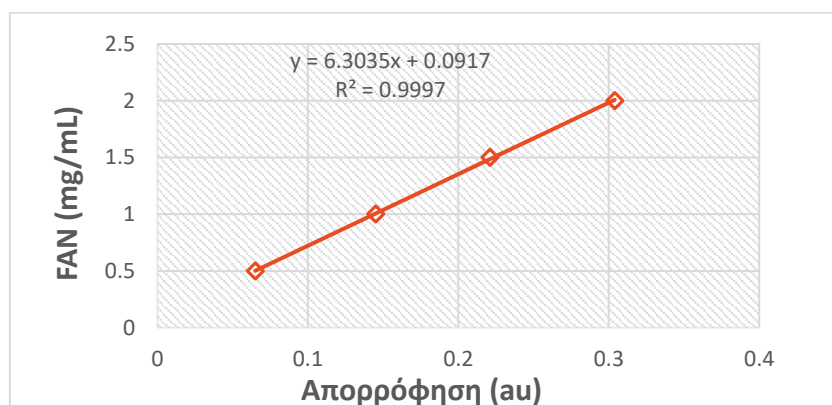
2.8 Θρεπτικό Υπόστρωμα Καλλιέργειας

Πραγματοποιήθηκε ζύμωση σε θρεπτικό υπόστρωμα από εμπορικά σάκχαρα. Αρχικά ο βιοαντιδραστήρας πληρώθηκε με υπόστρωμα που περιείχε άλατα συγκεκριμένα 1,16 g/L NaHPO_4 , 3,1 g/L Na_2HPO_4 , 1 g/L NaCl , 0,2 g/L $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ και 0,2 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ μαζί με την τεμαχισμένη κυτταρίνη έτσι ώστε ο όγκος να φτάσει τα 1000 mL. Το υλικό παρέμεινε να αναδεύεται με ταχύτητα 300 rpm για 12 ώρες με σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας και παροχής CO_2 . Έπειτα από 12 ώρες αφαιρέθηκαν 200 mL από το υλικό και προστέθηκαν 100 mL εμβόλιο *Actinobacillus succinogenes* και 100 mL θρεπτικό μέσο με 9 g yeast 20 g xylose. Αφέθηκε σε σταθερές συνθήκες να αναπτυχθεί για 19 ώρες. Έπειτα έγινε έκπλυση της κυτταρίνης, και εισάχθηκαν σταδιακά 3 L τα οποία περιείχαν 2700mL νερό, 300mL άλατα σε αναλογία όπως αναφέρθηκε παραπάνω καθώς και 15 g ξυλόζη. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε εισαγωγή 1 L υλικού και αφαίρεσή του εναλλάξ 3 φορές. Η ενέργεια αυτή πραγματοποιήθηκε με σκοπό να αφαιρεθεί όλο το υγρό που περιείχε ο βιοαντιδραστήρας, και να καθαριστεί και η κυτταρίνη έτσι ώστε να καταστεί εφικτό να διαπιστωθεί εάν ο μικροοργανισμός ακινητοποιήθηκε. Μετά την έκπλυση αυτή προστέθηκε το κανονικό υπόστρωμα της ζύμωσης που περιείχε 900 mL απιονισμένο νερό, 6 g yeast, 20 g ξυλόζη και 100 mL άλατα. Στην αντλία παροχής θρεπτικού μέσου τοποθετήθηκε φιάλη με 500 g/L ξυλόζη για την τροφοδοσία.

2.9 Χημικές Αναλύσεις

2.9.1 Προσδιορισμός αζώτου των ελευθέρων αμινομάδων (FAN analysis)

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του αζώτου των ελευθέρων αμινομάδων (FAN, Free Amino Nitrogen) είναι η φωτομετρική μέθοδος της νινυδρίνης (Lie 1973). Σε δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκε 1 mL κατάλληλα αραιωμένου δείγματος και 0,5 mL αντιδραστηρίου χρώσης (color reagent). Οι δοκιμαστικοί σωλήνες πωματίστηκαν και μεταφέρθηκαν σε υδατόλουτρο στους 100 °C για 16 min. Ακολούθησε ψύξη των δειγμάτων σε νερό στους 20 °C για 20 min. Έπειτα, προστέθηκαν 2,5 mL αντιδραστηρίου αραιώσης (dilution reagent) και αναδεύτηκαν μέχρι αλλαγή χρώματος (20 sec). Τέλος, μετρήθηκε η απορρόφηση σε φασματοφωτόμετρο (Hitachi U-2000 Spectrophotometer) στα 570 nm. Το τυφλό δείγμα για το μηδενισμό του φασματοφωτόμετρου, περιείχε 1 mL απιονισμένο νερό συγκέντρωση του δείγματος σε FAN υπολογίστηκε από την πρότυπη καμπύλη αναφοράς εκφρασμένη σε mg/L (Διάγραμμα 2.1). Για την πρότυπη καμπύλη αναφοράς ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία, χρησιμοποιώντας διαφορετικές αραιώσεις πρότυπου διαλύματος γλυκίνης. Η σύσταση των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκε για την μέθοδο FAN περιγράφεται στον Πίνακα 2.3.



Διάγραμμα 2.1- Καμπύλη απορρόφησης FAN

Πίνακας 2.3- Σύσταση αντιδραστηρίων FAN

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

2.9.2 Μέθοδος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (hplc)

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των σακχάρων και των αλκοολών πραγματοποιήθηκε με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography). Όλα τα δείγματα αρχικά φυγοκεντρούνταν και στην συνέχεια φιλτράρονταν με την χρήση φίλτρων whatman που διέθεταν μεμβράνη διαμέτρου οπών 0,2 μm . Ο απαιτούμενος όγκος κάθε ένεσης ήταν 20 μL . Χαρακτηριστικά υγρού χρωματογράφου:

- Όργανο: Waters 600E
- Στήλη (στατική φάση): Aminex HPX-87H (Bio-rad, Richmond, USA) (30cmx7,8 mL)
- Κινητή φάση: 5 mM H_2SO_4 σε απιονισμένο, απεσταγμένο και φιλτραρισμένο νερό
- Ανιχνευτής: RI (410 Waters)
- Ροή διαλυτών (κινητής φάσης): 0,6 mL/min

- Όγκος ένεσης: 50μl.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Ζυμώσεις διαλείποντος έργου με χρήση εμπορικών σακχάρων

Αρχικά μελετήθηκε η παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης με την χρήση συνθετικών πηγών άνθρακα. Το βακτηριακό στέλεχος *G.sucrofermentans* αναπτύχθηκε σε ξυλόζη, μαννόζη, αραβινόζη και γαλακτόζη με σκοπό να αξιολογηθεί η ικανότητά του να αφομοιώσει τα προαναφερθέντα συνθετικά σάκχαρα και να παράξει βακτηριακή κυτταρίνη. Ο Πίνακας 3-1 παρουσιάζει συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα των ζυμώσεων μετά από 13 ημέρες ζύμωσης. Η ξυλόζη, η μαννόζη και η αραβινόζη δεν μεταβολίστηκαν επαρκώς από το βακτηριακό στέλεχος οδηγώντας σε σχετικά χαμηλή παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης με αντίστοιχες τιμές 0,81 g/L, 1,13 g/L και 1,58 g/L. Το ποσοστό κατανάλωσης των προαναφερθέντων σακχάρων κυμάνθηκε μεταξύ 44,19-30,38 % . Η γαλακτόζη ήταν το πιο αποδοτικό σάκχαρο καταλήγοντας στην μέγιστη συγκέντρωση βακτηριακής κυτταρίνης 3,22 g/L, και ποσοστό κατανάλωσης 48,64 % γεγονός που επιβεβαιώνεται και από την βιβλιογραφία όπου σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε, η παραγωγή κυτταρίνης με χρήση γαλακτόζης ανήλθε στα 3,38 g/L (Singh R. *et al.*, 2016). Η μεγαλύτερη απόδοση σε βακτηριακή κυτταρίνη και παραγωγικότητα ζύμωσης επιτεύχθηκαν με την χρήση γαλακτόζης και τιμές 0,32 g/g και 0,24 g/L/d αντίστοιχα.

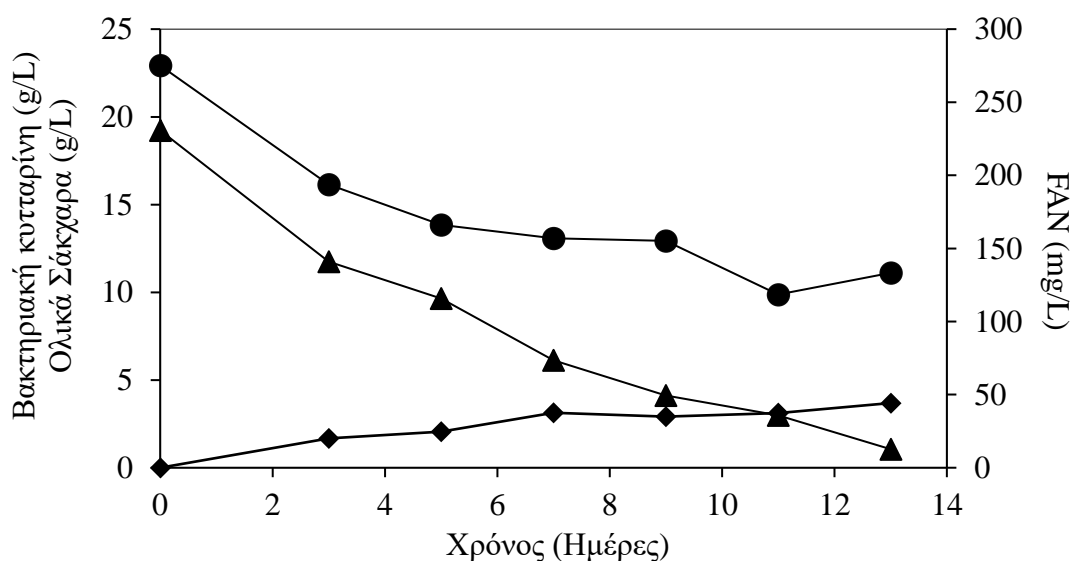
Πίνακας 3.1- Κατανάλωση σακχάρων (%), συγκέντρωση βακτηριακής κυτταρίνης (g/L), απόδοση (g/g) και παραγωγικότητα (g/L/d) της ζύμωσης κατά την καλλιέργεια του *G. sucrofermentans* σε συνθετικά υποστρώματα ξυλόζης, μαννόζης, αραβινόζης και γαλακτόζης μετά από 13 ημέρες επώασης.

	Κατανάλωση σακχάρων (%)	Συγκέντρωση BC (g/L)	Απόδοση (g/g)	Παραγωγικότητα (g/L/d)
Ξυλόζη	33,95	0,81	0,12	0,06
Μαννόζη	30,38	1,13	0,24	0,08
Αραβινόζη	44,19	1,58	0,17	0,12
Γαλακτόζη	48,64	3,22	0,32	0,24

3.2 Ζυμώσεις σε θρεπτικά υποστρώματα προερχόμενα από πορτοκάλια

Σε αυτό το στάδιο της πειραματικής μελέτης πραγματοποιήθηκαν πειράματα προς παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης με την χρήση χυμού και εκχυλισμάτων με πρώτη ύλη το πορτοκάλι. Για συγκριτικούς λόγους και για να διαπιστωθεί σε ποιον βαθμό η παρουσία βιταμινών και ιχνοστοιχείων που περιέχονται στο πορτοκάλι ευνοούν την παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης πραγματοποιήθηκαν επιπλέον πειράματα με προσομοιωμένο θρεπτικό υπόστρωμα στην αναλογία των σακχάρων του χυμού και των εκχυλισμάτων από πορτοκάλια. Η μελέτη του χυμού θεωρείται σκόπιμη διότι σε υπαίθριες λαϊκές αγορές οι ποσότητες ολόκληρων εσπεριδοειδών που καταλήγουν σε κάδους σκουπιδιών ως απόβλητα είναι μεγάλες.

Στο Διάγραμμα 3-1 απεικονίζεται η κατανάλωση των ολικών σακχάρων, η κατανάλωση του αζώτου των ελεύθερων αμινοομάδων (FAN) καθώς και η παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης καθ' όλη την διάρκεια της ζύμωσης (13 ημέρες) του χυμού πορτοκαλιού με τον *G. sucrofermentans*.

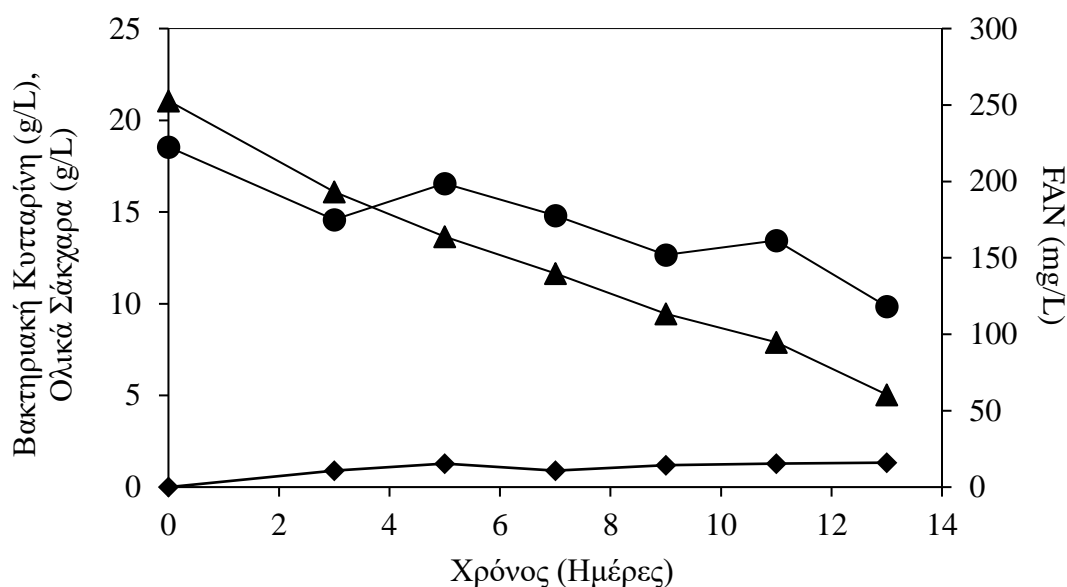


Διάγραμμα 3-1: Κινητική κατανάλωσης σακχάρων (▲), κατανάλωσης FAN (●) και παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης (◆) κατά την διάρκεια ζύμωσης διαλείποντος έργου με τον *G. sucrofermentans* σε θρεπτικό υπόστρωμα από χυμό πορτοκάλι.

Η μέγιστη συγκέντρωση βακτηριακής κυτταρίνης που επιτεύχθηκε ήταν 3,68 g/L και η απόδοση της ζύμωσης υπολογίστηκε ως 0,20 g βακτηριακής κυτταρίνης ανά g

καταναλωθέντος υποστρώματος ενώ η παραγωγικότητα ως 0,28 g/L/d. Τα σάκχαρα του χυμού μεταβολίστηκαν σχεδόν πλήρως από το βακτηριακό στέλεχος μετά από 13 ημέρες καλλιέργειας ενώ το FAN αφομοιώθηκε κατά 52 %.

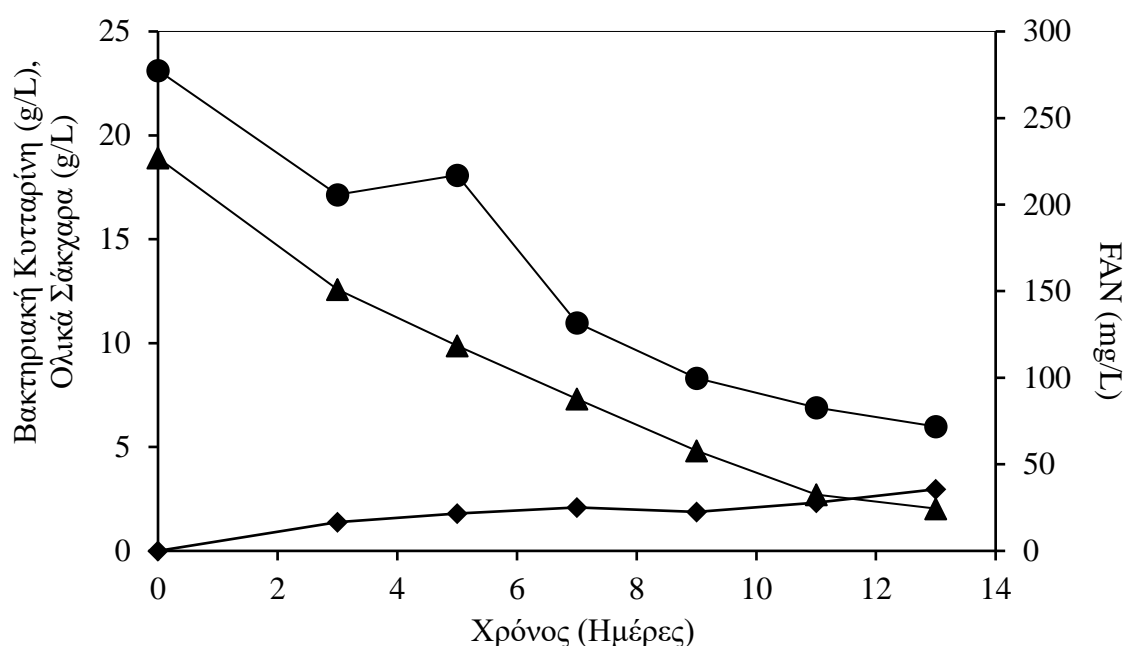
Στο Διάγραμμα 3-2 παρουσιάζεται η κατανάλωση των ολικών σακχάρων, η κατανάλωση FAN καθώς και η παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης κατά την διάρκεια ζύμωσης (13 ημέρες) διαλείποντος έργου με το βακτηριακό στέλεχος *G. sucrofermentans* σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα προσομοιωμένο στην σύσταση σακχάρων του χυμού από πορτοκάλια.



Διάγραμμα 3-2: Κινητική κατανάλωσης σακχάρων (▲), κατανάλωσης FAN (●) και παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης (◆) κατά την διάρκεια ζύμωσης (13 ημέρες) διαλείποντος έργου με το βακτηριακό στέλεχος *G. sucrofermentans* σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα προσομοιωμένο στην σύσταση σακχάρων του χυμού από πορτοκάλια.

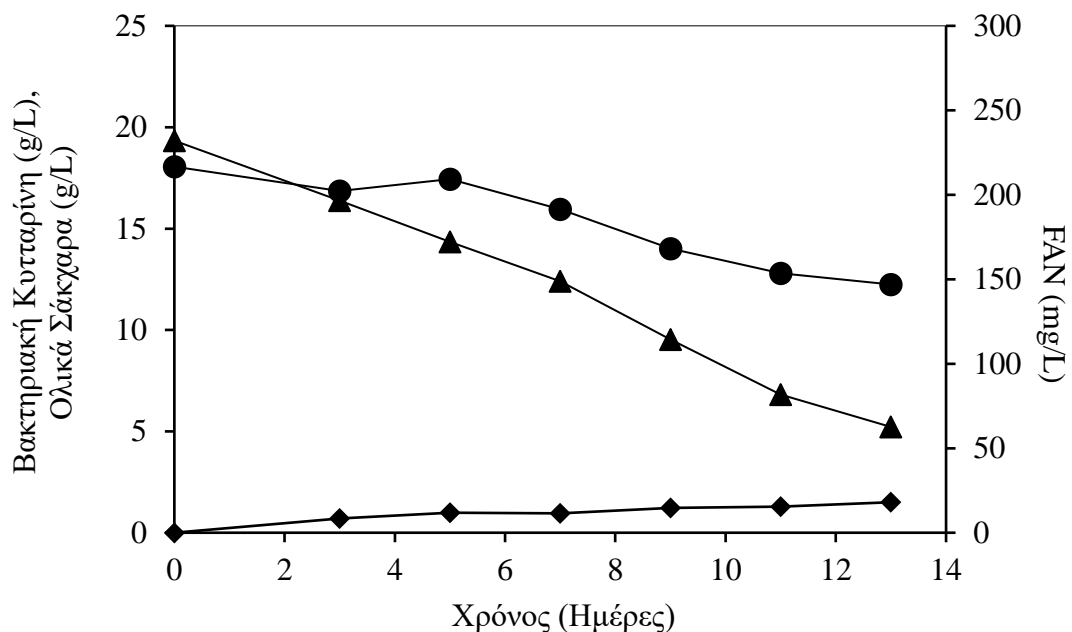
Το προσομοιωμένο συνθετικό υπόστρωμα ήταν μη αποδοτικό ως προς την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης (1,33 g/L) παρουσιάζοντας ταυτόχρονα χαμηλές τιμές απόδοσης (0,083 g/g) και παραγωγικότητας (0,10 g/L/d). Τα ολικά σάκχαρα της ζύμωσης καταναλώθηκαν κατά 76 % ενώ το FAN κατά 47 %. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα με αυτά του πειράματος στο οποίο χρησιμοποιήθηκε χυμός πορτοκαλιού, η συγκέντρωση της βακτηριακής κυτταρίνης σχεδόν υποτριπλασιάστηκε στην παρούσα ζύμωση γεγονός το οποίο καθιστά το πορτοκάλι ένα αρκετά ελπιδοφόρο θρεπτικό υπόστρωμα πλούσιο σε θρεπτικά στοιχεία ωφέλιμα για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού, υποστηρίζοντας ταυτόχρονα την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης

Στο Διάγραμμα 3-3 απεικονίζεται η κατανάλωση των ολικών σακχάρων, η κατανάλωση του αζώτου των ελεύθερων αμινοομάδων (FAN) καθώς και η παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης καθ' όλη την διάρκεια της ζύμωσης (13 ημέρες) του εκχυλίσματος των αποβλήτων αποχυμοποίησης πορτοκαλιών με τον *G. sacrofermentans*. Η μέγιστη συγκέντρωση κυτταρίνης στο υπόστρωμα αυτό ανήλθε στα 3,13 g/L με την απόδοση να φτάνει στα 0,28 g/g και η παραγωγικότητα της ζύμωσης να είναι 0,17 g/L/d. Τα ολικά σάκχαρα της ζύμωσης καταναλώθηκαν σε ποσοστό 89% ενώ το FAN κατά 74%.



Διάγραμμα 3-3: Κινητική κατανάλωσης σακχάρων (▲), κατανάλωσης FAN (●) και παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης (◆) κατά την διάρκεια ζύμωσης (13 ημέρες) διαλείποντος έργου με το βακτηριακό στέλεχος *G. sacrofermentans* σε εκχύλισμα πορτοκαλιών.

Στο διάγραμμα 3-4 απεικονίζεται η κατανάλωση των σακχάρων και του αζώτου καθώς και η παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης, στο προσομοιωμένο συνθετικό υπόστρωμα όπως του εκχυλίσματος πορτοκαλιών. Η πηγή άνθρακα σε αυτή την περίπτωση προήλθε από εμπορικά σάκχαρα. Όπως παρατηρούμε, η παραγωγή κυτταρίνης, την 13^η μέρα της ζύμωσης έφτασε στο 1,50 g/L. Η παραγωγικότητα τις 3 πρώτες μέρες ήταν 0,23 g/L/d ενώ την τελευταία, μόλις 0,11 g/L/d και η απόδοση της ζύμωσης 0,10 g/g. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα με αυτά της ζύμωσης σε υπόστρωμα από εκχύλισμα πορτοκαλιών παρατηρούμε ότι η παραγωγικότητα υποδιπλασιάστηκε, παρά το γεγονός ότι το ποσοστό των σακχάρων που καταναλώθηκε ήταν 73%. Το FAN αφομοιώθηκε σε ποσοστό 32%.



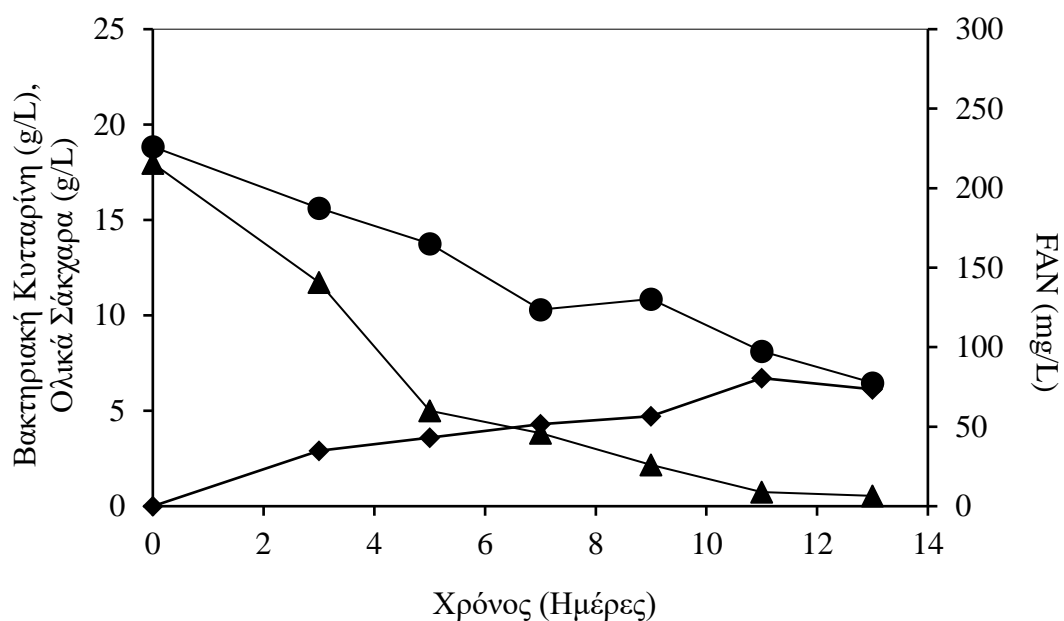
Διάγραμμα 3-4: : Κινητική κατανάλωσης σακχάρων (▲), κατανάλωσης FAN (●) και παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης (◆) κατά την διάρκεια ζύμωσης (13 ημέρες) διαλείποντος έργου με το βακτηριακό στέλεχος *G. sucrofermentans* σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα προσομοιωμένο στην σύσταση σακχάρων του εκχυλίσματος από πορτοκάλια

3.3 Ζυμώσεις σε θρεπτικά υποστρώματα προερχόμενα από Γκρέιπφρουτ

Σε αυτή την σειρά ζυμώσεων χρησιμοποιήθηκαν απόβλητα από γκρέιπφρουτ. Συγκεκριμένα μελετήθηκε η ικανότητα παραγωγής κυτταρίνης από τον *G. sucrofermentans* σε υπόστρωμα που προήλθε από χυμό γκρέιπφρουτ. Σε αντιπαραβολή των αποτελεσμάτων την ζύμωσης, πραγματοποιήθηκε και μια επιπλέον ζύμωση με εμπορικά σάκχαρα σε ίδιες αναλογίες με αυτές του χυμού για να διαπιστωθεί εάν τα συστατικά του γρέιπφρουτ ευνοούν τη παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης. Η περιεκτικότητα του χυμού σε σάκχαρα ήταν πολύ μεγαλύτερη από την επιθυμητή, σύμφωνα με τους Hestrin–Schramm, έτσι πραγματοποιήθηκε αραίωση του υποστρώματος με απιονισμένο νερό και προστέθηκαν σε αυτό εμπορικό yeast extract και bacteriological peptone έτσι ώστε η αρχική συγκέντρωση FAN να φτάσει στο επιθυμητό επίπεδο (385 mg/L).

Στο διάγραμμα 3-5 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ζύμωσης σε υπόστρωμα χυμού γκρέιπφρουτ. Η μέγιστη συγκέντρωση της κυτταρίνης, παρατηρήθηκε την 11^η ημέρα της ζύμωσης όπου έφτασε στα 6,71 g/L, ενώ την 13^η η συγκέντρωση παρουσίασε μια ελαφρώς

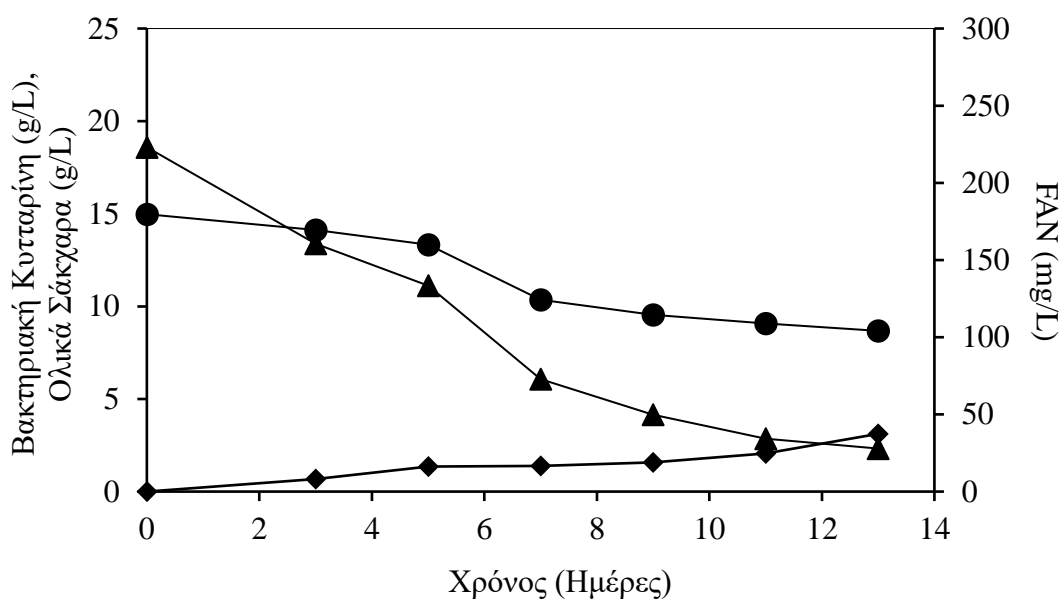
πρωτική τάση εφόσον έφτασε στα 6,12 g/L με την συγκέντρωση των σακχάρων να είναι 0,73 g/L και 0,54 g/L αντίστοιχα. Σύμφωνα με το αποτέλεσμα αυτό, η 11^η μέρα μπορεί να θεωρηθεί η τελευταία μέρα της ζύμωσης. Η παραγωγικότητα, τις πρώτες 3 ημέρες έφτασε στα 0,97 g/L/d και την 13^η στο 0,47 g/L/d, ενώ την 11^η μέρα που μπορεί να θεωρηθεί ως η τελευταία ημέρα της ζύμωσης η παραγωγικότητα ήταν στα 0,61 g/L/d. Η κατανάλωση του αζώτου τις 3 πρώτες ημέρες ήταν 62,5 mg/L/d, την 11^η 8,87 mg/L/d και την 13^η 5,97 mg/L/d γεγονός που μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι υπήρχε αρχικά στροφή του μεταβολισμού προς παραγωγή βιομάζας. Η απόδοση της ζύμωσης την 11^η μέρα έφτασε στα 0,38 g/g ενώ την 13^η 0,35 g/g. Τα ολικά σάκχαρα της ζύμωσης καταναλώθηκαν σε ποσοστό 96% ενώ το FAN αφομοιώθηκε κατά 65%.



Διάγραμμα 3-5: Κινητική κατανάλωσης σακχάρων (▲), κατανάλωσης FAN (●) και παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης (◆) κατά την διάρκεια ζύμωσης διαλείποντος έργου με τον *G. sucrofermentans* σε θρεπτικό υπόστρωμα από χυμό γκρέιπφρουτ.

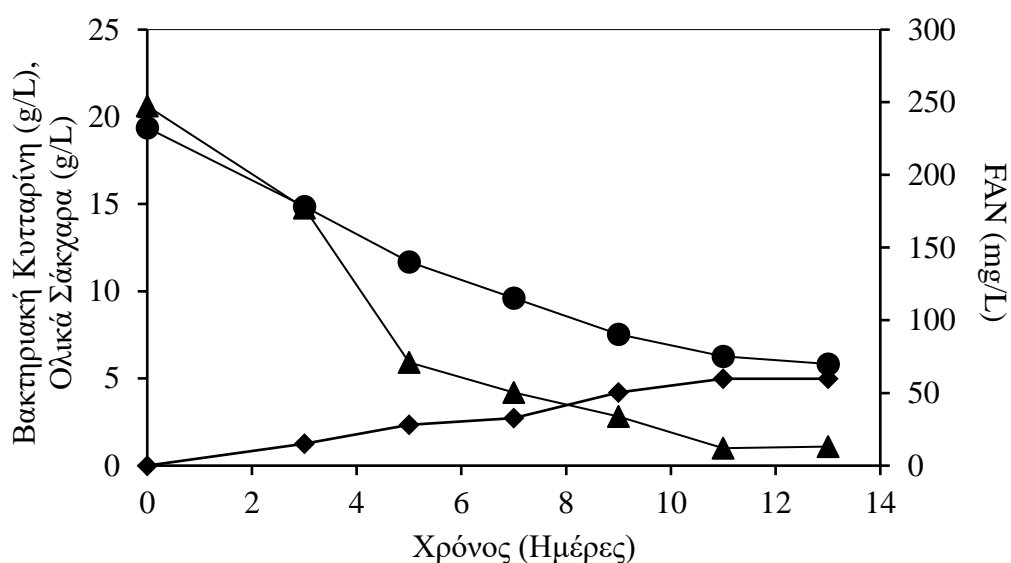
Συγκριτικά με την ζύμωση σε υπόστρωμα από χυμό γκρέιπφρουτ, η ζύμωση που πραγματοποιήθηκε σε συνθετικό υπόστρωμα προσομοιωμένο στη σύσταση του χυμού από γκρέιπφρουτ, ήταν λιγότερο αποδοτική και διήρκεσε 13 ημέρες. Στο διάγραμμα 3-6 παρουσιάζεται η κινητική της ζύμωσης αυτής. Η παραγωγή κυτταρίνης ήταν υποδιπλάσια αυτής που παράχθηκε στο υπόστρωμα του χυμού από γκρέιπφρουτ, με την συγκέντρωσή της την 13^η μέρα να είναι 3,11 g/L. Η παραγωγικότητα φαίνεται να παρέμεινε σχεδόν σταθερή σε όλη την διάρκεια της ζύμωσης. Τις 3 πρώτες μέρες ήταν 0,22 g/L/d ενώ την 13^η μέρα ελαφρώς αυξημένη, 0,23 g/L/d. Την μικρότερη παραγωγικότητα, εμφάνισε την 11^η μέρα με ρυθμό 0,17

g/L/d ενώ η απόδοση της ζύμωσης ήταν 0,19 g/g. Η κατανάλωση των σακχάρων του υποστρώματος έγινε σε ποσοστό 87% ενώ το FAN αφομοιώθηκε σε ποσοστό 42%.



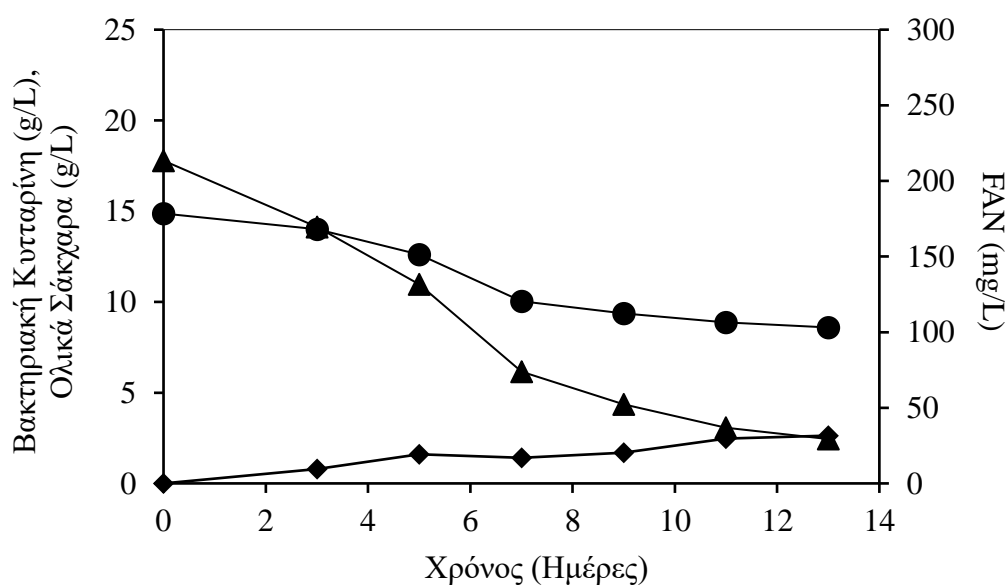
Διάγραμμα 3-6: Κινητική κατανάλωσης σακχάρων (▲), κατανάλωσης FAN (●) και παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης (◆) κατά την διάρκεια ζύμωσης (13 ημέρες) διαλείποντος έργου με το βακτηριακό στέλεχος *G. sacrofermentans* σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα προσομοιωμένο στην σύσταση σακχάρων του χυμού από γκρέιπφρουτ.

Στο πείραμα που ακολούθησε χρησιμοποιήθηκε, εκχύλισμα από τα απόβλητα της αποχυμοποίησης του γκρέιπφρουτ. Σε αυτή τη ζύμωση, η συγκέντρωση των σακχάρων έφτασε στο επιθυμητό (20 g/L) με προσθήκη εμπορικών σακχάρων καθώς η αρχική συγκέντρωσή τους ήταν 15 g/L. Η παραγωγή της κυτταρίνης έφτασε στα 5 g/L ενώ η απόδοση της ζύμωσης ήταν 0,26 g/g και η παραγωγικότητα 0,38 g/L/d. Η κατανάλωση των ολικών σακχάρων της ζύμωσης ήταν 94% ενώ το FAN αφομοιώθηκε κατά. Στο διάγραμμα 3-7 παρουσιάζεται το προφίλ της ζύμωσης.



Διάγραμμα 3-7: Κινητική κατανάλωσης σακχάρων (▲), κατανάλωσης FAN (●) και παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης (◆) κατά την διάρκεια ζύμωσης (13 ημέρες) διαλείποντος έργου με το βακτηριακό στέλεχος *G. sucrofermentans* σε εκχύλισμα αποβλήτων γκρέιπφρουτ.

Στο διάγραμμα 3-8 απεικονίζεται το προφίλ της ζύμωσης που πραγματοποιήθηκε σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα προσομοιωμένο στην σύσταση σακχάρων του εκχυλίσματος γκρέιπφρουτ. Η συγκέντρωση της κυτταρίνης σε αυτό το πείραμα έφτασε στα 2,63 g/L με απόδοση της ζύμωσης 0,17 g/g. Η παραγωγικότητα της ζύμωσης ανήλθε στα 0,20 g/L/d ενώ τα σάκχαρα καταναλώθηκαν σε ποσοστό 86% και το FAN αφομοιώθηκε σε ποσοστό 42%.

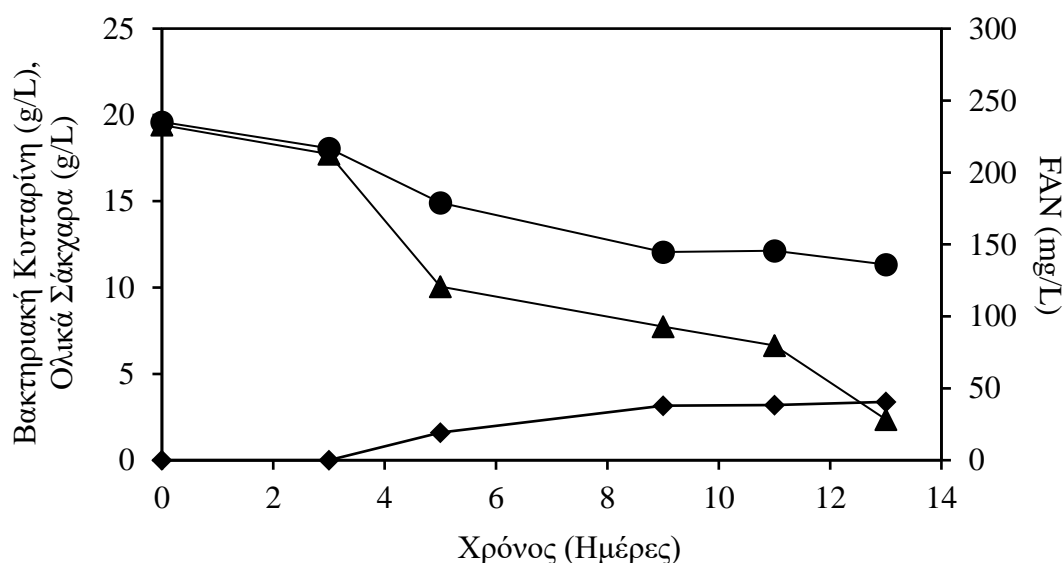


Διάγραμμα 3-8: Κινητική κατανάλωσης σακχάρων (▲), κατανάλωσης FAN (●) και παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης (◆) κατά την διάρκεια ζύμωσης (13 ημέρες) διαλείποντος έργου με το βακτηριακό στέλεχος *G. sucrofermentans* σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα προσομοιωμένο στην σύσταση σακχάρων του εκχυλίσματος γκρέιπφρουτ.

3.4 Ζυμώσεις σε θρεπτικά υποστρώματα προερχόμενα από Λεμόνια

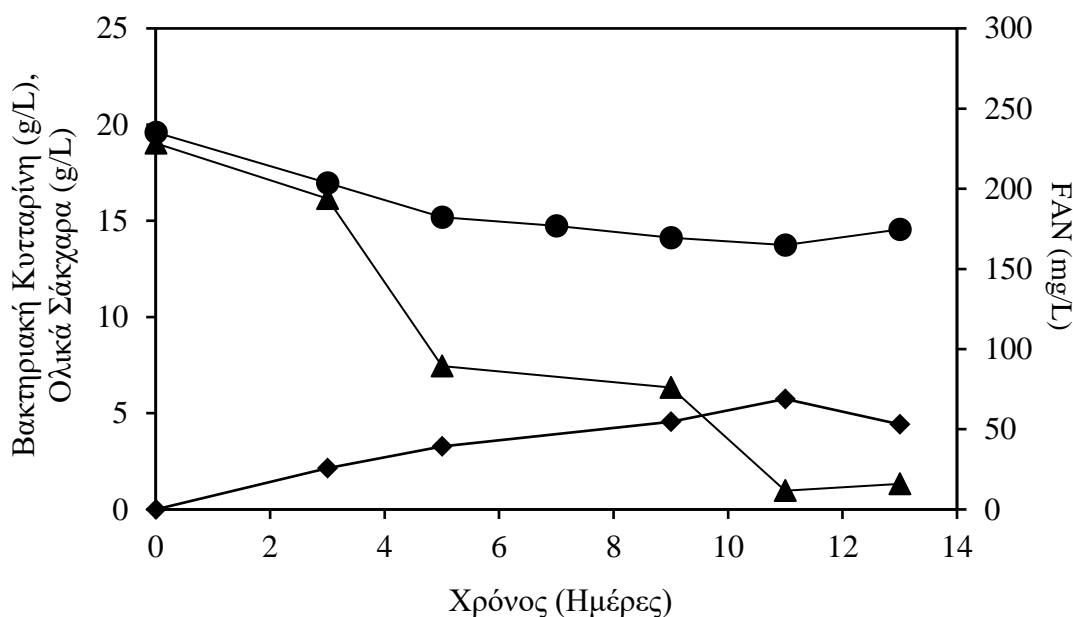
Το λεμόνι χαρακτηρίζεται από υψηλή περιεκτικότητα σε βιταμίνη C και κιτρικό οξύ. Όπως και στα προηγούμενα πειράματα, έτσι και σε αυτό μελετήθηκε η ικανότητα παραγωγής κυτταρίνης σε υποστρώματα από χυμό λεμόνι και εκχύλισμα των αποβλήτων αποχυμοποίησης λεμονιών και τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με τα αποτελέσματα των ζυμώσεων σε υποστρώματα που περιείχαν εμπορικά σάκχαρα σε ίδιες αναλογίες με αυτές του χυμού και του υδρολύματος.

Όσον αφορά την ζύμωση σε υπόστρωμα από χυμό λεμόνι, δε υπήρξε παραγωγή κυτταρίνης. Σε αντίθεση με την ζύμωση σε συνθετικό υπόστρωμα χυμού λεμονιών, όπου η παραγωγή της κυτταρίνης έφτασε στα 3,37 g/L. Στο διάγραμμα 3-9 παρατηρείται ότι η κατανάλωση των σακχάρων αλλά και η παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης καθυστερεί (μετά την 3^η μέρα της ζύμωσης), πράγμα το οποίο μπορεί να οφείλεται στον μεγάλο χρόνο προσαρμογής (lag phase) του μικροοργανισμού, λόγω διαφόρων απροσδιόριστων παραγόντων που δεν κατέστη δυνατό να ελεγχθούν. Η παραγωγικότητα της ζύμωσης έφτασε στα 0,25g/L/d την 13^η μέρα ενώ η απόδοση της ζύμωσης ήταν 0,20 g/g. Η συνολική κατανάλωση των σακχάρων ήταν 87 % και το FAN αφομοιώθηκε κατά 42%



Διάγραμμα 3-9 Κινητική κατανάλωσης σακχάρων (▲), κατανάλωσης FAN (●) και παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης (◆) κατά την διάρκεια ζύμωσης (13 ημέρες) διαλείποντος έργου με το βακτηριακό στέλεχος *G. sucrofermentans* σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα προσομοιωμένο στην σύσταση σακχάρων του χυμού από λεμόνια.

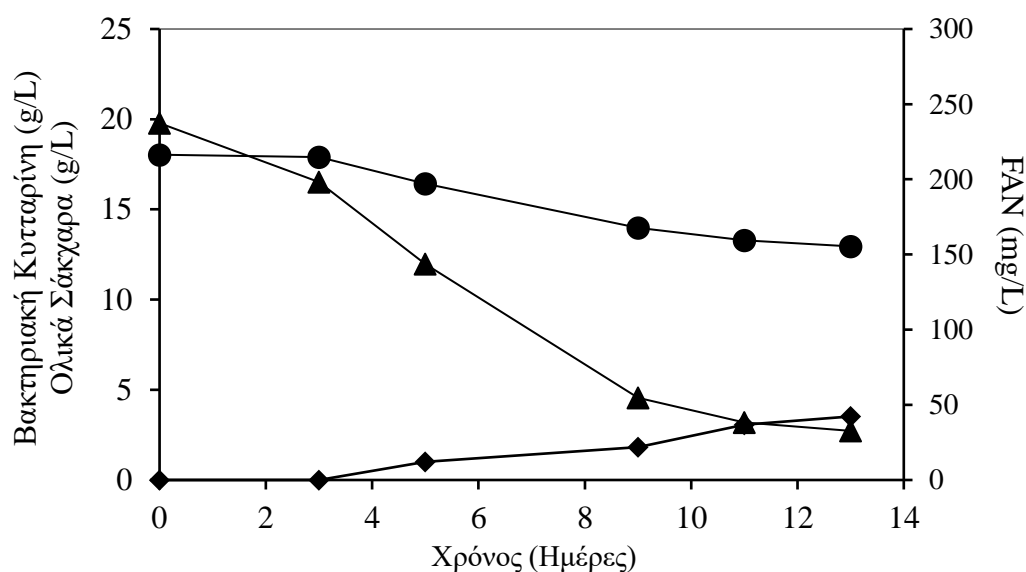
Στο διάγραμμα 3-10 παρουσιάζεται η πορεία της ζύμωσης (13 ημέρες), σε εκχύλισμα αποβλήτων από λεμόνια Σε αντίθεση με το υπόστρωμα που προήλθε από χυμό λεμόνι, σε αυτό το υπόστρωμα ο μικροοργανισμός προχώρησε στην παραγωγή κυτταρίνης. Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα την 11^η μέρα της ζύμωσης παράχθηκε η μεγαλύτερη ποσότητα κυτταρίνης, με την συγκέντρωσή της να φτάνει στα 5,74 g/L ενώ την 13^η μέρα παρουσίασε μια ελαφρώς πτωτική τάση με την συγκέντρωση να είναι , 4,42 g/L. Με βάση το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να θεωρηθεί η 11^η μέρα ως τελευταία ημέρα της ζύμωσης. Η απόδοση της ζύμωσης την 11^η μέρα ήταν 0,45 g/g ενώ την 13^η 0,25 g/g. Η παραγωγικότητα της ζύμωσης την 11^η μέρα ήταν 0,52 g/L/d σε αντίθεση με την 13^η που έφτασε στα 0,34 g/L/d. Η συνολική κατανάλωση σακχάρων έφτασε σε ποσοστό 90% και το FAN αφομοιώθηκε κατά 25%.



Διάγραμμα 3-10: Κινητική κατανάλωσης σακχάρων (▲), κατανάλωσης FAN (●) και παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης (◆) κατά την διάρκεια ζύμωσης (13 ημέρες) διαλείποντος έργου με το βακτηριακό στέλεχος *G. sucrofermentans* σε εκχύλισμα αποβλήτων από λεμόνια.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε μια ακόμα ζύμωση συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα προσομοιωμένο στην σύσταση σακχάρων του εκχυλίσματος από λεμόνια,. Το προφίλ της

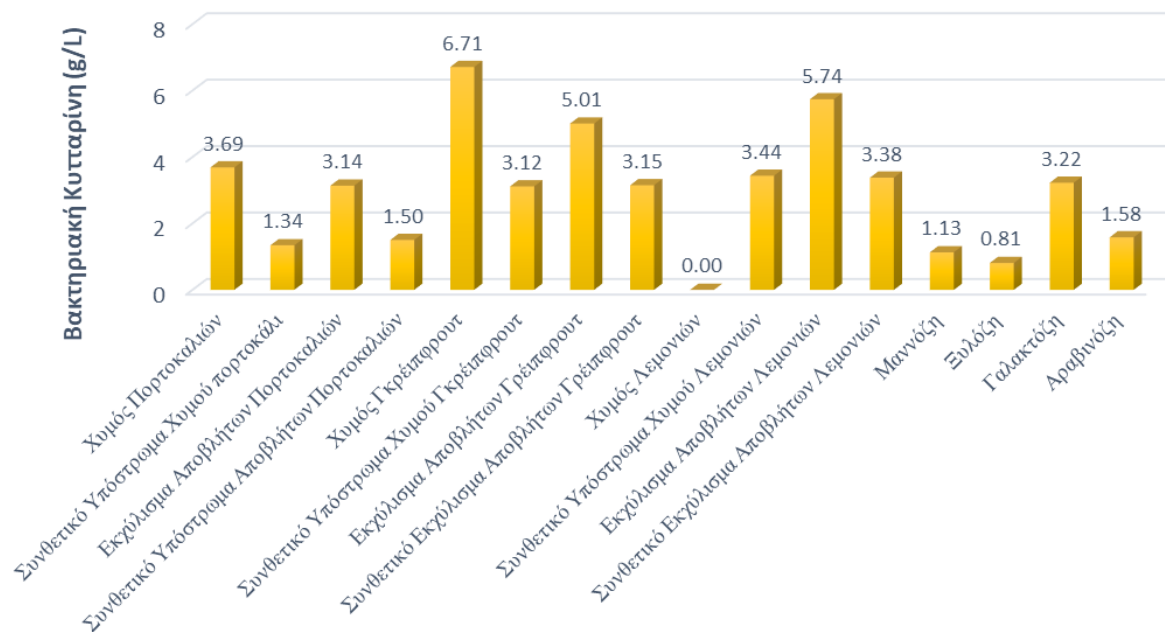
ζύμωσης αυτής παρουσιάζεται στο διάγραμμα 3-11. Η παραγωγή κυτταρίνης έφτασε στα 3,52 g/L και σε αντίθεση με την ζύμωση σε εκχυλίσματος αποβλήτων από λεμόνια. Η ζύμωση αυτή φαίνεται να τελείωσε την 13^η ημέρα. Η απόδοση της ζύμωσης έφτασε στα 0,20 g/g, η παραγωγικότητα 0,27 g/L/d και η κατανάλωση των ολικών σακχάρων της ζύμωσης ήταν 86%. Και σε αυτή τη ζύμωση παρατηρήθηκε ότι η κατανάλωση των σακχάρων και η παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης ξεκίνησε μετά την 3^η μέρα της ζύμωσης, πράγμα το οποίο μπορεί να οφείλεται στον μεγάλο χρόνο προσαρμογής (lag phase) του μικροοργανισμού, λόγω διαφόρων απροσδιόριστων παραγόντων που δεν κατέστη δυνατό να ελεγχθούν. Η αφομοίωση του FAN ήταν και σε αυτή την ζύμωση αρκετά μειωμένη με ποσοστό 28%.



Διάγραμμα 3-11: : Κινητική κατανάλωσης σακχάρων (▲), κατανάλωσης FAN (●) και παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης (◆) κατά την διάρκεια ζύμωσης (13 ημέρες) διαλείποντος έργου με το βακτηριακό στέλεχος *G. sucrofermentans* σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα προσομοιωμένο στην σύσταση του εκχυλίσματος από λεμόνια.

3.5 Σύγκριση Υποστρωμάτων

Στο διάγραμμα 3-12 παρουσιάζονται συνολικά όλα τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν και η συγκέντρωση της κυτταρίνης που παράχθηκε στο καθένα. Η μεγαλύτερη παραγωγή κυτταρίνης επιτεύχθηκε στο υπόστρωμα από τον χυμό γκρέιφρουτ όπου έφτασε στα 6,71 g/L την 11^η ημέρα και αμέσως μετά ακολουθεί η ζύμωση που πραγματοποιήθηκε σε εκχύλισμα αποβλήτων αποχυμοποίησης λεμονιών η συγκέντρωση της βακτηριακής κυτταρίνης έφτασε στα 5,74 g/L.



Διάγραμμα 3-12: Παραγωγή Βακτηριακής Κυτταρίνης σε όλα τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν

3.6 Βιβλιογραφική Ανασκόπηση Παραγωγής Βακτηριακής Κυτταρίνης από Απόβλητα

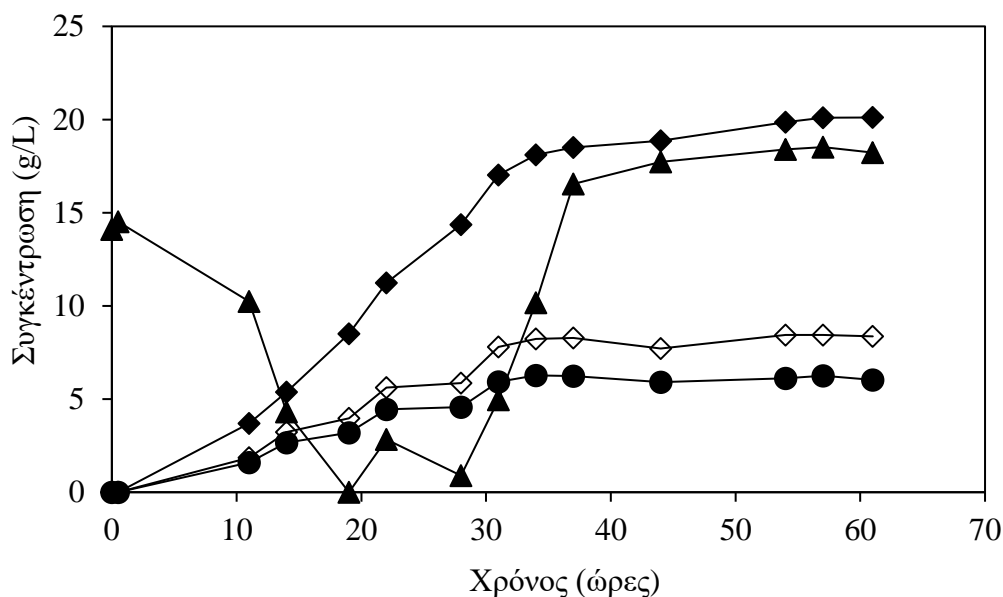
Η παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης με χρήση ανανεώσιμων πηγών που προέρχονται από απόβλητα βιομηχανιών, είναι ευρέως διαδεδομένη. Επί σειρά ετών, πραγματοποιούνται μελέτες που βασίζονται στην αξιοποίηση παραπροϊόντων προερχόμενα από βιομηχανίες και που περιέχουν μία ή και περισσότερες πηγές άνθρακα. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Kurosuni *et al*, η συγκέντρωση βακτηριακής κυτταρίνης σε υπόστρωμα χυμού πορτοκάλι έφτασε στα 5,9 g/L και σε υπόστρωμα που προήλθε από ανανά στα 4,1 g/L. Επίσης έχει αναφερθεί ότι σε ζύμωση που πραγματοποιήθηκε σε υδατικό εκχύλισμα από καρπούς σταφυλιών η παραγωγή κυτταρίνης έφτασε μόλις στα 0,6 g/L (Carreira, P. *et al*, 2011). Αρκετά αυξημένη παραγωγή κυτταρίνης (7 g/L) έχει επιτευχθεί με χρήση υδρολυμάτων από απόβλητα ζυθοποιίας (Lin *et al*, 2014). Μια άλλη μελέτη από τον έδειξε ότι διαφορετικά στελέχη του *K. sucrofermentans* απέδωσαν έως και 533,33 g/L κυτταρίνη σε υπόστρωμα από χυμό καρύδας και σε υπόστρωμα από χυμό ανανά το βακτηριακό στέλεχος *K. sucrofermentans* 893 παράγαγε 576,66 g/L.

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, χαμηλές ποσότητες BC προέκυψαν σε ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν με λακτόζη και ξυλόζη (Nguyen *et al.* 2008; Battad-Bernardo *et al.* 2004). Ακόμη, οι Ishihara *et al.* (2002), ανέφεραν ότι η BC μόλις που σχηματίστηκε σε μέσο που είχε ξυλόζη ως πηγή άνθρακα μετά από τέσσερις εβδομάδες επώασης, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τη παρούσα μελέτη όπου η συγκέντρωση της κυτταρίνης έφτασε μόλις τα 0,81 g/L. Επιπροσθέτως, οι Dahman *et al.* (2010), ανέφεραν ότι η υψηλότερη παραγωγή της BC (5,65 g/L) επιτεύχθηκε σε θρεπτικό μέσο που περιείχε φρουκτόζη, με συνολική κατανάλωση σακχάρου ανέρχεται σε ποσοστό 96%.

3.7 Ακίνητοποίηση *A. succinogenes* και Παραγωγή Ηλεκτρικού Οξέος

Η βακτηριακή κυτταρίνη διαθέτει ευρύ φάσμα βιομηχανικών εφαρμογών. Στη παρούσα μελέτη, κατόπιν αξιολόγησης του αποδοτικότερου υποστρώματος προς παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης, παράχθηκε επαρκής ποσότητα με σκοπό την χρήση της ως μέσο ακίνητοποίησης του βακτηριακού στελέχους *A.succinogenes* προς παραγωγή ηλεκτρικού οξέος. Η επιλογή της κυτταρίνης ως φορέα ακίνητοποίησης του μικροοργανισμού, έγινε με βάση τις ιδιότητες της. Αποτελεί, ένα νέο λειτουργικό υλικό λόγω της εξαιρετικής μηχανικής αντοχής της και της τρισδιάστατης νανοδομής που την χαρακτηρίζει. Διαθέτει ένα πολύ μεγάλο δίκτυο ινών, πράγμα που ευνοεί την προσκόλληση του μικροοργανισμού σε αυτήν.

Μετά την εισαγωγή του φρέσκου θρεπτικού υποστρώματος παρατηρήθηκε παραγωγή ηλεκτρικού οξέος γεγονός το οποίο υποδηλώνει ότι μέρος του μικροοργανισμού είχε παραμείνει ακίνητοποιημένο στην κυτταρίνη. Η παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος συνεχίστηκε για 61 ώρες με την συγκέντρωση του να φτάνει 20,11 g/L (διάγραμμα 3-14). Η παραγωγικότητα του ηλεκτρικού στις 61 ώρες ήταν 0,33 g/L/h ενώ η απόδοση του ηλεκτρικού οξέος στην ξυλόζη 0,49 g/g. Η συνολική ποσότητα της ξυλόζης που καταναλώθηκε ήταν 42,72 g ενώ τα παραπροϊόντα που παρήχθησαν ήταν το μυρμηκικό και το οξικό οξύ σε συγκέντρωσης 6,02 g/L και 8,37 g/L αντίστοιχα (διάγραμμα 3-14). Επίσης αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι το μεγαλύτερο ποσοστό της παραγωγής του ηλεκτρικού οξέος (90%) παρατηρήθηκε στις 34 ώρες λειτουργίας του αντιδραστήρα με την παραγωγικότητα του ηλεκτρικού οξέος να φτάνει την τιμή των 0,53 g/L/h. Η παρατήρηση αυτή δείχνει ότι σε τυχόν βιομηχανική εφαρμογή παραγωγής ηλεκτρικού οξέος με την συγκεκριμένη μεθοδολογία η ζύμωση θα σταματούσε στις 34 ώρες, λόγω του ότι η συνέχεια της λειτουργίας του αντιδραστήρα θα σήμαινε κατανάλωση ενέργειας με μικρή παραγωγή προϊόντος.



Διάγραμμα 3-14: Ακινητοποίηση *A. succinogenes* - Κατανάλωση σακχάρων (▲), παραγωγή ηλεκτρικού οξέος (◆), παραγωγή μυρμηκικού Οξέος (●), παραγωγή οξικού οξέος (◇) και παραπροϊόντων σε ημι-συνεχούς λειτουργίας ζύμωση σε υπόστρωμα ξυλόζης.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι το βακτηριακό στέλεχος *K. sucrofermentans* μεταβόλισε ικανοποιητικά όλα τα θρεπτικά υποστρώματα στα οποία καλλιεργήθηκε εκτός από το υπόστρωμα από χυμό λεμόνι. Το γεγονός ότι δεν αναπτύχθηκε στο υπόστρωμα αυτό, ενδεχομένως να οφείλεται στην υψηλή συγκέντρωση κιτρικού οξέος σε συνδυασμό με την υψηλή του περιεκτικότητα σε βιταμίνη C. Η χρήση χυμού από γκρέιπφρουτ οδήγησε σε αυξημένη παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης (6,71 g/L) συγκριτικά με τα υπόλοιπα υποστρώματα που προήλθαν από εσπεριδοειδή αλλά και συγκριτικά με τα συνθετικά υπόστρωμα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν εμπορικά σάκχαρα. Η αυξημένη παραγωγή κυτταρίνης στα υποστρώματα που προήλθαν από εσπεριδοειδή έναντι των συνθετικών υποστρωμάτων, παρόλο που οι αναλογίες των σακχάρων ήταν ίδιες, οφείλεται στην παρουσία βιταμινών και ιχνοστοιχείων στα υποστρώματα αυτά. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται, κάνοντας μια βιβλιογραφική ανασκόπηση, όπου σύμφωνα με τον S. Keshk (2014) η παρουσία βιταμίνης C ευνοεί την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης. Περεταίρω μελέτη, για την επίδραση των βιταμινών και των ιχνοστοιχείων που περιέχουν τα

εσπεριδοειδή αλλά και για την κατανάλωσή τους από το βακτηριακό στέλεχος, κρίνεται απαραίτητη για την εξαγωγή πιο ασφαλών συμπερασμάτων.

Η ζύμωση σε υπόστρωμα από χυμό γκρέιπφρουτ διήρκησε 2 μέρες λιγότερο όπως και η ζύμωση σε υδρόλυμα από φλούδες λεμονιών εφόσον όπως παρατηρήθηκε η περιεκτικότητα των σακχάρων και για τις 2 ζυμώσεις, την 11^η και την 13^η ημέρα ήταν σχεδόν μηδενικές και η παραγωγή κυτταρίνης την 13^η ημέρα παρουσίαζε μια ελαφρώς πτωτική τάση.

Είναι σαφές ότι η κυτταρίνη που παράγεται με χρήση διαφορετικών πηγών άνθρακα, αλλά και συνθηκών (στατικά ή υπό ανάδευση), παρουσιάζει διαφορές στο χρώμα, την ικανότητα συγκράτησης νερού, στο βαθμό πολυμερισμού και κυρίως στη μηχανική αντοχή.

Σε προσεκτική βιβλιογραφική ανασκόπηση που έγινε, παρατηρήθηκε ότι έχουν χρησιμοποιηθεί αρκετά φρούτα και υδρολύματα αυτών, ως πηγή άνθρακα για την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης, ωστόσο η χρήση αποβλήτων λεμονιών και γκρέιπφρουτ προς παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης δεν έχει αναφερθεί πουθενά.

Τα πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι σε όλες τις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν ο ρυθμός κατανάλωσης του αζώτου τις πρώτες 3 ημέρες των ζυμώσεων ήταν αρκετά αυξημένος και η παραγωγή κυτταρίνης μικρή, συγκριτικά με τις τελευταίες, γεγονός που αποδεικνύει την στροφή του κυτταρικού μεταβολισμού σε παραγωγή βιομάζας.

Η παραγωγή κυτταρίνης με χρήση των εμπορικών σακχάρων όπως η ξυλόζη, η μαννόζη και η αραβινόζη ήταν αρκετά μειωμένη. Βασισόμενη σε αυτή τη μικρή παραγωγή κυτταρίνης μπορούμε να συμπεράνουμε ότι ίσως μια ενδεχόμενη προσαρμογή του μικροοργανισμού να επιτύγχανε καλύτερο μεταβολισμό των σακχάρων αυτών, άρα και μεγαλύτερη παραγωγή κυτταρίνης. Περαιτέρω έρευνα είναι αναγκαία για να διαπιστωθεί.

Τέλος, από την μελέτη ακινητοποίησης του βακτηριακού στελέχους *A.succinogenes* προς παραγωγή ηλεκτρικού οξέος, αποδείχθηκε ότι η βακτηριακή κυτταρίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την ακινητοποίηση του συγκεκριμένου στελέχους. Μελλοντική έρευνα σε αυτό θα πρέπει να εστιάσει στην παραγωγή ηλεκτρικού οξέος μέσω της ακινητοποίησης, σε ζυμώσεις συνεχούς λειτουργίας.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Brett, C. T. (2000): Cellulose microfibrils in plants: biosynthesis, deposition, and integration into the cell wall. *International review of cytology*, 199, 161-199.
- 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.
- Carreira P., Mendes J., Trovatti E., Serafim L., Freire C., Silvestre A., (2011): Utilization of residues from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose. *Bioresources Technology*, 102(15), 7354-60.
- 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.
- 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.
- Chevalier, P. and Noue, J. (1988): Behavior of algae and bacteria co immobilized in carrageenan, in a fluidized bed. *Enzyme Microbial Technology*, 1988, 10, 19–23.
- 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.

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

Driemeier, C., & Francisco, L. H. (2014): X-ray diffraction from faulted cellulose I constructed with mixed I α -I β stacking. *Cellulose*, 21(5), 3161-3169.

El-Saied H, El-Diwany AI, Basta AH, Atwa NA, El-Ghwas DE (2008): Production and characterization of economical bacterial cellulose. *Bioresources*. 3(4), 1196-217.

Fegeros K., Zervas G., Stamouli S. and Apostolaki E., (1995): Nutritive Value of Dried Citrus Pulp and its effect on Milk Yield and Milk Composition of Lactating Ewes. *Journal of Dairy Science*, 78: 1116-1121.

Frazao C., Silva N.,Freire C.,Silvestre A., Xavier A.,Tavares A.,(2014): Bacterial cellulose as carrier for immobilization of laccase: Optimization and characterization. *Engineering in Life Sciences*,14, 500-508

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.

Guettler Michael V., Denise Rumler and Mahendra K. Jain (1999): *Actinobacillus succinogenes* sp. nov., a novel succinic acid producing strain from the bovin rumen. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49, 207-216

Hamdy S., Honecker O., Rehm H., (1992): A comparative study on the formation of citric acid and polyols and on morphological changes of three strains of free and immobilized *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*,36,518-524.

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.

Huber Tim , Jorg Mu ssig , Owen Curnow , Shusheng Pang , Simon Bickerton , Mark P.

Staiger(2012): A critical review of all-cellulose composites J Mater Sci. 47, 1171– 1186 ,

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

Ishihara M., M. Matsunaga, N. Hayashi, V. Ti (2002): Utilization of D-xylose as carbon source for production of bacterial cellulose, Enzyme Microbial Technology 31, 986– 991.

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

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.

Kokubu, T., Karube, I. and Suzuki, S.,(1978): α -Amylase production by immobilized whole cells of *Bacillus subtilis*. European Journal of Applied Microbiology & Biotechnology, 5, 233-240.

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, 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. Bioresources technology, 151, 113-119.

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.

Mahmoud, A. H., El Sayed, M. and Rehm, H. J.,(1986): Semicontinuous penicillin production by two *Penicillium chrysogenum* strains immobilized in calcium alginate beads *Applied Microbiology & Biotechnology.*, 26, 211–214.

Mitropoulou G., Nedovic V, Arun Goyal A., & Kourkoutas Y. (2013): Immobilization Technologies in Probiotic Food Production. *Journal Nutrition and Metabolism*.

Nguyen, V.T., Flanagan, B., Gidley, M.J., Dykes, G.A. (2008): Characterization of Cellulose Production by a *Gluconacetobacter xylinus* Strain from Kombucha. *Current Microbiology* 57, 449–453.

Ogaki M, Sonomoto K, Nakajima H, Tanaka A (1986): Continuous production of oxytetracycline by immobilized growing *Streptomyces rimosus* cells. *Applied Microbiology & Biotechnology* 24, 6.

Okiyama, A., Motoki M., Yamanaka S., (1993): Bacterial cellulose IV. Application to processed foods. *Food hydrocolloids*, 6(6), 503-51.

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.

Pourbafrani M, Forgács G, Horváth IS, Niklasson C, Taherzadeh MJ. (2010): Production of biofuels, limonene and pectin from citrus wastes. *Bioresources Technology* 11, 4246-50.

Pourramezan G.Z., A.M. Roayaei and Q.R. Qezelbash (2009): Optimization of culture conditions for bacterial cellulose production by *Acetobacter* sp. 4B-2 *Biotechnology*. 8, 150-154.

Samuelov NS, Lamed R, Lowe S, Zeikus JG (1991): Influence of CO₂-HCO₃ Levels and pH on Growth, Succinate Production, and Enzyme Activities of *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. *Applied Environmental Microbiology* 57(10) :3013-9.

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.

Singh R., Mathur A., Goswami N., Mathur G., (2016): Effect of carbon sources on physicochemical properties of bacterial cellulose produced from *Gluconacetobacter xylinus* MTCC 7795. *E- polymers*, 16 :265-349.

Song H., Sang Yup Lee S.Y. (2006): Production of succinic acid by bacterial fermentation, *Enzyme and Microbial Technology* 39, 352–361.

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. *sacrofermentans* subsp. nov. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 41(4), 307-314.

Valla S., D. H. Coucheron, E. Fjaervik, J. Kjosbakken, H. Weinhouse, P. Ross, D. Amikam, M. Benziman (1989): Cloning of a gene involved in cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: Complementation of cellulose-negative mutant by the UDPG pyrophosphorylase structural gene, *Molecular Genomics & Genetics* 217, 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.

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.

Xiao, L., Mai, Y., He, F., Yu, L., Zhang, L., Tang, H., (2012): Bio-based green composites with high performance from poly (lactic acid) and surfacemodified microcrystalline cellulose. *Journal of Materials Chemistry*, 22(31),15732-15739.

Yamada Yuzo, Pattaraporn Yukphan, Huong Thi Lan Vu, Yuki Muramatsu, Duangjai Ochaikul, Somboon Tanasupawat, and Yasuyoshi Nakagawa (2012): Description of *Komagataeibacter* gen. nov., with proposals of new combinations (*Acetobacteraceae*). *Journal of General and Applied Microbiology* 58, 397–404.

Yamada, Y., Hoshino, K., and Ishikawa, T. (1998): Validation list no. 64 Validation of publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB. *International Journal of System Bacteriology* 48, 327-328,

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

Zaar K. (1977): The biogenesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. *Cytobiologie*, 16, 1.

Zhang X., You S, Ma L., Chen C., Chao L. (2015): The Application of Immobilized Microorganism Technology in Wastewater Treatment. 2nd International Conference on Machinery, Materials Engineering, Chemical Engineering and Biotechnology.

Παπαγεωργίου, Β.Π.: Εφαρμοσμένη Οργανική Χημεία: Άκυκλες Ενώσεις, εκδόσεις «Παρατηρητής», Θεσσαλονίκη 1986.