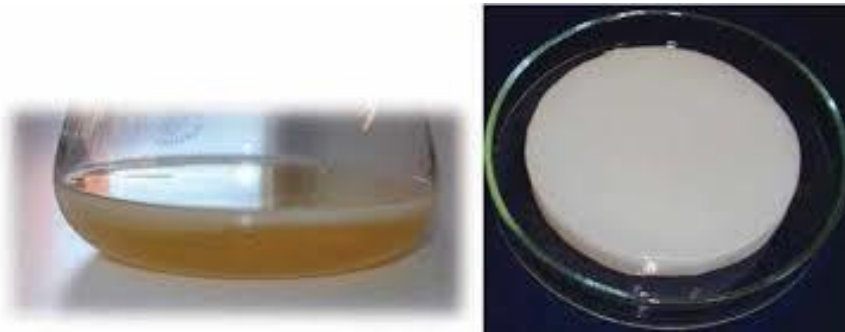




**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ & ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ**  
**ΤΡΟΦΙΜΩΝ**  
**ΠΙΜΣ: ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**  
**& ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ**  
**ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΒΙΟΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ &**  
**ΒΙΟΔΙΥΛΙΣΤΗΡΙΩΝ**

## **ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**

**ΘΕΜΑ: «Ανάπτυξη βιοδιυλιστηρίου για την αξιοποίηση παραπροϊόντων χυμοποίησης όπως και αποβλήτων από λαϊκές αγορές για την παραγωγή βακτηριακής κντταρίνης και άλλων προϊόντων προστιθέμενης αξίας»**



**Ελπνίκη-Ευαγγελία Γ. Κόπανου**  
**Επιβλέπων Καθηγητής: Κουτίνας Αποστόλης**

**Αθήνα, 2020**

## **ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**

**ΘΕΜΑ:** «Ανάπτυξη βιοδιυλιστηρίου για την αξιοποίηση παραπροϊόντων χυμοποίησης όπως και αποβλήτων από λαϊκές αγορές για την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης και άλλων προϊόντων προστιθέμενης αξίας»

**SUBJECT:** « Development of a bio-refinery for the utilization of fruit processing by-products as well as waste from open markets for the production of bacterial cellulose and other value-added products»

**Ελπινίκη-Ευαγγελία Γ. Κόπανου**

### **Εξεταστική επιτροπή:**

**Επιβλέπων:** Κουτίνας Αποστόλης, Αναπληρωτής Καθηγητής

**A' Μέλος:** Παπανικολάου Σεραφείμ, Καθηγητής

**B' Μέλος:** Στοφόρος Νικόλαος, Καθηγητής

## **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 στο εργαστήριο «Μηχανικής και Επεξεργασίας Τροφίμων». Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στο να φέρω εις πέρας την παρούσα Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Αποστόλη Κουτίνα για την ανάθεση ενός τόσο ενδιαφέροντος και πρωτότυπου θέματος ως αντικείμενο της μεταπτυχιακής μου μελέτης, την άψογη συνεργασία μας, καθώς και την εμπιστοσύνη που έδειξαν στο πρόσωπο μου.

Ξεχωριστά θέλω να ευχαριστήσω το μεταδιδάκτορα ερευνητή Δρ. Δημήτριο Λαδάκη για την αποτελεσματική συνεργασία και καθοδήγηση του, καθώς χωρίς την πολύτιμη βοήθεια του η εκπόνηση της παρούσας μελέτης δε θα μπορούσε να είχε ολοκληρωθεί.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις υποψήφιες διδάκτορες Κατιάνα Φιλιππή και Σοφία Ιωαννίδου, τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Έλλη Σινάπη, καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου για τη σημαντική βοήθεια τις πολύτιμες συμβουλές και υποδείξεις τους, καθ' όλη τη διάρκεια της διεξαγωγής των πειραμάτων.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την αμέριστη συμπαράσταση, βοήθεια και προ πάντων κατανόηση και ανοχή καθ' όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου.

## Περίληψη

Η κυτταρίνη είναι το πιο άφθονο βιοπολυμερές στη γη. Αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος του κυτταρικού τοιχώματος των φυτικών ιστών και μπορεί να παραχθεί μέσω των μικροβιακών ζυμώσεων κυρίως από βακτηριακά στελέχη του γένους *Acetobacter*. Λόγω της υψηλής της καθαρότητας και των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών της, βρίσκει εφαρμογή σε πολλαπλούς τομείς όπως στην ιατρική, τη βιομηχανία τροφίμων και καλλυντικών καθώς και σε άλλα εμπορικά και βιομηχανικά προϊόντα.

Στη παρούσα μελέτη, αξιολογήθηκε η δυνατότητα παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης από το βακτηριακό στέλεχος *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM 15973 αξιοποιώντας απόβλητα φρούτων, φλοιών πορτοκαλιού και στεμφύλων μετά τη διαδικασία παραγωγής οίνου. Ο μικροοργανισμός *Komagataeibacter sucrofermentans* αναπτύχθηκε σε χυμούς αυτών, καθώς και σε εκχυλίσματα που προέκυψαν μετά από κατάλληλη επεξεργασία της φλούδας ύστερα από χημική και ενζυμική υδρόλυση.

Η βάση για όλες τις βακτηριακές ζυμώσεις ήταν το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας Hestrin-Schramm (HS-γλυκόζη) όπου η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων είναι 20 g/L και η συγκέντρωση του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων αμινοξέων και πεπτιδίων είναι 385 mg/L. Η μέγιστη παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης σε κωνικές φιάλες επιτεύχθηκε όταν ο μικροοργανισμός *K. sucrofermentans* αναπτύχθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα προερχόμενο από ελεύθερα σάκχαρα φρούτων με συγκέντρωση 6,48 g/L και απόδοση 0,35 g/g. Στη ζύμωση που έλαβε χώρα σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου με υπόστρωμα προερχόμενο από ελεύθερα σάκχαρα φρούτων η συγκέντρωση της βακτηριακής κυτταρίνης έφτασε τα 10,2 g/L και η απόδοση τα 0,62 g/g. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις σε πλαστικά δοχεία με σκοπό τη βελτιστοποίηση της παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης παρουσία και απουσία αερισμού με υπόστρωμα προερχόμενο από ελεύθερα σάκχαρα αποβλήτων φλοιών πορτοκαλιού και η μέγιστη συγκέντρωση βακτηριακής κυτταρίνης έφτασε τα 11,56 g/L με απόδοση 0,72 g/g με παροχή αερισμού. Αντιθέτως, οι ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες με υποστρώματα προερχόμενα από ελεύθερα σάκχαρα στεμφύλων και υδρόλυμα αποβλήτων φλοιών πορτοκαλιού παρουσίασαν τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις βακτηριακής κυτταρίνης συγκριτικά με τις υπόλοιπες ζυμώσεις.

Επιπροσθέτως, μελετήθηκε η δυνατότητα εκχύλισης πηκτινών με χρήση διαφορετικών οξέων (κιτρικό οξύ: 68,15%, HNO<sub>3</sub>: 55,23%, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 64,21%, HCl: 47,14%) από απόβλητα φλοιών πορτοκαλιού. Τέλος, μελετήθηκε ο βαθμός πολυμερισμού δειγμάτων βακτηριακής κυτταρίνης που προέκυψαν από τις παραπάνω ζυμώσεις, με μέγιστη τιμή στη ζύμωση με πηγή άνθρακα τα ελεύθερα σάκχαρα αποβλήτων φρούτων.

**Λέξεις κλειδιά:** βιοδωλιστήριο, ανανεώσιμες πρώτες ύλες, απόβλητα χυμοποίησης, απόβλητα φρούτων, *Komagataeibacter sucrofermentans*, βακτηριακή κυτταρίνη, πηκτίνες

## ***Abstract***

Cellulose is the most abundant biopolymer on earth. It constitutes the largest part of the cell wall of plant tissues. Furthermore, it can be produced by microbial fermentation mainly by bacterial strains of the genus *Acetobacter*. Nowadays, research is focused on bacterial cellulose production due to its high purity, physico-chemical characteristics and wide range of applications in numerous sectors namely medicine, food industry and various bio-based products formation.

In the present study, the bacterial cellulose production potential of the bacterial strain *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM 15973 was evaluated using fruit, grape and orange peel waste. The bacterial strain *Komagataeibacter sucrofermentans* was cultivated in fruit derived sugars and extracts obtained after proper chemical treatment and enzymatic hydrolysis of peels.

The basis for all bacterial fermentations was the Hestrin-Schramm (HS-glucose) culture medium, where the initial sugar concentration is 20 g/L and the free amino nitrogen concentration is 385 mg/L. The highest bacterial cellulose concentration (6,48 g/L) with a yield of 0,35 g/g was achieved when the *K. sucrofermentans* strain was cultivated in shake flasks using a fermentation medium containing fruit derived free sugars. Batch bioreactor fermentation was subsequently carried out using fruit derived free sugars leading to bacterial cellulose concentration of 10,2 g/L with yield of 0,62 g/g. In addition, fermentations were carried out in plastic containers with or without air sparging to optimize bacterial cellulose production using orange peel derived free sugars leading to bacterial cellulose concentration up to 11,56 g/L with yield of 0,72 g/g when aeration was employed. The lowest bacterial cellulose production was observed when sugars derived from winery waste and orange peel waste hydrolysates were used in shake flask fermentations.

Pectin extraction from orange peels was evaluated using different acids (citric acid: 68,15%, HNO<sub>3</sub>: 55,23%, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 64,21%, HCl: 47,14%). The degree of polymerization of bacterial cellulose samples resulting from the above fermentations was studied, with the maximum value obtained when the bacterial cellulose was produced using free sugars derived from fruit waste.

**Keywords:** biorefinery, renewable resources, fruit waste, *Komagataeibacter sucrofermentans*, bacterial cellulose, pectins

## Περιεχόμενα

<i>Περίληψη</i> .....	4
<i>Abstract</i> .....	5
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	4
1.1 Βιοσύνθεση της Βακτηριακής Κυτταρίνης .....	5
1.2 Μηχανισμός της Βιοσύνθεσης .....	6
1.3 Δομή Βακτηριακής Κυτταρίνης .....	7
1.4 Ιδιότητες Βακτηριακής Κυτταρίνης .....	9
1.5 Εφαρμογές Βακτηριακής Κυτταρίνης .....	10
1.5.1 Εφαρμογές στη Βιομηχανία Τροφίμων .....	11
1.5.2 Ιατρικές και Φαρμακευτικές Εφαρμογές .....	12
1.6 Χαρακτηριστικά Μικροοργανισμού <i>Komagataeibacter sucrofermentans</i> .....	13
1.6.1 Επίδραση Συνθηκών Ζύμωσης στη Παραγωγή Βακτηριακής Κυτταρίνης .....	14
1.7 Απόβλητα Φρούτων και Ειδικότερα Εσπεριδοειδών και Απόβλητα Στεμφύλων .....	15
1.7.1 Απόβλητα Φρούτων .....	16
1.7.2 Απόβλητα Εσπεριδοειδών .....	18
1.7.3 Απόβλητα Στεμφύλων .....	20
1.8 Χαρακτηριστικά Πηκτίνης και Εκχύλιση της .....	22
1.8.1 Δομή και Χαρακτηριστικά Πηκτίνης .....	22
1.8.2 Εκχύλιση Πηκτίνης .....	23
1.9 Σκοπός Μελέτης .....	23
2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	24
2.1 Βιολογικό Υλικό .....	24
Παρασκευή Εμβολίου .....	24
Συνθήκες Αποθήκευσης .....	24
2.2 Θρεπτικά Υποστρώματα .....	24
2.2.1 Υπόστρωμα με Ελεύθερα Σάκχαρα από Απόβλητα Φρούτων .....	24
2.2.2 Υπόστρωμα με Ελεύθερα Σάκχαρα από Στέμφυλα .....	26
2.2.3 Υπόστρωμα με Ελεύθερα Σάκχαρα από Απόβλητα Φλοιών Πορτοκαλιού .....	27

2.3	Συνθήκες Ζύμωσης Διαλείποντος Έργου .....	28
2.4	Παραλαβή και Καθαρισμός της Βακτηριακής Κυτταρίνης .....	29
2.5	Ζύμωση Διαλείποντος Έργου σε Βιοαντιδραστήρα με Υπόστρωμα από Ελεύθερα Σάκχαρα από Απόβλητα Φρούτων .....	29
2.5.1	Τεχνικά Χαρακτηριστικά Βιοαντιδραστήρα.....	29
2.5.2	Θρεπτικό Υπόστρωμα Καλλιέργειας.....	30
2.6	Εργαστηριακές Αναλύσεις.....	30
2.6.1	Προσδιορισμός της Σύστασης Αποβλήτων Φρούτων και Φλοιών Πορτοκαλιού (πρωτόκολλο NREL) .....	30
2.6.2	Προσδιορισμός της Περιεκτικότητας των Αποβλήτων Φρούτων και Φλοιών Πορτοκαλιού σε Πρωτεΐνη με τη Μέθοδο Kjeldahl .....	31
2.7	Προσδιορισμός Αζώτου των Ελεύθερων Αμινομάδων Αμινοξέων και Πεπτιδίων (FAN).....	32
2.8	Μέθοδος Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης .....	34
2.9	Μέθοδος Εκχύλισης Πηκτινών από Απόβλητα Φλοιών Πορτοκαλιών .....	34
2.9.1	Προσδιορισμός Γαλακτουρονικού Οξέος Πηκτινών .....	35
2.10	Χημική και Ενζυμική Υδρόλυση για Παραγωγή Σακχάρων .....	36
2.11	Βαθμός Πολυμερισμού .....	37
3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	38
3.1	Προσδιορισμός της Σύστασης Αποβλήτων Φρούτων και Φλοιών Πορτοκαλιού .....	38
3.2	Ζύμωση Διαλείποντος Έργου με Υπόστρωμα από Ελεύθερα Σάκχαρα Αποβλήτων Φρούτων .....	39
3.3	Ζύμωση Διαλείποντος Έργου με Υπόστρωμα από Ελεύθερα Σάκχαρα Στεμφύλων. ....	41
3.4	Ζύμωση Διαλείποντος Έργου σε Βιοαντιδραστήρα με Υπόστρωμα από Ελεύθερα Σάκχαρα από Απόβλητα Φρούτων .....	44
3.5	Προσδιορισμός Πηκτινών από Απόβλητα Φλοιών Πορτοκαλιού .....	46
3.6	Ζύμωση Διαλείποντος Έργου με Υπόστρωμα από Ελεύθερα Σάκχαρα Αποβλήτων Φλοιών Πορτοκαλιού σε Πλαστικά Δοχεία.....	47
3.7	Υδρολύσεις .....	51
3.8	Ζύμωση Διαλείποντος Έργου με Υπόστρωμα από Υδρόλυμα Αποβλήτων Φλοιών Πορτοκαλιού.....	52

3.9	Ζύμωση Διαλείποντος Έργου με Υπόστρωμα από Υδρόλυμα Αποβλήτων Φλοιών Πορτοκαλιού σε Πλαστικά Δοχεία.....	54
3.10	Βαθμός Πολυμερισμού .....	57
4	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	58
5	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	60



## Κατάλογος Πινάκων

<b>Πίνακας 1.1</b> Γενική σύσταση φρούτων και λαχανικών ανά εκατό γραμμάρια καρπού (Lintas <i>et al.</i> , 1992). .....	17
<b>Πίνακας 2.1</b> Σύσταση αντιδραστηρίων για τη μέτρηση FAN. ....	33
<b>Πίνακας 3.1</b> Αποτελέσματα (σε % ξηρό βάρος) της σύστασης των φρούτων. ....	38
<b>Πίνακας 3.2</b> Αποτελέσματα (σε % ξηρό βάρος) της σύστασης των φλοιών του πορτοκαλιού και σύγκριση τους με βιβλιογραφικά στοιχεία. ....	39
<b>Πίνακας 3.3</b> Αποτελέσματα στερεού μετά την εκχύλιση πηκτίνης (%) με χρήση διαφορετικών οξέων, από φλοιούς των αποβλήτων του πορτοκαλιού, ποσότητας D-γαλακτουρονικού οξέος (g/100 g ξηρό βάρος) που περιέχεται στη πηκτίνη και ποσοστό ανακτηθείσας πηκτίνης (%). ....	46
<b>Πίνακας 3.4</b> Αποτελέσματα του βαθμού πολυμερισμού των δειγμάτων βακτηριακής κυτταρίνης προερχόμενα από διαφορετικές ζυμώσεις. ....	57

## Κατάλογος Εικόνων

<b>Εικόνα 1.1</b> Μεταβολικό μονοπάτι του άνθρακα στον <i>K. sucrofermentans</i> . CS, συνθάση της κυτταρίνης; FBP, φρουκτόζη-1,6-διφωσφορική φωσφατάση; FK, γλυκοκινάση; G6PDH, γλυκόζη-6-φωσφορική αφυδρογονάση; 1FPk, φρουκτόζη-1-φωσφορική κινάση; PGI, φωσφο-γλυκο-ισομεράση; PGM, φωσφο-γλυκο-μουτάση; PTS, σύστημα φωσφο-τρανσφερασών; UGP, πυροφωσφορυλάση; UDPGlc, ουριδίνη διφωσφογλυκόζης (Shoda <i>et al.</i> , 2005). ....	7
<b>Εικόνα 1.2</b> Η δομή της κυτταρίνης (Yamanaka <i>et al.</i> , 2000). ....	8
<b>Εικόνα 1.3</b> Μεμβράνη βακτηριακής κυτταρίνης σε στατικές συνθήκες καλλιέργειας (προσωπικό αρχείο). ....	8
<b>Εικόνα 1.4</b> Μικροϊνίδια βακτηριακής κυτταρίνης (Jonas <i>et al.</i> , 1998). ....	8
<b>Εικόνα 1.5</b> Ποσοστά εκτάσεων καλλιέργειας των φρούτων κατά κύριο κράτος της Ευρωπαϊκής Ένωσης, 2017 (Eurostat, 2017). ....	16
<b>Εικόνα 1.6</b> Παγκόσμια παραγωγή πορτοκαλιών για τα έτη 2012 έως 2019- (USDA, Ιούλιος 2019). ....	18
<b>Εικόνα 1.7</b> Παγκόσμια παραγωγή χυμού πορτοκαλιών, παγκόσμια κατανάλωση χυμού πορτοκαλιών για τα έτη 2009 έως 2019- (USDA, Ιούλιος 2019). ....	20
<b>Εικόνα 1.8</b> Ποσοστά εκτάσεων καλλιέργειας των σταφυλιών κατά κύριο κράτος της Ευρωπαϊκής Ένωσης, 2015 (Eurostat, 2015). ....	21

## Κατάλογος Διαγραμμάτων

<b>Διάγραμμα 2.1</b> Διάγραμμα ροής για παραλαβή των ελεύθερων σακχάρων από απόβλητα φρούτων και ζύμωση σε κωνικές φιάλες για παραλαβή βακτηριακής κυτταρίνης.	25
<b>Διάγραμμα 2.2</b> Διάγραμμα ροής για παραλαβή των ελεύθερων σακχάρων από απόβλητα στεμφύλων και ζύμωση σε κωνικές φιάλες για παραλαβή βακτηριακής κυτταρίνης. ....	27
<b>Διάγραμμα 2.3</b> Διάγραμμα ροής για παραλαβή των ελεύθερων σακχάρων από απόβλητα φλοιών πορτοκαλιού και ζύμωση σε πλαστικά δοχεία για παραλαβή βακτηριακής κυτταρίνης. ....	28
<b>Διάγραμμα 2.4</b> Καμπύλη αναφοράς της γλυκίνης με τη μέθοδο FAN. ....	33
<b>Διάγραμμα 2.5</b> Διάγραμμα ροής για την απομάκρυνση των πηκτινών από τα απόβλητα των φλοιών πορτοκαλιού.....	35
<b>Διάγραμμα 2.6</b> Διάγραμμα ροής χημικής υδρόλυσης του στερεού μετά την απομάκρυνση των πηκτινών.....	36
<b>Διάγραμμα 3.1</b> Κινητική κατανάλωσης σακχάρων: σακχαρόζη (▲), γλυκόζη (◆), φρουκτόζη (■) και παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης (◇) κατά τη διάρκεια ζύμωσης διαλείποντος έργου με το <i>K. sucrofermentans</i> σε θρεπτικό υπόστρωμα από ελεύθερα σάκχαρα αποβλήτων φρούτων. ....	40
<b>Διάγραμμα 3.2</b> Κινητική κατανάλωσης σακχάρων (◇), κατανάλωσης FAN (■) και παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης (◆) κατά τη διάρκεια ζύμωσης διαλείποντος έργου με το <i>K. sucrofermentans</i> σε θρεπτικό υπόστρωμα από ελεύθερα σάκχαρα αποβλήτων φρούτων. ....	41
<b>Διάγραμμα 3.3</b> Κινητική κατανάλωσης σακχάρων: σακχαρόζη (▲), γλυκόζη (◆), φρουκτόζη (■) και παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης (◇) κατά τη διάρκεια ζύμωσης διαλείποντος έργου με το <i>K. sucrofermentans</i> σε θρεπτικό υπόστρωμα από ελεύθερα σάκχαρα στεμφύλων.....	42
<b>Διάγραμμα 3.4</b> Κινητική κατανάλωσης σακχάρων (◆), κατανάλωσης FAN (■) και παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης (◇) κατά τη διάρκεια ζύμωσης διαλείποντος έργου με το <i>K. sucrofermentans</i> σε θρεπτικό υπόστρωμα από ελεύθερα σάκχαρα στεμφύλων.....	43
<b>Διάγραμμα 3.5</b> Κινητική κατανάλωσης σακχάρων: σακχαρόζη (▲), γλυκόζη (■), φρουκτόζη (◆) και παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης (◇) κατά τη διάρκεια ζύμωσης διαλείποντος έργου σε βιοαντιδραστήρα με το <i>K. sucrofermentans</i> σε θρεπτικό υπόστρωμα από ελεύθερα σάκχαρα αποβλήτων φρούτων. ....	44
<b>Διάγραμμα 3.6</b> Κινητική κατανάλωσης σακχάρων (◇), κατανάλωσης FAN (○) και παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης (◆) κατά τη διάρκεια ζύμωσης διαλείποντος έργου σε βιοαντιδραστήρα με το <i>K. sucrofermentans</i> σε θρεπτικό υπόστρωμα από ελεύθερα σάκχαρα αποβλήτων φρούτων. ....	45

**Διάγραμμα 3.7** Αποτελέσματα στερεού μετά την εκχύλιση πηκτίνης (%) με χρήση διαφορετικών οξέων (κιτρικό οξύ (■), HNO<sub>3</sub> (⊠), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (⊞), HCl (⊞), HCl (1/2) (⊞), HCl (1/4) (⊞)) από φλοιούς των αποβλήτων του πορτοκαλιού, ποσότητας D-γαλακτουρονικού οξέος (%) που περιέχεται στη πηκτίνη και ποσοστό ανακτηθείσας πηκτίνης (%). ..... 47

**Διάγραμμα 3.8** Κινητική κατανάλωσης σακχάρων: σακχαρόζη (□), γλυκόζη (○), φρουκτόζη (▲) και παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης (◆) κατά τη διάρκεια ζύμωσης διαλείποντος έργου σε πλαστικά δοχεία παρουσία αερισμού με το *K. sucrofermentans* σε θρεπτικό υπόστρωμα από ελεύθερα σάκχαρα αποβλήτων φλοιών πορτοκαλιού. .... 48

**Διάγραμμα 3.9** Κινητική κατανάλωσης σακχάρων (◇), κατανάλωσης FAN (○) και παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης (◆) κατά τη διάρκεια ζύμωσης διαλείποντος έργου σε πλαστικά δοχεία παρουσία αερισμού με το *K. sucrofermentans* σε θρεπτικό υπόστρωμα από ελεύθερα σάκχαρα αποβλήτων φλοιών πορτοκαλιού. .... 49

**Διάγραμμα 3.10** Κινητική κατανάλωσης σακχάρων: σακχαρόζη (□), γλυκόζη (○), φρουκτόζη (▲) και παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης (◆) κατά τη διάρκεια ζύμωσης διαλείποντος έργου σε πλαστικά δοχεία απουσία αερισμού με το *K. sucrofermentans* σε θρεπτικό υπόστρωμα από ελεύθερα σάκχαρα αποβλήτων φλοιών πορτοκαλιού. .... 50

**Διάγραμμα 3.11** Κινητική κατανάλωσης σακχάρων (□), κατανάλωσης FAN (○) και παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης (◆) κατά τη διάρκεια ζύμωσης διαλείποντος έργου σε πλαστικά δοχεία απουσία αερισμού με το *K. sucrofermentans* σε θρεπτικό υπόστρωμα από ελεύθερα σάκχαρα αποβλήτων φλοιών πορτοκαλιού. .... 51

**Διάγραμμα 3.12** Κινητική κατανάλωσης σακχάρων: γλυκόζη (■), ξυλόζη (◆), αραβινόζη (▲) και παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης (◇) κατά τη διάρκεια ζύμωσης διαλείποντος έργου με το *K. sucrofermentans* σε θρεπτικό υπόστρωμα από υδρόλυμα αποβλήτων φλοιών πορτοκαλιού. .... 52

**Διάγραμμα 3.13** Κινητική κατανάλωσης σακχάρων (■), κατανάλωσης FAN (◆) και παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης (◇) κατά τη διάρκεια ζύμωσης διαλείποντος έργου με το *K. sucrofermentans* σε θρεπτικό υπόστρωμα από υδρόλυμα αποβλήτων φλοιών πορτοκαλιού. .... 53

**Διάγραμμα 3.14** Κινητική κατανάλωσης σακχάρων: γλυκόζη (▲), ξυλόζη (○), αραβινόζη (◇) και παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης (◆) κατά τη διάρκεια ζύμωσης διαλείποντος έργου σε πλαστικά δοχεία παρουσία αερισμού με το *K. sucrofermentans* σε θρεπτικό υπόστρωμα από υδρόλυμα αποβλήτων φλοιών πορτοκαλιού..... 54

**Διάγραμμα 3.15** Κινητική κατανάλωσης σακχάρων (■), κατανάλωσης FAN (○) και παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης (◆) κατά τη διάρκεια ζύμωσης διαλείποντος έργου σε πλαστικά δοχεία απουσία αερισμού με το *K. sucrofermentans* σε θρεπτικό υπόστρωμα από υδρόλυμα αποβλήτων φλοιών πορτοκαλιού. .... 55

**Διάγραμμα 3.16** Κινητική κατανάλωσης σακχάρων: γλυκόζη (▲), ξυλόζη (○), αραβινόζη (◇) και παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης (◆) κατά τη διάρκεια ζύμωσης διαλείποντος έργου σε πλαστικά δοχεία απουσία αερισμού με το *K. sacrofermentans* σε θρεπτικό υπόστρωμα από υδρόλυμα αποβλήτων φλοιών πορτοκαλιού..... 56

**Διάγραμμα 3.17** Κινητική κατανάλωσης σακχάρων (■), κατανάλωσης FAN (○) και παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης (◆) κατά τη διάρκεια ζύμωσης διαλείποντος έργου σε πλαστικά δοχεία απουσία αερισμού με το *K. sacrofermentans* σε θρεπτικό υπόστρωμα από υδρόλυμα αποβλήτων φλοιών πορτοκαλιού. .... 56

## 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η κυτταρίνη είναι το πιο άφθονο βιοπολυμερές στη γη, αποτελώντας το μεγαλύτερο μέρος των κυτταρικών τοιχωμάτων των φυτών. Είναι γραμμικό πολυμερές μονάδων γλυκόζης που συνδέονται μεταξύ τους με β-(1,4) γλυκοζιτικό δεσμό. Υπάρχουν δύο κατηγορίες κυτταρίνης: η φυτική και η βακτηριακή. Η βακτηριακή κυτταρίνη περιλαμβάνεται στα προϊόντα πρωτογενούς μεταβολισμού των βακτηρίων και λειτουργεί ως μια προστατευτική μεμβράνη σε αντίθεση με τη φυτική κυτταρίνη της οποίας ο ρόλος είναι δομικός. Η φυτική κυτταρίνη συνυπάρχει με τη λιγνίνη και την ημικυτταρίνη με αποτέλεσμα να μην είναι εύκολη η παραγωγή της σε καθαρή μορφή. Το γεγονός αυτό δημιουργεί την ανάγκη αναζήτησης άλλων πηγών κυτταρίνης υψηλότερης καθαρότητας (Lestari *et al.*, 2014).

Η βακτηριακή κυτταρίνη (Bacterial Cellulose-BC) έχει τον ίδιο μοριακό τύπο με τη φυτική,  $(C_6H_{10}O_5)_n$ , όμως διαφέρει ως προς τα φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά της. Η βακτηριακή κυτταρίνη εμφανίζει απόλυτη χημική καθαρότητα, υψηλότερο βαθμό πολυμερισμού, πορώδες καθώς και δείκτη κρυσταλλικότητας. Βάσει των ανωτέρω ιδιοτήτων μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε διάφορους τομείς, όπως στις βιομηχανίες κλωστοϋφαντουργίας, χάρτου, τροφίμων (ως σταθεροποιητής), στην εξόρυξη μετάλλων και πετρελαίου, στην επεξεργασία αποβλήτων (πρώτη ύλη), ως βιοϋλικό σε καλλυντικά και στην ιατρική και στην τεχνολογία ήχου (ως μεμβράνη ηχητικής μεταγωγής).

Η βακτηριακή κυτταρίνη διαφέρει μορφολογικά από τη φυτική, καθώς αποτελείται από ένα δίκτυο μικροϊνιδίων. Αντίθετα, η φυτική κυτταρίνη αποτελείται από ινίδια ή δέσμες μικροϊνιδίων (Okuyama *et al.*, 1993). Τα ινίδια βακτηριακής κυτταρίνης είναι περίπου 100 φορές λεπτότερα από εκείνα της φυτικής καθιστώντας την εξαιρετικά πορώδη, με αποτέλεσμα να αποτελεί καλό μεταφορέα αντιβιοτικών ή άλλων φαρμάκων εντός του τραύματος, ενώ παράλληλα χρησιμεύει ως φυσικό εμπόδιο σε εξωτερικές μολύνσεις. Χρησιμοποιείται, έτσι, σε ποικίλες ιατρικές εφαρμογές, όπως η επούλωση πληγών.

Η πιο γνωστή εφαρμογή της βακτηριακής κυτταρίνης είναι η χρήση της, ως πρώτη ύλη για τη παραγωγή του nata de coco, ένα γηγενές επιδόρπιο που παράγεται στις Φιλιππίνες. Για την παραγωγή του επιδορπίου αυτού φύλλα από τζελ κυτταρίνης με πάχος 1 cm έχουν υποστεί ζύμωση με νερό καρύδας και στη συνέχεια, κόβονται σε κύβους και βυθίζονται στη ζάχαρη. Το nata de coco εκτός από τις Φιλιππίνες παρασκευάζεται σε μεγάλες ποσότητες και στην Ινδονησία.

Η βακτηριακή κυτταρίνη μελετήθηκε κυρίως το δεύτερο μισό του 20<sup>ου</sup> αιώνα, ενώ το 1886 αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τον A. J. Brown η σύνθεση ενός εξωκυτταρικού ζελατινώδους στρώματος από το μικροοργανισμό *Acetobacter xylinum*. Όμως, η σύνθεση της βακτηριακής κυτταρίνης (BC) μελετήθηκε εντατικά από τους Hestrin *et al.* (1954) από το στέλεχος *Acetobacter xylinum* και απέδειξαν ότι σε στατικές συνθήκες ο μικροοργανισμός

συνθέτει κυτταρίνη παρουσία γλυκόζης και οξυγόνου. Στη συνέχεια, οι Colvin και Beer (1957) εξέτασαν τη σύνθεση κυτταρίνης σε δείγματα τα οποία περιείχαν εκχύλισμα ελεύθερων κυττάρων του *A. xylinum*, γλυκόζη και ATP.

Τα πιο αποδοτικά μικροβιακά στελέχη για την παραγωγή της μικροβιακής κυτταρίνης είναι τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια που παράγουν οξικό οξύ, όπως το βακτηριακό στέλεχος *Komagataeibacter sucrofermentans* (*Acetobacter xylinum*) (Yamada *et al.*, 1998), τα οποία έχουν καθιερωθεί ως μικροοργανισμοί-πρότυπα για βασική και εφαρμοσμένη έρευνα στην παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης. Κι αυτό λόγω της ικανότητάς τους να παράγουν υψηλές συγκεντρώσεις του πολυμερούς από ένα ευρύ φάσμα πηγών άνθρακα και αζώτου.

### 1.1 Βιοσύνθεση της Βακτηριακής Κυτταρίνης

Η σύνθεση της κυτταρίνης από το βακτήριο *K. sucrofermentans* 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 μοριακή δομή δεν είναι καθορισμένη με σαφή τρόπο. Η διαδικασία περιλαμβάνει τη σύνθεση της ουριδίνης της διφωσφογλυκόζης (UDP-Glc), ενός πρόδρομου μορίου της κυτταρίνης, ακολουθούμενη από τον πολυμερισμό της γλυκόζης σε μακριές και μη διακλαδισμένες, β-(1→4) αλυσίδες γλυκάνης και σύνδεσή τους σε μια πλεγματοειδή δομή (Brown *et al.*, 1987).

Η γλυκόζη αποτελεί την πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη πηγή άνθρακα για την παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης από το βακτηριακό στέλεχος *K. sucrofermentans*. Ωστόσο, η σύνθεση της έχει αναφερθεί και σε άλλα υποστρώματα όπως διάφορες πεντόζες, εξόζες, άμυλο και οργανικά οξέα (Hestrin *et al.*, 1954). Το βακτήριο *K. sucrofermentans* για να συνθέσει κυτταρίνη λαμβάνει αυτές τις πηγές άνθρακα, οι οποίες εισέρχονται και αφομοιώνονται στο κύκλο του κιτρικού οξέος (ή κύκλος του Krebs), τη γλυκονογένεση ή το 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 μετατροπής στο 50% κβ. (Delmer *et al.*, 1995).

Το κρίσιμο ένζυμο κατά τη διαδικασία σύνθεσης της κυτταρίνης είναι η πυροφωσφορυλάση (UGP), αφού κάποια μη κυτταρινοπαραγωγά κύτταρα (Cel-) εκδηλώνουν ανεπάρκεια αυτού του ενζύμου, αν και εμφανίζουν ενεργότητα του ενζύμου συνθάση της κυτταρίνης (CS) (Valla *et al.*, 1989). Επιπλέον, η ενεργότητα της πυροφωσφορυλάσης ποικίλει μεταξύ διαφορετικών στελεχών του *K. sucrofermentans* και η υψηλότερη τιμή της ανιχνεύθηκε στους πιο αποτελεσματικούς παραγωγούς κυτταρίνης, όπως το στέλεχος *A. xylinum ssp. sucrofermentans* BPR2001. Το στέλεχος αυτό εμφανίζει υψηλή ενεργότητα της φωσφο-γλυκο-

ισομεράσης και κατέχει ένα σύστημα φωσφο-τρανσφερασών εξαρτώμενο από το φωσφο-ενολο-πυροσταφυλικό.

Τα βακτήρια που παράγουν οξικό οξύ δε μπορούν να συνθέσουν το ένζυμο φωσφοφρουκτο-κινάση, συνεπώς τα σάκχαρα δε 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 τη σύνθεση της BC καταναλώνεται το 10% της ενέργειας που προέρχεται από τις καταβολικές αντιδράσεις (De Iannino *et al.*, 1988).

## 1.2 Μηχανισμός της Βιοσύνθεσης

Όλοι οι μικροοργανισμοί που παράγουν κυτταρίνη ακολουθούν 2 στάδια για το σχηματισμό του πολυμερούς.

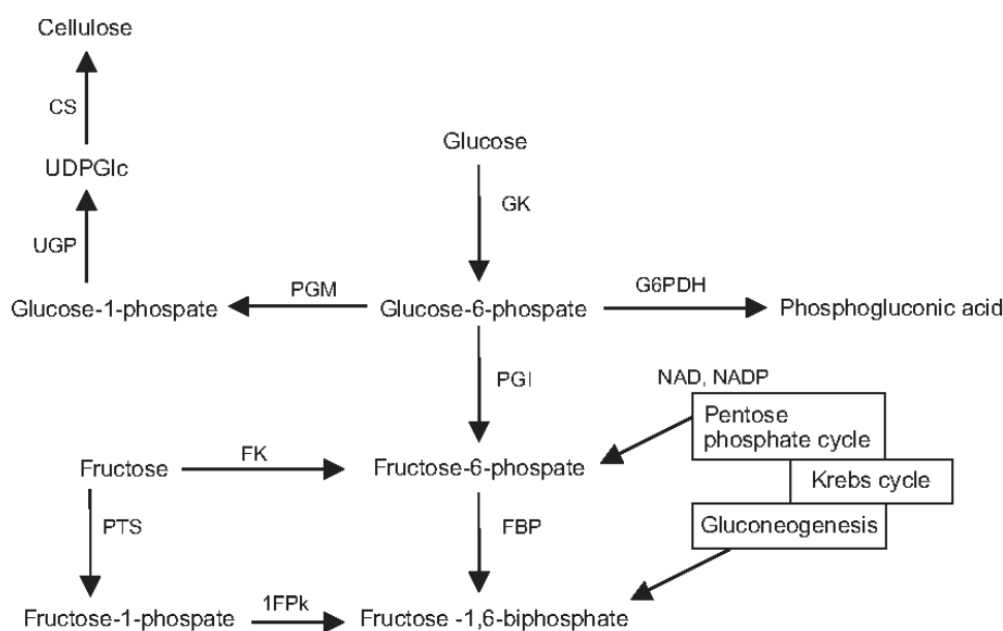
- 1ο στάδιο: Σχηματισμός β-(1→4) αλυσίδων γλυκάνης και πολυμερισμός τους.

Το ένζυμο συνθάση της κυτταρίνης καταλύει το 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 μέσο είτε όχι. Στη 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 στη κυτταροπλασματική μεμβράνη (Brown *et al.*, 1987).

- 2ο στάδιο: Σχηματισμός της αλυσίδας της 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 (Zaar *et al.*, 1979), 3.2 × 133 nm (Brown *et al.*, 1987) ή 4.1 × 117 nm (Yamanaka *et al.*, 2000). Αυτές οι ταινίες αλληλεπιδρούν με άλλες από γειτονικά κύτταρα, σχηματίζοντας ένα διδιάστατο επίπεδο, ενώ στη συνέχεια παράλληλα αλληλεπιδρούν το ένα με το άλλο με δεσμούς υδρογόνου και δυνάμεις Van der Waals, σχηματίζοντας ένα ζελατινώδες εναιώρημα στην επιφάνεια του μέσου καλλιέργειας (Brett *et al.*, 2000). Κάθε στοιβάδα βακτηριακής κυτταρίνης περιέχει νερό, το οποίο όταν αφαιρεθεί, χημικές ομάδες διατίθενται προς δημιουργία νέων δεσμών υδρογόνου μεταξύ γειτονικών αλυσίδων κυτταρίνης, αυξάνοντας τη κρυσταλλικότητα (Colvin *et al.*, 1960).

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



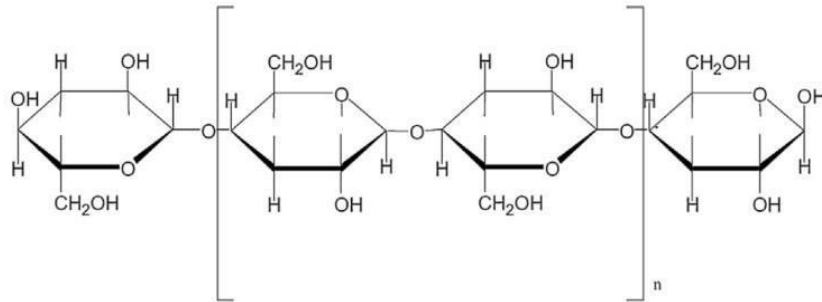
**Εικόνα 1.1** Μεταβολικό μονοπάτι του άνθρακα στον *K. sucrofermentans*. CS, συνθάση της κυτταρίνης; FBP, φρουκτόζη-1,6-διφωσφορική φωσφατάση; FK, γλυκοκινάση; G6PDH, γλυκόζη-6-φωσφορική αφυδρογονάση; 1FPk, φρουκτόζη-1-φωσφορική κινάση; PGI, φωσφο-γλυκο-ισομεράση; PGM, φωσφο-γλυκο-μουτάση; PTS, σύστημα φωσφο-τρανσφερασών; UGP, πυροφωσφορυλάση; UDPGlc, ουριδίνη διφωσφογλυκόζης (Shoda *et al.*, 2005).

### 1.3 Δομή Βακτηριακής Κυτταρίνης

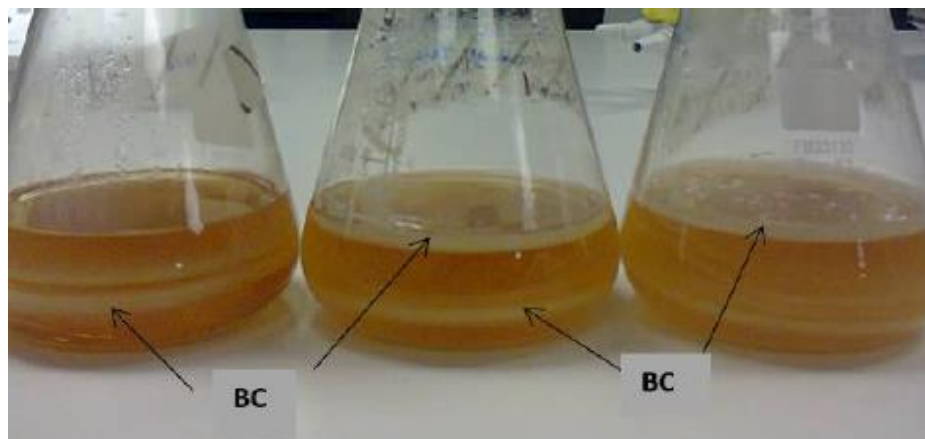
Η βακτηριακή κυτταρίνη είναι το γραμμικό πολυμερές μονομερών μονάδων D-γλυκόζης που είναι συνδεδεμένα με β-(1→4) γλυκοζιτικούς δεσμούς (Εικόνα 1.2). Τα βακτήρια συσσωρεύονται εντός του παραγόμενου πολυσαχαρίτη, του οποίου η μακροσκοπική μορφολογία διαφέρει όταν παράγεται υπό στατικές συνθήκες ή συνθήκες ανάδευσης (Yamanaka *et al.*, 2000). Στη πρώτη περίπτωση στην επιφάνεια του θρεπτικού μέσου σχηματίζεται μια κυτταρινούχος μεμβράνη (Εικόνα 1.3). Η μεμβράνη αυτή είναι αποτέλεσμα σχηματισμού παράλληλων αλλά αποδιοργανωμένων επιπέδων αποτελούμενα από μικροϊνίδια (Huber *et al.*, 2012). Στη 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 διατμηματικές τάσεις κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. Οι κλώνοι της βακτηριακής κυτταρίνης που παράγεται υπό στατικές συνθήκες διασυνδέονται λιγότερο συχνά από αυτούς σε συνθήκες ανάπτυξης.



**Εικόνα 1.2** Η δομή της κυτταρίνης (Yamanaka *et al.*, 2000).



**Εικόνα 1.3** Μεμβράνη βακτηριακής κυτταρίνης σε στατικές συνθήκες καλλιέργειας (προσωπικό αρχείο).



**Εικόνα 1.4** Μικροϊνίδια βακτηριακής κυτταρίνης (Jonas *et al.*, 1998).

Στη 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 ανάδευσης, οι άζονες 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. sucrofermentans* σε στατικές καλλιέργειες και αποτελείται από β-(1→4) αλυσίδες γλυκάνης, διατεταγμένες παράλληλα και ομοαξονικά. Η κυτταρίνη II παράγεται από ορισμένα φύκη, μύκητες και βακτήρια όπως το είδος *Saccharum ventriculi*, με β-(1→4) αλυσίδες γλυκάνης να διατάσσονται τυχαία και αντιπαράλληλα (άμορφο πολυμερές), να συνδέονται με περισσότερους δεσμούς υδρογόνου και συνεπώς να αποκτούν θερμοδυναμική σταθερότητα (Iguchi *et al.*, 2000). Αυτή που παράγεται από βακτήρια και μικροφύκη περιέχει κυρίως τον τύπο Ia, ενώ των ανωτέρω φυτών αποτελείται κυρίως από Ib.

Η αναλογία των δύο μορφών σε ένα δείγμα εξαρτάται από τη προέλευση της κυτταρίνης και μπορούν να διακριθούν με ακτίνες X, φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), φασματοσκοπία Raman και υπέρυθρη 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 (Driemeier *et al.*, 2014).

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

#### 1.4 Ιδιότητες Βακτηριακής Κυτταρίνης

Η βακτηριακή κυτταρίνη τα τελευταία χρόνια βρίσκεται στο επίκεντρο του ερευνητικού ενδιαφέροντος χάρη στις μοναδικές φυσικές και μηχανικές ιδιότητες που τη χαρακτηρίζουν. Στη φυσική της κατάσταση, η BC χαρακτηρίζεται ως ένα υδατο-διογκωμένο δίκτυο ινιδίων κυτταρίνης, 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 επιστήμονες έχουν αναφέρει ότι η δομή της κυτταρίνης δεν επηρεάζεται αλλάζοντας τη πηγή άνθρακα ή αζώτου (Keshk *et al.*, 2014), ενώ άλλοι έχουν παρατηρήσει διαφορές. Η χρήση υποστρώματος μελάσας σε συνδυασμό με Corn Steep Liquor (CSL) οδήγησε σε BC με υψηλότερο βαθμό κρυσταλλοποίησης από αυτή που προκύπτει σε μέσα που περιλαμβάνουν γλυκόζη, μαννιτόλη, εκχύλισμα ζύμης και πεπτόνη (El-Saied *et al.*, 2008). Αντίθετα, άλλοι επιστήμονες αναφέρουν μια μείωση στην κρυσταλλικότητα σε θρεπτικό μέσο μελάσας. Σε μία άλλη μελέτη η χρήση της γλυκερόλης ως πηγή άνθρακα οδήγησε στην παραγωγή κυτταρίνης με 9% υψηλότερη κρυσταλλικότητα, χαμηλότερη ικανότητα συγκράτησης νερού και χαμηλότερο ιξώδες σε σύγκριση με τη χρήση 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 (Shi *et al.*, 2014).

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 τη πρότυπη μέθοδο ASTM D 882 της Αμερικάνικης εταιρείας δοκιμών και υλικών (Jonas *et al.*, 1998; Watanabe *et al.*, 1998; Klemm *et al.*, 2011; Iguchi *et al.*, 2000).

## 1.5 Εφαρμογές Βακτηριακής Κυτταρίνης

Η βακτηριακή κυτταρίνη διαθέτει ένα ευρύ φάσμα από τρέχουσες και πιθανές μελλοντικές εφαρμογές. Λόγω των πολλών και μοναδικών ιδιοτήτων της βρίσκει εφαρμογή στη βιομηχανία τροφίμων, στην παραγωγή βιογενών προϊόντων, στο τομέα της ιατρικής καθώς και σε άλλους τεχνικούς τομείς. Το βιοπολυμερές μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε διαφορετικές χρήσεις.

### 1.5.1 Εφαρμογές στη Βιομηχανία Τροφίμων

Η βακτηριακή κυτταρίνη αποτελεί πηγή διαιτητικών ινών και έχει ταυτοποιηθεί ως «γενικά αναγνωρισμένη ως ασφαλής» (GRAS) και έγινε δεκτή από τον Αμερικανικό Οργανισμό Τροφίμων και Ποτών (FDA) το 1992. Η παραγωγή της σε διάφορα διαγράμματα (ταινίες, νήματα, σφαιρίδια), το μέγεθος των ινών της που είναι εντός της νανοκλίμακας καθώς και η τρισδιάστατη δομή του δικτύου της, ευνοούν τη χρήση της σε καινούριες διαδικασίες παραγωγής τροφίμων (Shi *et al.*, 2014).

Η παλαιότερη και πιο γνωστή εφαρμογή της κυτταρίνης στο τομέα των τροφίμων, είναι ως πρώτη ύλη για τη παρασκευή παραδοσιακού γλυκού στις Φιλιππίνες, γνωστό ως nata de coco. Επίσης, ερευνητικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι ιδιότητες και η δομή της βακτηριακής κυτταρίνης ως συστατικό σε σκευάσματα τροφίμων, ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις, ευνόησε την αποφυγή της αλληλεπίδρασης των γεύσεων και βελτίωσε τη 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 η χρήση της ως σταθεροποιητικός και πηκτικός παράγοντας, είχε θετική επίδραση κατά τη προσθήκη σε καρκεύματα σε μορφή πάστας και σε παγωτά (Okuyama *et al.*, 1993). Τα προϊόντα που περιείχαν βακτηριακή κυτταρίνη μπορούσαν να διατηρήσουν την υγρασία τους για τουλάχιστον ένα μήνα αποθήκευσης. Όταν προστέθηκε κυτταρίνη σε προϊόν από γάλα σόγιας (Tofu) σε ποσοστό 0,2-0,3% η συνεκτικότητα του πηκτώματος αυξήθηκε σημαντικά, προσδίδοντας καλύτερη υφή και σταθερότητα στο προϊόν. Ακόμη, η χρήση της ως ζελατινοποιητής και ως παράγοντας αναστολής σε σοκολατούχο ρόφημα, απέτρεψε τη καθίζηση του κακάο, λόγω της ικανότητας του πλέγματος της κυτταρίνης να συγκρατήσει τα σωματίδια του κακάο (Shi *et al.*, 2014).

Στις μέρες μας, είναι σημαντική η ανάπτυξη νέων, φυσικών πρόσθετων τροφίμων με χαμηλά ή χωρίς λιπαρά, με σκοπό τη μείωση της θερμιδικής τους αξίας. Τη δεκαετία του 1960 το ερευνητικό ενδιαφέρον στράφηκε στη χρήση της φυτικής κυτταρίνης ως ρυθμιστής υφής, διογκωτικό μέσο και φυσικό συστατικό με χαμηλά λιπαρά. Παράλληλα όμως, ενδιαφέρον παρουσιάζει και η καθαρότητα και το μέγεθος των ινών της βακτηριακής κυτταρίνης. Η προσθήκη 10% κυτταρίνης σε προϊόν κρέατος 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 *et al.*, 2004). Άλλη εφαρμογή της βακτηριακής κυτταρίνης ήταν ως πρόσθετο σε μηδενικής θερμιδικής αξίας γιαπωνέζικα προϊόντα, κυρίως γλυκά, πλούσια σε ζάχαρη και χαμηλά σε λιπαρά. Πιο συγκεκριμένα, η προσθήκη της στη παραδοσιακή γιαπωνέζικη μαρμελάδα An, η οποία φτιάχνεται από πουρέ ζάχαρης και κόκκινων φασολιών, αντικατέστησε τη ζάχαρη με ασπαρτάμη, με αποτέλεσμα η θερμιδική αξία του προϊόντος να μειωθεί κατά

30%, διατηρώντας παράλληλα τα χαρακτηριστικά που προσδίδουν τη χαρακτηριστική γεύση (Esa *et al.*, 2014).

### 1.5.2 Ιατρικές και Φαρμακευτικές Εφαρμογές

Η βακτηριακή κυτταρίνη παρουσιάζει υψηλή αντοχή σε εφελκυσμό, υψηλή πορώδη ικανότητα και δομή μικροϊνιδίων. Χρόνια τραύματα όπως φλεβικά έλκη των ποδιών, κοιλιακά και διαβητικά έλκη είναι δύσκολο να επουλωθούν και αντιπροσωπεύουν μια σημαντική κλινική πρόκληση τόσο για τους ασθενείς όσο και για τους γιατρούς στο τομέα της υγείας. Η θεραπεία χρόνιων τραυμάτων περιλαμβάνει την εφαρμογή διαφόρων υλικών (υδροκολλοειδή, βιολογικά συνθετικές μεμβράνες), παρέχουν ένα υγρό περιβάλλον επούλωσης πληγών απαραίτητο για τη βέλτιστη επούλωση τους. Σύμφωνα με τις σύγχρονες προσεγγίσεις, ένα ιδανικό σύστημα επίδεσης τραύματος πρέπει να εμφανίζει ομοιότητα με τεχνητό δέρμα τόσο δομικά όσο και λειτουργικά. Τα χαρακτηριστικά των υλικών επίδεσης που χρησιμοποιούνται σε μια πληγή είναι μη τοξικά, μη πυρογενή και βιοσυμβατά, παρέχοντας τη δυνατότητα φραγμού κατά της λοίμωξης, την ικανότητα να ελέγχεται η απώλεια υγρών, τη δυνατότητα περιορισμού του πόνου κατά τη διάρκεια της θεραπείας, να παρέχουν εύκολη κάλυψη του τραύματος, επιτρέποντας, έτσι, την εισαγωγή ή τη μεταφορά φαρμάκων στη περιοχή της πληγής, την ικανότητα απορρόφησης εκκρινμάτων κατά τη διάρκεια της φλεγμονώδους φάσης, καθώς και υψηλή μηχανική αντοχή, ελαστικότητα και δυνατότητα προσαρμογής. Έτσι, εμφανίζουν μια προαιρετική επιφάνεια και σχήμα, επιτρέποντας την εύκολη και ανώδυνη επούλωση της πληγής.

Η βακτηριακή κυτταρίνη είναι ένα εξαιρετικά πορώδες υλικό, παρέχοντας τη δυνατότητα μεταφοράς αντιβιοτικών ή άλλων φαρμάκων στο τραύμα, ενώ ταυτόχρονα, χρησιμεύει ως αποτελεσματικός φυσικός φραγμός σε οποιαδήποτε εξωτερική μόλυνση. Η βακτηριακή κυτταρίνη έχει υψηλή χωρητικότητα συγκράτησης νερού και το μέγεθος των ινιδίων είναι περίπου 100 φορές μικρότερο από αυτά της φυτικής κυτταρίνης. Μια εταιρεία της Βραζιλίας στη Biofill διερεύνησε τις μοναδικές της ιδιότητες στην επούλωση των πληγών. Χρησιμοποιήθηκε παρασκεύασμα βακτηριακής κυτταρίνης για κλινικές δοκιμές, ώστε να επουλωθούν έλκη και πληγές. Τα αιμοφόρα αγγεία που κατασκευάζονται από ιστό (TEBV) αντιπροσωπεύουν μια ελκυστική προσέγγιση ξεπερνώντας τα προβλήματα αναπνοής που σχετίζονται με καρδιαγγειακές παθήσεις παρέχοντας αγγειακά μοσχεύματα μικρού διαμετρήματος. Η βακτηριακή κυτταρίνη παρουσιάζει ιδιότητες πολλά υποσχόμενες, ώστε να χρησιμοποιηθεί ως ικρίωμα για αιμοφόρα αγγεία με ιστική μηχανική (Backdahl *et al.*, 2006).

Μεταξύ των νέων εμπορικών εφαρμογών, έχει αποδειχθεί ότι η βακτηριακή κυτταρίνη είναι ωφέλιμη και λόγω της υψηλής ικανότητας συγκράτησης νερού μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως προσωρινό τεχνητό δέρμα για τη θεραπεία εγκαυμάτων δευτερογενούς και τριτογενούς

βαθμού. Πραγματοποιήθηκαν κλινικές μελέτες σε 34 ασθενείς και εφαρμόστηκαν απευθείας στα εγκαύματα που κάλυπταν το 9-18% της επιφάνειας του σώματος, υλικά επίδεσης βακτηριακής κυτταρίνης, τα οποία φάνηκαν να είναι από τα καλύτερα υλικά για την επούλωση των πληγών από εγκαύματα. Η χρήση της βακτηριακής κυτταρίνης ως προσωρινό δέρμα διατίθενται ήδη στην αγορά από τη βραζιλιάνικη εταιρεία Fibrocel και τα ονόματα των προϊόντων είναι BioProcess™, Dermafill™, BioFill™ και NexFill™. Ένα άλλο εμπορικό προϊόν είναι το Prima Cel™ από τη Xylos Corporation, που έχει εφαρμοστεί σε κλινικές δοκιμές προς επούλωση από φλεβικά έλκη. Άλλες χρήσεις στο τομέα της ιατρικής που έχουν κατοχυρωθεί ως διεθνείς πατέντες είναι αυτές σε οστικά μοσχεύματα, στην αναγέννηση ιστών και σε γάζες, όπου η ενίσχυση τους με BC σε συνδυασμό με κολλαγόνο και υδροξυ-απατίτη βελτιστοποιεί τις ιδιότητες τους. Επίσης, η βακτηριακή κυτταρίνη έχει εφαρμοσθεί σε σκευάσματα όπως μάσκες προσώπου που παρέχουν προστασία ενάντια σε ιούς και ως μέσο ψύξης (Fu *et al.*, 2013). Η BC αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο βιοπολυμερές, το οποίο έχει πολλές νέες εφαρμογές στη φροντίδα των τραυμάτων συμπεριλαμβανομένων και των χειρουργικών πληγών, των ελκών καθώς και της μηχανικής ιστών και οργάνων.

## 1.6 Χαρακτηριστικά Μικροοργανισμού *Komagataeibacter sucrofermentans*

Τα βακτήρια που ανήκουν στο γένος *Acetobacter* είναι αερόβιοι μικροοργανισμοί, αρνητικοί κατά gram, μερικές φορές μεταβλητοί, ελλειψοειδείς ή ράβδοι και θετικοί στο ένζυμο καταλάση. Το κύριο χαρακτηριστικό αυτών των βακτηρίων είναι η ικανότητα τους να οξειδώνουν την αιθανόλη σε οξικό οξύ. Αυτά τα βακτήρια σχηματίζουν οξικό οξύ από γλυκόζη, αιθυλική αλκοόλη (αιθανόλη), προπυλική αλκοόλη και γλυκόλη, η οποία οξειδώνει το οξικό οξύ σε CO<sub>2</sub> και νερό. Ο μικροοργανισμός *Acetobacter xylinum* sp. έχει την ικανότητα να σχηματίζει την κυτταρίνη με τη μορφή μεμβράνης στην επιφάνεια της στατικής υγρής ζύμωσης. Τα περισσότερα στελέχη αυτού του είδους είναι ικανά να χρησιμοποιούν ως πηγή άνθρακα διαφορετικά υποστρώματα, εκτός από την αιθανόλη, τα οποία μπορεί να είναι γλυκόζη, γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ, και μαννιτόλη. Τα βακτήρια *Acetobacter* είναι μικροοργανισμοί που βρίσκονται σε φρούτα, λουλούδια, αλκοολούχα ποτά και δεν έχουν παθογόνο δράση, αντίθετα είναι παρόντα υπό φυσιολογικές συνθήκες στο ανθρώπινο έντερο.

Τα οξικά βακτήρια έχουν βέλτιστη θερμοκρασία γύρω στους 30 °C, ενώ το βέλτιστο pH κυμαίνεται από 5 έως 6. Ένα άλλο σημαντικό χαρακτηριστικό των βακτηρίων που παράγουν οξικό οξύ είναι η δυνατότητά τους να αναπτυχθούν ακόμη και παρουσία αντιβιοτικών. Επιπλέον, οι μικροοργανισμοί αυτοί μπορούν να πολλαπλασιαστούν στο έντερο χάρη στην ικανότητα τους να επιβιώνουν παρουσία μικρών ποσοτήτων O<sub>2</sub>.

### 1.6.1 Επίδραση Συνθηκών Ζύμωσης στη Παραγωγή Βακτηριακής Κυτταρίνης

Το μέσο ζύμωσης περιέχει πηγές άνθρακα και αζώτου καθώς και άλλα θρεπτικά συστατικά που απαιτούνται για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Οι αλλαγές στα συστατικά του μέσου και οι συνθήκες ζύμωσης μπορούν να επηρεάσουν άμεσα ή έμμεσα την ανάπτυξή του, το σχηματισμό των προϊόντων ζύμωσης και κατ' επέκταση της μικροβιακής κυτταρίνης. Πιο συγκεκριμένα, η ρύθμιση της θερμοκρασίας επώασης και της αρχικής τιμής pH στο μέσο καλλιέργειας, αποτελούν κρίσιμες παραμέτρους που επηρεάζουν τόσο την ανάπτυξη του μικροοργανισμού όσο και τη παραγωγή κυτταρίνης. Σύμφωνα με μελέτες, η μέγιστη παραγωγή κυτταρίνης παρατηρείται μεταξύ 28 και 30 °C σε pH 5 έως 6 (Hestrin and Schramm, 1954). Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, το pH του μέσου μειώνεται λόγω παραγωγής γλυκονικού ή γαλακτικού οξέος (Masaoka *et al.*, 1993).

Οι υδατάνθρακες αποτελούν την πιο εύκολα χρησιμοποιούμενη πηγή άνθρακα τόσο με οξειδωτικό όσο και με αντιοξειδωτικό τρόπο. Μεταξύ των βασικών μονοσακχαριτών των εξοζών, η D-γλυκόζη, η D-φρουκτόζη και η D-μαννόζη χρησιμοποιούνται απ' όλους τους μικροοργανισμούς *Acetobacter* (Lee *et al.*, 2001). Γενικά, η γλυκόζη εμφανίζει κατασταλτική και ανασταλτική επίδραση στην αφομοίωση άλλων σακχάρων από το βακτήριο *Acetobacter*. Άλλοι σακχαρίτες, πολυόλες, πολυσακχαρίτες όπως διαλυτό άμυλο και αλκοόλες όπως μεθανόλη, αιθανόλη, γλυκερόλη, καθώς και οργανικά οξέα και άλλες ουσίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν από αυτά τα βακτήρια ως πηγές άνθρακα. Στη ζύμωση για παραγωγή κυτταρίνης συνήθως χρησιμοποιείται γλυκόζη και αιθανόλη ως πηγές άνθρακα, ώστε να ενισχυθεί η παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης.

Η πηγή αζώτου που χρησιμοποιείται στη ζύμωση παρουσία του μικροοργανισμού *Acetobacter xylinum* sp. παρέχεται συνήθως από οργανικές ενώσεις, όπως πεπτόνη και εκχύλισμα ζύμης μεταξύ άλλων. Οι Smith *et al.* (1975) διαπίστωσαν ότι η πηγή αζώτου που περιέχεται στο εκχύλισμα ζύμης είναι ο κύριος παράγοντας που βελτιώνει τη μικροβιακή ανάπτυξη. Η χρησιμοποίηση μικρής ποσότητας εκχυλίσματος ζύμης ή πιθανή αντικατάστασή του με μια λιγότερο δαπανηρή πηγή αζώτου μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη μιας οικονομικά βιώσιμης βιομηχανικής διεργασίας. Η βελτίωση της ζύμωσης έχει μελετηθεί για διαφορετικούς παράγοντες και συστατικά μέσα (Kim *et al.*, 2006). Το εκχύλισμα ζύμης περιέχει κυρίως αμινοξέα τα οποία βελτιώνουν τη βακτηριακή ανάπτυξη. Τα ελεύθερα αμινοξέα ενσωματώνονται απευθείας χωρίς τροποποίηση σε πρωτεΐνες ή αποικοδομούνται από το κύτταρο, το άζωτο στη συνέχεια, χρησιμοποιείται για τη σύνθεση άλλων αζωτούχων συστατικών των κυττάρων και τα κετο-οξέα παράγωγα αμινοξέων μπορούν να χρησιμοποιηθούν από το κύτταρο για σκοπούς σύνθεσης. Τα αμμωνιακά άλατα (θειικά, φωσφορικά, νιτρικά) είναι γνωστά φθηνά συμπληρώματα αζώτου που χρησιμοποιούνται στη ζύμωση (Rajoka *et al.*, 2006). Τα αμμωνιακά άλατα των οργανικών οξέων χρησιμοποιούνται

καλύτερα από τα άλατα των ανόργανων οξέων, καθώς η αποσύνθεση τους παράγει ασθενή οξέα που μπορούν να χρησιμεύσουν ως πρόσθετη πηγή άνθρακα. Τα ισχυρά οργανικά οξέα όμως, αλλάζουν τα επίπεδα του pH και έχουν ανασταλτικό αποτέλεσμα στην ανάπτυξη των κυττάρων. Εξαιρέση αποτελεί το φωσφορικό αμμώνιο, καθώς ο φώσφορος είναι ένα κύριο συστατικό της μικροβιακής βιομάζας και το φωσφορικό οξύ λειτουργεί ως ένα καλό ρυθμιστικό σύστημα. Οι Sims *et al.* (1974) διερεύνησαν το μεταβολισμό ιόντων αμμωνίου ( $\text{NH}_4^+$ ) και πρότειναν ότι το 75% των  $\text{NH}_4^+$  ενσωματώθηκαν στο γλουταμινικό άλας, ενώ το υπόλοιπο στην ομάδα αμιδίου γλουταμίνης.

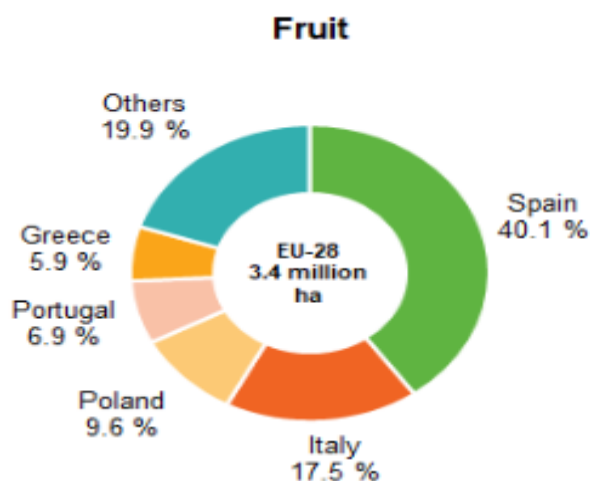
Ένα από τα σημαντικά συστατικά των θρεπτικών μέσων για το μικροοργανισμό *Acetobacter* αποτελεί ο φώσφορος. Ο φώσφορος θεωρείται κρίσιμος για τη σύνθεση ουσιών όπως φωσφοπρωτεΐνες, φωσφολιπίδια, νουκλεοπρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα, φωσφορυλιωμένοι πολυσακχαρίτες και είναι επίσης παρόν στα κύτταρα ως ανόργανο ορθοφωσφορικό, πυροφωσφορικό, μεταφωσφορικό και πολυφωσφορικό. Τά φωσφορικά άλατα προστίθενται σε θρεπτικά μέσα με τη μορφή καλίου, αμμωνίου ή μερικές φορές φωσφορικού νατρίου. Η μελάσα ή άλλα μέσα με χαμηλή περιεκτικότητα σε αφομοιώσιμες πηγές αζώτου και φωσφόρου τροφοδοτούνται συνήθως με αμμωνιακά και φωσφορικά άλατα. Το μέσο απαιτεί κυρίως θείο, για τη βιοσύνθεση αμινοξέων που περιέχουν θείο.

## 1.7 Απόβλητα Φρούτων και Ειδικότερα Εσπεριδοειδών και Απόβλητα Στεμφύλων

Τα απόβλητα φρούτων αποτελούν μία από τις κυριότερες πηγές αστικών αποβλήτων. Τη τελευταία δεκαετία, μαζί με την άνοδο της μεσαίας τάξης και τη ταχεία οικονομική ανάπτυξη σε διάφορες χώρες όπως η Κίνα, οι διάφορες ποικιλίες φρούτων που παράγονται καταναλώνονται όλο και περισσότερο. Λόγω, της υψηλής κατανάλωσης και της βιομηχανικής επεξεργασίας των βρώσιμων φρούτων, στις μεγαλουπόλεις παράγονται μεγάλες ποσότητες αποβλήτων φρούτων όπως φλούδες εσπεριδοειδών και άλλα υπολείμματα φρούτων (κυρίως φλούδες και σπόροι). Τα απόβλητα φρούτων έχουν καταστεί ως μία από τις κύριες πηγές αστικών στερεών αποβλήτων (MSW), τα οποία αποτελούν όλο και πιο δύσκολο περιβαλλοντικό ζήτημα. Επί του παρόντος, οι δύο βασικές τεχνικές διάθεσης των αποβλήτων των φρούτων είναι η υγειονομική ταφή και η αποτέφρωση. Ωστόσο, η ακατάλληλη διαχείριση του χώρου υγειονομικής ταφής έχει ως αποτέλεσμα εκπομπές μεθανίου και διοξειδίου του άνθρακα, ενώ η αποτέφρωση περιλαμβάνει τον επακόλουθο σχηματισμό και την έκλυση ρύπων και δευτερογενών αποβλήτων, όπως οι διοξίνες, τα φουράνια, τα όξινα αέρια, καθώς και τα σωματίδια, τα οποία ενέχουν σοβαρούς κινδύνους για το περιβάλλον και την υγεία. Για αυτούς του λόγους, είναι επείγουσα ανάγκη να αναζητηθούν πόροι και να υπάρξει προστιθέμενη αξία που θα προκύψει από την αξιοποίηση των αποβλήτων των φρούτων. Μία από τις πιο επωφελείς προσεγγίσεις είναι η ανάκτηση των βιοδραστικών συστατικών, ιδιαίτερα



των φαινολικών ενώσεων, με πλήρη χρήση τους στη βιομηχανία τροφίμων καθώς και στη βιομηχανία φαρμάκων και καλλυντικών. Έτσι, η αξιοποίηση των αποβλήτων των φρούτων ως πηγές βιοδραστικών ενώσεων μπορεί να έχει σημαντικά οικονομικά οφέλη (Deng *et al.*, 2011).



Source: Eurostat (online data code: apro\_cpsh1)

**Εικόνα 1.5** Ποσοστά εκτάσεων καλλιέργειας των φρούτων κατά κύριο κράτος της Ευρωπαϊκής Ένωσης, 2017 (Eurostat, 2017).

### 1.7.1 Απόβλητα Φρούτων

Τα φρούτα αποτελούνται κυρίως από το περικάρπιο, που αποτελεί και το εδώδιμο μέρος και τα κουκούτσια τα οποία και περιβάλλει. Τα περισσότερα φρούτα είναι διαθέσιμα όλο το χρόνο σε μεγάλη ποικιλία και εκτός από φρέσκα μπορεί να είναι διαθέσιμα ζεστά ή κρύα, κονσερβοποιημένα, κατεψυγμένα ή αποξηραμένα. Περιέχουν βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ), καροτένιο και παρέχουν υψηλή συγκέντρωση ιχνοστοιχείων. Όλα τα φρούτα έχουν ιδιαίτερα υψηλή περιεκτικότητα σε νερό, η οποία είναι μεγαλύτερη από το 70% του συνολικού τους βάρους (Uthrala *et al.*, 2018).

Οι υδατάνθρακες αποτελούν το κύριο συστατικό των φρούτων καθώς αντιπροσωπεύουν το 50 έως 80% του ξηρού τους βάρους. Στα φρούτα τα κύρια σάκχαρα είναι κυρίως η φρουκτόζη και η γλυκόζη, σε ίσες συνήθως ποσότητες, καθώς επίσης και η σακχαρόζη. Σε πολλά φρούτα (μήλα, αχλάδια, φράουλες, σταφύλια) η γλυκόζη και η φρουκτόζη απαντώνται σε μεγαλύτερες ποσότητες από τη σακχαρόζη, ωστόσο στα ώριμα φρούτα η περιεκτικότητα σε σακχαρόζη είναι μεγαλύτερη (Vicente *et al.*, 2009). Επιπλέον, τα

φρούτα περιέχουν σε μικρές ποσότητες κυτταρίνη, ημικυτταρίνη, πηκτίνες και διάφορους ολιγοσακχαρίτες.

**Πίνακας 1.1** Γενική σύσταση φρούτων και λαχανικών ανά εκατό γραμμάρια καρπού (Lintas *et al.*, 1992).

Νερό (g/100g)	80-95
Υδατάνθρακες (g/100g)	1,5-2,6
Πρωτεΐνες (g/100g)	0,5-15
Λίπος (g/100g)	0,1-1
Φυτικές Ίνες (g/100g)	0,2-6,4
Μεταλλικά στοιχεία (mg/100g)	
Ca	6-50
Fe	0,3-1
K	110-450
Βιταμίνες (mg/100g)	
β-καροτένιο	0,2-2
C	10-90
B6	0,03-0,35

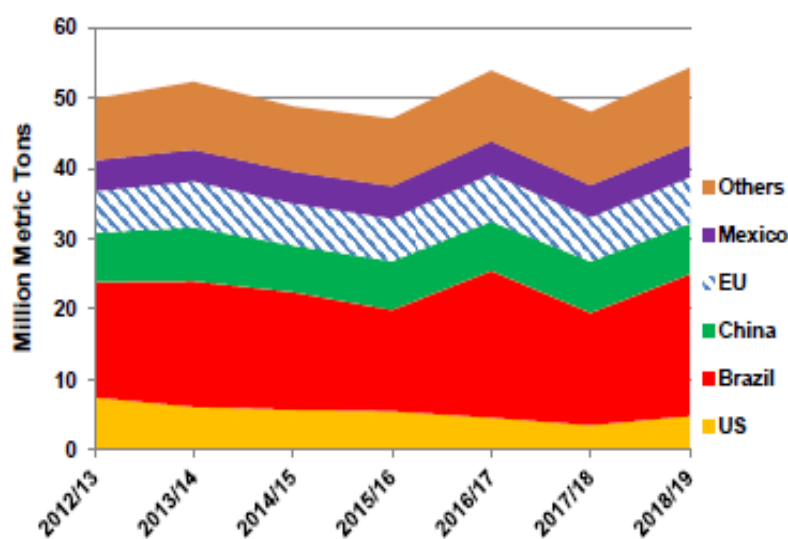
Η λιγνίνη, η κυτταρίνη και η ημικυτταρίνη περιέχονται σε πολύ μικρές ποσότητες στα φρούτα. Η λιγνίνη περιβάλλει την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη με ένα σύμπλεγμα φαινολικών ομάδων τα οποία είναι πολύ ισχυρά συνδεδεμένα μεταξύ τους. Η ημικυτταρίνη είναι ένας έτερο-πολυσακχαρίτης μορίων κυρίως ξυλόζης αλλά και μαννόζης, γαλακτόζης, ραμνόζης και αραβινόζης που συνδέονται μεταξύ τους δημιουργώντας μικρού μήκους αλυσίδες με πολλές διακλαδισμένες μονάδες σακχάρων.

Τα σάκχαρα παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη ανάπτυξη βιοδιωλιστηρίων καθώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως κύρια πηγή άνθρακα για παραγωγή βιογενών προϊόντων με χρήση μικροοργανισμών. Η κυτταρίνη και η ημικυτταρίνη μπορούν να μετατραπούν στους αντίστοιχους μονοσακχαρίτες από τους οποίους αποτελούνται με εφαρμογή συνδυασμού χημικής επεξεργασίας και ενζυμικής υδρόλυσης. Η κυτταρίνη είναι αδιάλυτη σε οργανικούς διαλύτες. Η ημικυτταρίνη διασπάται πιο εύκολα είτε μέσω όξινης, είτε μέσω βασικής, είτε μέσω ενζυμικής υδρόλυσης με χρήση ημικυτταρινασών. Το μεγαλύτερο μέρος της λιγνίνης λαμβάνεται συνήθως ως αδιάλυτο υπόλειμμα.

### 1.7.2 Απόβλητα Εσπεριδοειδών

Τα εσπεριδοειδή όπως πορτοκάλια, λεμόνια, λάιμ και γκρέιπφρουτ καλλιεργούνται παγκοσμίως και το 40% αυτών 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 εκατομμύρια τόνους αποβλήτων ετησίως (Pfaltzgraff *et al.*, 2013).

Σύμφωνα με το USDA (United States Department of Agriculture), η παγκόσμια παραγωγή πορτοκαλιών για το 2018/19 προβλέπεται να αυξηθεί κατά 6,3 εκατομμύρια τόνους στα 54,3 εκατομμύρια τόνους, το υψηλότερο επίπεδο των τελευταίων 8 χρόνων, καθώς ο ευνοϊκός καιρός οδηγεί σε μεγαλύτερες καλλιέργειες στις Ηνωμένες Πολιτείες και στη Βραζιλία (Εικόνα 1.6). Η παγκόσμια παραγωγή χυμού πορτοκαλιού για το 2018/19 αναμένεται να σημειώσει άνοδο κατά 36% σε 2,2 εκατομμύρια τόνους, καθώς η παραγωγή της Βραζιλίας και των ΗΠΑ αυξάνεται με την απότομη αύξηση της καλλιέργειας των πορτοκαλιών για χυμοποίηση.



**Εικόνα 1.6** Παγκόσμια παραγωγή πορτοκαλιών για τα έτη 2012 έως 2019- (USDA, Ιούλιος 2019).

Η παγκόσμια παραγωγή γκρέιπφρουτ το 2018/19 εκτιμάται ότι θα αυξηθεί κατά 3% σε 6,9 εκατομμύρια τόνους. Ο ευνοϊκός καιρός βοήθησε να ενισχυθούν οι καλλιέργειες στις Ηνωμένες Πολιτείες και στην Κίνα. Η κατανάλωση και τα φρούτα για μεταποίηση είναι και τα δύο υψηλότερα σε σχέση με την ενισχυμένη παραγωγή, ενώ οι εξαγωγές αναμένεται να μειωθούν ελαφρά.

Η παγκόσμια παραγωγή λεμονιών το 2018/19 εκτιμάται να αυξηθεί ελαφρά σε 8.4 εκατομμύρια τόνους. Η υψηλότερη παραγωγή στην Ευρωπαϊκή Ένωση και στην Τουρκία αναμένεται να αντισταθμίσει τη μειωμένη παραγωγή στην Αργεντινή.

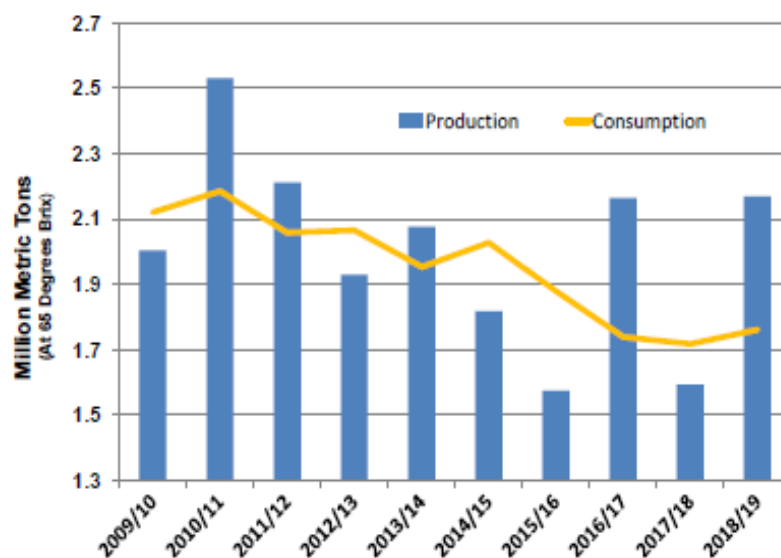
Ο φλοιός του πορτοκαλιού, αλλά και όλων των εσπεριδοειδών, παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω των ποικίλων συστατικών που περιλαμβάνει. Αποτελεί πηγή διαιτητικών ινών, φυσικών αντιοξειδωτικών, χρωστικών και αρωματικών συστατικών, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε τρόφιμα.

Η φλούδα του πορτοκαλιού περιέχει περισσότερο από 80% νερό. Η πηκτίνη και το D-λεμονένιο τα οποία και περιέχονται στο φλοιό του πορτοκαλιού βρίσκουν εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων, στο τομέα της ιατρικής και των καλλυντικών, στη 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 (Pfaltzgraff *et al.*, 2013).

Η φλούδα του λεμονιού είναι πλούσια σε αντιοξειδωτικά όπως βιταμίνη C, κιτρικό, μηλικό και μυρμηκικό οξύ, εσπεριδίνη (βιοφλαβονοειδές) και πηκτίνη. Η φλούδα από γκρέιπφρουτ είναι επίσης πλούσια σε νερό (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% (Mohamed *et al.*, 2016).

Όπως ήδη αναφέρθηκε, οι φλούδες από τα εσπεριδοειδή περιέχουν σημαντικές πηγές συστατικών υψηλής προστιθέμενης αξίας. Στην Ελλάδα μέρος των στερεών αποβλήτων που προκύπτουν από τη χυμοποίηση και πιο συγκεκριμένα η πούλπα, χρησιμοποιείται συνήθως από βιομηχανίες παραγωγής χυμού για την παρασκευή προϊόντων που έχουν γεύση φυσικών χυμών. Επιπλέον, ένα μέρος των φλοιών μετά τη παραλαβή των αιθέριων ελαίων αποξηραίνεται και αξιοποιείται για τη παραγωγή ζωοτροφών, ενώ ένα άλλο μέρος μετά την αποξήρανση πωλείται για τη παραγωγή πηκτίνης και εσπεριδίνης. Παρ' όλα αυτά, το κόστος αποξήρανσης των φλοιών είναι πολύ υψηλό και για αυτό το λόγο οι περισσότερες επιχειρήσεις δε πραγματοποιούν αποξήρανση των φλοιών.

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



**Εικόνα 1.7** Παγκόσμια παραγωγή χυμού πορτοκαλιών, παγκόσμια κατανάλωση χυμού πορτοκαλιών για τα έτη 2009 έως 2019- (USDA, Ιούλιος 2019).

### 1.7.3 Απόβλητα Στεμφύλων

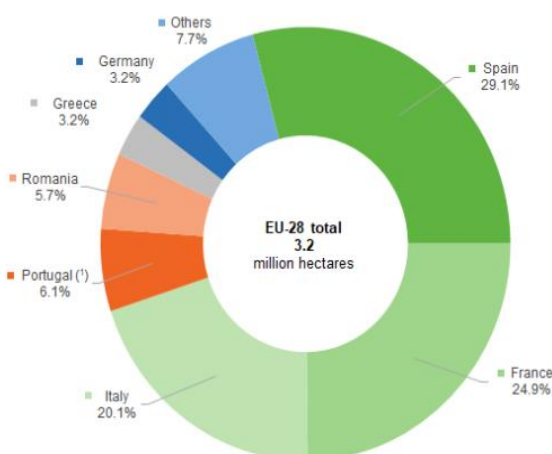
Η ετήσια παραγωγή σταφυλιών ανέρχεται περίπου σε 75 εκατομμύρια τόνους. Περίπου το 50% των σταφυλιών χρησιμοποιείται για τη παραγωγή κρασιού, ενώ ένα σημαντικό ποσοστό καταναλώνεται ως χυμός σταφυλιών ή αποθηκεύεται με τη μορφή γλεύκων σταφυλιών. Η καλλιέργεια των σταφυλιών είναι διαδεδομένη σε ολόκληρο το κόσμο, με εκτιμώμενη επιφάνεια 7,5 εκατομμυρίων εκταρίων το 2014, σε 100 διαφορετικές χώρες (FAO-OIV Focus, 2016).

Τα σταφύλια καταναλώνονται τόσο νωπά όσο και ως μεταποιημένα προϊόντα, όπως κρασί, ζελέ, μαρμελάδα, χυμός, εκχύλισμα σπόρων σταφυλιών, σταφίδες, ξύδι και έλαιο σταφυλιού. Ο λόγος που έχουμε τόσο μεγάλη ποικιλία επεξεργασμένων προϊόντων οφείλεται στην εξαιρετική σύσταση του καρπού. Για το λόγο αυτό, η καλλιέργεια των σταφυλιών κατέχει τη μεγαλύτερη εμπορική αξία σε σχέση με διάφορα φρούτα (FAO-OIV Focus, 2016).

Η παγκόσμια παραγωγή σταφυλιών το 2014 εκτιμήθηκε σε 75 εκατομμύρια τόνους εκ των οποίων το 41% παρήχθη στην Ευρώπη, το 29% στην Ασία και το 21% στην Αμερική. Περίπου το 45% της παραγωγής σταφυλιών δεν υφίσταται κατεργασία, ενώ το υπόλοιπο 55% χρησιμοποιείται κυρίως για τη παραγωγή οίνου. Μέχρι και το 81% (26.8 εκατομμύρια τόνοι το 2014) μη αποφλοιωμένων σταφυλιών καταναλώνονται ως νωπά σταφύλια. Δεδομένης της πολυμορφίας των σταφυλιών και του μεγέθους της παγκόσμιας καλλιέργειας τους, είναι προφανές ότι η αγορά σταφυλιών παίζει σημαντικό ρόλο στη παγκόσμια κατανάλωση τροφίμων.

Η παγκόσμια έκταση για παραγωγή σταφυλιών για όλες τις χρήσεις εκτιμάται ότι είναι σχεδόν ισοδύναμη με εκείνη του 2017 φτάνοντας τα 7,4 εκατομμύρια εκτάρια. Στην Ευρώπη,

τα τελευταία διαθέσιμα στοιχεία δείχνουν μια σταθεροποίηση της επιφάνειας των αμπελώνων στην Ισπανία (969 χιλιάδες εκτάρια), τη Γαλλία (789 χιλιάδες εκτάρια), τη Ρουμανία (106 χιλιάδες εκτάρια), τη Γερμανία (103 χιλιάδες εκτάρια) και την Ελβετία (15 χιλιάδες εκτάρια). Ωστόσο, η έκταση που καλλιεργείται με αμπέλους στην Ιταλία εκτιμάται ότι αυξήθηκε κατά περίπου 5 χιλιάδες εκτάρια μεταξύ 2017 και 2018, φθάνοντας τα 702 χιλιάδες εκτάρια. Μόνο δύο ευρωπαϊκές χώρες φαίνεται να έχουν μειώσει ελαφρά τις αμπελουργικές τους εκτάσεις μεταξύ 2017 και 2018.



**Εικόνα 1.8** Ποσοστά εκτάσεων καλλιέργειας των σταφυλιών σε διαφορετικά κράτη της Ευρωπαϊκής Ένωσης το 2015 (Eurostat, 2015).

Τα απόβλητα οινοποιίας περιλαμβάνουν τα στέμφυλα, τα γίγαρτα και τους βοστρύχους, τα οποία είναι κυρίως λιγνοκυτταρινούχα υπολείμματα, καθώς και την οινολάσπη. Τα οινοποιεία είναι στη πλειοψηφία τους επιχειρήσεις μικρής κλίμακας που δεν έχουν τη δυνατότητα να καλύψουν το κόστος εγκατάστασης συστημάτων επεξεργασίας των στερεών τους αποβλήτων, με αποτέλεσμα να τα διαχειρίζονται με περιβαλλοντικά μη-αποδεκτές μεθόδους. Μετά το πέρας της οινοποίησης, σε μερικές περιπτώσεις τα απόβλητα, είτε τα στερεά ή και τα υγρά, συνήθως επεξεργάζονται μέσω κομποστοποίησης ή απορρίπτονται στο περιβάλλον. Το ιδιαίτερα υψηλό οργανικό φορτίο αποβλήτων δεν βιοαποικοδομείται εύκολα, ενώ οι υψηλές συγκεντρώσεις φαινολικών ενώσεων οδηγούν στην εμφάνιση βιοτοξικών φαινομένων και κατ' επέκταση στην υποβάθμιση του φυσικού περιβάλλοντος (Lafka *et al.*, 2007; Prozil *et al.*, 2012).

Η αξιοποίηση των παραπροϊόντων ή υποπροϊόντων ή αποβλήτων που παράγονται από διάφορες βιομηχανικές διεργασίες κρίνεται πλέον απαραίτητη με απώτερο σκοπό την αντικατάσταση χημικών ουσιών και καυσίμων που παράγονται από το πετρέλαιο (Koutinas *et al.*, 2014).

## 1.8 Χαρακτηριστικά Πηκτίνης και Εκχύλισή της

### 1.8.1 Δομή και Χαρακτηριστικά Πηκτίνης

Η πηκτίνη είναι ένας δομικός ετεροπολυσακχαρίτης που υπάρχει σε μη ξυλώδεις φυτικούς ιστούς και συμβάλλει στη δομή και στην αντοχή του κυτταρικού τοιχώματος. Είναι υπεύθυνη για τη σταθερότητα και τη δομή του φυτικού ιστού και ανήκει στη δομή του κυτταρικού τοιχώματος. Σχηματίζει δίκτυα περαιτέρω σταθεροποιημένα από διασυνδέσεις με ασβέστιο και ασταθή αλκάλια (Pfaltzgraff *et al.*, 2014).

Είναι ένα συστατικό της πρωτεοπηκτίνης του κυτταρικού τοιχώματος. Η πηκτίνη συνίσταται κυρίως από αλυσίδες μονάδων D-γαλακτουρονικού οξέος (galA) συνδεδεμένες μεταξύ τους με  $\alpha$ -(1→4) γλυκοζιτικούς δεσμούς. Επιπροσθέτως, η αλυσίδα του πολυ-1,4-D-γαλακτουρονικού οξέος (polygalA) περιέχει σάκχαρα όπως ραμνόζη, γαλακτόζη, αραβινόζη, φουκόζη ή ξυλόζη. Η δομή της πηκτίνης είναι οργανωμένη σε τέσσερις διαφορετικές υπομονάδες. Οι τρεις περιέχουν διακλαδισμένα σάκχαρα που βρίσκονται στο σκελετό του polygalA: ραμνογαλακτουρονάνη I και II (αντίστοιχα RG I και RG II) και ξυλογαλακτουρονάνη (XGA). Αυτές συχνά αναφέρονται ως οι «τριχωτές περιοχές» της πηκτίνης. Ο μη διακλαδισμένος σκελετός του polygalA ονομάζεται HG ή ομογαλακτουρονάνη και συνήθως αναφέρεται ως «ομαλή περιοχή». Αυτές οι τέσσερις διαφορετικές υπομονάδες σχηματίζουν διακλαδισμένους δεσμούς οργανωμένους γύρω από τη κύρια αλυσίδα polygalA. Η σύνθεση της εκχυλισθείσας πηκτίνης εξαρτάται από το τύπο και τη ποικιλία της βιομάζας που προέρχεται όπως και από τις συνθήκες εξαγωγής. Η διαδικασία εκχύλισης με όξινη υδρόλυση βασισμένη στη χρήση ανόργανων οξέων παράγει πηκτίνη που αποτελείται κυρίως από αλυσίδες γαλακτουρονικού οξέος. Σύμφωνα με τα πρότυπα της Ευρωπαϊκής Ένωσης, η πηκτίνη μπορεί να περιέχει πάνω από 65% D-γαλακτουρονικού οξέος (Pfaltzgraff *et al.*, 2014).

Η πηκτίνη μπορεί να αξιοποιηθεί στο τομέα των τροφίμων, των καλλυντικών καθώς και στο τομέα της φαρμακευτικής. Η πηκτίνη χρησιμοποιείται στη βιομηχανία τροφίμων ως παράγοντας πηκτωματοποίησης και πάχυνσης. Η ικανότητά της να σχηματίζει ένα δίκτυο ικανό να συγκρατεί νερό έχει ωθήσει τη χρήση της στην παρασκευή μαρμελάδας, ως σταθεροποιητής σε χυμούς φρούτων και σε γαλακτοκομικά προϊόντα και ως υποκατάστατο λίπους σε προϊόντα μειωμένου λίπους. Άλλες εφαρμογές περιλαμβάνουν συστήματα χορήγησης φαρμάκων στη φαρμακευτική βιομηχανία ή για ιατρικές εφαρμογές. Οι ιδιότητες σχηματισμού πηκτής της πηκτίνης οφείλονται στη παρουσία καρβοξυλικής λειτουργικής ομάδας στο C<sub>6</sub> της galA. Αυτή η καρβοξυλομάδα μπορεί να υπάρχει ως ελεύθερο οξύ ή μεθυλεστέρας (Pfaltzgraff *et al.*, 2014).

### 1.8.2 Εκχύλιση Πηκτίνης

Η εκχύλιση της πηκτίνης πραγματοποιείται συμβατικά με όξινη υδρόλυση που συνεπάγεται τη δημιουργία όξινων υγρών αποβλήτων. Η επεξεργασία της πρώτης ύλης πραγματοποιείται υπό όξινες συνθήκες με τη χρήση ανόργανων και οργανικών οξέων, όπως υδροχλωρικό οξύ (HCl),θειϊκό οξύ (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), νιτρικό οξύ (HNO<sub>3</sub>), κιτρικό οξύ (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>), υπό υψηλή θερμοκρασία για 3 έως 12 ώρες. Τα αδιάλυτα σωματίδια (αλεσμένοι φλοιοί πορτοκαλιού) απομακρύνονται από το μίγμα. Η πηκτίνη επανακτάται με κατακρήμνιση χρησιμοποιώντας αιθανόλη. Στη συνέχεια καθαρίζεται με διάλυμα όξινη αιθανόλης και ξηραίνεται μέχρι να επιτευχθεί τελική υγρασία 6-10%. Η ξηρή πηκτίνη μπορεί να ληφθεί με απόδοση 25-30% επί του ολικού ξηρού βάρους του φλοιού του πορτοκαλιού. Τα πολλά στάδια καθαρισμού δημιουργούν πολλά ρεύματα αποβλήτων, καθένα από τα οποία απαιτεί ειδικό χειρισμό (Pfaltzgraff *et al.*, 2014).

## 1.9 Σκοπός Μελέτης

Το υψηλό κόστος για τη παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης σε βιομηχανική κλίμακα απαιτεί την εύρεση ανανεώσιμων πρώτων υλών χαμηλού ή μηδενικού κόστους για την παραγωγή της. Για την εμπορευματοποίηση της βακτηριακής κυτταρίνης πρέπει να βελτιωθεί η παραγωγικότητα της ζύμωσης. Στην παρούσα μελέτη διερευνάται η δυνατότητα παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης με χρήση του βακτηριακού στελέχους *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM 15973 αξιοποιώντας ανανεώσιμες πρώτες ύλες χαμηλού ή μηδενικού κόστους (απόβλητα φρούτων και φλοιών πορτοκαλιού). Αξιολογήθηκε η παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης μέσω διαφορετικών παραμέτρων έχοντας ως στόχο την αύξηση της συγκέντρωσης της βακτηριακής κυτταρίνης, καθώς και τη βελτιστοποίηση της απόδοσης και της παραγωγικότητας του τελικού προϊόντος.



## **2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **2.1 Βιολογικό Υλικό**

Ο μικροοργανισμός που χρησιμοποιήθηκε για τη παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη είναι ο *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM 15973 (Toyosaki *et al.* 1995), ο οποίος ανήκει στην οικογένεια *Acetobacteraceae*. Το συγκεκριμένο βακτήριο απομονώθηκε από μαυροκέρασο και προμηθεύτηκε από το Ινστιτούτο Leibniz-DSMZ της Γερμανίας (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures).

### **Παρασκευή Εμβολίου**

Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για τη παρασκευή του εμβολίου ήταν το Hestrin-Schramm (HS-γλυκόζη) (Schramm & Hestrin 1954), το οποίο περιέχει (ανά 1 L απιονισμένου νερού): 20 g γλυκόζη, 5 g yeast extract, 5 g βακτηριακή πεπτόνη, 2,7 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,15 g κιτρικό οξύ. Το pH του μέσου αρχικά ρυθμίστηκε στο 6 με προσθήκη 5 M NaOH. Η ζύμωση διήρκησε 2 ημέρες, κατά την οποία κωνικές φιάλες των 250 mL τοποθετήθηκαν σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο στους 30 °C με ρυθμό 180 rpm.

### **Συνθήκες Αποθήκευσης**

Σε φιαλίδια ειδικού τύπου (Cryo Vial) (2 mL) προστέθηκαν 0,9 mL γλυκερόλης και 0,9 mL εμβολίου HS-γλυκόζη και η συντήρησή τους πραγματοποιήθηκε στους -80 °C προκειμένου να διατηρηθούν βιώσιμα τα κύτταρα για μεγάλο χρονικό διάστημα, καθώς κάτω από αυτές τις συνθήκες οι διάφορες λειτουργίες αναστέλλονται.

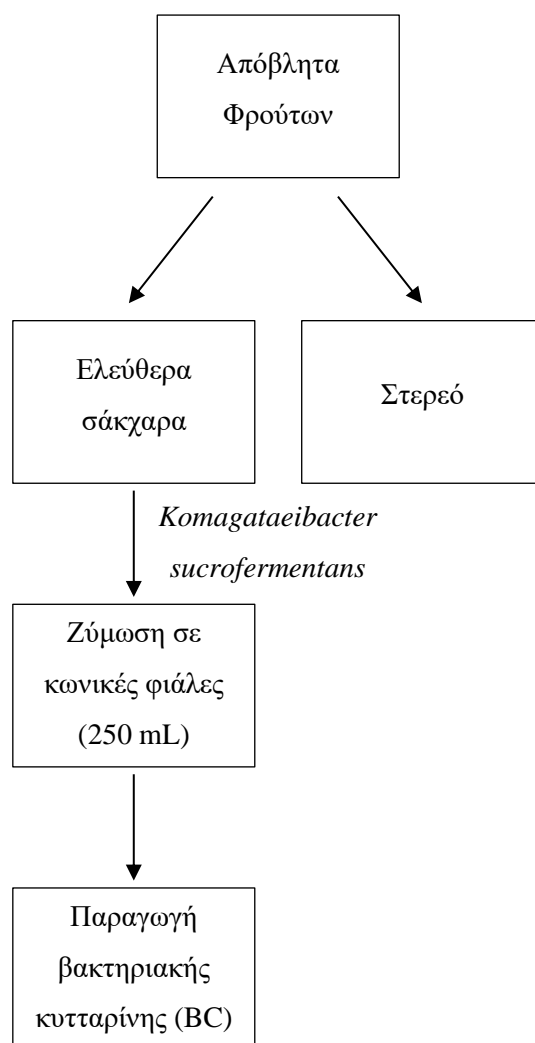
### **2.2 Θρεπτικά Υποστρώματα**

Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκαν μικροβιακές ζυμώσεις σε δύο υποστρώματα που διέφεραν μεταξύ τους ως προς τη πηγή άνθρακα και μελετήθηκε η επίδραση τους στη παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης. Η βάση για όλες τις ζυμώσεις ήταν το μέσο Hestrin-Schramm (HS-γλυκόζη). Η αρχική συγκέντρωση σακχάρων διατηρήθηκε σταθερή, 20 g/L.

#### **2.2.1 Υπόστρωμα με Ελεύθερα Σάκχαρα από Απόβλητα Φρούτων**

Το συγκεκριμένο υπόστρωμα προήλθε από εκχύλισμα από απόβλητα διαφόρων φρούτων (αχλάδι, πορτοκάλι, μήλο, ροδάκινο, βανίλιες) ως πηγή άνθρακα. Πιο συγκεκριμένα,

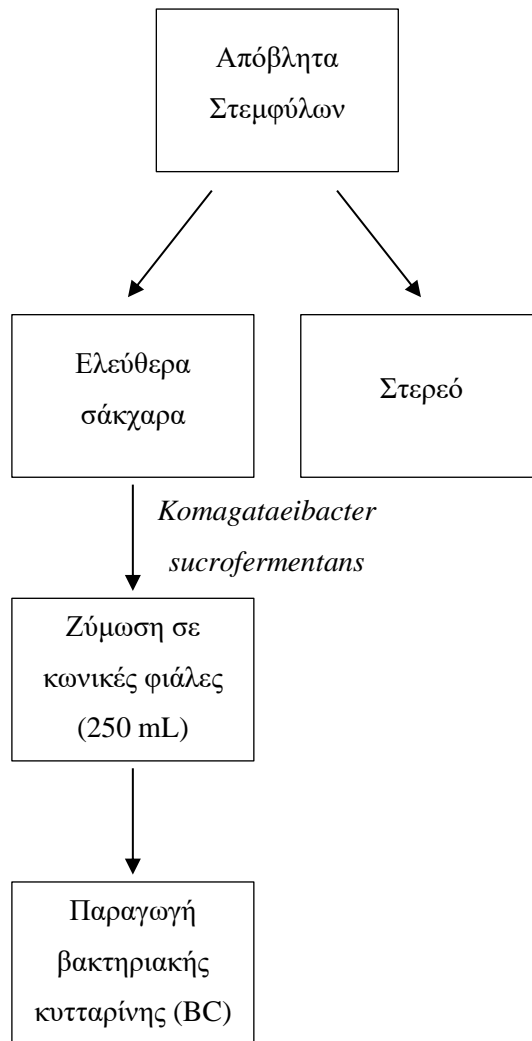
σε ξηρό δείγμα από πολτοποιημένα απόβλητα φρούτων (τα οποία προήλθαν από λαϊκές αγορές) προστέθηκε απιονισμένο νερό σε αναλογία στερεό προς υγρό 1:10, προκειμένου να επιτευχθεί η επιθυμητή αρχική συγκέντρωση σακχάρων (20 g/L) για τη παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης. Το μίγμα αναδεύτηκε για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια το εκχύλισμα διαχωρίστηκε από το στερεό υπόλειμμα με φυγοκέντριση σε φυγόκεντρο (Thermo Scientific, Sorvall LYNX 6000), ώστε να διαχωριστούν τα στερεά υπολείμματα από το υγρό. Το εκχύλισμα αποστειρώθηκε με φίλτρο διαμέτρου οπών 0,2  $\mu\text{m}$  (Polycap 36 AS, Whatman). Σε αυτό προστέθηκε yeast extract και βακτηριακή πεπτόνη καθώς και κιτρικό οξύ και ιχνοστοιχεία απαραίτητα για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Όλα τα υλικά, σκεύη και διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν, αποστειρώθηκαν προηγουμένως σε αυτόκαυστο στους 121  $^{\circ}\text{C}$  για 20 min. Επίσης, όλοι οι χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες, σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής.



**Διάγραμμα 2.1** Διάγραμμα ροής για παραλαβή των ελεύθερων σακχάρων από απόβλητα φρούτων και ζύμωση σε κωνικές φιάλες για παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης.

### **2.2.2 Υπόστρωμα με Ελεύθερα Σάκχαρα από Στέμφυλα**

Το συγκεκριμένο υπόστρωμα προήλθε από εκχύλισμα από τέσσερις διαφορετικές ποικιλίες σταφυλιών (Ασύρτικο Σαντορίνης, Σαββατιανό, Μοσχάτο Τυρνάβου, Αγιωργίτικο Νεμέας) ως πηγή άνθρακα. Πιο συγκεκριμένα, σε ξηρό δείγμα από πολτοποιημένα στέμφυλα προστέθηκε απιονισμένο νερό σε αναλογία στερεό προς υγρό 1:10, προκειμένου να επιτευχθεί η επιθυμητή αρχική συγκέντρωση σακχάρων (20 g/L) για τη παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης. Το μίγμα αναδεύτηκε για 3 ώρες σε υδατόλουτρο στους 50 °C και στη συνέχεια το εκχύλισμα διαχωρίστηκε από το στερεό υπόλειμμα με φυγοκέντριση (Thermo Scientific, Sorvall LYNX 6000), ώστε να διαχωριστούν τα στερεά υπολείμματα από το υγρό. Το εκχύλισμα αποστειρώθηκε με φίλτρο διαμέτρου οπών 0,2 μm (Polycap 36 AS, Whatman). Σε αυτό προστέθηκε εκχύλισμα ζύμης και βακτηριακή πεπτόνη καθώς και κιτρικό οξύ και ιχνοστοιχεία απαραίτητα για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Όλα τα υλικά, σκεύη και διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν, αποστειρώθηκαν προηγουμένως σε αυτόκαυστο στους 121 °C για 20 min. Τέλος, όλοι οι χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες, σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής.

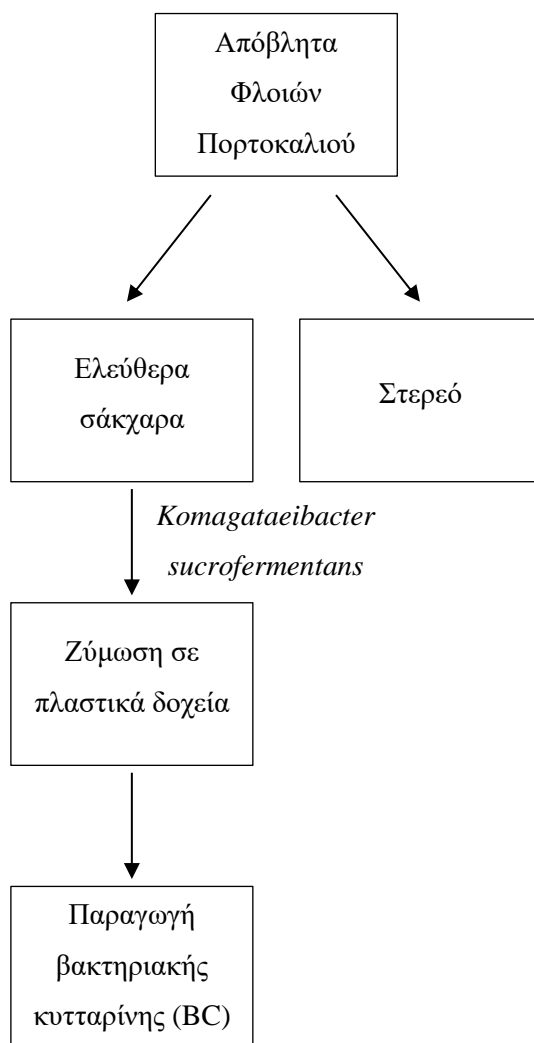


**Διάγραμμα 2.2** Διάγραμμα ροής για παραλαβή των ελεύθερων σακχάρων από απόβλητα στεμφύλων και ζύμωση σε κωνικές φιάλες για παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης.

### 2.2.3 Υπόστρωμα με Ελεύθερα Σάκχαρα από Απόβλητα Φλοιών Πορτοκαλιού

Το συγκεκριμένο υπόστρωμα προήλθε από εκχύλισμα από απόβλητα φλοιών πορτοκαλιού ως πηγή άνθρακα. Πιο συγκεκριμένα, σε ξηρό δείγμα από πολτοποιημένα απόβλητα φλοιών πορτοκαλιού (τα οποία προήλθαν από λαϊκές αγορές) προστέθηκε απιονισμένο νερό σε αναλογία στερεό προς υγρό 1:20, προκειμένου να επιτευχθεί η επιθυμητή αρχική συγκέντρωση σακχάρων (20 g/L) για την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης. Το μίγμα αναδεύτηκε για 2 ώρες σε υδατόλουτρο σε θερμορασία 50 °C και στη συνέχεια το εκχύλισμα διαχωρίστηκε από το στερεό υπόλειμμα με φυγοκέντριση (Thermo Scientific, Sorvall LYNX 6000), ώστε να διαχωριστούν τα στερεά υπολείμματα από το υγρό. Το εκχύλισμα αποστειρώθηκε με φίλτρο διαμέτρου οπών 0,2 μm (Polycap 36 AS, Whatman). Σε αυτό προστέθηκε εκχύλισμα ζύμης και βακτηριακή πεπτόνη, καθώς και κιτρικό οξύ και ιχνοστοιχεία απαραίτητα για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού. 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.



**Διάγραμμα 2.3** Διάγραμμα ροής για παραλαβή των ελεύθερων σακχάρων από απόβλητα φλοιών πορτοκαλιού και ζύμωση σε πλαστικά δοχεία για παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης.

### 2.3 Συνθήκες Ζύμωσης Διαλείποντος Έργου

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

Ακόμη, πραγματοποιήθηκαν πειράματα βελτιστοποίησης παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης σε υπόστρωμα που περιείχε ελεύθερα σάκχαρα από απόβλητα φρούτων και

απόβλητα φλοιών πορτοκαλιού σε πλαστικά δοχεία με επιφάνεια 80×80 cm<sup>2</sup>. Η ζύμωση στα πλαστικά δοχεία πραγματοποιήθηκε παρουσία και απουσία αερισμού. Το εμβόλιο που χρησιμοποιήθηκε ήταν μεμβράνες βακτηριακής κυτταρίνης που παράχθηκαν σε κωνικές φιάλες όπως αναφέρθηκε προηγουμένως.

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

## **2.4 Παραλαβή και Καθαρισμός της Βακτηριακής Κυτταρίνης**

Η βακτηριακή κυτταρίνη που είχε τη μορφή ενυδατωμένων μεμβρανών πλύθηκε με απιονισμένο νερό ώστε να απομακρυνθούν τα υπολείμματα της καλλιέργειας. Στη συνέχεια, εμβαπτίστηκε σε NaOH 2 M για 24 ώρες περίπου, προκειμένου να εξουδετερωθούν τα βακτηριακά κύτταρα. Έπειτα, ξεπλύθηκε αρκετές φορές με απιονισμένο νερό και αφέθηκε για μερικές ώρες στο νερό αυτό μέχρι να επιτευχθεί ουδέτερη τιμή pH. Τέλος, τοποθετήθηκε σε φούρνο στους 30 °C μέχρι να επιτευχθεί σταθερό βάρος.

## **2.5 Ζύμωση Διαλείποντος Έργου σε Βιοαντιδραστήρα με Υπόστρωμα από Ελεύθερα Σάκχαρα από Απόβλητα Φρούτων**

Σε αυτό το πειραματικό στάδιο, μελετήθηκε η ικανότητα παραγωγής της βακτηριακής κυτταρίνης με χρήση του μικροοργανισμού *Komagataeibacter sucrofermentans* (DSM 15973) ως προϊόν υψηλής προστιθέμενης αξίας.

### **2.5.1 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 διπλά τοιχώματα από βιοπυριτικό γυαλί, όπου μεταξύ των δύο τοιχωμάτων κυκλοφορεί νερό το οποίο απαιτείται για την εναλλαγή θερμότητας με το υγρό της ζύμωσης. Ο βιοαντιδραστήρας αυτός δίνει τη δυνατότητα ελέγχου των συνθηκών της ζύμωσης. Πιο συγκεκριμένα, έχει τη δυνατότητα να ρυθμίζει το pH, τη θερμοκρασία, την παροχή οξυγόνου, την παροχή τροφοδοσίας με θρεπτικό μέσο και τον αριθμό των στροφών του αναδευτήρα. Όλες οι παραπάνω ρυθμίσεις πραγματοποιούνται μέσω του ειδικού εξοπλισμού που διαθέτει ο βιοαντιδραστήρας και ο οποίος αποτελείται από πεγάμετρο, θερμοκρασία,

οξυγονόμετρο, αναδευτήρα δύο πτερωτών, αισθητήρα αφρισμού, καθώς και δύο αντλίες για τη παροχή οξέος και βάσεως.

### **2.5.2 Θρεπτικό Υπόστρωμα Καλλιέργειας**

Πραγματοποιήθηκε ζύμωση σε θρεπτικό υπόστρωμα από ελεύθερα σάκχαρα προερχόμενα από τα απόβλητα φρούτων. Το υπόστρωμα προσαρμόστηκε σύμφωνα με το θρεπτικό μέσο Hestrin-Schramm (HS-γλυκόζη) και περιείχε 20 g/L ελεύθερα σάκχαρα, 5 g/L εκχύλισμα ζύμης, 5 g/L βακτηριακή πεπτόνη, 2,7 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> και 1,15 g/L κιτρικό οξύ, ενώ ο όγκος του εμβολίου ήταν 10% v/v και το αρχικό pH ρυθμίστηκε στο 6 με 5 M NaOH. Έτσι, ο ενεργός όγκος του βιοαντιδραστήρα ήταν 1500 mL, ενώ η ζύμωση διήρκεσε συνολικά 8 ημέρες.

## **2.6 Εργαστηριακές Αναλύσεις**

Οι παράμετροι που εξετάστηκαν στα πειράματα των υγρών ζυμώσεων διαλείποντος έργου ήταν η κατανάλωση της πηγής αζώτου και των σακχάρων κατά τη διάρκεια της μικροβιακής ζύμωσης. Αυτό επιτεύχθηκε προσδιορίζοντας τη σύσταση των αποβλήτων φρούτων και φλοιών πορτοκαλιού, την περιεκτικότητά τους σε πρωτεΐνη, το άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων αμινοξέων και πεπτιδίων (free amino nitrogen, FAN) με τη φωτομετρική μέθοδο της νινυδρίνης και χρησιμοποιώντας την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης για ποιοτικό και ποσοτικό έλεγχο των σακχάρων.

### **2.6.1 Προσδιορισμός της Σύστασης Αποβλήτων Φρούτων και Φλοιών Πορτοκαλιού (πρωτόκολλο NREL)**

Με τη μέθοδο αυτή πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός όλων των συστατικών που περιέχονται στα απόβλητα των φρούτων και των φλοιών των πορτοκαλιών. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε η διεργασία της εκχύλισης σε 2 στάδια για την απομάκρυνση του υδατοδιαλυτού και διαλυτού σε αιθανόλη μη δομικού υλικού, ώστε να αποφευχθεί η παρεμβολή σε μεταγενέστερα αναλυτικά βήματα. Χρησιμοποιήθηκαν φιάλες βρασμού, οι οποίες αρχικά τοποθετήθηκαν σε κλίβανο ξήρανσης 105 °C για τουλάχιστον 12 h. Στη συνέχεια, παρέμειναν σε ξηραντήρα, ώστε να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου, τοποθετήθηκαν πέτρες βρασμού και καταγράφηκε με ακρίβεια το βάρος τους. Το προς εκχύλιση δείγμα τοποθετήθηκε σε προζυγισμένο ειδικό κουκούλι και καταγράφηκε με ακρίβεια το βάρος του. Τοποθετήθηκε σε σωλήνα ειδικό για τη διαδικασία της Soxhlet και προστέθηκαν 190 mL υπερκάθαρου νερού (νερό HPLC). Το δείγμα αφέθηκε με

ανακυκλοφορία για 6-24 h προκειμένου να εκχυλιστούν τα συστατικά. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε η ίδια διαδικασία με 200 mL αιθανόλης και το δείγμα αφέθηκε με ανακυκλοφορία για 16-24 h προκειμένου να εκχυλιστούν τα υπόλοιπα συστατικά τα οποία δεν εκχυλίζονται με το νερό. Η φιάλη βρασμού που περιέχει τα εκχυλίσματα που προήλθαν από το νερό τοποθετήθηκε σε εξατμιστήρα (αφού προηγουμένως έχει κρατηθεί δείγμα για HPLC ανάλυση), ώστε να εξατμιστεί όλο το περιεχόμενο και παρέμεινε σε ξηραντήρα για σταθεροποίηση του βάρους και καταγραφή του με ακρίβεια. Στη συνέχεια, το κουκούλι με το δείγμα τοποθετήθηκε σε κλίβανο ξήρανσης στους 45 °C για τουλάχιστον 12 h και μεταφέρθηκε στο ξηραντήρα σταθεροποίηση του βάρους και καταγραφή του με ακρίβεια. Έπειτα, ζυγίστηκαν με ακρίβεια 300 mg από το δείγμα, το οποίο υπέστη εκχύλιση και μεταφέρθηκαν σε φιάλη McCartney. Προστέθηκαν 3 mL θειϊκού οξέος 72%, ώστε να υδρολυθεί το δείγμα και η φιάλη τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο στους 30 °C για 1 h. Χρησιμοποιήθηκε ράβδος ανάδευσης και το δείγμα αναδευόταν κάθε 5 min. Μετά την υδρόλυση, το περιεχόμενο της φιάλης μεταφέρθηκε σε φιάλη αναεροβίωσης και προστέθηκαν 86,73 mL απιονισμένου νερού. Παράλληλα, ετοιμάστηκε και ένα πρότυπο διάλυμα σακχάρων με συγκέντρωση 10 g/L, το οποίο περιείχε γλυκόζη, ξυλόζη, αραβινόζη, μαννόζη και γαλακτόζη. Από το διάλυμα αυτό μεταφέρθηκε ποσότητα 1 mL σε φιάλη αναεροβίωσης και προστέθηκαν 348 μL θειϊκού οξέος 72% και 9 mL απιονισμένου νερού. Οι φιάλες αναεροβίωσης τοποθετήθηκαν στο αυτόκαυστο για 1 h στους 121 °C. Μετά το αυτόκαυστο, πραγματοποιήθηκε φιλτράρισμα υπό κενό του διαλύματος της υδρόλυσης. Το διήθημα συλλέχθηκε, ογκομετρήθηκε, καταγράφηκε ο ακριβής του όγκος και πάρθηκε ποσότητα δείγματος, ώστε να πραγματοποιηθεί ανάλυση HPLC. Χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο νερό για να μεταφερθούν ποσοτικά όλα τα εναπομείναντα στερεά σε ειδικό προζυγισμένο χαρτάκι που χρησιμοποιήθηκε για τη διαδικασία της διήθησης υπό κενό. Στη συνέχεια, το ειδικό αυτό χαρτάκι τοποθετήθηκε σε προζυγισμένο χωνευτήρι και τοποθετήθηκε σε κλίβανο ξήρανσης στους 105 °C για περίπου 4 h. Έπειτα, το χωνευτήρι μεταφέρθηκε στο ξηραντήρα, ώστε να επιτευχθεί σταθερό βάρος και να καταγραφεί το βάρος του με ακρίβεια. Το χωνευτήρι τοποθετήθηκε έπειτα, στο πυριαντήριο σε θερμοκρασία 575 °C για τουλάχιστον 5 h, ώστε να προκύψει η τέφρα του δείγματος. Τέλος, το χωνευτήρι τοποθετήθηκε σε ξηραντήρα, ώστε να επιτευχθεί σταθερό βάρος και να καταγραφεί το βάρος της τέφρας με ακρίβεια.

## **2.6.2 Προσδιορισμός της Περιεκτικότητας των Αποβλήτων Φρούτων και Φλοιών Πορτοκαλιού σε Πρωτεΐνη με τη Μέθοδο Kjeldahl**

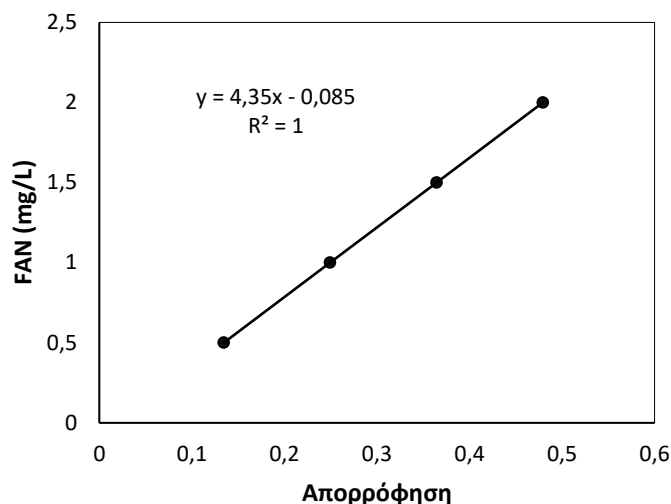
Η μέθοδος Kjeldahl είναι η συνηθέστερη μέθοδος προσδιορισμού της συνολικής πρωτεΐνης σε ένα τρόφιμο. Ζυγίζονται 0,5 g λεπτοδιαμερισμένου δείγματος και τοποθετούνται στο σωλήνα καύσης. Προστίθεται μίγμα  $K_2SO_4$  και  $CuSO_4$  (σε μορφή δίσκου) και 12 mL



πυκνού θειϊκού οξέος. Η καύση διαρκεί έως ότου το δείγμα διαυγάσει και αποκτήσει ασθενώς κυανοπράσινο χρώμα (1 h). Μετά το τέλος της καύσης ο σωλήνας καύσης τοποθετείται στη συσκευή απόσταξης. Σε κωνική φιάλη τοποθετούνται 50 mL δ/τος βορικού οξέος με δείκτες πράσινο της βρωμοκρεσόλης (bromocresol green) και ερυθρό του μεθυλίου (methyl red). Η φιάλη τοποθετείται στην έξοδο της αποστακτικής συσκευής. Η συσκευή τίθεται σε λειτουργία. Αρχικά, προστίθενται 75 mL H<sub>2</sub>O και στη συνέχεια 50 mL NaOH 40%. Η απόσταξη θεωρείται πλήρης όταν συλλεχθούν τουλάχιστον 150-200 mL αποστάγματος. Το περιεχόμενο της κωνικής ογκομετρείται με διάλυμα HCl 0,1 M μέχρι να εμφανιστεί ίχνος ροζ χροιάς. Το άζωτο που τυχόν υπάρχει στα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται κατά το προσδιορισμό θα συνυπολογιστεί στο άζωτο των άγνωστων δειγμάτων. Έτσι, απαιτείται λευκός προσδιορισμός, δηλαδή προσδιορισμός κατά τον οποίο εκτελείται η διαδικασία πλήρως, αλλά αντί για δείγμα προστίθενται 2 mL H<sub>2</sub>O και 0,7 g σακχαρόζης. Ο όγκος του διαλύματος HCl στο λευκό (πρέπει να είναι πάντα > 0,0 mL), αφαιρείται από τον όγκο που καταναλώθηκε για το δείγμα.

## **2.7 Προσδιορισμός Αζώτου των Ελεύθερων Αμινομάδων Αμινοξέων και Πεπτιδίων (FAN)**

Με τη φωτομετρική μέθοδο νινυδρίνης (FAN, Free Amino Nitrogen) προσδιορίστηκε το άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων που περιέχονται σε αμινοξέα και πεπτίδια (Lie *et al.*, 1973). Σε δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκε 1 mL κατάλληλα αραιωμένου δείγματος και 0,5 mL αντιδραστηρίου χρώσης (color reagent). Οι δοκιμαστικοί σωλήνες πωματίστηκαν και μεταφέρθηκαν σε υδατόλουτρο στους 100 °C για 16 min. Ακολούθησε ψύξη των δειγμάτων σε νερό στους 20 °C για 20 min, προσθήκη 2,5 mL αντιδραστηρίου αραιώσης (dilution reagent) και ανάδευση μέχρι αλλαγής χρώματος (20 sec). Τέλος, μετρήθηκε η απορρόφηση σε φασματοφωτόμετρο τύπου Hitachi U-2000 στα 570 nm. Το τυφλό δείγμα για το μηδενισμό του φασματοφωτομέτρου περιείχε 1 mL απιονισμένο νερό, αντί του αραιωμένου δείγματος. Η συγκέντρωση του δείγματος σε FAN υπολογίστηκε από την πρότυπη καμπύλη αναφοράς εκφρασμένη σε mg/L όπως φαίνεται στο διάγραμμα 2.1. Για τη πρότυπη καμπύλη αναφοράς ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία, χρησιμοποιώντας διαφορετικές αραιώσεις πρότυπου διαλύματος γλυκίνης. Η σύσταση των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκε για το FAN περιγράφεται στο πίνακα 2.1.



**Διάγραμμα 2.4** Καμπύλη αναφοράς της γλυκίνης με τη μέθοδο FAN.

**Πίνακας 2.1** Σύσταση αντιδραστηρίων για τη μέτρηση FAN.

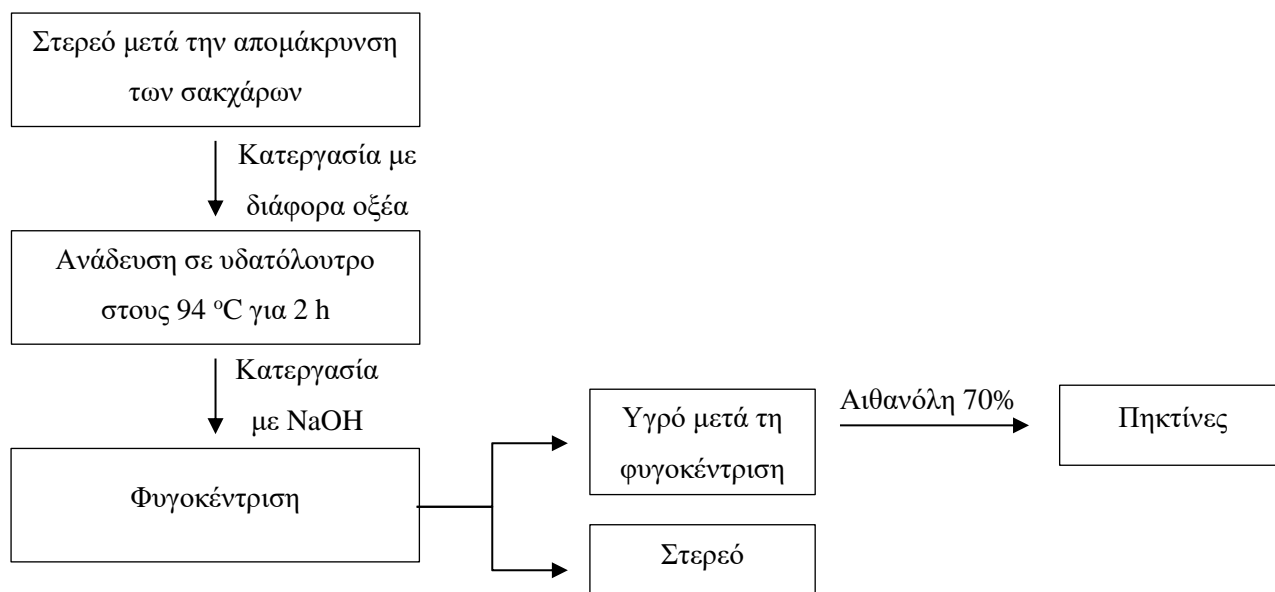
Αντιδραστήρια για τη μέτρηση FAN	Σύσταση
Colour reagent	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 49,71 g όξινο φωσφορικό δινάτριο (<math>\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}</math>), 5 g νινυδρίνη, 3 g φρουκτόζη και περίπου 60 g όξινο διφωσφορικό κάλιο (<math>\text{KH}_2\text{PO}_4</math>)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

## 2.8 Μέθοδος Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των σακχάρων πραγματοποιήθηκε με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography) με τη χρήση του συστήματος SHIMADZU UFLC XR. Συγκεκριμένα, η στήλη με την οποία επιτεύχθηκε ο διαχωρισμός του δείγματος ήταν τύπου Phenomenex Rezex ROA (300mm×7,8mm). Η ταυτοποίηση των διαφόρων χημικών ενώσεων και καταναλωθέντων σακχάρων βασίστηκε στο χρόνο κατακράτησης, ο οποίος συγκρίθηκε με γνωστά πρότυπα αυτών. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε διάλυμα H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10 mM), η ροή κατά την ανάλυση των δειγμάτων ήταν καθορισμένη στο 0,6 mL min<sup>-1</sup>, με τη θερμοκρασία στήλης να είναι στους 65 °C. Από τη στήλη περνούσαν 10 μL δείγματος και η διάρκεια της ανάλυσης ήταν 24 min. Όλα τα δείγματα αρχικά φυγοκεντρήθηκαν και στη συνέχεια φιλτραρίστηκαν μέσω φίλτρων whatman με μεμβράνη διαμέτρου σπών 0,2 μm. Ο απαιτούμενος όγκος κάθε ένεσης ήταν 20 μL.

## 2.9 Μέθοδος Εκχύλισης Πηκτινών από Απόβλητα Φλοιών Πορτοκαλιών

Μετά την απομάκρυνση των σακχάρων το στερεό που προέκυψε από αυτή τη διαδικασία χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση των πηκτινών σε αναλογία στερεό προς υγρό 1:20 και 1:30. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε κατεργασία σε 100 g στερεού με διάφορα οξέα (πυκνό HCl, πυκνό H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, πυκνό HNO<sub>3</sub>, κιτρικό οξύ), ώστε να φθάσει το pH στο 1-2. Το μίγμα τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο με θερμοκρασία από 70 έως 94 °C και ανάδευση 200 rpm για 1 έως 2 ώρες. Στη συνέχεια, το μίγμα αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να κρυώσει και να ρυθμιστεί το pH στο 4 με 4,5 με NaOH 10M. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του στερεού από το υγρό με φυγοκέντριση σε φυγόκεντρο (Thermo Scientific, Sorvall LYNX 6000), ώστε να διαχωριστούν τα στερεά υπολείμματα από το υγρό. Στο υγρό μετά τη φυγοκέντριση προστέθηκε αιθανόλη σε αναλογία υγρό προς αιθανόλη 1:2 και το μίγμα αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες, ώστε να πραγματοποιηθεί κατακρήμνιση των πηκτινών. Ακολούθησε διαχωρισμός των πηκτινών από το υγρό με φυγοκέντριση σε φυγόκεντρο (Thermo Scientific, Sorvall LYNX 6000), ώστε να διαχωριστούν οι πηκτίνες από το υγρό. Τέλος, ακολούθησε ξήρανση των πηκτινών με λυοφιλίωση, καθώς και προσδιορισμός του γαλακτουρονικού οξέος.



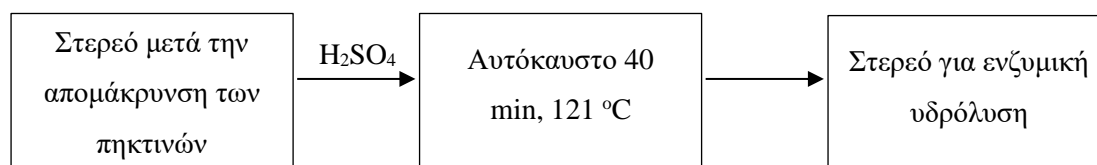
**Διάγραμμα 2.5** Διάγραμμα ροής για την απομάκρυνση των πηκτινών από τα απόβλητα των φλοιών πορτοκαλιού.

### 2.9.1 Προσδιορισμός Γαλακτουρονικού Οξέος Πηκτινών

Σε δοκιμαστικό σωλήνα ζυγίστηκαν περίπου 10 mg λυοφιλωμένης πηκτίνης και προστέθηκε 1 mL πυκνόθειικό οξύ και τοποθετήθηκε σε παγόλουτρο με ανάδευση για 5 λεπτά. Προστέθηκε ακόμη 1 mL πυκνόθειικό οξύ και τοποθετήθηκε σε παγόλουτρο με ανάδευση για άλλα 5 λεπτά. Στη συνέχεια, έγινε προσθήκη 0,5 mL απιονισμένο  $H_2O$  και τοποθετήθηκε σε παγόλουτρο με ανάδευση για 5 λεπτά. Έπειτα, προστέθηκαν ακόμη 0,5 mL απιονισμένο  $H_2O$  και τοποθετήθηκε πάλι σε παγόλουτρο υπό ανάδευση για 5 λεπτά. Πραγματοποιήθηκε προσθήκη  $H_2O$  μέχρι τελικού όγκου 10 mL και ακολούθησε η διαδικασία για τη φωτομέτρηση των δειγμάτων. Χρησιμοποιήθηκαν τρεις δοκιμαστικοί σωλήνες για κάθε δείγμα με 400  $\mu L$  από κάθε δείγμα ο καθένας και προστέθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια: 1) 40  $\mu L$  sulfamic acid/potassium sulfamate solution 4 M, pH = 1,6 και ανάδευση των δειγμάτων, 2) 2,4 mL sodium tetraborate in sulfuric acid solution 75 mM και ανάδευση. Κατόπιν, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 100 °C για 20 min και μεταφέρθηκαν σε παγόλουτρο για ψύξη για 10 min. Στους δύο δοκιμαστικούς σωλήνες προστέθηκαν 80  $\mu L$  m-hydroxydiphenyl solution, ενώ στο τρίτο δοκιμαστικό προστέθηκαν 80  $\mu L$  0,5% NaOH και ανάδευση του κάθε δοκιμαστικού σωλήνα τρεις φορές, ώστε να αναμιχθούν καλά. Μετά την ανάπτυξη του ροζ χρώματος τα δείγματα φωτομετρήθηκαν στα 525 nm σε φασματοφωτόμετρο τύπου Hitachi U-2000 Spectrophotometer. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για το σχεδιασμό της πρότυπης καμπύλης του γαλακτουρονικού οξέος με χρήση διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης σε γαλακτουρονικό οξύ.

## 2.10 Χημική και Ενζυμική Υδρόλυση για Παραγωγή Σακχάρων

Η ποσότητα του στερεού, μετά την εκχύλιση των πρωτεϊνών, χρησιμοποιήθηκε για χημική και κατόπιν για ενζυμική υδρόλυση. Η χημική υδρόλυση πραγματοποιήθηκε στο στερεό σε αναλογία στερεό προς υγρό 1:20 προσθέτοντας 0,5%  $H_2SO_4$  (κατάλληλη ποσότητα ώστε να μην αλλάξει η αναλογία) και έπειτα επεξεργάστηκε στο αυτόκαυστο για 40 min στους  $121^\circ C$ . Μετά το αυτόκαυστο, μικρή ποσότητα χρησιμοποιήθηκε για ανάλυση HPLC, ενώ η υπόλοιπη ποσότητα χρησιμοποιήθηκε για ενζυμική υδρόλυση, όπου προστέθηκε ποσότητα νερού κατάλληλη, ώστε η αναλογία στερεό προς υγρό να παραμείνει 1:20 και το pH ρυθμίστηκε στο 4,8-5 με NaOH 10 M, κατάλληλη τιμή για να δράσουν τα ένζυμα. Μετά τη ρύθμιση του pH ακολούθησε προσθήκη των ενζύμων cellulase 20 U/g και  $\beta$ -glucosidase 80 U/g και το δείγμα τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο στους  $50^\circ C$ , όπου και παρέμεινε για 96 h. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του στερεού από το υγρό με φυγοκέντριση σε φυγόκεντρο (Thermo Scientific, Sorvall LYNX 6000), ώστε να διαχωριστούν τα στερεά υπολείμματα από το υγρό. Στη συνέχεια, δείγμα του υγρού πάρθηκε για ανάλυση HPLC, ώστε να προσδιοριστεί η συγκέντρωση των σακχάρων και το υδρόλυμα χρησιμοποιήθηκε για ζύμωση προς παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης σε κωνικές φιάλες των 250 mL με ενεργό όγκο 50 mL. Ο όγκος του εμβολίου ήταν 10% v/v και το αρχικό pH ρυθμίστηκε στο 6 με 5 M NaOH. Οι κωνικές φιάλες τοποθετήθηκαν αρχικά σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο με θερμοκρασία  $30^\circ C$  και 180 rpm για 1-2 ημέρες και στη συνέχεια επικράτησαν στατικές συνθήκες και στη συνέχεια επικράτησαν στατικές συνθήκες. Εκτός από τη ζύμωση σε κωνικές φιάλες το υδρόλυμα χρησιμοποιήθηκε σε πλαστικά δοχεία με επιφάνεια  $80 \times 80 \text{ cm}^2$ . Η ζύμωση στα πλαστικά δοχεία πραγματοποιήθηκε παρουσία και απουσία αερισμού. Ο αερισμός ήταν 0,5 vvm. Το εμβόλιο που χρησιμοποιήθηκε ήταν μεμβράνες βακτηριακής κυτταρίνης που παράχθηκαν σε κωνικές φιάλες όπως αναφέρθηκε προηγουμένως.



**Διάγραμμα 2.6** Διάγραμμα ροής χημικής υδρόλυσης του στερεού μετά την απομάκρυνση των πηκτινών.

## 2.11 Βαθμός Πολυμερισμού

Για το προσδιορισμό του βαθμού πολυμερισμού χρησιμοποιήθηκαν διάφορες ποσότητες δείγματος βακτηριακής κυτταρίνης από όλες τις ζυμώσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω και διαλύθηκαν σε ποσότητα διαλύτη Copper(II)-ethylenediamine (CED) 0,5 M. Το σχετικό ιξώδες ( $\eta_r$ ) και το ειδικό ιξώδες ( $\eta_{sp}$ ) κάθε διαλύματος μετρήθηκαν χρησιμοποιώντας ιξωδόμετρο τύπου Cannon-Fenske Routine Viscometer που βρισκόταν βυθισμένο σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 25 °C και στη συνέχεια υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τις παρακάτω εξισώσεις:

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

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

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

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

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

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

Όπου  $\alpha = 0,905$  και  $K = 1,33 \cdot 10^{-4}$  dL/g. Οι τιμές των παραμέτρων Mark-Houwink  $\alpha$  και  $K$  για το συγκεκριμένο σύστημα πολυμερούς-διαλύτη λήφθηκαν από το Polymer Data Handbook (1999). Τελικά, ο βαθμός πολυμερισμού (DP) υπολογίστηκε ως ο λόγος του μέσου μοριακού βάρους ( $M$ ) προς το μοριακό βάρος της μονομερούς μονάδας άνυδρης γλυκόζης:

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

### 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

#### 3.1 Προσδιορισμός της Σύστασης Αποβλήτων Φρούτων και Φλοιών Πορτοκαλιού

Σύμφωνα με τις αναλυτικές μεθόδους που περιγράφηκαν στην προηγούμενη ενότητα προσδιορίστηκε η σύσταση των φρούτων και των φλοιών πορτοκαλιού. Τα συστατικά των φρούτων και φλοιών πορτοκαλιού παρατίθενται στους Πίνακες 3.1 και 3.2 αντίστοιχα.

**Πίνακας 3.1** Αποτελέσματα (σε % ξηρό βάρος) της σύστασης των φρούτων.

Συστατικά	Προσδιορισμός σύστασης
Ελεύθερα σάκχαρα (% ξ.β.)	72,5
Πρωτεΐνη (% ξ.β.)	4
Πηκτίνη (% ξ.β.)	9,2
Κυτταρίνη (% ξ.β.)	4,9
Ημικυτταρίνη (% ξ.β.)	4,11
Λιγνίνη (% ξ.β.)	2,18
Τέφρα (% ξ.β.)	2
Φαινολικά (g GAE/100 g ξ.β.)	0,65
Λίπος (% ξ.β.)	0,46

**Πίνακας 3.2** Αποτελέσματα (σε % ξηρό βάρος) της σύστασης των φλοιών του πορτοκαλιού και σύγκριση τους με βιβλιογραφικά στοιχεία.

Συστατικά	Προσδιορισμός σύστασης	Pourbafrani <i>et al.</i> , 2010 (% ξηρό βάρος)
Ελεύθερα σάκχαρα (% ξ.β.)	17,8	22,9
Γλυκόζη (% ξ.β.)	7,5	8,10
Φρουκτόζη (% ξ.β.)	8,4	12,0
Σακχαρόζη (% ξ.β.)	1,96	2,8
Πρωτεΐνη (% ξ.β.)	6,14	6,07
Πηκτίνη (% ξ.β.)	28,7	25,0
Κυτταρίνη (% ξ.β.)	24,6	22,0
Ημικυτταρίνη (% ξ.β.)	16,6	11,1
Λιγνίνη (% ξ.β.)	1,5	2,2
Τέφρα (% ξ.β.)	1,4	3,8
D-λεμονένιο (% ξ.β.)	3,2	3,7

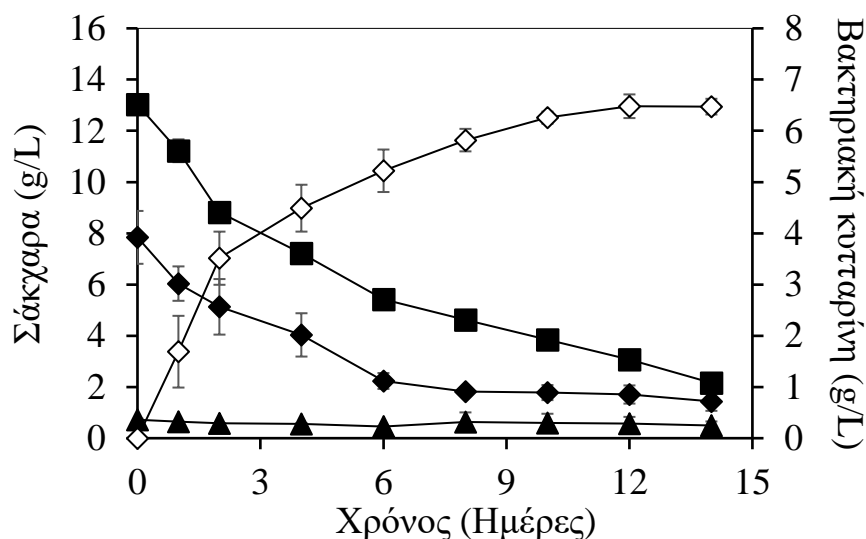
Ο Πίνακας 3.2 παρουσιάζει τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις αναλυτικές μεθόδους προσδιορισμού της σύστασης που αφορά στους φλοιούς του πορτοκαλιού και τα οποία συμπίπτουν με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη βιβλιογραφία για την ίδια πρώτη ύλη.

### 3.2 Ζύμωση Διαλείποντος Έργου με Υπόστρωμα από Ελεύθερα Σάκχαρα Αποβλήτων Φρούτων

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν πειράματα για παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης με χρήση ελεύθερων σακχάρων που προέρχονται από απόβλητα φρούτων. Το βακτηριακό στέλεχος *K. sucrofermentans* αναπτύχθηκε σε υπόστρωμα το οποίο προσαρμόστηκε σύμφωνα με το θρεπτικό μέσο Hestrin-Schramm (HS-γλυκόζη), με σκοπό να αξιολογηθεί η ικανότητα του να αφομοιώσει τα σάκχαρα που υπήρχαν και να παράξει βακτηριακή κυτταρίνη. Η περιεκτικότητα του χυμού σε σάκχαρα ήταν πολύ μεγαλύτερη από την επιθυμητή (20 g/L), σύμφωνα με τους Hestrin-Schramm, έτσι πραγματοποιήθηκε αραίωση του υποστρώματος με απιονισμένο νερό και προστέθηκαν σε αυτό εμπορικό εκχύλισμα ζύμης και και πεπτόνη, ώστε η αρχική συγκέντρωση FAN να φτάσει στο επιθυμητό επίπεδο (385 mg/L). Η μελέτη του χυμού αυτού θεωρήθηκε σκόπιμη, διότι σε υπαίθριες λαϊκές αγορές οι ποσότητες ολόκληρων φρούτων που καταλήγουν σε κάδους σκουπιδιών ως απόβλητα είναι μεγάλες.

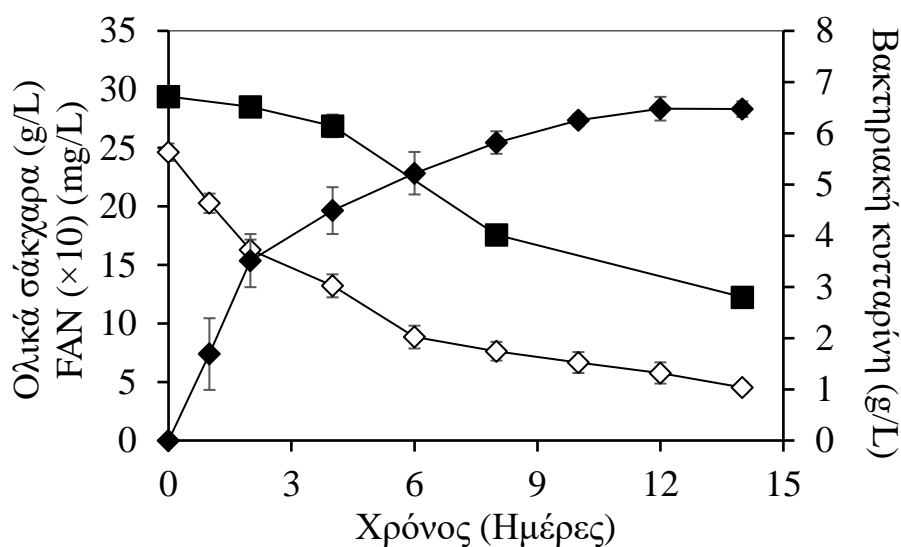


Στο Διάγραμμα 3.1 απεικονίζεται η κατανάλωση της σακχαρόζης, της γλυκόζης και της φρουκτόζης και η παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης (14 ημέρες) του χυμού των αποβλήτων φρούτων με το μικροοργανισμό *K. sucrofermentans*.



**Διάγραμμα 3.1** Κινητική κατανάλωσης σακχάρων, σακχαρόζη (▲), γλυκόζη (◆), φρουκτόζη (■), και παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης (◇) κατά τη διάρκεια ζύμωσης διαλείποντος έργου με το βακτηριακό στέλεχος *K. sucrofermentans* σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε ελεύθερα σάκχαρα αποβλήτων φρούτων.

Στο Διάγραμμα 3.2 απεικονίζεται η κατανάλωση των ολικών σακχάρων, η κατανάλωση του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων πεπτιδίων και αμινοξέων (FAN), καθώς και η παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης (14 ημέρες) του χυμού των αποβλήτων φρούτων με το μικροοργανισμό *K. sucrofermentans*.



**Διάγραμμα 3.2** Κινητική κατανάλωσης ολικών σακχάρων (◇) και FAN (■) και παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης (◆) κατά τη διάρκεια ζύμωσης διαλείποντος έργου με το βακτηριακό στέλεχος *K. sucrofermentans* σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιέχει ελεύθερα σάκχαρα αποβλήτων φρούτων.

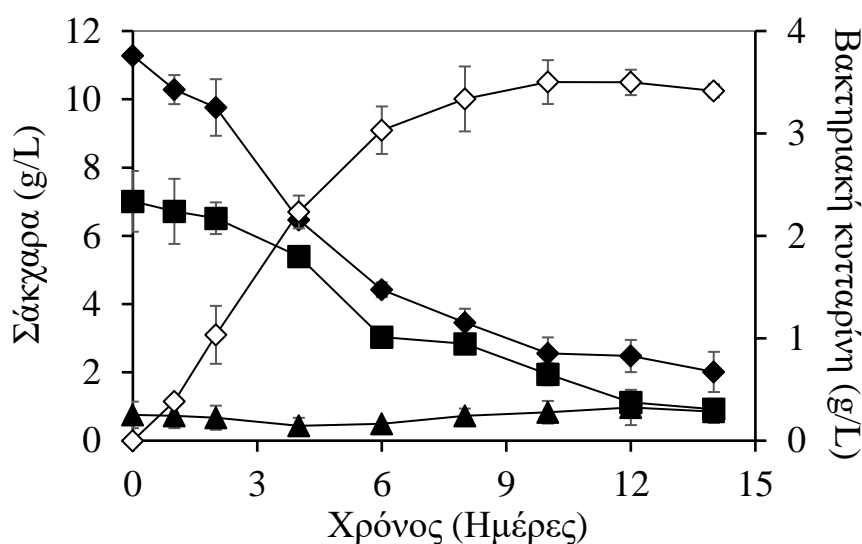
Η μέγιστη συγκέντρωση βακτηριακής κυτταρίνης παρατηρήθηκε την 12<sup>η</sup> ημέρα της ζύμωσης όπου έφτασε στα 6,48 g/L, ενώ τη 14<sup>η</sup> ημέρα η συγκέντρωση της κυτταρίνης παρουσίασε μια ελαφρώς πτωτική τάση, με τη συγκέντρωση σακχάρων να είναι περίπου 5,8 g/L. Σύμφωνα με το αποτέλεσμα αυτό, η 12<sup>η</sup> ημέρα μπορεί να θεωρηθεί η τελευταία μέρα της ζύμωσης. Η παραγωγικότητα τις πρώτες 3 ημέρες έφτασε στα 1,76 g/L/d και τη 14<sup>η</sup> ημέρα στο 0,46 g/L/d, ενώ τη 12<sup>η</sup> ημέρα που μπορεί να θεωρηθεί ως η τελευταία μέρα της ζύμωσης η παραγωγικότητα ήταν στα 0,54 g/L/d. Η απόδοση της ζύμωσης τη 12<sup>η</sup> ημέρα έφτασε στα 0,35 g βακτηριακής κυτταρίνης ανά g καταναλωθέντος υποστρώματος, ενώ τη 14<sup>η</sup> ημέρα ήταν 0,34 g βακτηριακής κυτταρίνης ανά g καταναλωθέντος υποστρώματος. Τα ολικά σάκχαρα καταναλώθηκαν από το βακτηριακό στέλεχος μετά από 14 ημέρες καλλιέργειας σε ποσοστό 76%, ενώ το FAN αφομοιώθηκε κατά 58%. Πιο συγκεκριμένα η σακχαρόζη καταναλώθηκε κατά 30%, η γλυκόζη κατά 82% και η φρουκτόζη κατά 83%. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα αυτού του πειράματος με τη βιβλιογραφία, το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε στην εργασία αυτή ήταν πιο αποδοτικό σε σχέση με αυτό της βιβλιογραφίας, καθώς στη βιβλιογραφία η παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης ανήλθε στα 4,8 g/L (Kurosumi *et al.*, 2009).

### 3.3 Ζύμωση Διαλείποντος Έργου με Υπόστρωμα από Ελεύθερα Σάκχαρα Στεμφύλων

Σε αυτή τη σειρά ζυμώσεων χρησιμοποιήθηκαν στέμφυλα τα οποία προήλθαν μετά τη διαδικασία παραγωγής οίνου. Μελετήθηκε η ικανότητα παραγωγής κυτταρίνης από το

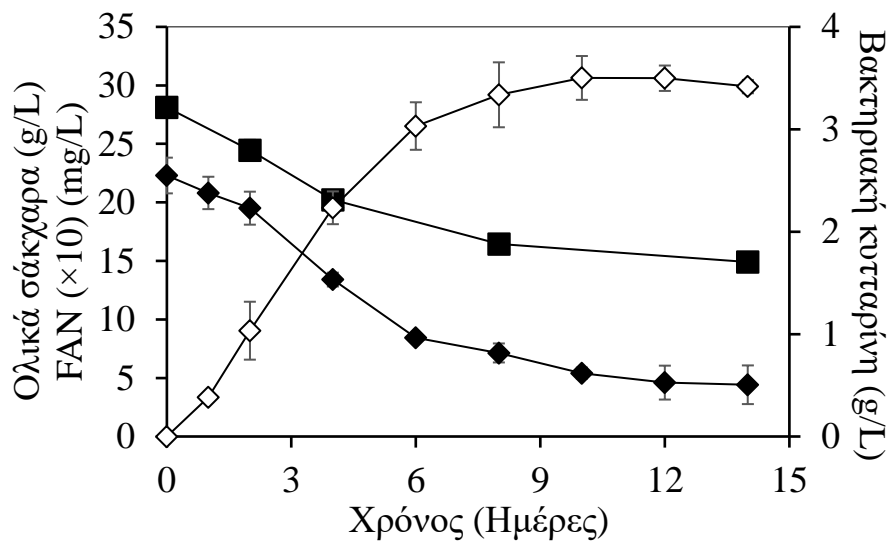
βακτηριακό στέλεχος *K. sucrofermentans* σε υπόστρωμα από ελεύθερα σάκχαρα αποβλήτων σταφυλιών, το οποίο προσαρμόστηκε σύμφωνα με το θρεπτικό μέσο Hestrin-Schramm (HS-γλυκόζη). Η περιεκτικότητα του χυμού σε σάκχαρα ήταν μεγαλύτερη από την επιθυμητή (20 g/L), σύμφωνα με τους Hestrin-Schramm, έτσι πραγματοποιήθηκε αραίωση του υποστρώματος με απιονισμένο νερό και προστέθηκαν σε αυτό εμπορικό εκχύλισμα ζύμης και εμπορική πεπτόνη, ώστε η αρχική συγκέντρωση FAN να φτάσει στο επιθυμητό επίπεδο (385 mg/L).

Στο Διάγραμμα 3.3 απεικονίζεται η κατανάλωση της σακχαρόζης, της γλυκόζης και της φρουκτόζης και η παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης (14 ημέρες) του χυμού των στεμφύλων με το μικροοργανισμό *K. sucrofermentans*.



**Διάγραμμα 3.3** Κινητική κατανάλωσης σακχάρων, σακχαρόζη (▲), γλυκόζη (◆), φρουκτόζη (■), και παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης (◇) κατά τη διάρκεια ζύμωσης διαλείποντος έργου με το στέλεχος *K. sucrofermentans* σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε ελεύθερα σάκχαρα στεμφύλων.

Στο Διάγραμμα 3.4 απεικονίζεται η κατανάλωση των ολικών σακχάρων, η κατανάλωση του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων πεπτιδίων και αμινοξέων (FAN), καθώς και η παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης (14 ημέρες) του χυμού των στεμφύλων με το μικροοργανισμό *K. sucrofermentans*.



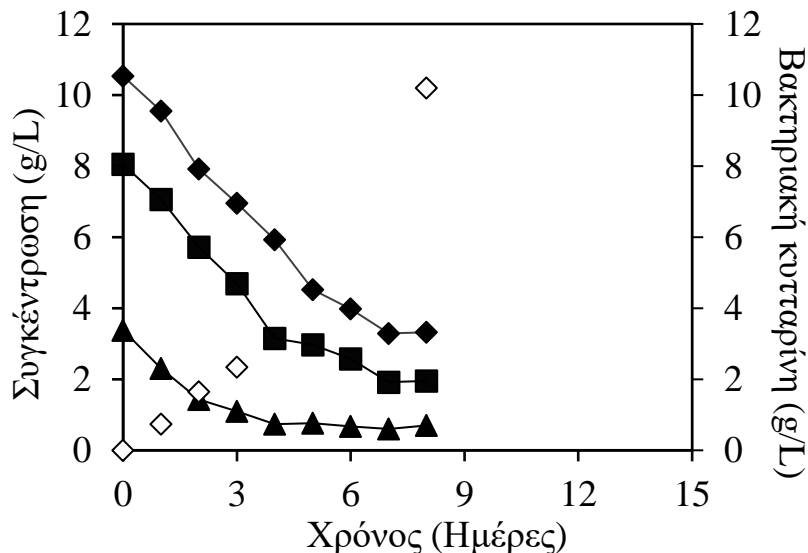
**Διάγραμμα 3.4** Κινητική κατανάλωσης σακχάρων (♦) και FAN (■) και παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης (◇) κατά τη διάρκεια ζύμωσης διαλείποντος έργου με το βακτηριακό στέλεχος *K. sucrofermentans* σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε ελεύθερα σάκχαρα στεμφύλων.

Η μέγιστη συγκέντρωση βακτηριακής κυτταρίνης παρατηρήθηκε την 12<sup>η</sup> ημέρα της ζύμωσης όπου έφτασε στα 3,5 g/L, ενώ τη 14<sup>η</sup> ημέρα η συγκέντρωση παρουσίασε μια ελαφρώς πτωτική τάση, με τη συγκέντρωση σακχάρων να είναι περίπου 4,5 g/L. Σύμφωνα με το αποτέλεσμα αυτό, η 12<sup>η</sup> ημέρα μπορεί να θεωρηθεί η τελευταία μέρα της ζύμωσης. Η παραγωγικότητα τις πρώτες 4 ημέρες έφτασε στα 0,56 g/L/d και τη 14<sup>η</sup> ημέρα στο 0,25 g/L/d, ενώ τη 12<sup>η</sup> ημέρα που μπορεί να θεωρηθεί ως η τελευταία μέρα της ζύμωσης η παραγωγικότητα ήταν 0,29 g/L/d. Η απόδοση της ζύμωσης τη 12<sup>η</sup> ημέρα έφτασε στα 0,22 g βακτηριακής κυτταρίνης ανά g καταναλωθέντος υποστρώματος, ενώ τη 14<sup>η</sup> στα 0,19 g βακτηριακής κυτταρίνης ανά g καταναλωθέντος υποστρώματος. Τα ολικά σάκχαρα καταναλώθηκαν από το βακτηριακό στέλεχος μετά από 14 ημέρες καλλιέργειας σε ποσοστό 80%, ενώ το FAN αφομοιώθηκε κατά 47%. Πιο συγκεκριμένα η σακχαρόζη καταναλώθηκε κατά 11%, η γλυκόζη κατά 82% και η φρουκτόζη κατά 87%. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα αυτού του πειράματος με τη βιβλιογραφία το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε στην εργασία αυτή ήταν πιο αποδοτικό σε σχέση με αυτό της βιβλιογραφίας, καθώς στη βιβλιογραφία η παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης ανήλθε στα 0,63 g/L (Carreira *et al.*, 2011).

### 3.4 Ζύμωση Διαλείποντος Έργου σε Βιοαντιδραστήρα με Υπόστρωμα από Ελεύθερα Σάκχαρα από Αποβλήτα Φρούτων

Σε αυτό το στάδιο της μελέτης πραγματοποιήθηκε ζύμωση διαλείποντος έργου σε βιοαντιδραστήρα, ώστε να αξιολογηθεί η ικανότητα του βακτηριακού στελέχους *K. sucrofermentans* να παράξει βακτηριακή κυτταρίνη. Το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε περιείχε ελεύθερα σάκχαρα αποβλήτων φρούτων και προσαρμόστηκε σύμφωνα με το θρεπτικό μέσο Hestrin-Schramm (HS-γλυκόζη). Η περιεκτικότητα του χυμού σε σάκχαρα ήταν πολύ μεγαλύτερη από την επιθυμητή (20 g/L), σύμφωνα με τους Hestrin-Schramm, έτσι πραγματοποιήθηκε αραίωση του υποστρώματος με απιονισμένο νερό και προστέθηκαν σε αυτό εμπορικό εκχύλισμα ζύμης και εμπορική πεπτόνη, ώστε η αρχική συγκέντρωση FAN να φτάσει στο επιθυμητό επίπεδο (385 mg/L). Η ζύμωση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 30 °C, το pH ρυθμίστηκε στο 6, η παροχή αέρα ήταν 1 vvm, η ταχύτητα ανάδευσης 300 rpm και ο ενεργός όγκος 1.5 L.

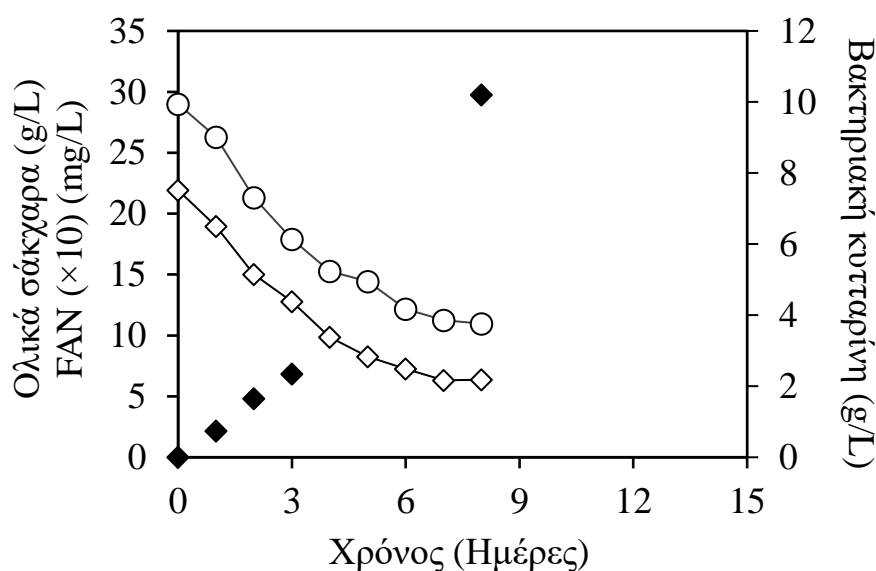
Στο Διάγραμμα 3.5 απεικονίζεται η κατανάλωση της σακχαρόζης, της γλυκόζης και της φρουκτόζης και η παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης (8 ημέρες) του χυμού των αποβλήτων σταφυλιών με το μικροοργανισμό *K. sucrofermentans*.



**Διάγραμμα 3.5** Κινητική κατανάλωσης σακχάρων, σακχαρόζη (▲), γλυκόζη (■), φρουκτόζη (◆), και παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης (◇) κατά τη διάρκεια ζύμωσης διαλείποντος έργου σε βιοαντιδραστήρα με το στέλεχος *K. sucrofermentans* σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε ελεύθερα σάκχαρα αποβλήτων φρούτων.

Στο Διάγραμμα 3.6 απεικονίζεται η κατανάλωση των ολικών σακχάρων, η κατανάλωση του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων πεπτιδίων και αμινοξέων (FAN), καθώς

και η παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης (8 ημέρες) του χυμού των αποβλήτων φρούτων με το μικροοργανισμό *K. sucrofermentans* σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου.



**Διάγραμμα 3.6** Κινητική κατανάλωσης σακχάρων (◇) και FAN (○) και παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης (◆) κατά τη διάρκεια ζύμωσης διαλείποντος έργου σε βιοαντιδραστήρα με το στέλεχος *K. sucrofermentans* σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε ελεύθερα σάκχαρα αποβλήτων φρούτων.

Η ζύμωση διήρκησε 8 ημέρες και η μέγιστη συγκέντρωση βακτηριακής κυτταρίνης ήταν 10,2 g/L την 8<sup>η</sup> ημέρα. Η παραγωγικότητα έφτασε στα 1,27 g/L/d, ενώ η απόδοση της ζύμωσης έφτασε στα 0,62 g βακτηριακής κυτταρίνης ανά g καταναλωθέντος υποστρώματος. Τα ολικά σάκχαρα καταναλώθηκαν από το βακτηριακό στέλεχος μετά από 8 ημέρες σε ποσοστό 75%, ενώ το FAN αφομοιώθηκε κατά 62%. Πιο συγκεκριμένα, η σακχαρόζη κατά 79%, η γλυκόζη καταναλώθηκε κατά 76% και η φρουκτόζη κατά 68%. Με βάση τη βιβλιογραφία αντίστοιχη ζύμωση που πραγματοποιήθηκε σε βιοαντιδραστήρα 5 L έδωσε 6,71 g/L βακτηριακή κυτταρίνη με χρόνο ζύμωσης 5 ημέρες και η παραγωγικότητα έφτασε στα 1,34 g/L/d (Hungund *et al.*, 2010). Άλλη μελέτη έδειξε τη παραγωγή 0,59 g/L βακτηριακής κυτταρίνης και παραγωγικότητα 0,01 g/L/h με ταχύτητα ανάδευσης 500 rpm και παραγωγή 1,13 g/L βακτηριακής κυτταρίνης και παραγωγικότητα 0,02 g/L/h με ταχύτητα ανάδευσης 700 rpm (Blanco Parte *et al.*, 2019).

### 3.5 Προσδιορισμός Πηκτινών από Αποβλήτα Φλοιών Πορτοκαλιού

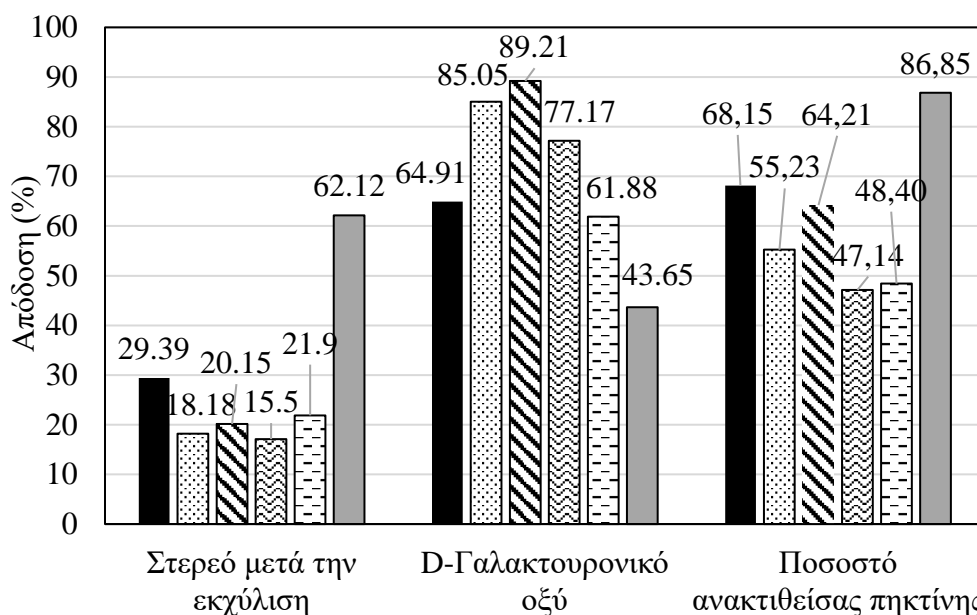
Για το προσδιορισμό των πηκτινών στους φλοιούς των αποβλήτων πορτοκαλιού πραγματοποιήθηκαν πειράματα με διάφορα μέσα οξίνισης για τη μείωση του pH, ώστε να διαπιστωθεί με ποιο οξύ επιτυγχάνεται η βέλτιστη περιεκτικότητα σε πηκτίνη αλλά και σε D-γαλακτουρονικό οξύ που περιέχεται σε αυτή. Εκτός από τα διαφορετικά οξέα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη διαδικασία, το εκχύλισμα της πηκτίνης που προήλθε από το HCl τοποθετήθηκε σε εξαμιστήρα, ώστε ο όγκος της ποσότητας να μειωθεί στη μία περίπτωση στο 1/2 και στην άλλη περίπτωση στο 1/4 για να προσδιοριστεί η απόδοση της πηκτίνης και να μετρηθεί η ποσότητα του D-γαλακτουρονικού οξέος και στις δύο περιπτώσεις.

Στον Πίνακα 3.3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μέθοδο προσδιορισμού της πηκτίνης με χρήση διαφορετικών οξέων στους φλοιούς του πορτοκαλιού και αφορούν στο ποσοστό του στερεού μετά την εκχύλιση της πηκτίνης (%), στο D-γαλακτουρονικό οξύ που περιέχεται σε αυτή, καθώς και στο ποσοστό ανακτηθείσας πηκτίνης.

**Πίνακας 3.3** Ποσοστό εκχυλισμένου στερεού (%) με χρήση διαφορετικών οξέων από φλοιούς των αποβλήτων του πορτοκαλιού, ποσότητα D-γαλακτουρονικού οξέος (g/100 g ξηρό βάρος) που περιέχεται στο εκχυλισμένο στερεό και ποσοστό ανακτηθείσας πηκτίνης.

Οξύ	Εκχυλισμένο στερεό πλούσιο σε πηκτίνη (%)	D-Γαλακτουρονικό οξύ (g/100 g ξηρού στερεού)	Ποσοστό ανακτηθείσας πηκτίνης (%)
Κιτρικό οξύ	29,39	64,91	68,15
HNO <sub>3</sub>	18,18	85,05	55,23
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20,15	89,21	64,21
HCl	15,50	77,17	47,14
HCl (1/2)	21,9	61,88	48,40
HCl (1/4)	62,12	43,65	86,85

Στο Διάγραμμα 3.7 απεικονίζεται το ποσοστό του εκχυλισμένου στερεού πλούσιου σε πηκτίνη με χρήση διαφορετικών οξέων από φλοιούς των αποβλήτων του πορτοκαλιού, η ποσότητα του D-γαλακτουρονικού οξέος που περιέχεται στο εκχυλισμένο στερεό, καθώς και το ποσοστό της ανακτηθείσας πηκτίνης.



**Διάγραμμα 3.7** Ποσοστό εκχυλισμένου στερεού (%) με χρήση διαφορετικών οξέων (κιτρικό οξύ (■), HNO<sub>3</sub> (▤), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (▨), HCl (▩), HCl (1/2) (▭), HCl (1/4) (▮)) από φλοιούς αποβλήτων πορτοκαλιού, περιεκτικότητα D-γαλακτουρονικού οξέος στο εκχυλισμένο στερεό (%) και ποσοστό ανακτηθείσας πηκτίνης (%).

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία βρέθηκε ότι η πηκτίνη σε φλοιούς κίτρου που ανακτήθηκε με τη χρήση κιτρικού οξέος κυμάνθηκε μεταξύ 5,20% έως 23,59% (Rodsarman *et al.*, 2018). Σε άλλη μελέτη βρέθηκε πως η ανάκτηση της πηκτίνης σε φλοιούς πορτοκαλιού με χρήση θειϊκού οξέος είναι 23,6% και με κιτρικό οξύ 22,69%, ενώ σε φλοιούς γκρέιπφρουτ ήταν 25,53% και 24,54% (Sayah *et al.*, 2016). Σύμφωνα με τους Senit *et al.* (2019) υπολογίστηκε ότι το ποσοστό της πηκτίνης σε απόβλητα φλοιών πορτοκαλιού με χρήση HCl είναι 19,62%, ενώ με βάση τους Rose *et al.* (2016) το ποσοστό της πηκτίνης σε φλοιούς λεμονιού με χρήση νιτρικού οξέος κυμαίνεται από 13,8% έως 44,2%.

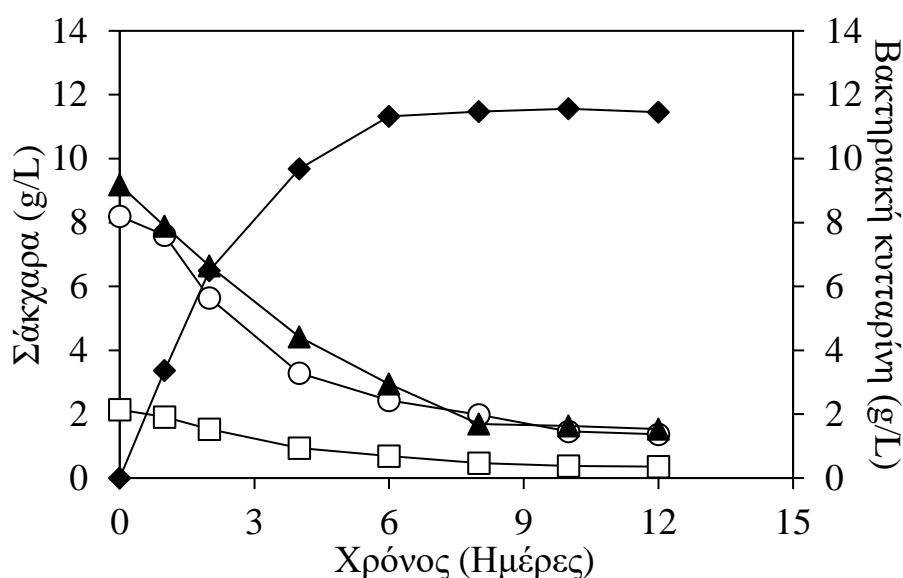
### 3.6 Ζύμωση Διαλείποντος Έργου με Υπόστρωμα από Ελεύθερα Σάκχαρα Αποβλήτων Φλοιών Πορτοκαλιού σε Πλαστικά Δοχεία

Σε αυτό το στάδιο πραγματοποιήθηκαν πειράματα για παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης με χρήση ελεύθερων σακχάρων που προέρχονται από απόβλητα φλοιών πορτοκαλιού σε πλαστικά δοχεία παρουσία και απουσία αερισμού για βελτιστοποίηση της παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης από το βακτηριακό στέλεχος *K. sucrofermentans*. Το υπόστρωμα προσαρμόστηκε σύμφωνα με το θρεπτικό μέσο Hestrin-Schramm (HS-γλυκόζη). Η περιεκτικότητά του σε σάκχαρα ήταν μεγαλύτερη από την επιθυμητή (20 g/L), σύμφωνα με τους Hestrin-Schramm και γι' αυτό το λόγο πραγματοποιήθηκε αραίωση του υποστρώματος



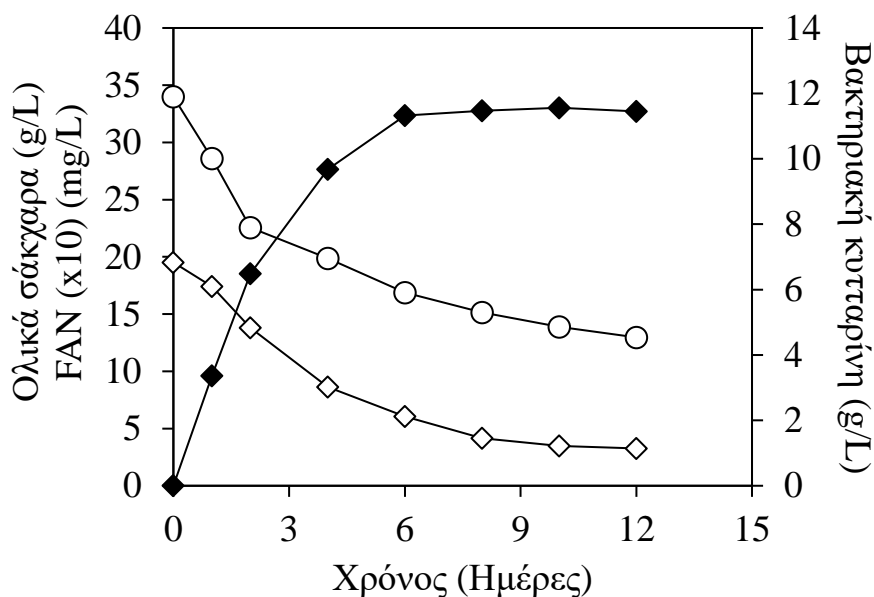
με απιονισμένο νερό και προστέθηκαν σε αυτό εμπορικό εκχύλισμα ζύμης και εμπορική πεπτόνη, ώστε η αρχική συγκέντρωση FAN να φτάσει στο επιθυμητό επίπεδο (385 mg/L). Η ζύμωση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 30 °C, το pH ρυθμίστηκε στο 6, η παροχή αέρα ήταν 0,5 vvm (στα πλαστικά δοχεία με αερισμό) και ο ενεργός όγκος 300 mL.

Στο Διάγραμμα 3.8 απεικονίζεται η κατανάλωση της σακχαρόζης, της γλυκόζης και της φρουκτόζης και η παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης σε πλαστικά δοχεία παρουσία αερισμού καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης (12 ημέρες) του χυμού των αποβλήτων φλοιών πορτοκαλιού με το μικροοργανισμό *K. sucrofermentans*.



**Διάγραμμα 3.8** Κινητική κατανάλωσης σακχάρων, σακχαρόζη (□), γλυκόζη (○), φρουκτόζη (▲), και παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης (◆) κατά τη διάρκεια ζύμωσης διαλείποντος έργου σε πλαστικά δοχεία παρουσία αερισμού με το βακτηριακό στέλεχος *K. sucrofermentans* σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιέχει ελεύθερα σάκχαρα αποβλήτων φλοιών πορτοκαλιού.

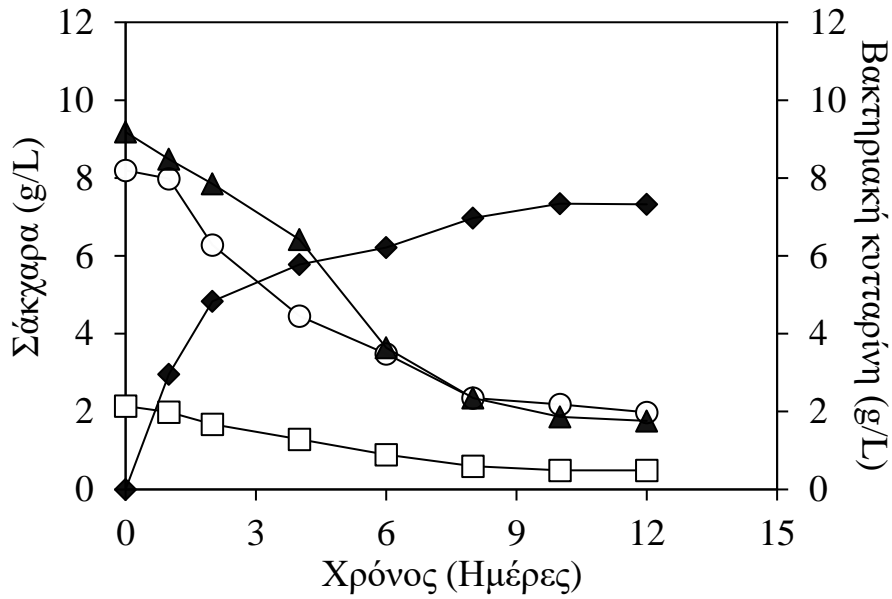
Στο Διάγραμμα 3.9 απεικονίζεται η κατανάλωση των ολικών σακχάρων, η κατανάλωση του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων αμινοξέων και πεπτιδίων (FAN), καθώς και η παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης σε πλαστικά δοχεία παρουσία αερισμού, καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης (12 ημέρες) του υδrolύματος των αποβλήτων φλοιών πορτοκαλιού με το μικροοργανισμό *K. sucrofermentans*.



**Διάγραμμα 3.9** Κινητική κατανάλωσης σακχάρων (◇) και FAN (○) και παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης (◆) κατά τη διάρκεια ζύμωσης διαλείποντος έργου σε πλαστικά δοχεία παρουσία αερισμού με το βακτηριακό στέλεχος *K. sucrofermentans* σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιέχει ελεύθερα σάκχαρα αποβλήτων φλοιών πορτοκαλιού.

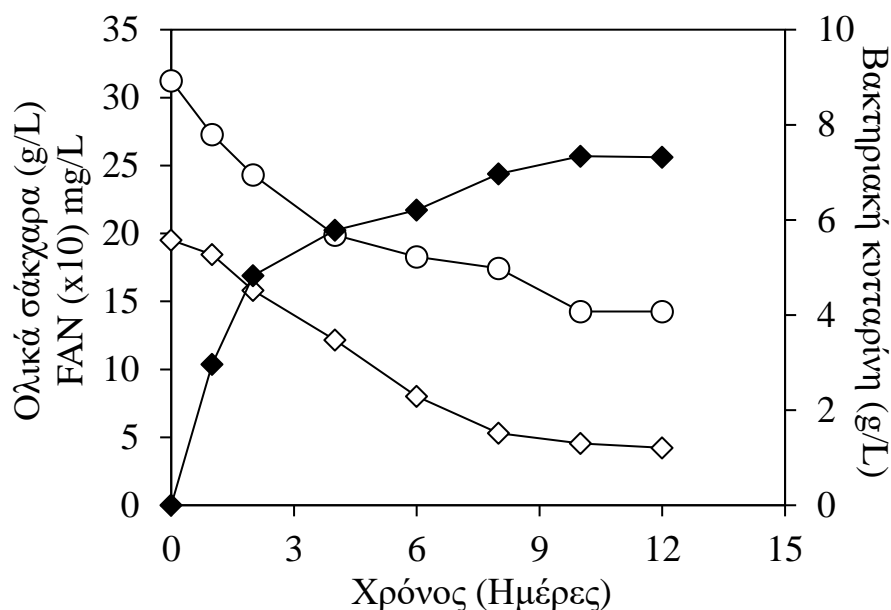
Η μέγιστη συγκέντρωση βακτηριακής κυτταρίνης παρατηρήθηκε τη 10<sup>η</sup> ημέρα της ζύμωσης όπου έφτασε στα 11,56 g/L, ενώ τη 12<sup>η</sup> ημέρα η συγκέντρωση παρουσίασε μια ελαφρώς πτωτική τάση, με τη συγκέντρωση των σακχάρων να είναι περίπου 3,4 g/L. Σύμφωνα με το αποτέλεσμα αυτό, η 10<sup>η</sup> ημέρα μπορεί να θεωρηθεί η τελευταία μέρα της ζύμωσης. Η παραγωγικότητα τις πρώτες 2 ημέρες έφτασε στα 3,25 g/L/d και τη 12<sup>η</sup> ημέρα στο 0,95 g/L/d, ενώ τη 10<sup>η</sup> ημέρα που μπορεί να θεωρηθεί ως η τελευταία μέρα της ζύμωσης η παραγωγικότητα ήταν στα 1,43 g/L/d. Η απόδοση της ζύμωσης τη 10<sup>η</sup> ημέρα έφτασε στα 0,72 g βακτηριακής κυτταρίνης ανά g καταναλωθέντος υποστρώματος, ενώ τη 12<sup>η</sup> στα 0,70 g βακτηριακής κυτταρίνης ανά g καταναλωθέντος υποστρώματος. Τα ολικά σάκχαρα καταναλώθηκαν από το βακτηριακό στέλεχος μετά από 12 ημέρες καλλιέργειας σε ποσοστό 83%, ενώ το FAN αφομοιώθηκε κατά 61%. Πιο συγκεκριμένα, η σακχαρόζη καταναλώθηκε κατά 83%, η γλυκόζη κατά 83% και η φρουκτόζη κατά 75%.

Στο Διάγραμμα 3.10 απεικονίζεται η κατανάλωση της σακχαρόζης, της γλυκόζης και της φρουκτόζης και η παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης σε πλαστικά δοχεία απουσία αερισμού, καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης (14 ημέρες) του χυμού των αποβλήτων φλοιών πορτοκαλιού με το μικροοργανισμό *K. sucrofermentans*.



**Διάγραμμα 3.10** Κινητική κατανάλωσης σακχάρων, σακχαρόζη (□), γλυκόζη (○), φρουκτόζη (▲), και παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης (◆) κατά τη διάρκεια ζύμωσης διαλείποντος έργου σε πλαστικά δοχεία απουσία αερισμού με το βακτηριακό στέλεχος *K. sucrofermentans* σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιέχει ελεύθερα σάκχαρα αποβλήτων φλοιών πορτοκαλιού.

Στο Διάγραμμα 3.11 απεικονίζεται η κατανάλωση των ολικών σακχάρων, η κατανάλωση του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων αμινοξέων και πεπτιδίων (FAN), καθώς και η παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης σε πλαστικά δοχεία απουσία αερισμού, καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης (14 ημέρες) του χυμού των αποβλήτων φλοιών πορτοκαλιού με το μικροοργανισμό *K. sucrofermentans*.



**Διάγραμμα 3.11** Κινητική κατανάλωσης σακχάρων ( $\square$ ), κατανάλωσης FAN ( $\circ$ ) και παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης ( $\blacklozenge$ ) κατά τη διάρκεια ζύμωσης διαλείποντος έργου σε πλαστικά δοχεία απουσία αερισμού με το βακτηριακό στέλεχος *K. sucrofermentans* σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιέχει ελεύθερα σάκχαρα αποβλήτων φλοιών πορτοκαλιού.

Η μέγιστη συγκέντρωση βακτηριακής κυτταρίνης παρατηρήθηκε την 12<sup>η</sup> ημέρα της ζύμωσης όπου έφτασε στα 7,34 g/L με τη συγκέντρωση σακχάρων να είναι περίπου 4,2 g/L. Σύμφωνα με το αποτέλεσμα αυτό, η 12<sup>η</sup> ημέρα μπορεί να θεωρηθεί η τελευταία μέρα της ζύμωσης. Η παραγωγικότητα τις πρώτες 3 ημέρες έφτασε στα 2,41 g/L/d και την 14<sup>η</sup> ημέρα στα 0,52 g/L/d, ενώ τη 12<sup>η</sup> ημέρα που μπορεί να θεωρηθεί ως η τελευταία μέρα της ζύμωσης η παραγωγικότητα ήταν στα 0,73 g/L/d. Η απόδοση της ζύμωσης τη 12<sup>η</sup> ημέρα έφτασε στα 0,49 g βακτηριακής κυτταρίνης ανά g καταναλωθέντος υποστρώματος, ενώ τη 14<sup>η</sup> στα 0,46 g βακτηριακής κυτταρίνης ανά g καταναλωθέντος υποστρώματος. Τα ολικά σάκχαρα καταναλώθηκαν από το βακτηριακό στέλεχος μετά από 14 ημέρες καλλιέργειας σε ποσοστό 82%, ενώ το FAN αφομοιώθηκε κατά 52%. Πιο συγκεκριμένα, η σακχαρόζη καταναλώθηκε κατά 80%, η γλυκόζη κατά 81% και η φρουκτόζη κατά 82%.

### 3.7 Υδρολύσεις

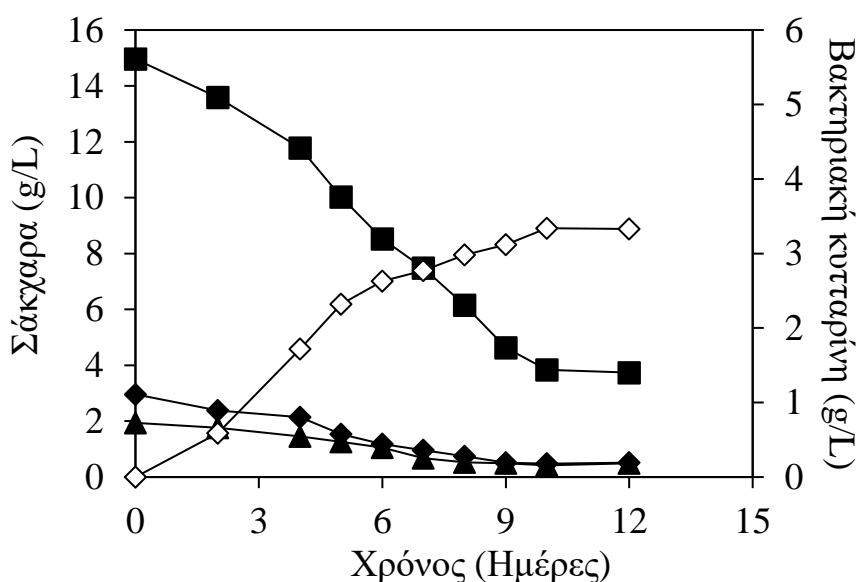
Μετά τη διαδικασία εκχύλισης των πηκτινών από τα απόβλητα φλοιών πορτοκαλιού, ακολούθησε χημική υδρόλυση με 0,5%  $H_2SO_4$  και στη συνέχεια ενζυμική υδρόλυση με χρήση κατάλληλων εμπορικών ενζύμων. Με βάση την ανάλυση της HPLC, υδρολύθηκε το 14% της ημικυτταρίνης μέσω της χημικής και το 76% της κυτταρίνης μέσω της ενζυμικής υδρόλυσης. Πιο συγκεκριμένα, το υδρόλυμα περιείχε 18,71 g/L γλυκόζη, 1,28 g/L ξυλόζη και 0,54 g/L αραβινόζη. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία πραγματοποιήθηκε χημική υδρόλυση σε φλοιούς πορτοκαλιού με 0,06% και 0,5% θειϊκό οξύ για 20 min στους 120 °C και η απόδοση έφτασε

στο 9% (Grohmann *et al.*, 1995). Σύμφωνα με τους Kuo *et al.* (2017) η ενζυμική υδρόλυση των φλοιών πορτοκαλιού έλαβε χώρα με χρήση εμπορικών κυτταρινασών 1500 U/g και πηκτινολυτικών ενζύμων 60 U/g με τη συγκέντρωση των σακχάρων να φτάνει στα 79,24 g/L με διάρκεια αντίδρασης 4 h.

### 3.8 Ζύμωση Διαλείποντος Έργου με Υπόστρωμα από Υδρόλυμα Αποβλήτων Φλοιών Πορτοκαλιού

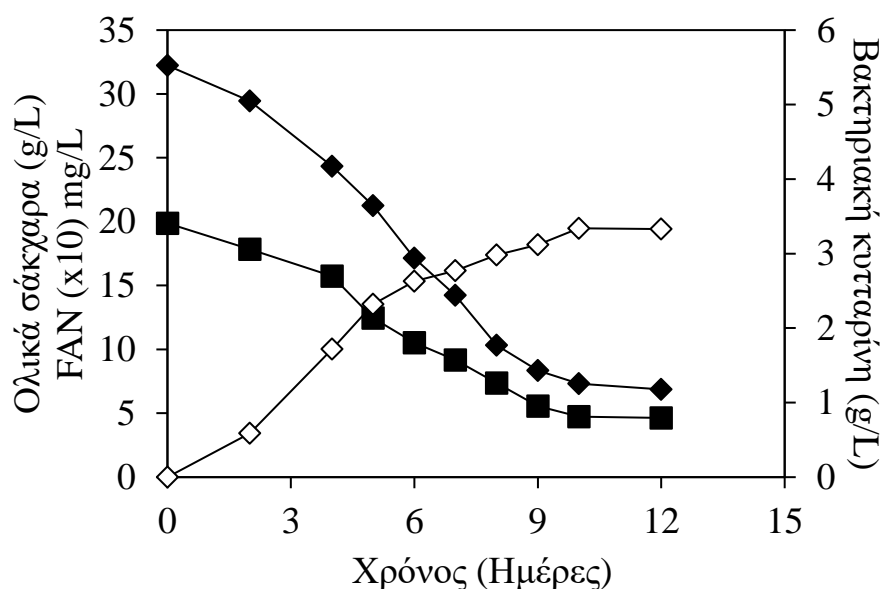
Σε αυτή τη ζύμωση χρησιμοποιήθηκε το υδρόλυμα που προήλθε από την ενζυμική υδρόλυση αποβλήτων φλοιών πορτοκαλιού και μελετήθηκε η ικανότητα παραγωγής κυτταρίνης από το βακτηριακό στέλεχος *K. sacrofermentans*. Το υπόστρωμα προσαρμόστηκε σύμφωνα με το θρεπτικό μέσο Hestrin-Schramm (HS-γλυκόζη). Η περιεκτικότητά του σε σάκχαρα ήταν μεγαλύτερη από την επιθυμητή (20 g/L), σύμφωνα με τους Hestrin-Schramm και γι' αυτό πραγματοποιήθηκε αραίωση του υποστρώματος με απιονισμένο νερό και προστέθηκαν σε αυτό εμπορικό εκχύλισμα ζύμης και εμπορική πεπτόνη, ώστε η αρχική συγκέντρωση FAN να φτάσει στο επιθυμητό επίπεδο (385 mg/L).

Στο Διάγραμμα 3.12 απεικονίζεται η κατανάλωση της γλυκόζης, της ξυλόζης, της αραβινόζης και η παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης (12 ημέρες) του υδρολύματος των αποβλήτων φλοιών πορτοκαλιού με το μικροοργανισμό *K. sacrofermentans*.



**Διάγραμμα 3.12** Κινητική κατανάλωσης σακχάρων, γλυκόζη (■), ξυλόζη (◆), αραβινόζη (▲), και παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης (◇) κατά τη διάρκεια ζύμωσης διαλείποντος έργου με το με το βακτηριακό στέλεχος *K. sacrofermentans* σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιέχει υδρόλυμα αποβλήτων φλοιών πορτοκαλιού.

Στο Διάγραμμα 3.13 απεικονίζεται η κατανάλωση των ολικών σακχάρων, η κατανάλωση του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων αμινοξέων και πεπτιδίων (FAN), καθώς και η παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης (12 ημέρες) του υδρολύματος των αποβλήτων φλοιών πορτοκαλιού με το μικροοργανισμό *K. sacrofermentans*.



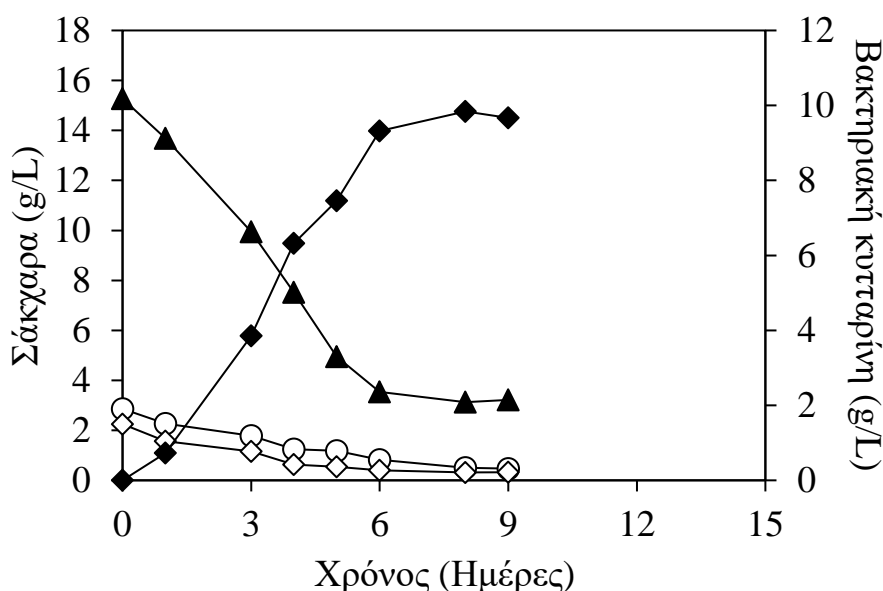
**Διάγραμμα 3.13** Κινητική κατανάλωσης σακχάρων (■) και FAN (◆) και παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης (◇) κατά τη διάρκεια ζύμωσης διαλείποντος έργου με το με το βακτηριακό στέλεχος *K. sacrofermentans* σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιέχει υδρόλυμα αποβλήτων φλοιών πορτοκαλιού.

Η μέγιστη συγκέντρωση βακτηριακής κυτταρίνης παρατηρήθηκε τη 10<sup>η</sup> ημέρα της ζύμωσης όπου έφτασε στα 3,34 g/L με τη συγκέντρωση σακχάρων να είναι 4,7 g/L. Σύμφωνα με το αποτέλεσμα αυτό, η 10<sup>η</sup> ημέρα μπορεί να θεωρηθεί η τελευταία μέρα της ζύμωσης. Η παραγωγικότητα τις πρώτες 5 ημέρες έφτασε στα 0,46 g/L/d και τη 12<sup>η</sup> ημέρα στο 0,27 g/L/d, ενώ τη 10<sup>η</sup> ημέρα που μπορεί να θεωρηθεί ως η τελευταία μέρα της ζύμωσης η παραγωγικότητα ήταν στα 0,33 g/L/d. Η απόδοση της ζύμωσης τη 10<sup>η</sup> ημέρα έφτασε στα 0,22 g βακτηριακής κυτταρίνης ανά g καταναλωθέντος υποστρώματος, ενώ τη 12<sup>η</sup> στα 0,21 g βακτηριακής κυτταρίνης ανά g καταναλωθέντος υποστρώματος. Τα ολικά σακχάρων καταναλώθηκαν από το βακτηριακό στέλεχος μετά από 12 ημέρες καλλιέργειας σε ποσοστό 77%, ενώ το FAN αφομοιώθηκε κατά 79%. Πιο συγκεκριμένα, η γλυκόζη καταναλώθηκε κατά 75%, η ξυλόζη κατά 83% και η αραβινόζη κατά 75%. Στη μελέτη των Kuo *et al.* (2017) πραγματοποιήθηκε ζύμωση με χρήση του υδρολύματος που προέκυψε από την ενζυμική υδρόλυση και το υπόστρωμα προσαρμόστηκε σύμφωνα με το θρεπτικό μέσο Hestrin-Schramm (HS-γλυκόζη). Η ζύμωση διήρκεσε 8 ημέρες και η παραγόμενη βακτηριακή κυτταρίνη έφτασε στα 0,83 g/L, ενώ η παραγωγικότητα έφτασε στα 0,10 g/L/d.

### 3.9 Ζύμωση Διαλείποντος Έργου με Υπόστρωμα από Υδρόλυμα Αποβλήτων Φλοιών Πορτοκαλιού σε Πλαστικά Δοχεία

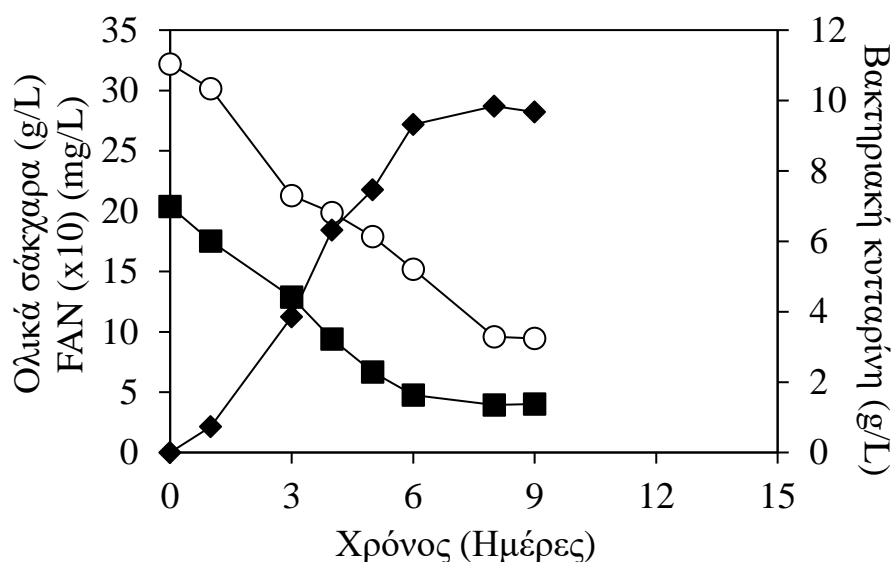
Σε αυτή τη ζύμωση χρησιμοποιήθηκε το υδρόλυμα που προήλθε από την ενζυμική υδρόλυση αποβλήτων φλοιών πορτοκαλιού σε πλαστικά δοχεία παρουσία και απουσία αερισμού για βελτιστοποίηση της παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης από το βακτηριακό στέλεχος *K. sucrofermentans*. Το υπόστρωμα προσαρμόστηκε σύμφωνα με το θρεπτικό μέσο Hestrin-Schramm (HS-γλυκόζη). Η περιεκτικότητά του σε σάκχαρα ήταν μεγαλύτερη από την επιθυμητή (20 g/L), σύμφωνα με τους Hestrin-Schramm και γι' αυτό πραγματοποιήθηκε αραίωση του υποστρώματος με απιονισμένο νερό και προστέθηκαν σε αυτό εμπορικό εκχύλισμα ζύμης και εμπορική πεπτόνη, ώστε η αρχική συγκέντρωση FAN να φτάσει στο επιθυμητό επίπεδο (385 mg/L). Η ζύμωση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 30 °C, το pH ρυθμίστηκε στο 6, η παροχή αέρα ήταν 0,5 vvm (στα πλαστικά δοχεία με αερισμό) και ο ενεργός όγκος 300 mL.

Στο Διάγραμμα 3.14 απεικονίζεται η κατανάλωση της γλυκόζης, της ξυλόζης, της αραβινόζης και η παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης σε πλαστικά δοχεία παρουσία αερισμού καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης (9 ημέρες) του υδρολύματος των αποβλήτων φλοιών πορτοκαλιού με το μικροοργανισμό *K. sucrofermentans*.



**Διάγραμμα 3.14** Κινητική κατανάλωσης σακχάρων, γλυκόζη (▲), ξυλόζη (○), αραβινόζη (◇), και παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης (◆) κατά τη διάρκεια ζύμωσης διαλείποντος έργου σε πλαστικά δοχεία παρουσία αερισμού με το βακτηριακό στέλεχος *K. sucrofermentans* σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιέχει υδρόλυμα αποβλήτων φλοιών πορτοκαλιού.

Στο Διάγραμμα 3.15 απεικονίζεται η κατανάλωση των ολικών σακχάρων, η κατανάλωση του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων αμινοξέων και πεπτιδίων (FAN), καθώς και η παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης σε πλαστικά δοχεία παρουσία αερισμού, καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης (9 ημέρες) του υδρολύματος των αποβλήτων φλοιών πορτοκαλιού με το μικροοργανισμό *K. sucrofermentans*.

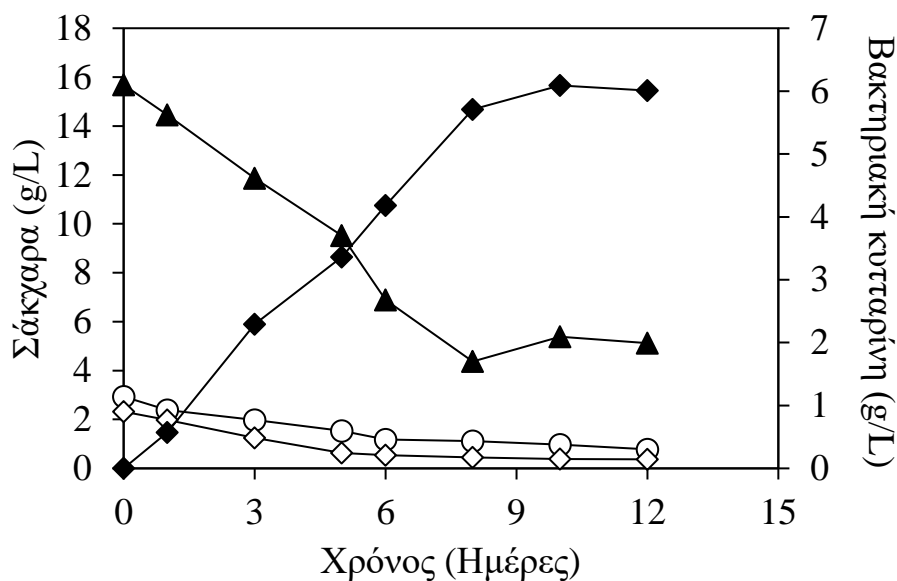


**Διάγραμμα 3.15** Κινητική κατανάλωσης σακχάρων (■) και FAN (○) και παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης (◆) κατά τη διάρκεια ζύμωσης διαλείποντος έργου σε πλαστικά δοχεία παρουσία αερισμού με το βακτηριακό στέλεχος *K. sucrofermentans* σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιέχει υδρόλυμα αποβλήτων φλοιών πορτοκαλιού.

Η μέγιστη συγκέντρωση βακτηριακής κυτταρίνης παρατηρήθηκε την 8<sup>η</sup> ημέρα της ζύμωσης όπου έφτασε στα 9,84 g/L με τη συγκέντρωση των σακχάρων να είναι 3,9 g/L. Σύμφωνα με το αποτέλεσμα αυτό, η 8<sup>η</sup> ημέρα μπορεί να θεωρηθεί η τελευταία μέρα της ζύμωσης. Η παραγωγικότητα τις πρώτες 4 ημέρες έφτασε στα 1,58 g/L/d και την 9<sup>η</sup> ημέρα στα 1,07 g/L/d, ενώ τη 8<sup>η</sup> ημέρα που μπορεί να θεωρηθεί ως η τελευταία μέρα της ζύμωσης η παραγωγικότητα ήταν στα 1,23 g/L/d. Η απόδοση της ζύμωσης την 8<sup>η</sup> ημέρα έφτασε στα 0,59 g βακτηριακής κυτταρίνης ανά g καταναλωθέντος υποστρώματος. Τα ολικά σάκχαρα καταναλώθηκαν από το βακτηριακό στέλεχος μετά από 9 ημέρες καλλιέργειας σε ποσοστό 80%, ενώ το FAN αφομοιώθηκε κατά 70%. Πιο συγκεκριμένα, η γλυκόζη καταναλώθηκε κατά 79%, η ξυλόζη κατά 84% και η αραβινόζη κατά 85%.

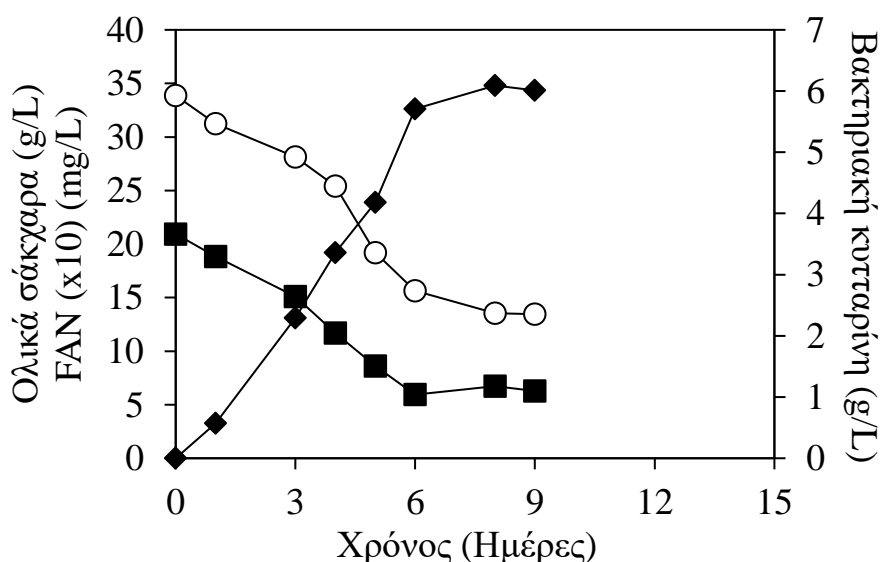
Στο Διάγραμμα 3.16 απεικονίζεται η κατανάλωση της γλυκόζης, της ξυλόζης, της αραβινόζης και η παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης σε πλαστικά δοχεία απουσία αερισμού, καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης (12 ημέρες) του υδρολύματος των αποβλήτων φλοιών πορτοκαλιού με το μικροοργανισμό *K. sucrofermentans*.





**Διάγραμμα 3.16** Κινητική κατανάλωσης σακχάρων, γλυκόζη (▲), ξυλόζη (○), αραβινόζη (◇), και παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης (◆) κατά τη διάρκεια ζύμωσης διαλείποντος έργου σε πλαστικά δοχεία απουσία αερισμού με το βακτηριακό στέλεχος *K. sucrofermentans* σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιέχει υδρόλυμα αποβλήτων φλοιών πορτοκαλιού.

Στο Διάγραμμα 3.17 απεικονίζεται η κατανάλωση των ολικών σακχάρων, η κατανάλωση του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων πεπτιδίων και αμινοξέων (FAN), καθώς και η παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης σε πλαστικά δοχεία απουσία αερισμού, καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης (9 ημέρες) του υδρόλυματος των αποβλήτων φλοιών πορτοκαλιού με το μικροοργανισμό *K. sucrofermentans*.



**Διάγραμμα 3.17** Κινητική κατανάλωσης σακχάρων (■) και FAN (○) και παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης (◆) κατά τη διάρκεια ζύμωσης διαλείποντος έργου σε πλαστικά δοχεία απουσία αερισμού με το βακτηριακό στέλεχος *K. sucrofermentans* σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιέχει υδρόλυμα αποβλήτων φλοιών πορτοκαλιού.

Η μέγιστη συγκέντρωση βακτηριακής κυτταρίνης παρατηρήθηκε την 10<sup>η</sup> ημέρα της ζύμωσης όπου έφτασε στα 6,09 g/L με τη συγκέντρωση των σακχάρων να είναι 6,74 g/L. Σύμφωνα με το αποτέλεσμα αυτό, η 10<sup>η</sup> ημέρα μπορεί να θεωρηθεί η τελευταία μέρα της ζύμωσης. Η παραγωγικότητα τις πρώτες 3 ημέρες έφτασε στα 0,76 g/L/d και την 12<sup>η</sup> ημέρα στα 0,5 g/L/d, ενώ τη 10<sup>η</sup> ημέρα που μπορεί να θεωρηθεί ως η τελευταία μέρα της ζύμωσης η παραγωγικότητα ήταν στα 0,6 g/L/d. Η απόδοση της ζύμωσης τη 10<sup>η</sup> ημέρα έφτασε στα 0,43 g βακτηριακής κυτταρίνης ανά g καταναλωθέντος υποστρώματος, ενώ τη 12<sup>η</sup> στα 0,4 g βακτηριακής κυτταρίνης ανά g καταναλωθέντος υποστρώματος. Τα ολικά σάκχαρα καταναλώθηκαν από το βακτηριακό στέλεχος μετά από 12 ημέρες καλλιέργειας σε ποσοστό 70%, ενώ το FAN αφομοιώθηκε κατά 60%. Πιο συγκεκριμένα, η γλυκόζη καταναλώθηκε κατά 67%, η ξυλόζη κατά 73% και η αραβινόζη κατά 84%.

### 3.10 Βαθμός Πολυμερισμού

Στο Πίνακα 3.4 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του βαθμού πολυμερισμού που πραγματοποιήθηκαν στα εξής δείγματα βακτηριακής κυτταρίνης κατά τη τελευταία ημέρα της κάθε ζύμωσης: δείγμα BC<sub>1</sub> (βακτηριακή κυτταρίνη που προήλθε από τη ζύμωση σε κωνικές φιάλες με πηγή άνθρακα τα ελεύθερα σάκχαρα των αποβλήτων φρούτων), δείγμα BC<sub>2</sub> (βακτηριακή κυτταρίνη που προήλθε από τη ζύμωση σε κωνικές φιάλες με πηγή άνθρακα τα σάκχαρα του υδρολύματος των αποβλήτων φλοιών πορτοκαλιού) και δείγμα BC<sub>3</sub> (βακτηριακή κυτταρίνη που προήλθε από τη ζύμωση σε πλαστικά δοχεία παρουσία αερισμού με πηγή άνθρακα τα σάκχαρα του υδρολύματος των αποβλήτων φλοιών πορτοκαλιού).

**Πίνακας 3.4** Βαθμός πολυμερισμού των δειγμάτων βακτηριακής κυτταρίνης προερχόμενα από διαφορετικές ζυμώσεις.

Δείγμα	Βαθμός Πολυμερισμού
BC <sub>1</sub> (14 ημερών)	2343,5
BC <sub>2</sub> (12 ημερών)	2194,9
BC <sub>3</sub> (9 ημερών)	2291,1

Σύμφωνα με το Πίνακα 3.4, τα δείγματα βακτηριακής κυτταρίνης (BC) των τριών ζυμώσεων εμφανίζουν παρόμοιο βαθμό πολυμερισμού και συμπίπτουν με τη βιβλιογραφία όπου ο βαθμός πολυμερισμού προσδιορίστηκε μεταξύ των τιμών 1889,1 - 2672,8 (Tsouko *et al.*, 2015).

## 4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι το βακτηριακό στέλεχος *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM 15973 δύναται να αναπτυχθεί ικανοποιητικά σε όλα τα θρεπτικά υποστρώματα στα οποία καλλιεργήθηκε. Οι ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες με υπόστρωμα που προήλθε από τα ελεύθερα σάκχαρα των στεμφύλων και από το υδρόλυμα των αποβλήτων φλοιών πορτοκαλιού παρουσίασαν τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις παραγόμενης βακτηριακής κυτταρίνης (3,5 g/L και 3,34 g/L αντίστοιχα).

Όσον αφορά στη ζύμωση που πραγματοποιήθηκε σε κωνικές φιάλες με υπόστρωμα που προήλθε από ελεύθερα σάκχαρα αποβλήτων φρούτων η συγκέντρωση της βακτηριακής κυτταρίνης έφτασε στα 6,48 g/L στη 12<sup>η</sup> ημέρα της ζύμωσης. Η ίδια ζύμωση έλαβε χώρα σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου παρουσία αερισμού με διάρκεια 8 ημέρες και μέγιστη συγκέντρωση βακτηριακής κυτταρίνης 10,2 g/L.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις σε πλαστικά δοχεία με υπόστρωμα που προήλθε από ελεύθερα σάκχαρα αποβλήτων φλοιών πορτοκαλιών παρουσία και απουσία αερισμού με μέγιστη συγκέντρωση βακτηριακής κυτταρίνης 11,56 g/L μετά από 12 ημέρες. Στις ζυμώσεις με υπόστρωμα από υδρόλυμα φλοιών πορτοκαλιού σε πλαστικά δοχεία παρουσία και απουσία αερισμού η μέγιστη συγκέντρωση βακτηριακής κυτταρίνης έφτασε στα 9,84 g/L μετά από 9 ημέρες.

Στα πειράματα με σκοπό το διαχωρισμό των πηκτινών, το ποσοστό της ανακτηθείσας πηκτίνης με χρήση διαφορετικών οξέων είναι:

- 68,15% με κιτρικό οξύ
- 55,23% με H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- 64,21% με HNO<sub>3</sub>
- 47,14% με HCl

Συγκρίνοντας τις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν σε πλαστικά δοχεία με αυτές στις κωνικές φιάλες, οι πρώτες παρουσίασαν υψηλότερες συγκεντρώσεις βακτηριακής κυτταρίνης. Στα πλαστικά δοχεία, όπου υπήρξε αερισμός, παρατηρήθηκε υψηλότερη συγκέντρωση βακτηριακής κυτταρίνης, γεγονός που οφείλεται ενδεχομένως στο ότι ο μικροοργανισμός *Komagataeibacter sucrofermentans* είναι αερόβιος. Η αυξημένη παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης στο υπόστρωμα που προέκυψε από ελεύθερα σάκχαρα φλοιών πορτοκαλιού οφείλεται στη παρουσία βιταμινών και ιχνοστοιχείων. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται από τη βιβλιογραφία, όπου σύμφωνα με τους Keshk *et al.* (2014) η παρουσία βιταμίνης C ευνοεί τη παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης. Περαιτέρω μελέτη για την επίδραση των βιταμινών και των ιχνοστοιχείων που περιέχουν τα εσπεριδοειδή, αλλά και η επίδραση τους στην ανάπτυξη του βακτηριακού στελέχους κρίνεται απαραίτητη για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.

Τα πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι σε όλες τις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν ο ρυθμός κατανάλωσης του αζώτου τις πρώτες 3-4 ημέρες των ζυμώσεων ήταν αρκετά αυξημένος, ενώ η παραγωγή κυτταρίνης είναι μικρότερη σε σχέση με τις τελευταίες ημέρες των ζυμώσεων, γεγονός που αποδεικνύει τη στροφή του κυτταρικού μεταβολισμού προς παραγωγή βιομάζας.

Τέλος, όσον αφορά στο βαθμό πολυμερισμού της βακτηριακής κυτταρίνης όσο πιο καθαρή είναι η πρώτη ύλη τόσο πιο μεγάλος εμφανίζεται ο βαθμός πολυμερισμού. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ζύμωση που πραγματοποιήθηκε σε κωνικές φιάλες με πηγή άνθρακα τα ελεύθερα σάκχαρα των αποβλήτων φρούτων. Αντίθετα, ο βαθμός πολυμερισμού που προέκυψε από τη ζύμωση με πηγή άνθρακα το υδρόλυμα των αποβλήτων φλοιών πορτοκαλιού παρουσιάζει πολύ μικρή μείωση, καθώς στη πηγή άνθρακα περιέχεται και ξυλόζη, η οποία δε μεταβολίζεται εύκολα από το μικροοργανισμό *Komagataeibacter sucrofermentans*.

## 5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Alatzas, S., Moustakas, K., Malamis, D., Vakalis, S. 2019. Biomass potential from agricultural waste for energetic utilization in Greece. *Energies*, 12(6).

Bäckdahl, H., Helenius, G., Bodin, A., Nannmark, U., Johansson, B., R., Risberg, B., Gatenholm, P., 2006. Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells. *Biomaterials*, 27(9), 2141–2149.

Blanco Parte, F., G., Santoso, S., P., Chou, C., C., Verma, V., Wang, H., T., Ismadji, S., Cheng, K., C., 2020. Current progress on the production, modification, and applications of bacterial cellulose. *Critical Reviews in Biotechnology*, 0(0), 1–18.

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. *Topics in Catalysis*, 1(5–6), 345–351.

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

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.

Colvin, J., R., Beer, M., 1960. The formation of cellulose microfibrils in suspensions of *Acetobacter xylinum*. *Canadian Journal of Microbiology*, 6(6018), 631–637.

De Iannino, N., I., Couso, R., O., Dankert, M., A., 2019. Lipid-linked Intermediates and the Synthesis of Acetan in *Acetobacter xylinum*. *Journal of General Microbiology*, 1988, 1731–1736.

De Laurentiis, V., Corrado, S., Sala, S., 2018. Quantifying household waste of fresh fruit and vegetables in the EU. *Waste Management*, 77, 238–251.

Delmer, D., P., Amor, Y., 1995. Cellulose biosynthesis. *Plant Cell*, 7(7), 987–1000.

Deng, G., F., Shen, C., Xu, X., R., Kuang, R., D., Guo, Y., J., Zeng, L., S., Li, H., Bin., 2012. Potential of fruit wastes as natural resources of bioactive compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), 8308–8323.

Deng, Q., Penner, M., H., Zhao, Y., 2011. Chemical composition of dietary fiber and polyphenols of five different varieties of wine grape pomace skins. *Food Research International*, 44(9), 2712–2720.

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

El-Saied, H., El-Diwany, A., I., Basta, A., H., Atwa, N., A., El-Ghwas, D., E., 2008. Production and characterization of economical bacterial cellulose. *BioResources*, 3(4), 1196–1217.

Envelope, I., N., T., H., E., Gram-negative, O., F., T., H., E., 1979.

Euzéby, J., 2005. Validation of publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSEM. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(3), 983–985.

FAO and OIV, 2016. Table and Dried Fao-Oiv Focus 2016.

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

Fruit, F., D., Inouye, A., Ward, M., 2019. Report Name: Fresh Deciduous Fruit Annual Report Highlights.

Fu, Y., Foden, J., A., Khayter, C., Maeder, M., L., Reyon, D., Joung, J., K., Sander, J., D., 2013. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nature Biotechnology*, 31(9), 822–826.

Garusinghe, U., M., Raghuwanshi, V., S., Batchelor, W., Garnier, G., 2018. Water Resistant Cellulose-Titanium Dioxide Composites for Photocatalysis. *Scientific Reports*, 8(1), 1–13.

Hestrin, S., Schramm, M., 1954. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. II. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *The Biochemical Journal*, 58(2), 345–352.

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

Hungund, B., S., Gupta, S., G., 2010. Improved production of bacterial cellulose from *Gluconacetobacter persimmonis* GH-2. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, 2(5), 127–133.

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

Jonas, R., Farah, L., F., 1998. Production and application of microbial cellulose. *Polymer Degradation and Stability*, 59(1–3), 101–106.

Keshk, S., M., 2014. Bacterial Cellulose Production and its Industrial Applications. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, 04(02).

Keshk, S., M., A., S., Sameshima, K., 2005. Evaluation of different carbon sources for bacterial cellulose production. *African Journal of Biotechnology*, 4(6), 478–482.

Kim, H., G., Song, H., J., Jeong, M., J., Seo, Y., L., Yang, J., K., Yoo, S., B., Choi, M., S., 2014. Bioethanol production by enzymatic saccharification of *Salix viminalis* var. *gigantea* biomass. *Forest Science and Technology*, 10(2), 67–72.

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 (Oxford)*, 26(9), 1561–1603.

Koutinas, A., A., Vlysidis, A., Pleissner, D., Kopsahelis, N., Lopez G., I., Kookos, I., K., Lin, C., S., K., 2014. Valorization of industrial waste and by-product streams via fermentation for the production of chemicals and biopolymers. *Chemical Society Reviews*, 43(8), 2587–2627.

Kurosumi, A., Sasaki, C., Yamashita, Y., Nakamura, Y., 2009. Utilization of various fruit juices as carbon source for production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* NBRC 13693. *Carbohydrate Polymers*, 76(2), 333–335.

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

Lestari, P., Elfrida, N., Suryani, A., Suryadi, Y., 2014. Study on the production of bacterial cellulose from *Acetobacter xylinum* using Agro-waste. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 7(1), 75–80.

Lin, K., W., Lin, H., Y., 2006. Quality Characteristics of Chinese-style Meatball Containing Bacterial Cellulose (Nata). *Journal of Food Science*, 69(3), 107–111.

Lintas, C., 1992. Nutritional aspects of fruit and vegetable consumption. *Les Fruits et Légumes Dans Les Économies Méditerranéennes : Actes Du Colloque de Chania*, 19, 79–87.

Lynd, L., R., Weimer, P., J., Zyl, W., H., V., Isak, S., 2002. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology *Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), 506–577.

Masaoka, S., Ohe, T., Sakota, N., 1993. Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 75(1), 18–22.

Mohamed, H., 2016. Extraction and Characterization of Pectin from Grapefruit Peels. *MOJ Food Processing & Technology*, 2(1), 31–38.



OIV, 2019. State of the sector in 2018. International Organisation of Vine and Wine, April, 1–16.

Okiyama, A., Motoki, M., Yamanaka, S., 1993. Bacterial cellulose IV. Application to processed foods. *Topics in Catalysis*, 6(6), 503–511.

Pfaltzgraff, L., A., 2014. The study & development of an integrated & additive-free waste orange peel biorefinery. September, 60–86.

Pfaltzgraff, L., A., De Bruyn, M., 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, I., S., Niklasson, C., Taherzadeh, M., J., 2010. Production of biofuels, limonene and pectin from citrus wastes. *Bioresource Technology*, 101(11), 4246–4250.

Prozil, S., O., Evtuguin, D., V., Lopes, L., P., C., 2012. Chemical composition of grape stalks of *Vitis vinifera* L. from red grape pomaces. *Industrial Crops and Products*, 35(1), 178–184.

Rajoka, M., I., Akhtar, M., W., Hanif, A., Khalid, A., M., 2006. Production and characterization of a highly active cellobiase from *Aspergillus niger* grown in solid state fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(9), 991–998.

Rose, P., A., E., Abilasha, D., 2016. Extraction and characterization of pectin from lemon peel. *International Journal of Advanced Science and Research*, 1(12), 12–15.

Sagar, N., A., Pareek, S., Sharma, S., Yahia, E., M., Lobo, M., G., 2018. Fruit and Vegetable Waste: Bioactive Compounds, Their Extraction, and Possible Utilization. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(3), 512–531.

Salmon, J., E., Siitonen, S., 1970. Carbon dioxide and metabolism in marine environments. *Journal of Marine Research*, 28(4), 493–495.

Sayah, M., Y., Chabir, R., Benyahia, H., Kandri, Y., R., Chahdi, F., O., Touzani, H., Errachidi, F., 2016. Yield, esterification degree and molecular weight evaluation of pectins isolated from orange and grapefruit peels under different conditions. *Plos One*, 11(9), 1–16.

Sayah, M., Y., Chabir, R., Nadia, E., M., Chahdi, F., O., Touzani, H., Errachidi, F., 2014. Comparative Study on Pectin Yield According to the State of the Orange Peels and Acids Used. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, 03(08), 15658–15665.

Securite, F., D., E., D., D., E., 2015. 1–9.

Shi, Z., Zhang, Y., Phillips, G., O., Yang, G., 2014. Utilization of bacterial cellulose in food. *Food Hydrocolloids*, 35, 539–545.

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

Toyosaki, H., Naritomi, T., Seto, A., Matsuoka, M., Tsuchida, T., Yoshinaga, F., 1995. Screening of Bacterial Cellulose-producing *Acetobacter* Strains Suitable for Agitated Culture. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 59(8), 1498–1502.

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

USDA, 2019. Fresh Apples, Grapes, and Pears: World Markets and Trade. Foreign Agricultural Service, 1–10.

USDA/FAS, 2019. Citrus: World Markets and Trade. United States Department of Agriculture. Foreign Agricultural Service, February, 1–13.

Uthpala, T., G., G., Marapana, R., A., U., J., 2017. Study on Nutritional Composition on Firmness of Two Gherkin (*Cucumis sativus* L.) Varieties (Ajax & Vlasset) on Brine Fermentation. *American Journal of Food Science and Technology*, 5(2), 61–63.

Valla, S., Coucheron, D., H., Fjærvik, E., Kjosbakken, J., Weinhouse, H., Ross, P., Benziman, M., 1989. Cloning of a gene involved in cellulose biosynthesis in *Acetobacter*

xylinum: Complementation of cellulose-negative mutants by the UDPG pyrophosphorylase structural gene. *MGG Molecular & General Genetics*, 217(1), 26–30.

Vandamme, E., J., De Baets, S., Vanbaelen, A., Joris, K., De Wulf, P., 1998. Improved production of bacterial cellulose and its application potential. *Polymer Degradation and Stability*, 59(1–3), 93–99.

Vicente, A., R., Manganaris, G., A., Sozzi, G., O., Chrisosto, C., H., 2009. Postharvest Handling: A Systems Approach Nutritional Quality of Fruits and Vegetables. In *Postharvest Handling: A Systems approach*, 79, 37–41.

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.

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