



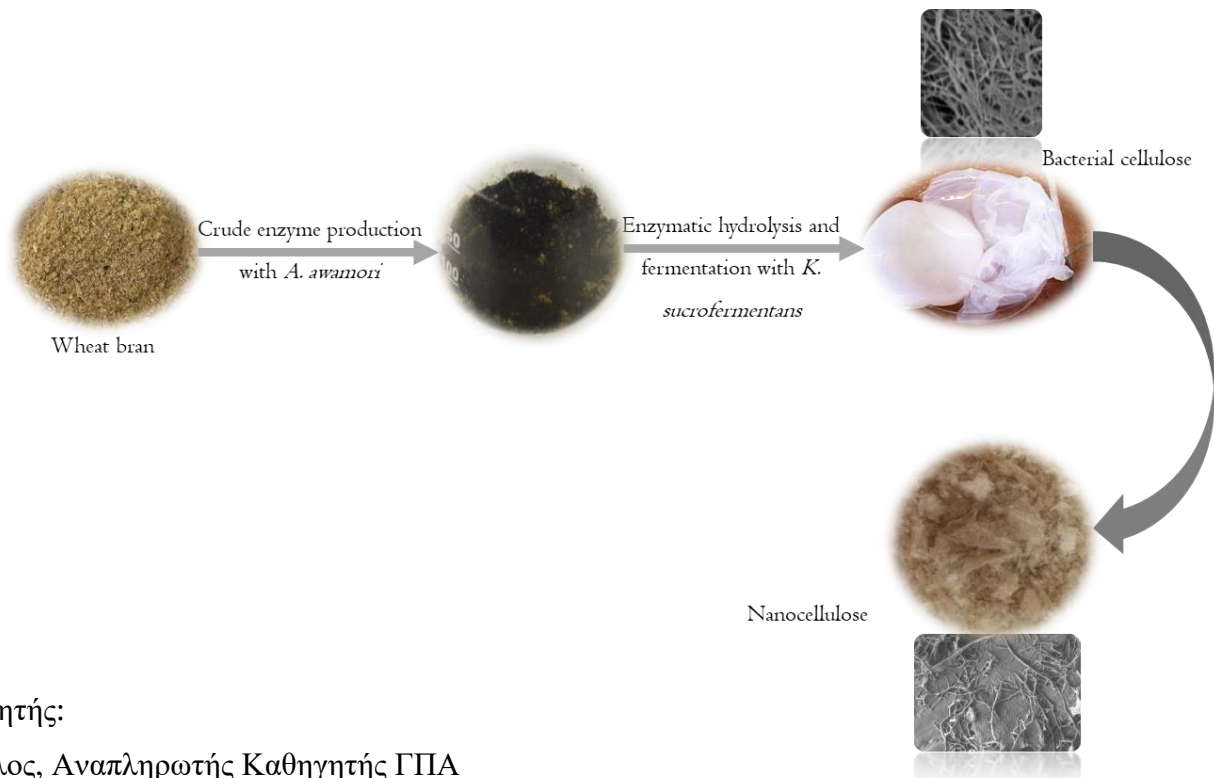
ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Αξιοποίηση παραπροϊόντων άλεσης σιτηρών προς παραγωγή βακτηριακής
κυτταρίνης και νανοκυτταρίνης

Αικατερίνη Ε. Νάτσια



Επιβλέπων Καθηγητής:

Κουτίνας Απόστολος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Αξιοποίηση παραπροϊόντων άλεσης σιτηρών προς παραγωγή βακτηριακής
κυτταρίνης και νανοκυτταρίνης
“ Valorization of wheat milling by-products for the production of bacterial
cellulose and its transformation to nanocellulose”

Αικατερίνη Ε. Νάτσια

Εξεταστική επιτροπή:

Κουτίνας Απόστολος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Παπανικολάου Σεραφείμ, Καθηγητής ΓΠΑ

Μαντάλα Ιωάννα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΓΠΑ

Αξιοποίηση παραπροϊόντων άλεσης σιτηρών προς παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης και νανοκυτταρίνης

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου

Εργαστήριο Μηχανικής και Επεξεργασίας Τροφίμων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η βακτηριακή κυτταρίνη συγκαταλέγεται μεταξύ των πιο πολλά υποσχόμενων βιοπολυμερών λόγω της βιοσυμβατότητας και βιοαποικοδομησιμότητας της βρίσκοντας εφαρμογές σε πολλούς τομείς όπως τρόφιμα, χημική βιομηχανία, ιατρική και άλλα. Οι ιδιότητες της βακτηριακής κυτταρίνης είναι άρρηκτα συνδεδεμένες με το τρισδιάστατο νανοδίκτυο που σχηματίζει όπως και τις συνθήκες της ζύμωσης. Αποτελεί ένα χαρακτηριστικό εξωκυτταρικό πολυμερές που διαθέτει υψηλό βαθμό πολυμερισμού και κρυσταλλικότητας, ενισχυμένες μηχανικές ιδιότητες, θερμική σταθερότητα και υψηλή ικανότητα συγκράτησης νερού. Τροποποίηση της βακτηριακής κυτταρίνης μέσω διαφόρων μεθόδων όπως όξινη υδρόλυση προς παραγωγή νανοκυτταρίνης θα μπορούσε να προσδώσει υψηλή προστιθέμενη αξία στο βιοπολυμερές.

Στην παρούσα εργασία αξιολογήθηκε, αρχικά, η δυνατότητα παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης χρησιμοποιώντας ως θρεπτικό υπόστρωμα ζύμωσης αμυλοπρωτεϊνούχα απόβλητα της βιομηχανίας τροφίμων και πιο συγκεκριμένα απόβλητα πιτύρου σίτου. Σε πρώτο στάδιο, πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις στερεής κατάστασης με το στέλεχος μύκητα *Aspergillus awamori* προς παραγωγή ακατέργαστων ενζύμων. Τα παραγόμενα ένζυμα χρησιμοποιήθηκαν ως βιοκαταλύτες για την υδρόλυση του πιτύρου σίτου προς παραγωγή θρεπτικού υποστρώματος ζύμωσης πλούσιο σε πηγές άνθρακα, αζώτου και άλλων θρεπτικών συστατικών με τελικό σκοπό την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης.

Πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις διαλείποντος έργου με το βακτηριακό στέλεχος *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM 15973 προς παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης. Εξετάστηκε η επίδραση διαφορετικών τιμών pH (4,5, 5,2, 6), διαφορετικών λόγων άνθρακα προς άζωτο που περιέχονται στις ελεύθερες

αμινομάδες αμινοξέων και πεπτιδίων (FAN- Free Amino Nitrogen) (C/FAN) (30, 20, 14, 10) και η παροχή αερισμού στην αποδοτικότητα της ζύμωσης. Στις βακτηριακές ζυμώσεις στις οποίες η τιμή του pH ρυθμιζόταν στο 6, επιτεύχθηκε ενισχυμένη συγκέντρωση βακτηριακής κυτταρίνης (3,2 g/L) με απόδοση ζύμωσης ίση με 0,16 g/g ολικών σακχάρων και παραγωγικότητα 0,41 g/L/ημέρα. Στην περίπτωση των διαφορετικών λόγων C/FAN, η μέγιστη παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης ήταν 5,2 g/L σε λόγο C/FAN ίσο με 14, με απόδοση 0,29 g/g ολικών σακχάρων και παραγωγικότητα 0,70 g/L/ημέρα. Περαιτέρω μείωση του λόγου είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της συγκέντρωσης της βακτηριακής κυτταρίνης. Σε επόμενο στάδιο, πραγματοποιήθηκαν βακτηριακές ζυμώσεις σε στατικούς βιοαντιδραστήρες με παροχή αερισμού για την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης. Η μέγιστη συγκέντρωση βακτηριακής κυτταρίνης που επιτεύχθηκε σε αυτή την περίπτωση ανήλθε σε 2,9 g/L. Η παροχή αερισμού στο περιβάλλον της ζύμωσης δεν φάνηκε να επηρεάζει ιδιαίτερα την αποδοτικότητα της ζύμωσης γεγονός το οποίο μπορεί να οφείλεται στην στροφή του βακτηριακού μεταβολισμού προς παραγωγή βιομάζας.

Σε τελικό στάδιο, η βακτηριακή κυτταρίνη υδρολύθηκε με τη χρήση θειικού οξέος προς παραγωγή νανοκυτταρίνης. Τα δείγματα χαρακτηρίστηκαν ως προς τη μορφολογία (Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (SEM)), την κρυσταλλικότητα (Φασματοσκοπία περίθλασης ακτίνων-X), το μέγεθος των σωματιδίων (Σκέδαση Φωτός), την απορρόφηση και εκπομπή υπερύθρου φάσματος (FT-IR), τη μέγιστη θερμοκρασία αποσύνθεσης (Θερμοσταθμική ανάλυση) και το ζ-δυναμικό. Από την ανάλυση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης φάνηκε ότι η νανοκυτταρίνη που προέκυψε μετά από 24 ώρες υδρόλυσης είχε διάμετρο 25,8-73,1 nm και αναλογία μήκους/διαμέτρου μεγαλύτερη από 13, γεγονός το οποίο δείχνει την καταλληλότητα της ως παράγοντας ενίσχυσης σε μήτρες πολυμερών. Ο δείκτης κρυσταλλικότητας της βακτηριακής κυτταρίνης προσδιορίστηκε ίσος με 81,8% ενώ της βακτηριακής κυτταρίνης μετά από υδρόλυση 24 ωρών ήταν 90,1%. Η μέγιστη θερμοκρασία αποσύνθεσης της βακτηριακής κυτταρίνης ήταν 338 °C ενώ της βακτηριακής κυτταρίνης μετά από υδρόλυση 24 ωρών ήταν ελαφρώς χαμηλότερη. Τέλος, τα φάσματα FT-IR της βακτηριακής κυτταρίνης υπέδειξαν την παρουσία των δύο I_{α} και I_{β} τύπου αλλόμορφων.

Απαραίτητη κρίνεται η περαιτέρω μελέτη βελτιστοποίησης των ζυμώσεων προς παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης με σκοπό την αύξηση της παραγωγικότητας του

πολυμερούς. Επιπλέον, μελλοντική έρευνα θα επικεντρωθεί στη μελέτη διαφορετικών συνθηκών υδρόλυσης της βακτηριακής κυτταρίνης με τη χρήση διαφορετικών μεθοδολογιών με στόχευση σε συγκεκριμένες εφαρμογές.

Επιστημονική περιοχή: Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων

Λέξεις κλειδιά: Ενζυμική υδρόλυση, Ανανεώσιμα υποστρώματα, Βακτηριακή κυτταρίνη, Νανοκυτταρίνη, Φυσικοχημικές ιδιότητες

Valorization of wheat milling by-products for the production of bacterial cellulose and its transformation to nanocellulose

Department of Food Science and Human Nutrition

Laboratory of Food Process Engineering

ABSTRACT

Bacterial cellulose ranges among the most promising biopolymers due to its biodegradability and biocompatibility and widespread applications in a vast number of applications including food, chemical industry and medicine. The properties of bacterial cellulose are highly dependent on the high orientation of its three-dimensional network and the conditions of the fermentative environment. Bacterial cellulose constitutes an extracellular biopolymer with high degree of polymerization and crystallinity, enhanced mechanical properties, thermal stability and water holding capacity. Modification of bacterial cellulose by various methods such as acid hydrolysis to produce nanocellulose could give high added value to the polymer.

In the present study, the potential to produce bacterial cellulose from flour and starch based waste streams derived from the food industry has been evaluated. The first stage of the experimental study dealt with the production of crude enzymes via solid state fermentation with the fungus *Aspergillus awamori*. The enzymes were used as biocatalysts to hydrolyze wheat flour milling by-products (namely wheat bran) and produce a fermentation medium rich in carbon, nitrogen and other nutrient sources for the production of bacterial cellulose.

Batch fermentations were carried out with the bacterial strain *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM 15973 to produce bacterial cellulose. The effect of different pH values (4.5, 5.2, 6), different ratios of C/FAN (30, 20, 14, 10) and air sparging on bacterial cellulose production were evaluated. Fermentations with pH value of 6, resulted in enhanced bacterial cellulose concentration (3.2 g/L) with a yield of 0.16 g/g total sugars and productivity of 0.41 g/L/day. The highest concentration of

bacterial cellulose (5.18 g/L) was achieved at a C/FAN ratio of 14, while conversion yield was 0.29 g/g total sugars with a productivity of 0.70 g /L/day. Further decrease of the C/FAN ratio did not favore bacterial cellulose production. Bacterial fermentations were also performed in static tray bioreactors with air sparging. The highest concentration of bacterial cellulose achieved in this case was 2.9 g/L. Fermentation efficiency was not particularly affected, probably due to the shift of bacterial metabolism to biomass production.

The final stage of this experimental study involved bacterial cellulose hydrolysis with sulfuric acid to produce nanocellulose. The samples were further characterized in terms of morphology (Scanning Electron Microscope), crystallinity (X-ray diffraction), particle size (Light scattering), absorption and emission of infrared spectrum (FT-IR), maximum decomposition temperatures (TGA) and z-potential. Bacterial cellulose samples after hydrolysis, showed varying diameters (25.8-73.1 nm) with a length/diameter ratio of higher than 13, indicating their suitability as a reinforcing agent in polymeric matrices. The crystallinity index of bacterial cellulose was 81,8% while that of bacterial cellulose after hydrolysis was 90,1%. The decomposition temperature of bacterial cellulose was 338 °C, while that of bacterial cellulose after hydrolysis was slightly decreased. Finally, the FT-IR spectra of bacterial cellulose indicated the presence of I_{α} and I_{β} type allomorphs.

Future study will focus on the optimization of bacterial cellulose fermentation to increase productivity. In addition, different hydrolysis conditions of bacterial cellulose using different acids and combinations at particular ratios and different hydrolysis duration should be evaluated.

Scientific area: Food Science and Technology

Keywords: Enzymatic hydrolysis, Renewable resources, Bacterial cellulose, Nanocellulose, Physicochemical properties

Ευχαριστίες

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε στα πλαίσια του Π.Μ.Σ «Επιστήμη & Τεχνολογία Τροφίμων & Διατροφή του Ανθρώπου» του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και έλαβε χώρα στα εργαστήρια «Μηχανικής και Επεξεργασίας Τροφίμων» και «Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων». Αρχικά, ήθελα να ευχαριστήσω τους κυρίους Κουτίνα Αποστόλη και Παπανικολάου Σεραφείμ όπως και την κυρία Μαντάλα Ιωάννα για την ανάθεση αυτού του τόσο ενδιαφέροντος και πρωτότυπου θέματος ως αντικείμενο της μεταπτυχιακής μου μελέτης. Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στην Δρ. Τσούκο Ερμίντα και την υποψήφια διδάκτωρ Ευθυμίου Μαρία-Νεφέλη για την πολύτιμη καθοδήγηση σε επιστημονικό επίπεδο και την βοήθειά τους καθ'όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της μελέτης αυτής. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Λαδάκη Δημήτρη και την Δρ. Πατεράκη Χρυσάνθη για την άψογη συνεργασία που είχαμε. Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στους γονείς μου, Βαγγέλη και Παρασκευή, για την υποστήριξη τους όλα αυτά τα χρόνια, καθώς και στα αδέρφια μου, Αχιλλέα και Λεωνίδα, στον Χριστόφορο και σε όσους ήταν δίπλα μου και με στήριζαν κατά τη διάρκεια του μεταπτυχιακού μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
1.1 Η βιοσύνθεση της βακτηριακής κυτταρίνης.....	11
1.2 Δομή και ιδιότητες της βακτηριακής κυτταρίνης.....	13
1.3 Μέθοδοι καλλιέργειας της βακτηριακής κυτταρίνης	14
1.4 Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης μέσω αποβλήτων της βιομηχανίας τροφίμων	16
1.5 Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης.....	20
1.6 Εφαρμογές της βακτηριακής κυτταρίνης	21
1.6.1 Εφαρμογή στη Βιομηχανία Τροφίμων	21
1.6.2 Εφαρμογή στη Φαρμακευτική και Ιατρική.....	23
1.6.3 Λοιπές εφαρμογές.....	24
1.7 Βακτηριακή νανοκυτταρίνη-Παραγωγή-Εφαρμογές.....	24
1.7.1 Όξινη υδρόλυση της κυτταρίνης	26
1.7.2 Ενζυμική υδρόλυση της κυτταρίνης	27
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	28
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	29
3.1 Ανανεώσιμη πρώτη ύλη	29
3.2 Ζυμώσεις στερεής κατάστασης (Solid State Fermentation, SSF)	29
3.2.1 Παρασκευή εμβολίου για τις ζυμώσεις στερεής κατάστασης με <i>Aspergillus awamori</i>	29
3.2.2 Εμβολιασμός και ζύμωση στερεής κατάστασης του μύκητα <i>Aspergillus awamori</i> σε πτύρο σίτου 30	
3.2.3 Προσδιορισμός της ενζυμικής ενεργότητας.....	31
3.3 Υδρόλυση πτύρου σίτου προς παραγωγή κατάλληλου θρεπτικού μέσου καλλιέργειας	32
3.4 Υγρές ζυμώσεις διαλείποντος έργου (batch) για παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης	33
3.4.1 Μικροοργανισμός και ανανέωση του λυοφιλιωμένου βιολογικού υλικού.....	34
3.4.2 Παρασκευή εμβολίου και αποθήκευση	34
3.4.3 Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης	34
3.4.4 Παραλαβή και καθαρισμός της βακτηριακής κυτταρίνης.....	35
3.5 Υδρόλυση βακτηριακής κυτταρίνης προς παραγωγή βακτηριακής νανοκυτταρίνης	36
3.6 Προσδιορισμός χημικών αναλύσεων βακτηριακής κυτταρίνης και βακτηριακής νανοκυτταρίνης.....	36
3.6.1 Ικανότητα συγκράτησης νερού	37
3.6.2 Μελέτη της μορφολογίας με χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης	37
3.6.3 Δυναμικό επιφανείας	38
3.6.4 Στατική και Δυναμική Σκέδαση φωτός.....	38
3.6.5 Θερμοσταθμική ανάλυση TGA	38
3.6.1 Φασματοσκοπία περίθλασης ακτίνων -X	39
3.6.2 Φασματοσκοπία Υπερύθρου Μετασχηματισμού Fourier (FT-IR)	40

3.7 Χημικές Αναλύσεις	40
3.7.1 Προσδιορισμός πηγών άνθρακα	40
3.7.2 Προσδιορισμός αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων.....	42
3.7.3 Προσδιορισμός ανόργανου φωσφόρου (IP)	43
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	45
4.1 Προσδιορισμός της σύστασης του πιτύρου σίτου	45
4.2 Προσδιορισμός ενζυμικής ενεργότητας μέσω της ζύμωσης στερεής κατάστασης του μύκητα <i>Aspergillus awamori</i> σε πίτυρο σίτου & Ενζυμική υδρόλυση του πιτύρου σίτου	45
4.3 Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης σε συνθετικό υπόστρωμα προσομοιωμένο στο υδρόλυμα του πιτύρου σίτου	49
4.4 Ζυμώσεις διαλείποντος έργου σε ενζυμικό υδρόλυμα πιτύρου σίτου προς παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης.....	50
4.4.1 Αξιολόγηση της επίδρασης των διαφορετικών τιμών pH	51
4.4.2 Αξιολόγηση της επίδρασης των διαφορετικών συγκεντρώσεων αζώτου.....	53
4.4.3 Αξιολόγηση της επίδρασης του αερισμού σε στατικούς βιοαντιδραστήρες	55
4.5 Ανάλυση ιδιοτήτων βακτηριακής κυτταρίνης και νανοκυτταρίνης	57
4.5.1 Ανάλυση μορφολογίας μέσω SEM	57
4.5.2 Ανάλυση του δυναμικού επιφάνειας	59
4.5.3 Στατική και Δυναμική Σκέδαση φωτός.....	60
4.5.4 Θερμοσταθμική ανάλυση TGA/ Παράγωγα θερμοβαρυτικών ιχνών DTG.....	62
4.5.5 Φασματοσκοπία περίθλασης ακτίνων-X (X-Ray Diffractometry, XRD) και δείκτης κρυσταλλικότητας.....	64
4.5.6 Φασματοσκοπία Υπερύθρου Μετασχηματισμού Fourier	66
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	69
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	71

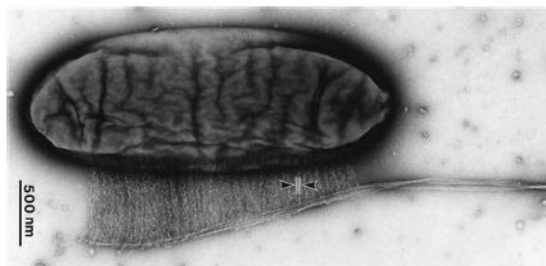
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οικονομικοί, κοινωνικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες έχουν οδηγήσει πολλές βιομηχανίες στην αναζήτηση καινοτόμων και ελκυστικών τρόπων διαχείρισης των αποβλήτων τους (Hussain et al., 2019). Η κυκλική οικονομία αποτελεί μία από τις πιο ελπιδοφόρες προσπάθειες για την ενσωμάτωση των περιβαλλοντικών και των οικονομικών οφελών. Μέσω της κυκλικής οικονομίας, η βιοοικονομία καθιερώνεται ως ο ακρογωνιαίος λίθος για την επίτευξη μιας βιώσιμης οικονομίας μέσω των ανανεώσιμων πρώτων υλών (Mohan et al., 2019). Η έννοια του βιοδυλιστηρίου βασίζεται στην αειφόρο ανάπτυξη ολοκληρωμένων και πολυλειτουργικών διαδικασιών όπου χρησιμοποιούνται όλα τα συστατικά των αποβλήτων με στόχο την παραγωγή καινοτόμων προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας, διασφαλίζοντας έτσι τη βελτίωση της οικονομίας και την περιβαλλοντική βιωσιμότητα (Mohan, 2016).

Το πίτουρο σίτου είναι ένα υποπροϊόν της άλεσης του σιταριού το οποίο προκύπτει κατά την παραγωγή των αλεύρων. Το πίτουρο σίτου μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρώτη ύλη σε ένα βιοδυλιστήριο με την αξιοποίηση των μη βρώσιμων κλασμάτων και με την ανάκτηση των δευτερευόντων ενώσεων με υψηλή προστιθέμενη αξία που μπορεί να είναι οικονομικά πολύ ευεργετικές σε βιοδιεργασίες (Alonso, 2018).

Η παραγωγή υλικών υψηλής προστιθέμενης αξίας από υπολείμματα γεωργικών και βιομηχανικών αποβλήτων που προέρχονται από ανανεώσιμες πρώτες ύλες είναι μια ενδιαφέρουσα διαδικασία (Li et al., 2015). Ένα τέτοιο υλικό είναι η βακτηριακή κυτταρίνη η οποία παράγεται εξωκυτταρικά κυρίως από Gram αρνητικά βακτήρια που ανήκουν στα γένη *Gluconacetobacter*, *Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Sarcina*, *Azobacter*, *Rhizobium*. Ο πιο αποτελεσματικός παραγωγός της βακτηριακής κυτταρίνης ανήκει στο γένος *Gluconacetobacter* (Picheth et al., 2017). Άλλοι μικροοργανισμοί που παράγουν βακτηριακή κυτταρίνη είναι φύκη (*Vallonia*) και μύκητες (*Saprolegnia*, *Dictyostelium discoideum*) (Keshk and Kott, 2017). Το βακτήριο *A. xylinum* λόγω της ικανότητας του να παράγει σε μεγάλη ποσότητα κυτταρίνη αποτελεί μικροοργανισμό-μοντέλο για βασικές και εφαρμοσμένες μελέτες της κυτταρίνης (Bielecki et al., 2005). Είναι αυστηρά αερόβιο βακτήριο και μπορεί να μετασχηματίσει τη γλυκόζη και άλλα οργανικά υποστρώματα σε βακτηριακή κυτταρίνη (Εικόνα 1). Το βακτήριο *A. xylinum* επίσης γνωστό ως *Gluconacetobacter xylinus* ή *Komagataeibacter xylinus* έχει απομονωθεί

από πολλές πηγές όπως φρούτα, λουλούδια, ζυμούμενα τρόφιμα, ποτά και ξύδι (Campano et al., 2015).



Εικόνα 1 Ίνα βακτηριακής κυτταρίνης από τον *Komagataeibacter xylinus* μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (Campano et al., 2015)

Η βακτηριακή κυτταρίνη έχει εξαιρετικές φυσικοχημικές ιδιότητες όπως η υψηλή κρυσταλλικότητα, η υψηλή αντοχή σε εφελκυσμό, η υψηλή ικανότητα συγκράτησης νερού και η βιοσυμβατότητα. Ως εκ τούτου, η βακτηριακή κυτταρίνη έχει χρησιμοποιηθεί σε προϊόντα τροφίμων, σε φαρμακευτικά και ιατρικά προϊόντα καθώς και σε άλλα εμπορικά προϊόντα. Η χρήση υπολειμμάτων των αποβλήτων ως πρώτη ύλη για την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης αποτελεί έναν οικονομικό και «πράσινο» τρόπο της παραγωγής της (Li et al., 2015).

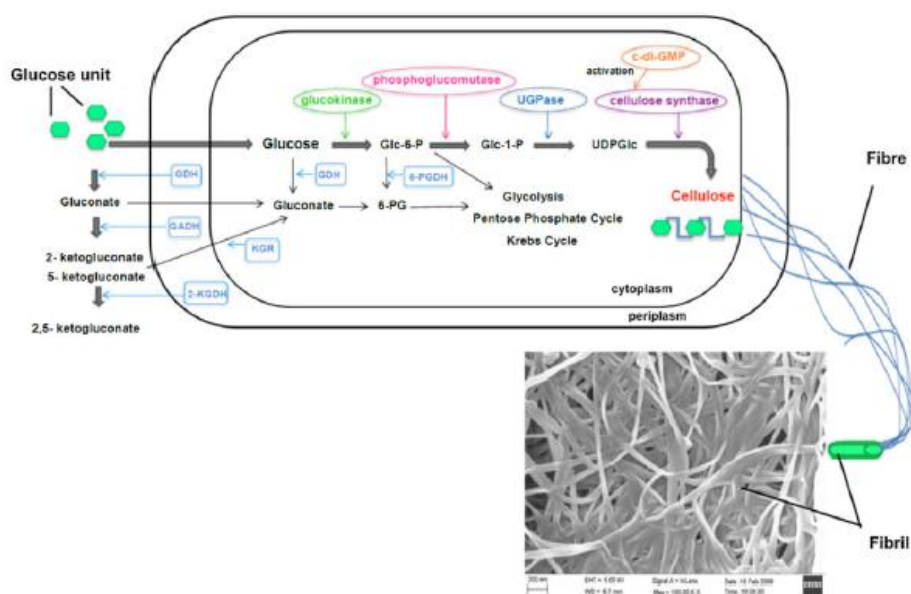
1.1 Η βιοσύνθεση της βακτηριακής κυτταρίνης

Ο *A. xylinum* για να συνθέσει την κυτταρίνη λαμβάνει πηγές άνθρακα οι οποίες εισέρχονται και αφομοιώνονται είτε στον κύκλο των φωσφορικών πεντοζών είτε στον κύκλο του Krebs είτε στη γλυκονεογένεση. Η βιοσύνθεση της βακτηριακής κυτταρίνης είναι μια διαδικασία πολλαπλών σταδίων που περιλαμβάνει ένζυμα και σύμπλοκα από καταλυτικές και ρυθμιστικές πρωτεΐνες (Σχήμα 1). Η σύνθεση της κυτταρίνης περιλαμβάνει τέσσερα βασικά ενζυμικά βήματα όταν χρησιμοποιείται γλυκόζη ως πηγή άνθρακα:

- I. Φωσφορυλίωση της γλυκόζης από τη γλυκοκινάση
- II. Ισομερισμός 6 φωσφορικής γλυκόζης (Glc-6-P) σε 1- φωσφορική γλυκόζη (Glc-1-P) με φωσφο-γλυκο-μουτάση
- III. Σύνθεση της ουριδίνης διφωσφογλυκόζης (UDP-Glc) από πυροφωσφορυλάση (UGPase)

IV. Αντίδραση συνθάσης της κυτταρίνης.

Όταν χρησιμοποιούνται ως πηγή άνθρακα δισακχαρίτες, η βιοσύνθεση της βακτηριακής κυτταρίνης ξεκινά με την υδρόλυση των δισακχαριτών σε μονοσακχαρίτες. Η ουριδίνη διφωσφογλυκόζης είναι η πρόδρομη ένωση σχηματισμού της κυτταρίνης. Επίσης, η πυροφωσφορυλάση φαίνεται να είναι το κρίσιμο ένζυμο της κυτταρινοσύνθεσης αφού είναι 100 φορές πιο ενεργή στα βακτήρια που παράγουν κυτταρίνη σε σχέση με αυτά που δεν παράγουν (Lee et al., 2014).



Σχήμα 1 Μεταβολικό μονοπάτι του *A. xylinum* προς σχηματισμό μορίων κυτταρίνης (Lee et al., 2014)

Η κυτταρίνη συντίθεται από τους μικροοργανισμούς σε δύο βήματα: i) το σχηματισμό β-(1→4) αλυσίδων γλυκάνης ii) το σχηματισμό της αλυσίδας της κυτταρίνης. Η βακτηριακή κυτταρίνη σχηματίζεται μεταξύ των εξωτερικών και των κυτοπλασματικών μεμβρανών του κυττάρου. Τα μόρια της κυτταρίνης συντίθενται πρώτα μέσα στο βακτήριο (Lee et al., 2014). Τα μόρια του προ-κυτταρικού πολυμερούς που συντίθενται στο εσωτερικό των βακτηριακών κυττάρων εξωθούνται στο εξωκυτταρικό περιβάλλον σχηματίζοντας πρωτοϊνίδια διαμέτρου 2-4 nm. Τα πρωτοϊνίδια ομαδοποιούνται με τη μορφή μικροϊνών σε δομές διαμέτρου περίπου 80x4 nm. Οι δομές αποτελούνται από 46 περίπου μικροΐνες και έχουν πλάτος 133 μm

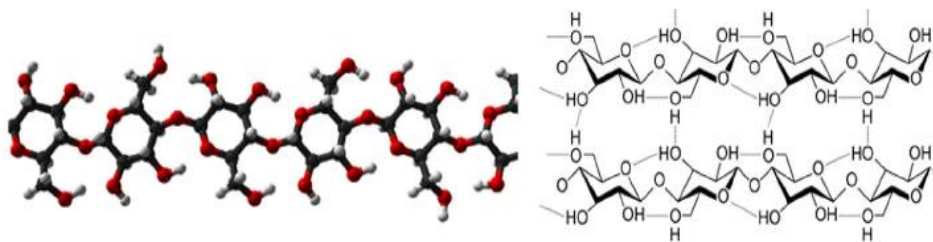
(Brown et al., 1976). Αυτές οι δομές αλληλεπιδρούν με άλλες από γειτονικά κύτταρα, σχηματίζοντας ένα δισδιάστατο επίπεδο. Στη συνέχεια, παράλληλα επίπεδα αλληλεπιδρούν το ένα με το άλλο με δεσμούς υδρογόνου και δυνάμεις Van der Waals, σχηματίζοντας ένα ζελατινώδες εναιώρημα στην επιφάνεια του μέσου καλλιέργειας (Brett 2000).

Ο *A. xylinum* παράγει δύο μορφές κυτταρίνης, την κυτταρίνη τύπου I και την κυτταρίνη τύπου II που παρουσιάζει πιο άμορφη μορφή πολυμερούς. Η κυτταρίνη I αποτελείται από παράλληλες αλυσίδες β-1,4 γλυκάνης που είναι διατεταγμένες μονοαξονικά ενώ στην κυτταρίνη II είναι διατεταγμένες με τυχαίο τρόπο. Η κυτταρίνη II περιέχει μεγάλο αριθμό δεσμών υδρογόνου με αποτέλεσμα μια πιο σταθερή μορφή (Mohite και Patil, 2013).

Η βιοσύνθεση της κυτταρίνης καταλύεται από τη συνθάση της κυτταρίνης η οποία πολυμερίζει τη γλυκόζη σε β-1,4 αλυσίδες γλυκάνης. Ο μηχανισμός πολυμερισμού των αλυσίδων γλυκάνης δεν είναι ακόμη καλά κατανοητός. Μια πρώτη υπόθεση είναι ότι ο πολυμερισμός περιέχει λιπιδικό ενδιάμεσο όπου η γλυκόζη είναι η πρώτη που μεταφέρεται από την UDP-Glc σε ένα μόριο λιπιδίου στην μεμβράνη του πλάσματος σχηματίζοντας το λιπιδικό ενδιάμεσο γλυκόζη-γλυκοσυλοτρανσφεράση. Μια άλλη υπόθεση είναι ότι δεν συμπεριλαμβάνεται λιπιδικό ενδιάμεσο. Σε αυτή την περίπτωση τα υπολείμματα γλυκόζης συνδέονται με το μη αναγωγικό άκρο του πολυσακχαρίτη, στον εξωκυτταροπλασματικό χώρο κατά τον πολυμερισμό των β(1→4) μονάδων γλυκάνης (Lee et al., 2014).

1.2 Δομή και ιδιότητες της βακτηριακής κυτταρίνης

Η βακτηριακή κυτταρίνη είναι ένα γραμμικό πολυμερές που αποτελείται από μόρια D-γλυκόζης συνδεδεμένα με β(1→4) γλυκοζιτικούς δεσμούς με μοριακό τύπο $(C_6H_{10}O_5)_n$ (Εικόνα 2) (Choi και Shin, 2020).



Εικόνα 2 Χημικός τύπος και δομή της κυτταρίνης (Foresti et al., 2017)

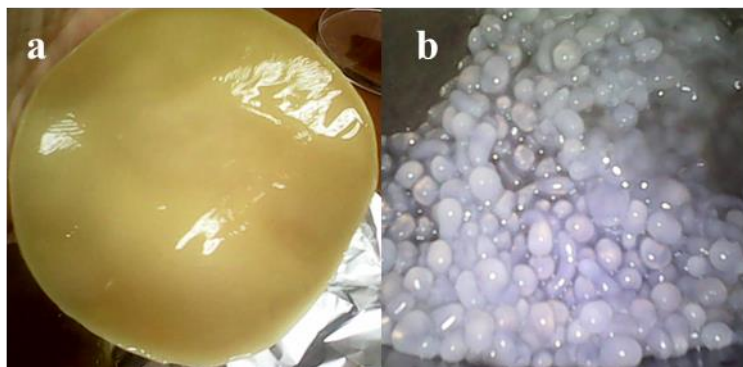
Η μοριακή δομή της βακτηριακής κυτταρίνης είναι η ίδια με αυτή της φυτικής κυτταρίνης. Ο βαθμός πολυμερισμού της φυτικής κυτταρίνης (13.000 έως 14.000) είναι αρκετά μεγαλύτερος σε σχέση με αυτόν της βακτηριακής κυτταρίνης (2.000 έως 6.000). Τα μικροϊνίδια της βακτηριακής κυτταρίνης φαίνεται να είναι 100 φορές μικρότερα από αυτά της φυτικής κυτταρίνης (Choi και Shin, 2020).

Η βακτηριακή κυτταρίνη είναι ένα βιοπολυμερές που έχει μοναδικές φυσικές και χημικές ιδιότητες. Παρουσιάζει υψηλή μηχανική αντοχή, απόλυτη καθαρότητα, κρυσταλλικότητα, βιοσυμβατότητα και βιοαποικοδομησιμότητα (Lin et al., 2020). Τα χαρακτηριστικά της επηρεάζονται από πολλούς παράγοντες όπως είναι τα θρεπτικά μέσα ζύμωσης και οι συνθήκες ζύμωσης (Shi et al., 2014). Το μέτρο ελαστικότητας της κυμαίνεται μεταξύ 15-35 GPa, η αντοχή σε εφελκυσμό 200-300 MPa και ο δείκτης κρυσταλλικότητας συνήθως είναι πάνω από 70% (Lin et al., 2020). Επιπλέον, η βακτηριακή κυτταρίνη είναι εξαιρετικά πορώδης και μπορεί να παραχθεί σε διάφορες μορφές καθώς οι μεμβράνες μπορούν εύκολα να ελεγχθούν με μεταβαλλόμενα σχήματα βιοαντιδραστήρων. Λόγω της μικρής διαμέτρου των ινών και της εξαιρετικά πορώδους δομής τους, οι μεμβράνες της βακτηριακής κυτταρίνης έχουν μεγάλη ικανότητα συγκράτησης νερού (Qiu et al., 2014).

1.3 Μέθοδοι καλλιέργειας της βακτηριακής κυτταρίνης

Η βακτηριακή κυτταρίνη μπορεί να παραχθεί είτε στατικά είτε υπό ανάδευση είτε μέσω βιοαντιδραστήρων. Η μακροσκοπική μορφολογία, η δομή, και οι ιδιότητες της βακτηριακής κυτταρίνης διαφέρουν ανάλογα με τη μέθοδο καλλιέργειας. Η μέθοδος της στατικής καλλιέργειας έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση της μεμβράνης της κυτταρίνης στην επιφάνεια του μέσου. Από την άλλη με την ανάδευση δημιουργούνται σφαίρες, σφαιρίδια ή ακανόνιστες μάζες. Η επιλογή της μεθόδου

εξαρτάται από τις τελικές εφαρμογές της βακτηριακής κυτταρίνης καθώς και από τα επιθυμητά φυσικά, μορφολογικά και μηχανικά χαρακτηριστικά της (Wang et al., 2019).



Εικόνα 3 Μεμβράνη βακτηριακής κυτταρίνης υπό στατικές συνθήκες καλλιέργειας (a), σφαιρίδια βακτηριακής κυτταρίνης σε ζυμώσεις υπό ανάδευση (b)

Η μέθοδος της στατικής καλλιέργειας (Εικόνα 3a) είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος για το σχηματισμό βακτηριακής κυτταρίνης σε εργαστηριακή κλίμακα. Η βακτηριακή κυτταρίνη που παράγεται υπό αυτές τις συνθήκες έχει εξαιρετική δομή και ιδιότητες. Η μεμβράνη της κυτταρίνης σχηματίζεται στην επιφάνεια του υγρού θρεπτικού μέσου καλλιέργειας (Wang et al., 2019).

Το υψηλό κόστος και ο χαμηλός ρυθμός παραγωγής είναι τα δύο κύρια προβλήματα της στατικής καλλιέργειας. Για την επίλυση αυτών των προβλημάτων χρησιμοποιήθηκε η υπό ανάδευση καλλιέργεια (Εικόνα 3b). Η παροχή οξυγόνου είναι άμεσα συνδεδεμένη με την παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης. Ωστόσο, η υπερβολική παροχή οξυγόνου έχει αποδειχθεί ότι οδηγεί στην μείωση της παραγωγής της. Παρόλα αυτά, μελέτες έχουν δείξει ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στην τελική συγκέντρωση της βακτηριακής κυτταρίνης που παράγεται ανάμεσα στις δύο μεθόδους (Wang et al., 2019).

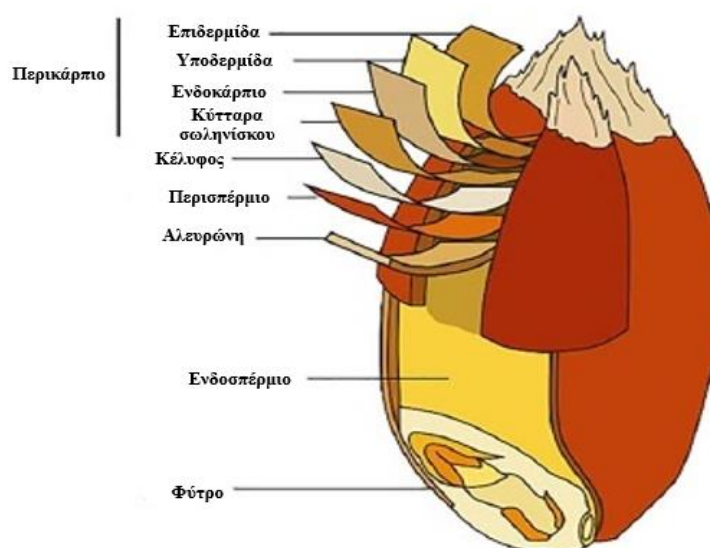
Με τη χρήση βιοαντιδραστήρων βελτιώνεται η παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης, μειώνονται οι πιθανότητες μετάλλαξης του βακτηρίου σε άλλα στελέχη που δεν παράγουν κυτταρίνη και μειώνεται το κόστος παραγωγής. Διάφορα συστήματα καινοτόμων βιοαντιδραστήρων έχουν μελετηθεί ως τώρα για να παραχθεί

βακτηριακή κυτταρίνη με επιθυμητές ιδιότητες. Βιοαντιδραστήρες αναδεδυόμενων δεξαμενών έχουν χρησιμοποιηθεί ώστε να αυξηθεί η παραγωγικότητα. Ένα από τα μειονεκτήματα του συστήματος είναι η μετάλλαξη του βακτηρίου σε στελέχη που δεν παράγουν βακτηριακή κυτταρίνη λόγω υψηλού αερισμού (Lee et al., 2014). Επιπλέον, βιοαντιδραστήρας με σύστημα ψεκασμού έχει χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης. Έχει αποδειχθεί ότι τα ενεργά βακτήρια υπάρχουν μόνο στα ανώτερα στρώματα της μεμβράνης της βακτηριακής κυτταρίνης όπου η συγκέντρωση του οξυγόνου είναι υψηλότερη (Hornung et al., 2006). Στους βιοαντιδραστήρες αυτούς ψεκάζονται τα θρεπτικά συστατικά από ένα ακροφύσιο που βρίσκεται πάνω από την κυτταρίνη. Έτσι, εξασφαλίζεται ότι τα βακτήρια που ζουν στο ανώτερο στρώμα λαμβάνουν πάντα υψηλά επίπεδα οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών (Czaja et al., 2007). Ο συγκεκριμένος αντιδραστήρας μπορεί να λειτουργεί για μεγάλο χρονικό διάστημα εφόσον δεν υπάρχει μόλυνση. Η απόδοση της βακτηριακής κυτταρίνης είναι υψηλότερη στη στατική καλλιέργεια διότι οι διατμητικές τάσεις που δημιουργούνται κατά την καλλιέργεια υπό ανάδευση ευνοούν την μετάλλαξη των βακτηρίων. Ωστόσο, το μέγεθος των δοχείων στατικής καλλιέργειας δεν είναι πρακτικό σε μεγάλης κλίμακας παραγωγή. Με τη χρήση βιοαντιδραστήρα μεμβράνης υπό στατικές συνθήκες τα θρεπτικά συστατικά περνούν από την μια πλευρά της μεμβράνης ενώ το βακτήριο από την άλλη. Τα θρεπτικά που χρειάζονται για την ανάπτυξη του βακτηρίου και την παραγωγή της κυτταρίνης διοχετεύονται μέσω της υδρόφιλης μεμβράνης. Επίσης, η μεμβράνη διαχωρίζει την κυτταρίνη με το μέσο καλλιέργειας και έτσι το μέσο κυκλοφορεί χωρίς να διαταράσσει το σχηματισμό της βακτηριακής κυτταρίνης (Lee et al., 2014).

1.4 Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης μέσω αποβλήτων της βιομηχανίας τροφίμων

Τα απόβλητα προκαλούν σοβαρά οικονομικά και περιβαλλοντικά προβλήματα παγκοσμίως. Μεγάλη σημασία έχουν τα απόβλητα των τροφίμων καθώς παράγονται εκατομμύρια τόνοι ετησίως. Εκτιμάται πως περίπου το ένα τρίτο όλων των τροφίμων χάνεται μεταξύ συλλογής και διανομής της αλυσίδας τροφίμων (Ul-Islam et al., 2020). Το σιτάρι είναι από τις σημαντικότερες καλλιέργειες δημητριακών και καταναλώνεται περίπου από το ένα τρίτο του πληθυσμού παγκοσμίως.

Είναι πλούσιο σε πρωτεΐνες, μέταλλα, βιταμίνες και διαιτητικές ίνες και θεωρείται ένας εξαιρετικά θρεπτικός σπόρος. Αποτελείται από το πίτυρο, το φύτρο και το ενδοσπέρμιο. Το 13-17% είναι το πίτυρο, το 2-3% το φύτρο και το 80-85% το ενδοσπέρμιο (Budhwar et al., 2020). Το πίτυρο σίτου είναι το εσωτερικό στρώμα του πυρήνα του σίτου, το οποίο περιβάλλουν το φύτρο και το ενδοσπέρμιο. Ξεκινώντας από το εξωτερικό του πυρήνα του σίτου παρατηρεί κανείς (Εικόνα 4) το περικάρπιο (επιδερμίδα, υποδερμίδα, ενδοκάρπιο και κύτταρα σωληνίσκου), το κέλυφος, το περισπέρμιο και το στρώμα αλευρώνης, το οποίο είναι στενά συνδεδεμένο με το στρώμα σπόρου. Το στρώμα της αλευρώνης και το ενδοσπέρμιο αποτελούν μέρος του πιτύρου σίτου. Το περικάρπιο είναι το εξώτατο στρώμα του κλάσματος του πιτύρου και αποτελείται από το επικάρπιο, το μεσοκάρπιο και το ενδοκάρπιο (Deroover et al., 2020).



Εικόνα 4 Ο σπόρος του σιταριού

Η συνολική χρήση σιταριού το 2019-2020 σύμφωνα με τον FAO (Food and Agricultural Organization) υπολογίζεται πως θα φτάσει τους 759,5 εκατομμύρια τόνους, δηλαδή, 1,5% περισσότερο από ότι το 2018-2019. Η συνολική χρήση του σίτου σε τρόφιμα προβλέπεται να πλησιάσει τους 518 εκατομμύρια τόνους δηλαδή αύξηση 1,1% η οποία συνδέεται άμεσα με την αύξηση του παγκόσμιου πληθυσμού.

Στην Ευρώπη, η βιομηχανία αλευροποιίας παράγει περίπου 35 εκατομμύρια τόνους αλεύρων ετησίως από περίπου 45 εκατομμύρια τόνους σιταριού και σίκαλης. Αυτή η

διαδικασία έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή περίπου 6,5 εκατομμυρίων τόνων πτύρου που χρησιμοποιούνται ως επί το πλείστον σε ζωοτροφές. Επειδή το πτύρο σίτου είναι μια εξαιρετική πηγή ινών και είναι άμεσα διαθέσιμο σε χαμηλή τιμή, χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο στην διατροφή των ανθρώπων σε δημητριακά και προϊόντα αρτοποιίας (Deroover et al., 2020).

Τα απόβλητα τροφίμων θα μπορούσαν να μετατραπούν σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας μέσω διαφόρων βιοδιεργασιών όπως για παράδειγμα τη χρήση μικροοργανισμών ως βιοκαταλύτες προς παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης (Hussain et al., 2019). Η παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης είναι μια σχετικά ακριβή διαδικασία κυρίως λόγω της χαμηλής παραγωγικότητας της διεργασίας και της χρήσης εμπορικών μέσων καλλιέργειας. Κατά τη διάρκεια της παραγωγής της βακτηριακής κυτταρίνης, το μέσο καλλιέργειας αντιπροσωπεύει περίπου το 30% του συνολικού κόστους. Επομένως, είναι σημαντική η εύρεση εναλλακτικών και ανανεώσιμων υποστρωμάτων οδηγώντας σε υψηλές τιμές παραγωγικότητας και απόδοσης της βιοδιεργασίας (Revin et al., 2018).

Διάφορες μελέτες έχουν ασχοληθεί με τη χρήση γεωργικών και βιομηχανικών αποβλήτων ως πηγή άνθρακα για τη μείωση του κόστους παραγωγής της βακτηριακής κυτταρίνης (Πίνακας 1). Μια πράσινη και βιώσιμη διεργασία παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση υδρολυμάτων γεωργικού μίσχου ως πηγή άνθρακα για την καλλιέργεια του *Acetobacter xylinus*. Η μέγιστη παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης έφτασε τα 2,86 g/L. Η υδρόλυση έγινε με οξικό οξύ το οποίο ανακτήθηκε με σκοπό την ανακύκλωσή του και την μείωση του κόστους της διεργασίας (Cheng et al., 2017).

Οι Luo et al. (2017) χρησιμοποίησαν το κέλυφος του φρούτου Ντούριαν το οποίο θεωρείται απόβλητο και το υδρόλυσαν με αραιό θειικό οξύ προκειμένου να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης από τον *Gluconacetobacter xylinus*. Η μέγιστη παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης (2,67 g/L) παρουσιάστηκε στις 8 ημέρες ζύμωσης υπό στατική καλλιέργεια και η δομή της φάνηκε να έχει μικρές διαφορές σε σχέση με τη βακτηριακή κυτταρίνη που παρήχθη με το παραδοσιακό μέσο Hestrin – Schramm.

Το άχυρο σίτου έχει χρησιμοποιηθεί σε αρκετές μελέτες ως πρώτη ύλη για την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης. Πιο συγκεκριμένα, οι Chen et al. (2013)

χρησιμοποίησαν άχυρο σίτου το οποίο είχαν προεπεξεργαστεί σε υψηλές θερμοκρασίες έως 120 °C προκειμένου να βελτιωθεί ο ρυθμός της ενζυμικής υδρόλυσης και η απόδοση παραγωγής των ζυμώμενων σακχάρων. Μετα την προεπεξεργασία η απόδοση των σακχάρων ήταν 3,6 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με αυτή του μη επεξεργασμένου άχυρου σίτου και η μέγιστη παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης ήταν 8,3 g/L. Ακόμη, οι Al-Abdallah et al. (2013) χρησιμοποίησαν άχυρο σίτου το οποίο υδρολύθηκε ενζυμικά και υπό όξινες συνθήκες για την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης από τον *Gluconacetobacter xylinus*. Στην περίπτωση της ενζυμικής υδρόλυσης η παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης ήταν μεγαλύτερη (10,6 g/L) σε σχέση με την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης (9,7 g/L) μέσω όξινης υδρόλυσης του υποστρώματος.

Τέλος, έχουν χρησιμοποιηθεί φλούδες εσπεριδοειδών για την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης. Οι Güzel et al. (2019) χρησιμοποίησαν φλούδες από λεμόνια, μανταρίνια, πορτοκάλια και γκρέιπφρουτ τα οποία υδρολύθηκαν με αραιό οξύ και τα υδρολύματα χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης. Η βακτηριακή κυτταρίνη η οποία παρήχθη είχε μέγιστη συγκέντρωση 7,44 g/L και είχε υψηλή ικανότητα συγκράτησης νερού, θερμική σταθερότητα και υψηλή κρυσταλλικότητα. Οι Tsouko et al. (2020) χρησιμοποίησαν υδρόλυμα που προέκυψε από υδρόλυμα με αραιό θειικό οξύ που προερχόταν από φλούδες πορτοκαλιών για την καλλιέργεια του *Komagataeibacter sucrofermentants*. Η τελική συγκέντρωση βακτηριακής κυτταρίνης έφτασε τα 1,9 g/L.

Πίνακας 1 Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης σε υδρολύματα από λιγνοκυτταρινούχα απόβλητα του αγροδιατροφικού τομέα

Ανανεώσιμη πρώτη ύλη	Μικροοργανισμός	Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης (g/L)	Βιβλιογραφία
Άχυρο σίτου	<i>Acetobacter xylinus</i> ATCC 23770	8,3	Chen et al., 2013
Μίσχος καλαμποκιού	<i>Acetobacter xylinus</i> ATCC 23767	2,86	Cheng et al., 2017
Κέλυφους του φρούτου Ντούριαν	<i>Gluconacetobacter xylinus</i> CH001	2,67	Luo et al., 2017

Άχυρο σίτου	<i>Gluconacetobacter xylinus</i> ATCC 700178	10,6	Al-Abdallah et al., 2013
Φλούδες εσπεριδοειδών	<i>Komagataeibacter hansenii</i> GA2016	7,44	Güzel et al., 2019
Φλούδες πορτοκαλιών	<i>Komagataeibacter</i> <i>sucrofermentants</i> DSM 15973	1,9	Tsouko et al., 2020

1.5 Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης

Οι συνθήκες του μέσου καλλιέργειας επηρεάζουν τις ιδιότητες και τις εφαρμογές της βακτηριακής κυτταρίνης. Ανεξάρτητα από τη μέθοδο της καλλιέργειας σημαντικοί παράγοντες για την παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης είναι το pH, το οξυγόνο και η θερμοκρασία (Azeredo et al., 2019).

Το pH του μέσου καλλιέργειας είναι ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει γενικά την παραγωγή των προϊόντων. Έτσι, κάθε μικροοργανισμός έχει το βέλτιστο pH καθώς και το εύρος pH στο οποίο αναπτύσσεται. Έχει αποδειχθεί πως το κατάλληλο εύρος του *A. xylinum* κυμαίνεται σε τιμές από 4 έως 6 (Jin et al., 2019).

Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας στην παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης είναι ο αερισμός (Azeredo et al., 2019). Το βακτήριο *A. xylinum* όπως έχει ήδη αναφερθεί ανήκει στους αυστηρά αερόβιους μικροοργανισμούς. Αυτό σημαίνει ότι χρειάζεται υποχρεωτικά οξυγόνο τόσο για την ανάπτυξη του όσο και για την παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης (Parte et al., 2020). Η χαμηλή περιεκτικότητα σε διαλυμένο οξυγόνο εμποδίζει την ανάπτυξη βακτηρίων και την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης. Από την άλλη, μια υψηλή οξυγόνωση μπορεί να ευνοήσει την παραγωγή γλυκονικού οξέος (Azeredo et al., 2019).

Ο έλεγχος της θερμοκρασίας κατά την καλλιέργεια για παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης είναι επίσης σημαντικός, καθώς μπορεί να επηρεάσει την απόδοση και τις ιδιότητές της (Azeredo et al., 2019). Έχει αναφερθεί ότι η βέλτιστη θερμοκρασία για την παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης είναι 30 °C. Η μείωση της θερμοκρασίας (25 °C) δεν επιφέρει σημαντικές αλλαγές στην παραγωγή της βακτηριακής

κυτταρίνης ενώ αυξημένες τιμές θερμοκρασίας (35 °C) θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε μειωμένη απόδοση της βιοδιεργασίας (Lee et al., 2014).

Τέλος, η πηγή αζώτου φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή κυτταρίνης. Διάφορες πηγές αζώτου έχουν δοκιμαστεί στην παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης με το εκχύλισμα ζύμης να έχει τα καλύτερα αποτελέσματα. Αυτό ίσως οφείλεται στις άφθονες ενώσεις αζώτου και στους πολλούς αυξητικούς παράγοντες που διαθέτει (Son et al., 2001).

1.6 Εφαρμογές της βακτηριακής κυτταρίνης

Η βακτηριακή κυτταρίνη λόγω των ιδιοτήτων της βρίσκει εφαρμογή σε πολλούς τομείς όπως είναι η βιομηχανία τροφίμων, η ιατρική, η φαρμακευτική καθώς και σε εμπορικά και βιομηχανικά προϊόντα.

1.6.1 Εφαρμογή στη Βιομηχανία Τροφίμων

Όπως είναι αποδεδειγμένο, οι διαιτητικές ίνες ωφελούν στην υγεία και μπορούν να συμβάλλουν στη μείωση του κινδύνου των χρόνιων ασθενειών. Η βακτηριακή κυτταρίνη αποτελεί μια τέτοια διαιτητική ίνα και χαρακτηρίζεται ως ‘γενικά αναγνωρισμένη ως ασφαλής’ (GRAS). Από το 1992 έχει γίνει δεκτή από την Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων. Σε σύγκριση με άλλες φυτικές ίνες η βακτηριακή κυτταρίνη παρουσιάζει μεγάλα πλεονεκτήματα. Αρχικά, είναι εξαιρετικά καθαρή και δεν απαιτούνται σκληρές χημικές επεξεργασίες για να απομονωθεί και να καθαριστεί όπως η φυτικής προέλευσης κυτταρίνη. Επιπλέον, όταν το βακτήριο αναπτύσσεται σε κάποιο φρούτο ή σιρόπι, η παραγόμενη βακτηριακή κυτταρίνη μπορεί να αποκτήσει τη γεύση και τη χρωστική ουσία του μέσου. Οι ίνες της βακτηριακής κυτταρίνης οι οποίες είναι εντός νανοκλίμακας καθώς και η τρισδιάστατη δομή του δικτύου της, της επιτρέπουν τη χρήση της σε καινοτόμες διεργασίες παρασκευής τροφίμων (Shi et al., 2014).

Μια από τις πρώτες χρήσεις της βακτηριακής κυτταρίνης είναι η παραγωγή του nata-de-coco, ενός επιδορπίου στις Φιλιππίνες. Τα θρεπτικά συστατικά του νερού της καρύδας χρησιμοποιούνται ώστε να παραχθεί βακτηριακή κυτταρίνη. Το nata-de-

coco έχει γίνει δημοφιλές και εξαπλώνεται γρήγορα σε όλο τον κόσμο σε μορφή επιδορπίου ή ζαχαρωτού (Ullah et al., 2016).

Η βακτηριακή κυτταρίνη έχει εφαρμοστεί ως πρόσθετο λειτουργικό τρόφιμο και ως πηκτικό μέσο. Σε συνδυασμό με το μύκητα *Monascus* μπορεί να αποτελέσει ιδανικό μέσο αντικατάστασης του κρέατος και των θαλασσινών (Keshk et al., 2014). Ο *Monascus* χρησιμοποιούνταν στην αρχαία Κίνα σαν πρόσθετο τροφίμων ως χρωστική και αρωματική ουσία σε τρόφιμα και ποτά. Η μονακολίνη K είναι ένας σημαντικός μεταβολίτης του *Monascus* που μειώνει τη σύνθεση της χοληστερόλης. Σε συνδυασμό με τις διαιτητικές ίνες του nata-de-coco όπου μειώνουν τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα και βοηθούν στην καλύτερη λειτουργία του εντέρου μπορούν να αποτελέσουν ένα καινοτόμο λειτουργικό τρόφιμο (Ng et al., 2004).

Οι λιπαρές ύλες παίζουν σημαντικό ρόλο στην υφή και στις ιδιότητες πολλών τροφίμων. Παρ'όλα αυτά, η κατανάλωση τροφίμων με υψηλή περιεκτικότητα λιπαρών σχετίζεται με αρκετά προβλήματα υγείας. Γι'αυτό έχουν γίνει πολλές προσπάθειες ώστε να αντικαταστεί το λίπος με άλλα προϊόντα τα οποία να έχουν τις ιδιότητές του, μειώνοντας παράλληλα την θερμιδική αξία και τα προβλήματα υγείας που σχετίζονται με το λίπος. Η βακτηριακή κυτταρίνη έχει χρησιμοποιηθεί για την αντικατάσταση του λίπους σε κεφτεδάκια (Azeredo et al., 2019). Ακόμη, σύμφωνα με τους Akoglu et al. (2018) η βακτηριακή κυτταρίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υποκατάστατο του λίπους σε μαγιονέζα χαμηλών λιπαρών. Φάνηκε πως η προσθήκη της επηρέασε μόνο το χρώμα και την στιλπνότητα ενώ δεν επηρέασε σημαντικά την οσμή, την λιπαρότητα και την γεύση του προϊόντος.

Τέλος, οι μεμβράνες της κυτταρίνης χρησιμοποιούνται για τη συσκευασία των τροφίμων καθώς αποτελούν ένα πολλά υποσχόμενο αντιμικροβιακό υλικό και είναι συμβατές με διάφορους τύπους προϊόντων διατροφής. Έχει αποδειχθεί ότι οι μεμβράνες μειώνουν σημαντικά την απώλεια υγρασίας και απορροφούν το λάδι από τα τηγανητά τρόφιμα. Επίσης, οι νανοΐνες της κυτταρίνης μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως επικάλυψη σε φρούτα και λαχανικά για την καλύτερη συντήρησή τους (Lin et al., 2020).

1.6.2 Εφαρμογή στη Φαρμακευτική και Ιατρική

Η βακτηριακή κυτταρίνη έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε επιδέσμους επούλωσης πληγών (Εικόνα 5) λόγω της υψηλής βιοσυμβατότητας, της αντοχής σε εφελκυσμό, στο υψηλό πορώδες και στην ικανότητα συγκράτησης νερού που διαθέτει. Οι επίδεσμοι αυτοί διατηρούν ένα υγρό περιβάλλον και μειώνουν τον πόνο της πληγής. Ακόμη, είναι απαλλαγμένοι από μικροβιακές λοιμώξεις και είναι εύκολη η αντικατάστασή τους (Pang et al., 2020).



Εικόνα 5 Τοποθέτηση της βακτηριακής κυτταρίνης ως τεχνητό δέρμα σε πρόσωπο και σώμα (Gorgieva et al., 2019)

Η βακτηριακή κυτταρίνη έχει εφαρμογή και σε σοβαρά εγκαύματα δημιουργώντας ένα ευνοϊκό περιβάλλον για γρήγορη επούλωση. Σύμφωνα με έρευνα, βακτηριακή κυτταρίνη τοποθετήθηκε στην επιφάνεια προσώπου ενός ασθενή με σοβαρά εγκαύματα δευτέρου βαθμού και μετά από 44 ημέρες το πρόσωπο είχε θεραπευτεί εξ ολοκλήρου χωρίς να χρειάζεται μόσχευμα (Fu et al., 2013). Επιπλέον, οι ιδιότητες της την καθιστούν κατάλληλη για χρήση σε αγγειακά μοσχεύματα. Έχει ήδη κυκλοφορήσει στην αγορά για μοσχεύματα μεγάλων αιμοφόρων αγγείων (Parte et al., 2020).

Το Biofill και το Gengiflex είναι προϊόντα της βακτηριακής κυτταρίνης τα οποία έχουν εφαρμογές σε χειρουργικά και οδοντικά εμφυτεύματα. Περιπτώσεις με δεύτερου και τρίτου βαθμού εγκαύματα, έλκη και άλλα θα μπορούσαν να

αντιμετωπιστούν επιτυχώς με το Biofill που λειτουργεί ως προσωρινό υποκατάστατο του ανθρώπινου δέρματος. Έχει αναφερθεί πως το Biofill έχει εφαρμογή σε περισσότερες από 300 θεραπείες: άμεση ανακούφιση του πόνου, ταχύτερη επούλωση, μειωμένο ποσοστό μόλυνσης, μειωμένο χρόνο και κόστος θεραπείας κ.α. Το Gengiflex αναπτύχθηκε για να ανακτήσει τους περιοδοντικούς ιστούς (Keshk et al., 2017).

1.6.3 Λοιπές εφαρμογές

Οι ταινίες της βακτηριακής κυτταρίνης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αποκατάσταση παλαιών χάρτινων υλικών, αποτελώντας ισχυρό εργαλείο για τη διατήρηση παλαιών ή και αρχαίων εγγράφων σε βιβλιοθήκες και μουσεία. Η μέθοδος επένδυσης περιλαμβάνει την εφαρμογή ενός στρώματος βακτηριακής κυτταρίνης πάνω στην επιφάνεια των εγγράφων διατηρώντας τα αναλλοίωτα με την πάροδο του χρόνου (Cacicedo et al., 2016).

Ακόμη, η βακτηριακή κυτταρίνη έχει αναφερθεί πως είναι ένα εξαιρετικό μη αλλεργιογόνο βιοπολυμερές για χρήση σε καλλυντικά. Αρχικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μάσκα προσώπου αυξάνοντας την περιεκτικότητα της υγρασίας του δέρματος κρατώντας το ενυδατωμένο. Επιπλέον, έχει χρησιμοποιηθεί για φαρμακευτικά καλλυντικά. Με την προσθήκη κομματιών βακτηριακής κυτταρίνης σε ένα καλλυντικό βελτιώθηκε η διείσδυση των συστατικών του καλλυντικού στο δέρμα με ταυτόχρονη απολέπιση του και απορροφήθηκε το σμήγμα (Ullah et al., 2016). Τέλος, η βακτηριακή κυτταρίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή φακών επαφής λόγω της διαφάνειας, της διαπερατότητας του φωτός και της διαπερατότητας σε υγρά και αέρια που διαθέτει (Ullah et al., 2016).

1.7 Βακτηριακή νανοκυτταρίνη-Παραγωγή-Εφαρμογές

Τα τελευταία χρόνια έχει αποδειχθεί η σημασία των ιδιοτήτων των βιοπολυμερών σε διάφορες εφαρμογές και ιδίως στα βιοπολυμερή που προέρχονται από μικροοργανισμούς όπως είναι για παράδειγμα η βακτηριακή νανοκυτταρίνη (Πίνακας 2) (Jozala et al., 2016). Γενικά, είναι αποδεκτό ότι η δομή της βακτηριακής νανοκυτταρίνης διαφέρει ανάλογα με την πηγή προέλευσης και τις μεθόδους

καλλιέργειας που χρησιμοποιούνται. Οι πιο γνωστές μέθοδοι παραγωγής βακτηριακής νανοκυτταρίνης είναι η όξινη και η ενζυμική υδρόλυση. Η γενική διαδικασία απομόνωσης των νανοκρυστάλλων της βακτηριακής κυτταρίνης βασίζεται στην όξινη υδρόλυση (Choi et al., 2020).

Οι Yan et al. (2019) χρησιμοποίησαν τους νανοκρυστάλλους της βακτηριακής κυτταρίνης οι οποίοι προέκυψαν από υδρόλυση με θειικό οξύ για την σταθεροποίηση των γαλακτωμάτων σε υδρόφοβα φάρμακα. Η υδρόλυση είχε ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση των άμορφων συστατικών και τη διάσπαση των κρυσταλλικών μικροϊνών κάνοντας τους νανοκρυστάλλους της βακτηριακής κυτταρίνης να έχουν υψηλή κρυσταλλικότητα και καλές κολλοειδείς ιδιότητες.

Οι George et al. (2011) παρήγαγαν νανοκρυστάλλους βακτηριακής κυτταρίνης μέσω ενζυμικής και όξινης υδρόλυσης και παρατήρησαν πως οι νανοκρυστάλλοι οι οποίοι προερχόταν μέσω της ενζυμικής υδρόλυσης είχαν σχεδόν διπλάσια θερμική σταθερότητα σε σχέση με αυτούς της όξινης υδρόλυσης. Έτσι, ενσωμάτωσαν τους νανοκρυστάλλους της βακτηριακής κυτταρίνης που είχαν προκύψει μέσω της ενζυμικής υδρόλυσης στη μήτρα της πολυβινυλικής αλκοόλης και δημιούργησαν ένα φιλμ με βελτιωμένη θερμική σταθερότητα και μηχανικές ιδιότητες.

Πίνακας 2 Ιδιότητες και εφαρμογές της νανοκυτταρίνης (Sharma et al., 2019)

Ιδιότητες	Εφαρμογές
Απορροφητικότητα και αντοχή των ινών	Για επιδέσμους με βάση το χαρτί
Αντοχή στην υγρασία και σε ακραίες θερμοκρασίες	Ως αυτοκόλλητα σε ετικέτες κλινικών δειγμάτων όπως το αίμα τα οποία παραμένουν σε χαμηλές θερμοκρασίες
Αδράνεια-ώστε να αποφευχθεί οποιαδήποτε αντίδραση μεταξύ των χημικών ουσιών και των προϊόντων όταν χρησιμοποιείται ως συσκευασία	Συσκευασία φαρμάκων και χειρουργικών εργαλείων
Αντοχή σε εξαιρετικά υψηλές θερμοκρασίες	Εύκολη αποστείρωση, χρήσιμο για αποστειρωμένες συσκευασίες
Βιοσυμβατότητα	Κατάλληλο για εμφυτεύματα, επιδέσμους, μάσκες προσώπου και πάνες
Βιοαποικοδομησιμότητα	Ιδιαίτερα χρήσιμο για την κατασκευή ικτιωμάτων
Μηχανική αντοχή	Ως εμφυτεύματα μηχανικής των ιστών στα οστά

1.7.1 Όξινη υδρόλυση της κυτταρίνης

Η κύρια διαδικασία διαχωρισμού των νανοκρυστάλλων της βακτηριακής κυτταρίνης από τις ίνες της βασίζεται στην όξινη υδρόλυση. Οι γλυκοσιδικοί δεσμοί στα άμορφα ή διαταραγμένα τμήματα της βακτηριακής κυτταρίνης υδρολύονται πρώτα σε ιόντα υδρογόνου και οι υπόλοιπες κρυσταλλικές περιοχές οι οποίες έχουν υψηλή αντοχή σε οξέα, απελευθερώνουν μεμονωμένους κρυστάλλους. Οι όξινες συνθήκες και οι πηγές της βακτηριακής κυτταρίνης επηρεάζουν την απόδοση και τα χαρακτηριστικά των νανοκρυστάλλων.

Για την υδρόλυση συνήθως χρησιμοποιείται υδροχλωρικό οξύ (HCl), θειικό οξύ (H_2SO_4) και μείγματα των προαναφερθέντων σε διάφορες αναλογίες (Choi et al., 2020). Το HCl δημιουργεί επιφανειακά φορτία χαμηλής πυκνότητας στους νανοκρυστάλλους της κυτταρίνης με περιορισμένη διασπορά νανοκρυστάλλων γεγονός που προάγει την κροκίδωση των υδατικών εναιωρημάτων. Αντίθετα, με τη χρήση H_2SO_4 προάγεται πολύ σταθερό κολλοειδές εναιώρημα λόγω του υψηλού αρνητικού επιφανειακού φορτίου από τη σουλφόνωση της επιφάνειας των νανοκρυστάλλων της κυτταρίνης (Vanconcellos et al., 2017). Το H_2SO_4 μπορεί να υδρολύσει γρήγορα λόγω της ισχυρής υδρολυτικής δράσης του. Παρ'όλα αυτά, το υδροδυναμικό μέγεθος των νανοκρυστάλλων είναι σχετικά μικρό. Οι εξαιρετικά αρνητικά φορτισμένοι νανοκρυστάλλοι της βακτηριακής κυτταρίνης που παράγονται από το H_2SO_4 αποτρέπουν τη συσσώρευση των νανοκρυστάλλων οι οποίοι συνδέονται με δεσμούς υδρογόνου. Με αυτό το τρόπο μπορεί να ληφθεί το εναιώρημα των διασκορπισμένων νανοκρυστάλλων (Choi et al., 2020). Ωστόσο, η παρουσία θειικών ομάδων μειώνει τη θερμοσταθερότητα των νανοκρυστάλλων. Υψηλές συγκεντρώσεις οξέων μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την υδρόλυση τόσο των άμορφων όσο και των κρυσταλλικών περιοχών της κυτταρίνης. Ακόμη, οι παρατεταμένοι χρόνοι υδρόλυσης και οι υψηλότερες θερμοκρασίες προκαλούν

μειωμένη κρυσταλλικότητα και αλλαγές στα μορφολογικά χαρακτηριστικά και στις φυσικές ιδιότητες των νανοκρυστάλλων (Vanconcellos et al., 2017).

1.7.2 Ενζυμική υδρόλυση της κυτταρίνης

Τα τελευταία χρόνια αρκετές εταιρείες έχουν καταβάλει προσπάθειες ώστε να αυξήσουν την αποτελεσματικότητα των κυτταρινολυτικών ενζύμων χρησιμοποιώντας μια διαδικασία που να είναι οικονομικά βιώσιμη βελτιώνοντας την αντίσταση των ενζύμων στη θερμοκρασία και στο pH, αυξάνοντας την ταχύτητα παραγωγής τους και μειώνοντας το κόστος τους.

Η ενζυμική υδρόλυση περιλαμβάνει μηχανισμούς που δρουν και μετατρέπουν τη διάσπαση των μικροϊνών σε μικρούς νανοκρυστάλλους για την υδρόλυση της κυτταρίνης. Οι ενδογλυκανάσες υδρολύουν τυχαία τα άμορφα μέρη των μεγάλων αλυσίδων κυτταρίνης και δημιουργούν μικρότερα κομμάτια κυτταρίνης. Αυτά τα κομμάτια περιλαμβάνουν i) τις ενδο-1,4-β-γλυκανάσες, οι οποίες αποικοδομούν γρήγορα τα άμορφα μέρη των αλυσίδων της κυτταρίνης για τη δημιουργία μικρότερων θραυσμάτων ii) τις εξωγλυκανάσες οι οποίες προσβάλλουν τις μικρές κρυσταλλικές περιοχές της κυτταρίνης και αποικοδομούν την κυτταρίνη διαχωρίζοντας τα μόρια από τα δύο άκρα της αλυσίδας δημιουργώντας έτσι διμερή κελλοβιόξης και iii) τις β-γλυκοσιδάσες, οι οποίες υδρολύουν τις μονάδες κελλοβιόξης που παράγονται κατά τη δράση των ενδο-1,4-β-γλυκανασών και των εξωγλυκανασών για την τελική παραγωγή γλυκόζης (Choi et al., 2020).

2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν, αρχικά, η αξιολόγηση της δυνατότητας παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης χρησιμοποιώντας υδρολύματα πιτύρου σίτου ως θρεπτικό υπόστρωμα ζύμωσης. Για τη δημιουργία υδρολυμάτων, ο μύκητας *Aspergillus awamori* αναπτύχθηκε σε πίτυρο σίτου μέσω ζυμώσεων στερεής κατάστασης προς παραγωγή αμυλολυτικών και πρωτεολυτικών ενζύμων τα οποία χρησιμοποιήθηκαν μετ'έπειτα για την υδρόλυση του πιτύρου σίτου.

Στη συνέχεια, εξετάστηκε η επίδραση διαφορετικών τιμών pH (4,5, 5,2, 6), διαφορετικών λόγων άνθρακα προς άζωτο ελεύθερων αμινομάδων (30, 20, 14, 10) και η παροχή αερισμού στις ζυμώσεις διαλείποντος έργου με το βακτηριακό στέλεχος *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM 15973 προς παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης.

Σε τελικό στάδιο, η βακτηριακή κυτταρίνη υδrolύθηκε με τη χρήση θειικού οξέος προς παραγωγή νανοκυτταρίνης. Τα δείγματα χαρακτηρίστηκαν ως προς τη μορφολογία (Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης), την κρυσταλλικότητα (Φασματοσκοπία περίθλασης ακτίνων-X), το μέγεθος των σωματιδίων (Σκέδαση Φωτός), την απορρόφηση και εκπομπή υπερύθρου φάσματος (FT-IR), τη μέγιστη θερμοκρασία αποσύνθεσης (Θερμοσταθμική ανάλυση) και το ζ-δυναμικό.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Ανανεώσιμη πρώτη ύλη

Τα στερεά υποπροϊόντα που προκύπτουν μετά την διεργασία άλεσης σίτου (πίτυρο σίτου) προμηθεύτηκαν από κατάστημα πώλησης γεωπονικών ειδών. Το πίτυρο σίτου χρησιμοποιήθηκε ως ανανεώσιμη πρώτη ύλη για την πραγματοποίηση αρχικά ζυμώσεων στερεής κατάστασης με σκοπό την παραγωγή ακατέργαστων ενζύμων. Τα ένζυμα χρησιμοποιήθηκαν σε επόμενο στάδιο ως βιοκαταλύτες για την υδρόλυση του πιτύρου σίτου προς παραγωγή αφομοιώσιμων από τους μικροοργανισμούς πηγών άνθρακα και αζώτου όπως και άλλων θρεπτικών στοιχείων. Ο τελικός στόχος ήταν η δημιουργία ενζυμικών υδρολυμάτων που να καλύπτουν τις ανάγκες του μικροοργανισμού για την ανάπτυξή του και την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης.

3.2 Ζυμώσεις στερεής κατάστασης (Solid State Fermentation, SSF)

Οι ζυμώσεις στερεής κατάστασης πραγματοποιήθηκαν με σκοπό την παραγωγή ακατέργαστων πρωτεολυτικών και αμυλολυτικών ενζύμων τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την υδρόλυση αμυλοπρωτεϊνούχων αποβλήτων της βιομηχανίας τροφίμων, και την μετατροπή τους σε θρεπτικά υποστρώματα κατάλληλα για την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης. Η χρήση του μύκητα *Aspergillus awamori* σε ζυμώσεις στερεής κατάστασης έχει στόχο την παραγωγή κυρίως αμυλολυτικών ενζύμων και πρωτεασών τα οποία διασπούν το άμυλο στο μονομερές του, την γλυκόζη.

3.2.1 Παρασκευή εμβολίου για τις ζυμώσεις στερεής κατάστασης με *Aspergillus awamori*

Για την προετοιμασία του εμβολίου των ζυμώσεων στερεής κατάστασης χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη του μύκητα *Aspergillus awamori* 2B.361 U 2/1 τα οποία ήταν διατηρημένα στους -80 °C, σε ελαιώδη νερού με tween (0,01%) και ίσης ποσότητας γλυκερόλης (Koutinas et al., 2001). Το εμβόλιο προετοιμάστηκε σε κωνικές φιάλες των 250 ml οι οποίες αποτελούταν από 50 ml θρεπτικού μέσου (5%

w/v πίτυρο σίτου και 2% w/v άγαρ) και επωάστηκε στους 30 °C για 4-5 μέρες, μέχρι τη δημιουργία σπορίων.

Όλα τα υλικά, τα σκεύη και τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν, αποστειρώθηκαν προηγουμένως σε αυτόκαυστο στους 121 °C για 20 λεπτά. Επίσης, όλοι οι χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής (τύπου HOLTEN-TL2448), ασηπτικά.

3.2.2 Εμβολιασμός και ζύμωση στερεής κατάστασης του μύκητα *Aspergillus awamori* σε πίτυρο σίτου

Κατά τη ζύμωση στερεής κατάστασης πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός και ανάπτυξη του μύκητα *Aspergillus awamori* 2B.361 U 2/1 σε πίτυρο σίτου. Στόχος ήταν η παραγωγή ακατέργαστων πρωτεασών και αμυλασών με την αξιοποίηση του πιτύρου σίτου ως υπόστρωμα.

Πειραματική πορεία

Στα ανεπτυγμένα εμβόλια προστέθηκαν 50 ml νερού-tween (0,01%) και μικρά γυάλινα σφαιρίδια διαμέτρου 2 mm για την δημιουργία εναιωρήματος πλούσιο σε σπόρια. Ο γαλακτωματοποιητής συμβάλει στην επίτευξη διασποράς των σπορίων του μύκητα στο θρεπτικό μέσο κατά τον εμβολιασμό. Η μικροσκοπική μέτρηση των σπορίων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση αιμοκυτομέτρου Thomas. Η ζύμωση στερεής κατάστασης πραγματοποιήθηκε σε κωνικές φιάλες των 250 ml, στις οποίες προστέθηκαν 5 g πιτύρου σίτου.

Ο εμβολιασμός με το εναιώρημα των σπορίων πραγματοποιήθηκε με $1 \cdot 10^7$ σπόρια ανά γραμμάριο πιτύρου προσέχοντας να διαβραχεί ομοιόμορφα όλη η επιφάνειά τους ώστε να επιτευχθεί ομοιόμορφη ανάπτυξη του μύκητα. Η ποσότητα του νερού με Tween 80 και του εναιωρήματος σπορίων ήταν τόση έτσι ώστε το ποσοστό υγρασίας του υποστρώματος να είναι 65% . Η περιεκτικότητα σε υγρασία αποτελεί μια από τις πιο σημαντικές παραμέτρους για τη βελτιστοποίηση στη ζύμωση στερεής κατάστασης. Μετά τον εμβολιασμό οι φιάλες τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο στους 30 °C.

Όλα τα υλικά, τα σκεύη και τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν, αποστειρώθηκαν προηγουμένως σε αυτόκαυστο στους 121 °C για 20 λεπτά. Επίσης, όλοι οι χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής (τύπου HOLTEN-TL2448), ασηπτικά.

3.2.3 Προσδιορισμός της ενζυμικής ενεργότητας

Κατά τη ζύμωση στερεής κατάστασης μελετήθηκε η ενεργότητα της γλυκοαμυλάσης, της πρωτεάσης, της μαλτάσης και της φυτάσης.

➤ Ενεργότητα γλυκοαμυλάσης

Οι βέλτιστες συνθήκες για τον προσδιορισμό της γλυκοαμυλάσης ρυθμίστηκαν στους 55 °C και σε 4,5 pH με τη βοήθεια ρυθμιστικού διαλύματος οξικού οξέος. Η δραστηριότητα της γλυκοαμυλάσης προσδιορίστηκε με τη μέτρηση της ποσότητας των αναγόντων σακχάρων, με τη μέθοδο δινιτροσαλικυλικού οξέος (Παράγραφος 3.7.1), που απελευθερώθηκε ανά λεπτό χρησιμοποιώντας άμυλο 1% w/v ως υπόστρωμα.

Μονάδα (Unit) ενεργότητας γλυκοαμυλάσης: η ποσότητα της γλυκοαμυλάσης που απαιτείται για την παραγωγή 1mg γλυκόζης ανά λεπτό.

➤ Ενεργότητα μαλτάσης

Οι βέλτιστες συνθήκες για τον προσδιορισμό της μαλτάσης ρυθμίστηκαν στους 55 °C και σε 4,5 pH με τη βοήθεια ρυθμιστικού διαλύματος οξικού οξέος. Η δραστηριότητα της μαλτάσης προσδιορίστηκε με τη μέτρηση της ποσότητας των αναγόντων σακχάρων, με τη μέθοδο δινιτροσαλικυλικού οξέος (Παράγραφος 3.7.1), που απελευθερώθηκε ανά λεπτό χρησιμοποιώντας μαλτόζη 1,5% w/v ως υπόστρωμα.

Μονάδα (Unit) ενεργότητας μαλτάσης: η ποσότητα της μαλτάσης που απαιτείται για την παραγωγή 1mg γλυκόζης ανά λεπτό.

➤ Ενεργότητα πρωτεάσης

Οι βέλτιστες συνθήκες για τον προσδιορισμό της πρωτεάσης ρυθμίστηκαν στους 55 °C και σε 7 pH με τη βοήθεια φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος. Η δραστηριότητα

της πρωτεάσης προσδιορίστηκε με τη μέτρηση της ποσότητας του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN) (Παράγραφος 3.7.2) που απελευθερώθηκε ανά λεπτό χρησιμοποιώντας καζεΐνη 0,75% w/v ως υπόστρωμα.

Μονάδα (Unit) ενεργότητας πρωτεάσης: η ποσότητα της πρωτεάσης που απαιτείται για την παραγωγή 1μg FAN ανά λεπτό.

➤ **Ενεργότητα φυτάσης**

Οι βέλτιστες συνθήκες για τον προσδιορισμό της φυτάσης ρυθμίστηκαν στους 55 °C και σε 4,5 pH με τη βοήθεια ρυθμιστικού διαλύματος οξικού οξέος. Η δραστητικότητα της φυτάσης προσδιορίστηκε με τη μέτρηση της ποσότητας του φωσφόρου (Παράγραφος 3.7.3) που απελευθερώθηκε ανά λεπτό χρησιμοποιώντας φυτικό οξύ 0,2% w/v ως υπόστρωμα.

Μονάδα (Unit) ενεργότητας φυτάσης: η ποσότητα της φυτάσης που απαιτείται για την παραγωγή 1μg φωσφόρου ανά λεπτό.

3.3 Υδρόλυση πιτύρου σίτου προς παραγωγή κατάλληλου θρεπτικού μέσου καλλιέργειας

Μέσω των ενζύμων που είχαν παραχθεί κατά τη ζύμωση στερεής κατάστασης από τον μύκητα *Aspergillus awamori* 2B.361 U 2/1 πραγματοποιήθηκε ενζυμική υδρόλυση του πιτύρου σίτου. Ο σκοπός της υδρόλυσης ήταν η παραγωγή ενός θρεπτικού μέσου κατάλληλου για την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης.

Πειραματική πορεία

Αρχικά, 100 g πιτύρου σίτου αναμίχθηκαν σε οικιακό μπλέντερ με 900 ml απεσταγμένου νερού μέχρι να ομογενοποιηθούν. Στη συνέχεια, το μίγμα μεταφέρθηκε σε μπουκάλι Duran του 1 L το οποίο τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο στους 85 °C και με τη βοήθεια μαγνητικών αναδευτήρων αναδεύτηκε για 20 λεπτά ώστε να ζελατινοποιηθεί το άμυλο του πιτύρου σίτου.

Μετά το πέρας των 20 λεπτών το μπουκάλι Duran αφέθηκε να κρυώσει ώστε το περιεχόμενο του να φτάσει στους 55 °C ώστε να μην επηρεαστούν τα ακατέργαστα ένζυμα τα οποία προστέθηκαν στη συνέχεια. Στο οικιακό μπλέντερ τοποθετήθηκαν οχτώ κωνικές φιάλες της ζύμωσης στερεής κατάστασης του μύκητα *Aspergillus awamori* 2B.361 U 2/1 και το μίγμα από το μπουκάλι Duran και αναμίχθηκαν ώσπου να ομογενοποιηθούν.

Το ομογενοποιημένο μίγμα μεταφέρθηκε σε ογκομετρικό κύλινδρο και έγινε προσθήκη νερού μέχρι ο τελικός όγκος να φτάσει το 1 L. Το μίγμα μοιράστηκε ισόποσα σε δυο δοχεία Duran του 1 L (500 ml/ δοχείο). Τα δυο μπουκάλια Duran τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο, όπου αναδεύτηκαν με τη βοήθεια μαγνητικών αναδευτήρων στους 55 °C. Οι μικροοργανισμοί είναι ευαίσθητοι στις αλλαγές στις τιμές του pH καθώς επηρεάζεται η ανάπτυξη των μικροοργανισμών και ως εκ τούτου η παραγωγή εξωκυτταρικών ενζύμων.

Μετά το πέρας της υδρόλυσης ακολούθησε φιλτράρισμα με τούλι ώστε να απομακρυνθούν τα στερεά μεγάλης διαμέτρου και στη συνέχεια φυγοκέντρωση (20 min, 9000 rpm, 4 °C) σε φυγόκεντρο (τύπου Heraeus Sepatech Suprafuge 22) ώστε να απομακρυνθούν όλα τα στερεά. Το υπερκείμενο υγρό αποθηκεύτηκε σε κατάψυξη μέχρι περαιτέρω επεξεργασίας.

Όλα τα υλικά, τα σκεύη και τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν, αποστειρώθηκαν προηγουμένως σε αυτόκαυστο στους 121 °C για 20 λεπτά. Επίσης, όλοι οι χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής (τύπου HOLTEN-TL2448), ασηπτικά και το οικιακό μπλέντερ πριν από κάθε χρήση του είχε πλυθεί για αρκετή ώρα με διάλυμα αιθανόλης 70% (v/v).

3.4 Υγρές ζυμώσεις διαλείποντος έργου (batch) για παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης

Σε αυτό το στάδιο πραγματοποιήθηκε μια σειρά υγρών ζυμώσεων διαλείποντος έργου, υπό μικροαερόβιες συνθήκες, που στόχο είχαν την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης. Ως θρεπτικό υπόστρωμα ζύμωσης χρησιμοποιήθηκαν υδρολύματα προερχόμενα από αμυλοπρωτεϊνούχα απόβλητα της βιομηχανίας τροφίμων. Όταν τα απόβλητα αυτά περιέχουν υψηλά επίπεδα αμύλου, πρωτεϊνών και μικροθρεπτικά

συστατικά είναι χρήσιμα στις διαδικασίες ζύμωσης για την παραγωγή άλλων βιομηχανικών προϊόντων μειώνοντας ταυτόχρονα τη ρύπανση του περιβάλλοντος.

3.4.1 Μικροοργανισμός και ανανέωση του λυοφιλιωμένου βιολογικού υλικού

Το βακτηριακό στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη για την παραγωγή μικροβιακής κυτταρίνης ήταν το *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM 15973. Το βακτήριο απομονώθηκε από μαυροκέρασο και προμηθεύτηκε από το Ινστιτούτο Leibniz-DSMZ της Γερμανίας (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures).

Για να εξασφαλιστεί η καλή ανάπτυξη του στελέχους μετά την παραλαβή του σε λυοφιλιωμένη μορφή χρησιμοποιήθηκε μέσο καλλιέργειας που αποτελούνταν από 100 g/L γλυκόζη, 10 g/L εκχύλισμα ζύμης (yeast extract), 20 g/L CaCO_3 και 15 g/L άγαρ. Το pH του μέσου ρυθμίστηκε στο 6,8 και η θερμοκρασία επώασης στους 30 °C. Τρυβλία Petri πληρώθηκαν με το μέσο καλλιέργειας και εφαρμόστηκε η τεχνική επίστρωσης με χρήση μικροβιακού κρίκου.

3.4.2 Παρασκευή εμβολίου και αποθήκευση

Για την παρασκευή του εμβολίου/προκαλλιέργειας χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό μέσο που περιείχε 20 g/L γλυκόζη, 5 g/L εκχύλισμα ζύμης, 5 g/L βακτηριακή πεπτόνη, 2,74 g/L Na_2HPO_4 και 1,15 g/L κιτρικό οξύ (Schramm & Hestrin, 1954). Το pH του μέσου ρυθμίστηκε στο 6,0 με 5 M NaOH. Η υγρή προκαλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε κωνικές φιάλες των 250 mL οι οποίες τοποθετήθηκαν σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο στους 30 °C, 120 rpm για 48 ώρες. Το βακτηριακό στέλεχος αποθηκεύτηκε στους -80 °C σε ειδικού τύπου φιαλίδια (2 ml) που περιείχαν 1 ml γλυκερόλη και 1 ml προκαλλιέργειας.

3.4.3 Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης

Οι ζυμώσεις διαλείποντος έργου πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες των 250 mL με ενεργό όγκο 50 ml όπου το 10% v/v αποτελούσε το εμβόλιο. Οι κωνικές φιάλες τοποθετήθηκαν σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο στους 30 °C στις 120 rpm για 1

ημέρα και στην συνέχεια παρέμειναν στατικά στους 30 °C. Το pH αρχικά ρυθμιζόταν στο 6 με 5 M NaOH. Η διάρκεια των ζυμώσεων ήταν 8-14 ημέρες.

Όλες οι βακτηριακές ζυμώσεις είχαν ως βάση το μέσο καλλιέργειας Hestrin και Schramm (Hestrin and Schramm 1954). Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν υδρολύματα πιτύρου των οποίων η σύσταση σε πηγές άνθρακα και άζωτο ρυθμιζόταν στο επιθυμητό (κατά Hestrin και Schramm) μέσω κατάλληλων αραιώσεων ανάλογα με τις απαιτήσεις του κάθε πειράματος. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων κατά τις οποίες μελετήθηκε η επίδραση διαφορετικών τιμών pH (4,5, 5,2, 6) στην παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης. Σε επόμενο σετ πειραμάτων αξιολογήθηκαν τέσσερις λόγοι άνθρακα προς άζωτο ελεύθερων αμινομάδων (free amino nitrogen-FAN) (30, 20, 14, 10) προσαρμόζοντας κάθε φορά την ποσότητα του απαιτούμενου εκχυλίσματος ζύμης ενώ η αρχική συγκέντρωση άνθρακα διατηρούνταν σταθερή (20 g/L).

Ακόμη, πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις σε στατικούς βιοαντιδραστήρες με επιφάνεια 15×15 cm² και παροχή αερισμού 0,25 vvm με ενεργό όγκο 250 ml. Η παροχή οξυγόνου ξεκίνησε από τη δεύτερη ημέρα της ζύμωσης.

Όλα τα υλικά, τα σκεύη και τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν, αποστειρώθηκαν προηγουμένως σε αυτόκαυστο στους 121 °C για 20 λεπτά. Επίσης, όλοι οι χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής (τύπου HOLTEN-TL2448).

3.4.4 Παραλαβή και καθαρισμός της βακτηριακής κυτταρίνης

Η βακτηριακή κυτταρίνη που είχε τη μορφή ενυδατωμένων μεμβρανών αρχικά πλύθηκε με απεσταγμένο νερό ώστε να απομακρυνθούν τα υπολείμματα της καλλιέργειας. Στη συνέχεια, η μεμβράνη εμβαπτίστηκε σε 0,01 M NaOH και ακολούθησε βρασμός για 30 λεπτά ώστε να εξουδετερωθούν τα βακτηριακά κύτταρα. Μετά το πέρας του βρασμού, η βακτηριακή κυτταρίνη πλύθηκε αρκετές φορές με απεσταγμένο νερό και αφέθηκε για μερικές ώρες στο νερό ώστε να επιτευχθεί ουδέτερη τιμή pH. Με τη βοήθεια μιας λαβίδας, η μεμβράνη αφαιρέθηκε από το νερό τοποθετήθηκε σε φούρνο στους 30 °C μέχρι να επιτευχθεί σταθερό βάρος.

3.5 Υδρόλυση βακτηριακής κυτταρίνης προς παραγωγή βακτηριακής νανοκυτταρίνης

Αρχικά, η λυοφιλιωμένη βακτηριακή κυτταρίνη θρυμματίστηκε με τη χρήση σφυρόμυλου (ECB mill, Casella Company London). Στη συνέχεια, ακολούθησε η ομογενοποίηση υδατικού διαλύματος βακτηριακής κυτταρίνης, με ομογενοποιητή υψηλής διάτμησης (IKA, ultra-turrax t 25 basic), για 5 λεπτά σε 10,000 rpm, με σκοπό τη δημιουργία ενός ομοιόμορφου εναιωρήματος. Έπειτα, προστέθηκε πυκνό θειικό οξύ ώστε η τελική συγκέντρωση του διαλύτη να φτάσει το 50% w/v H₂SO₄. Η διαδικασία έγινε σταδιακά με τη χρήση υδατόλουτρο πάγου ώστε να αποφευχθεί η απότομη αύξηση της θερμοκρασίας και επομένως η καταστροφή της βακτηριακής κυτταρίνης. Η υδρόλυση πραγματοποιήθηκε σε 2 χρόνους (24 και 32 ώρες). Η αρχική συγκέντρωση της βακτηριακής κυτταρίνης ήταν 10 g/L και η υδρόλυση πραγματοποιήθηκε στους 55 °C, 500 rpm σε μαγνητικό αναδευτήρα με θερμαινόμενη εστία (witeg MSH-20D). Με το πέρας της υδρόλυσης, πραγματοποιήθηκε αραίωση κατά 5 φορές με απιονισμένο νερό ώστε να σταματήσει η αντίδραση. Στη συνέχεια προστέθηκαν 0,5% v/v υπεροξειδίου του υδρογόνου (30%). Το εναιώρημα φυγοκεντρήθηκε στις 3,000 rpm για 15 λεπτά στους 4 °C. Στη συνέχεια οι κρύσταλλοι συλλέχθηκαν, επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε υπερκάθαρο νερό και υποβλήθηκαν σε υπερήχους (60 kHz, 300 W – Sonoplus 3200, Bandelin GmbH & Co. Berlin, Germany), για 3 λεπτά. Η διαδικασία της φυγοκέντρωσης και των υπερήχων επαναλήφθηκε δύο φορές, με σκοπό την απομάκρυνση της περίσσειας οξέος. Η παραγόμενη νανοκυτταρίνη τοποθετήθηκε σε μεμβράνες αντίστροφης όσμωσης (Medicell Membranes Ltd) με cut off μοριακού βάρους 12,000–14,000 Da. Το υπερκάθαρο νερό ανανεωνόταν έως ότου η τιμή του pH να γίνει ουδέτερη. Τέλος, η βακτηριακή νανοκυτταρίνη λυοφιλιώθηκε και αποθηκεύτηκε ώστε να είναι έτοιμη για περαιτέρω χαρακτηρισμό.

3.6 Προσδιορισμός χημικών αναλύσεων βακτηριακής κυτταρίνης και βακτηριακής νανοκυτταρίνης

3.6.1 Ικανότητα συγκράτησης νερού

Η ικανότητα συγκράτησης νερού (water holding capacity - WHC) υπολογίστηκε μέσω της μεθόδου της ανακίνησης κατά την οποία η μεμβράνη αφαιρέθηκε από το νερό με μια λαβίδα, τινάχτηκε δύο φορές και ζυγίστηκε. Εν συνεχεία ακολούθησε ξήρανση στους 30 °C έως σταθερού βάρους. Η WHC υπολογίστηκε ως η μάζα του νερού που αφαιρέθηκε κατά την ξήρανση διαιρούμενη με το βάρος της ξηρής βακτηριακής κυτταρίνης (Schrecker et al., 2005).

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

3.6.2 Μελέτη της μορφολογίας με χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης

Η ανάλυση της μορφολογίας των δειγμάτων έγινε με την χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (Field Emission Scanning Electron Microscope - FESEM). Το μηχάνημα που χρησιμοποιήθηκε (JEOL JSM-7610FPlus Field Emission SEM) συνδυάζει δύο υπάρχουσες τεχνολογίες – έναν ανιχνευτή ημι-φακού με ενσωματωμένο φίλτρο ενέργειας ηλεκτρονίων (r-filter) και ένα σύστημα εκπομπής πεδίου Schottky εντός του φακού- με σκοπό την παροχή εξαιρετικά υψηλών χωρικών αναλύσεων, με ένα ευρύ φάσμα εντάσεων (1 pA έως περισσότερα από 200 nA). Επιπλέον, προσφέρει μεγέθυνση έως 1.000.000× με ανάλυση 0,8 nm στα 15 kV (1,0 nm στα 1 kV) και πολύ υψηλή σταθερότητα δέσμης, καθιστώντας δυνατή την παρατήρηση της μορφολογίας των νανοδομών. Ενσωματώνει, επίσης, με επιτυχία ένα ολοκληρωμένο σύνολο ανιχνευτών για δευτερεύοντα ηλεκτρόνια, ηλεκτρόνια οπίσθιου διασκορπισμού, φασματοσκοπία ακτινών X διασποράς ενέργειας (EDS), WDS, STEM, EBSD και CL. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε ένα πλέγμα χαλκού και οπτικοποιήθηκαν μέσω του ψεκασμού τους με ένα λεπτό χρυσό φιλμ.

3.6.3 Δυναμικό επιφανείας

Το δυναμικό επιφανείας ή το ζ δυναμικό τόσο της βακτηριακής κυτταρίνης όσο και της βακτηριακής νανοκυτταρίνης ύστερα από υδρόλυση προσδιορίστηκαν μέσω Dynamic Laser Light Scattering (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Worcestershire, UK) σε θερμοκρασία δωματίου. Καθώς το ζ δυναμικό σχετίζεται με την ηλεκτροφορητική κινητικότητα των σωματιδίων υπολογίζεται από τη μετρούμενη ταχύτητα χρησιμοποιώντας την εξίσωση του Smoluchowski (Paximada et al., 2016). Η μέτρηση της τιμής του ζ δυναμικού έγινε σε εναιωρήματα λυοφιλιωμένων δειγμάτων με συγκέντρωση 3,75 g/L. Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν το υπερκάθαρο νερό για να αποφευχθούν πολλαπλά φαινόμενα σκέδασης.

3.6.4 Στατική και Δυναμική Σκέδαση φωτός

Τα πειράματα σκέδασης φωτός πραγματοποιήθηκαν σε σύστημα γωνιομέτρου με ψηφιακό αυτο-συσχετιστή ALV-CG-3/ALV-5000/EPP με λέιζερ He-Ne ($\lambda = 632.8 \text{ nm}$) σύμφωνα με τους Papagiannopoulos και Vlassi (2019). Στη στατική σκέδαση φωτός (SLS) η μέση τιμή (στο χρόνο) της σκεδαζόμενης έντασης συλλέγεται και ανάγεται στο λόγο Rayleigh $R(q)$. Από την προσέγγιση Guinier για τον παράγοντα μορφής $P(q)$ λαμβάνεται η γυροσκοπική ακτίνα (R_g) των σωματιδίων. Στη δυναμική σκέδαση φωτός (DLS) η εξίσωση Stokes-Einstein οδηγεί στην υδροδυναμική ακτίνα (R_h). Ο συντελεστής σχήματος που ορίζεται ως $\rho = R_g/R_h$ χαρακτηρίζει το σχήμα των σωματιδίων σκέδασης. Οι συναρτήσεις αυτοσυσχέτισης πεδίου αναλύθηκαν με τον αλγόριθμο CONTIN για την εξαγωγή της κατανομής των υδροδυναμικών ακτινών. Συλλέχθηκαν δεδομένα σκέδασης φωτός SLS και DLS σε ένα ευρύ γωνιακό εύρος από $\theta = 30^\circ$ έως $\theta = 130^\circ$.

3.6.5 Θερμοσταθμική ανάλυση TGA

Η θερμοσταθμική ανάλυση των δειγμάτων της βακτηριακής κυτταρίνης και της βακτηριακής νανοκυτταρίνης πραγματοποιήθηκε υπό αδρανή ατμόσφαιρα N_2 (ροή 50 ml/min) σε σύστημα (Thermogravimetric Analysis System TA Instruments, TGA Q500). Περίπου 5-10 mg από κάθε δείγμα ζυγίστηκαν σε ειδικό δοχείο και

θερμάνθηκαν υπό τη ροή αζώτου ώστε να αποτραπεί η οξείδωση των δειγμάτων. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η αύξηση της θερμοκρασίας από τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος έως τους 1000 °C με ρυθμό αύξησης 10 K/min.

3.6.1 Φασματοσκοπία περίθλασης ακτίνων –X

Η κρυσταλλικότητα των δειγμάτων μετρήθηκε μέσω ανάλυσης περίθλασης ακτίνων X (X Ray Diffraction - XRD). Τα λυοφιλιωμένα δείγματα της βακτηριακής κυτταρίνης και της νανοκυτταρίνης τοποθετήθηκαν σε τριχοειδείς σωλήνες διαμέτρου 0,5 mm (Hilgenberg tubes). Κάθε τριχοειδής σωλήνας τοποθετήθηκε στην γωνιομετρική κεφαλή περιθλασιμέτρου Bruker D8-VENTURE γεωμετρίας-kappa με Cu Kα πηγή ακτίνων-X ($\lambda = 1.54178 \text{ \AA}$) και 2-D ανιχνευτή Photon100 και ακτινοβολήθηκε εκτελώντας πλήρη περιστροφή ($\varphi = 360^\circ$) για 180 s. Οι δακτύλιοι Debye που προέκυψαν, ολοκληρώθηκαν με βήμα $0,05^\circ$ χρησιμοποιώντας το λογισμικό APEX3 της Bruker (Bruker 2012) και τα αποτελέσματα απεικονίζονται με τη βοήθεια του προγράμματος PROFEX (Dobelin et al., 2015).

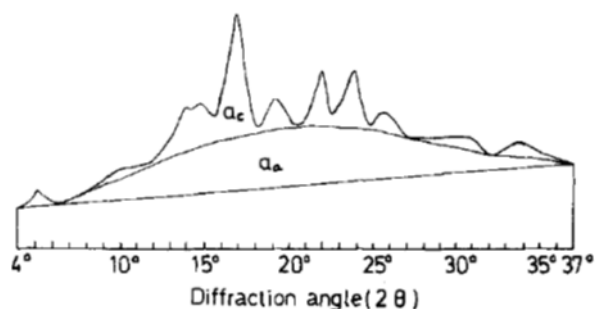
Ο δείκτης κρυσταλλικότητας (CrI-Crystallinity Index) υπολογίστηκε για κάθε δείγμα χρησιμοποιώντας το λογισμικό EVA της Bruker (Bruker 2012) και την ακόλουθη εξίσωση που δίνεται από τους Nara και Komiya (Nana και Komiya., 1983).

$$\text{CrI}(\%) = \frac{a_c}{a_a} \cdot 100\%$$

Όπου,

a_c : το εμβαδόν που ορίζεται από τη γραμμή βάσης (η ομαλή καμπύλη που ενώνει τα ελάχιστα της έντασης που αντιστοιχεί σε κρυσταλλικότητα) και την καμπύλη της έντασης στο περιθλασίγραμμα (Εικόνα 5).

a_a : Εμβαδόν περιοχής που ορίζεται από την ευθεία γραμμή που ενώνει την ένταση στα όρια 2θ του περιθλασιγράμματος και την καμπύλη της έντασης στο περιθλασίγραμμα. Περιέχει και την περιοχή υποβάθρου (άμορφο) που ορίζεται από την ευθεία και τη γραμμή βάσης (Εικόνα 6).



Εικόνα 6 Περιθλασίγραμμα υπολογισμού συντελεστών για υπολογισμό δείκτη κρυσταλλικότητας

3.6.2 Φασματοσκοπία Υπερύθρου Μετασχηματισμού Fourier (FT-IR)

Οι μετρήσεις φασματοσκοπίας υπερύθρου (ATR-FTIR) πραγματοποιήθηκαν σε όργανο Bruker Equinox 55 Fourier Transform Instrument, εξοπλισμένο με εξάρτημα διαμαντιού ολικής ανάκλασης (ATR) από την SENS-IR και μια πρέσα. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στο κέντρο του υποδοχέα, υπό ροή αζώτου και καταγράφηκαν 64 σαρώσεις στο εύρος $525\text{--}5000\text{ cm}^{-1}$ με φασματική ανάλυση 4 cm^{-1} . Συλλέχθηκαν δύο φάσματα σε διαφορετικές φορτώσεις κάθε δείγματος για επιβεβαίωση της επαναληψιμότητας.

3.7 Χημικές Αναλύσεις

3.7.1 Προσδιορισμός πηγών άνθρακα

Φωτομετρική μέθοδος του δινιτροσαλικυλικού οξέος

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της γλυκόζης στα πειράματα προσδιορισμού ενζυμικής ενεργότητας (Παράγραφος 3.2.3) είναι η φωτομετρική μέθοδος του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS). Με τη συγκεκριμένη μέθοδο προσδιορίζονται τα ανάγοντα σάκχαρα. Ως ανάγοντα σάκχαρα, χαρακτηρίζονται τα σάκχαρα που εμφανίζουν μια ελεύθερη ημιακεταλική ομάδα στο ανώτερο άτομο άνθρακα. Η αλδεϋδική ομάδα της γλυκόζης, η οποία είναι το ανάγον σάκχαρο,

ανάγει το 3,5-δινιτροσαλικυλικό οξύ προς 3-αμινο-5-νιτροσαλικυλικό οξύ παρουσία καυστικού νατρίου. Ταυτόχρονα οξειδώνεται η γλυκόζη προς γλυκονικό οξύ (Kuszmarn, 2006).

Προετοιμασία-Παρασκευή αντιδραστηρίων

Αντιδραστήριο DNS: Σε αυτό το αντιδραστήριο 200 ml καυστικού νατρίου 2N προστίθενται σε 500 ml απεσταγμένου νερού και εφαρμόζεται ήπια θέρμανση. Στη συνέχεια, διαλύονται αργά 10 g 3,5 δινιτροσαλικυλικό οξύ (DNS) και προστίθενται με τον ίδιο ρυθμό 300 g τρυγικού νατρίου. Συμπληρώνεται με απεσταγμένο νερό μέχρι ο τελικός όγκος του διαλύματος να είναι 1 L. Το διάλυμα αποθηκεύεται σε σκούρο μπουκάλι (Miller, 1959).

Εφαρμογή της μεθόδου

Αρχικά, 0,5 ml κατάλληλα αραιωμένου δείγματος τοποθετήθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα. Επίσης, 0,5 ml απεσταγμένου νερού τοποθετήθηκε σε άλλο δοκιμαστικό σωλήνα για την παρασκευή τυφλού δείγματος (blank). Έπειτα, 0,5 ml αντιδραστηρίου DNS μεταφέρθηκε στους παραπάνω δοκιμαστικούς σωλήνες και πραγματοποιήθηκε ανάδευση.

Στη συνέχεια, οι δοκιμαστικοί σωλήνες ποματίστηκαν ώστε να αποφευχθεί η εξάτμιση και τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 100 °C για 5 λεπτά. Μετά το πέρας του βρασμού τα δείγματα απομακρύνθηκαν και ψύχθηκαν σε υδατόλουτρο στους 20 °C για περίπου 2 λεπτά, ώσπου να φτάσουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Έπειτα, σε κάθε δοκιμαστικό προστέθηκαν 5 ml απεσταγμένου νερού και τα δείγματα αναδεύτηκαν.

Τέλος, μετρήθηκε η απορρόφηση στα 540 nm σε σύγκριση με το τυφλό διάλυμα σε φασματοφωτόμετρο (Hitachi U-2000 Spectrophotometer). Η συγκέντρωση του δείγματος σε γλυκόζη υπολογίστηκε από την πρότυπη καμπύλη αναφοράς ($y=0,4827x+0,0012$, $R^2=0,994$) εκφρασμένη σε g/L.

Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των σακχάρων στην ενζυμική υδρόλυση και στις ζυμώσεις διαλείποντος έργου προς παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης πραγματοποιήθηκε με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography - HPLC). Όλα τα δείγματα, αρχικά, φυγοκεντρούνταν και στην συνέχεια φιλτράρονταν με την χρήση φίλτρων whatman που διέθεταν μεμβράνη διαμέτρου $0,2\ \mu\text{m}$. Το σύστημα HPLC που χρησιμοποιήθηκε ήταν Shimadzu, με Shimadzu RI ανιχνευτή και Rezex ROA-Organic acid H⁺ στήλη (στατική φάση). Η θερμοκρασία της στήλης ήταν $65\ ^\circ\text{C}$ και η κινητή φάση ήταν $10\ \text{mM H}_2\text{SO}_4$, με ροή διαλύτη $0,6\ \text{ml/min}$. Επιπλέον, για τον προσδιορισμό των μονοσακχαριτών χρησιμοποιήθηκε η στήλη Shodex SPO810 στους $60\ ^\circ\text{C}$ και με ροή $1\ \text{mL/min}$ υπερκάρου νερού ως κινητή φάση.

3.7.2 Προσδιορισμός αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN, Free Amino Nitrogen) είναι η φωτομετρική μέθοδος της νινυδρίνης (Lie, 1973).

Προετοιμασία-Παρασκευή αντιδραστηρίων

Colour reagent-Αντιδραστήριο χρώσης: Το αντιδραστήριο αυτό αποτελείται από $49,71\ \text{g}$ όξινο φωσφορικό δινάτριο ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), $5\ \text{g}$ νινυδρίνη, $3\ \text{g}$ φρουκτόζη και περίπου $60\ \text{g}$ όξινο διφωσφορικό κάλιο (KH_2PO_4) διαλυμένα σε $1\ \text{L}$ απεσταγμένο νερό. Κατά την παρασκευή του αντιδραστηρίου χρώσης το pH του διαλύματος πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ $6,6$ και $6,8$. Το διάλυμα αποθηκεύεται σε σκούρο μπουκάλι σε θερμοκρασία $4\ ^\circ\text{C}$, ενώ κρίνεται σκόπιμος ο έλεγχος και η διόρθωση της τιμής pH ανά τακτά χρονικά διαστήματα με την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας KH_2PO_4 .

Dilution reagent-Αντιδραστήριο αραίωσης: Σε αυτό το αντιδραστήριο $2\ \text{g}$ ιωδικού καλίου (KIO_3) διαλύονται σε $616\ \text{ml}$ απεσταγμένο νερό και στη συνέχεια

προστίθενται 348 ml αιθανόλης (καθαρότητας 100%) ώστε ο τελικός όγκος του διαλύματος να είναι 1L.

Αποθεματικό διάλυμα γλυκίνης (Glycine stock solution): Σε αυτό το διάλυμα 0,1072 g γλυκίνης διαλύονται σε 100 ml απεσταγμένο νερό. Το διάλυμα αποθηκεύεται σε θερμοκρασία 4 °C.

Πρότυπο διάλυμα γλυκίνης (Glycine standard solution): Για το διάλυμα αυτό που χρησιμοποιείται για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης, 1 ml από το αποθεματικό διάλυμα γλυκίνης διαλύεται σε 99 ml απεσταγμένο νερό προκειμένου να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση FAN 2 mg/L.

Εφαρμογή της μεθόδου

Αρχικά, 1 ml κατάλληλα αραιωμένου δείγματος τοποθετήθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα. Επίσης, 1 ml απεσταγμένου νερού τοποθετήθηκε σε άλλο δοκιμαστικό σωλήνα για την παρασκευή τυφλού δείγματος (blank). Έπειτα, 0,5 ml αντιδραστηρίου χρώσης μεταφέρθηκε στους παραπάνω δοκιμαστικούς σωλήνες και πραγματοποιήθηκε ανάδευση.

Στη συνέχεια, οι δοκιμαστικοί σωλήνες ποματίστηκαν ώστε να αποφευχθεί η εξάτμιση και τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 100 °C για 16 λεπτά ακριβώς. Μετά το πέρας του βρασμού τα δείγματα απομακρύνθηκαν και ψύχθηκαν σε υδατόλουτρο στους 20 °C για 20 λεπτά. Έπειτα, σε κάθε δοκιμαστικό προστέθηκαν 5 ml αντιδραστηρίου αραιώσης και τα δείγματα αναδεύτηκαν για 20 δευτερόλεπτα ακριβώς.

Τέλος, μετρήθηκε η απορρόφηση (x) στα 570 nm σε σύγκριση με το τυφλό διάλυμα σε φασματοφωτόμετρο (Hitachi U-2000 Spectrophotometer). Η συγκέντρωση του δείγματος σε FAN (y) υπολογίστηκε με βάση την πρότυπη εξίσωση ($y = 4,158x - 0,017$, $R^2 = 0,9999$).

3.7.3 Προσδιορισμός ανόργανου φωσφόρου (IP)

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του ανόργανου φωσφόρου είναι χρωματομετρική μέθοδος κατά την οποία η ένταση του μπλε χρώματος είναι ανάλογη με την ένταση της συγκέντρωσης του ανόργανου φωσφόρου (Herbert et al., 1971).

Προετοιμασία-Παρασκευή αντιδραστηρίων

Αποθεματικό διάλυμα Δισόξινου Φωσφορικού καλίου (Potassium dihydrogen phosphate): Σε αυτό το διάλυμα 1,0967 g Δισόξινου Φωσφορικού καλίου (KH_2PO_4) διαλύονται σε 100 ml απεσταγμένου νερού. Το διάλυμα μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 250 ml και συμπληρώνεται με νερό μέχρι τη χαραγή. Με αυτό τον τρόπο παρασκευάζεται αποθεματικό διάλυμα με συγκέντρωση 1mg P/ml (Allen, 1940; Chen et al., 1956).

Πρότυπο διάλυμα Ανόργανου Φωσφόρου (Inorganic Phosphorus, IP): Για το διάλυμα αυτό που χρησιμοποιείται για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης, 1 ml από το αποθεματικό διάλυμα δισόξινου Φωσφορικού καλίου (KH_2PO_4) διαλύεται σε 99 ml απεσταγμένο νερό προκειμένου να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση 10 mg IP/L.

Εφαρμογή της μεθόδου

Αρχικά, 5 ml κατάλληλα αραιωμένου δείγματος τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα. Επίσης, 5 ml απεσταγμένου νερού τοποθετήθηκαν σε άλλο δοκιμαστικό σωλήνα για την παρασκευή τυφλού δείγματος (blank). Στη συνέχεια, σε κάθε δοκιμαστικό προστέθηκαν 0,4 ml διαλύματος Υπερχλωρικού Οξέος 60% και πραγματοποιήθηκε ανάδευση για 10 δευτερόλεπτα ακριβώς.

Έπειτα, προστέθηκαν 0,3 ml ασκορβικού οξέος 1% και 0,4 ml διαλύματος Μολυβδαινικού Αμμωνίου 5% και πραγματοποιήθηκε ανάδευση για 10 δευτερόλεπτα ακριβώς πριν και μετά την προσθήκη του Μολυβδαινικού Αμμωνίου.

Μετά από αναμονή 10 λεπτών ώστε να αναπτυχθεί χρώμα μετρήθηκε η απορρόφηση στα 730 nm σε σύγκριση με το τυφλό διάλυμα σε φασματοφωτόμετρο (Hitachi U-2000 Spectrophotometer). Η συγκέντρωση του δείγματος σε IP υπολογίστηκε από την πρότυπη καμπύλη αναφοράς ($y = 4,2614x + 0,2776$, $R^2 = 0,9942$) εκφρασμένη σε mg/L.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Προσδιορισμός της σύστασης του πιτύρου σίτου

Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 3) παρουσιάζεται η σύσταση του πιτύρου σίτου που πραγματοποιήθηκε στη συγκεκριμένη μελέτη σε σύγκριση με δημοσιευμένες έρευνες.

Πίνακας 3 Σύσταση του πιτύρου σίτου

Σύσταση	Στο παρόν πείραμα	Βιβλιογραφικά δεδομένα
Υγρασία (%)	7,2	8,1-12,7 ^a
Τέφρα (%)	4,1	3,9-8,1 ^a
Πρωτεΐνη (%)	15,9	9,6-18,6 ^a
Λίπος (%)	3,2	3,5-3,9 ^b
Φυτοστερόλες (%)	-	0,16-0,17 ^b
α-λινολεϊκό οξύ (%)	-	0,16 ^b
Υδατάνθρακες (%)	-	60-70 ^a
Σάκχαρα (%)	3,2	-
Άμυλο (%)	26,6	9,1-38,9 ^a
Κυτταρίνη (%)	25,7	-
Αραβινοξυλάνες	-	5-26,9 ^c
β-γλυκάνες	-	1,1-2,6 ^c
Άζωτο ελεύθερων αμινομάδων(mg/100g db)	37,6	-
Ανόργανος φώσφορος (mg/ 100g db)	791,5	-
Φαινολικά οξέα (%)	-	1,1 ^b
Φερρουλικό οξύ (%)	-	0,02-1,5 ^b
Φυτικό οξύ (%)	-	2,3-6 ^c

^a Onipe et al., 2015, ^b Apprich et al., 2014, ^c Fardet et al., 2010

4.2 Προσδιορισμός ενζυμικής ενεργότητας μέσω της ζύμωσης στερεής κατάστασης του μύκητα *Aspergillus awamori* σε πίτυρο σίτου & Ενζυμική υδρόλυση του πιτύρου σίτου

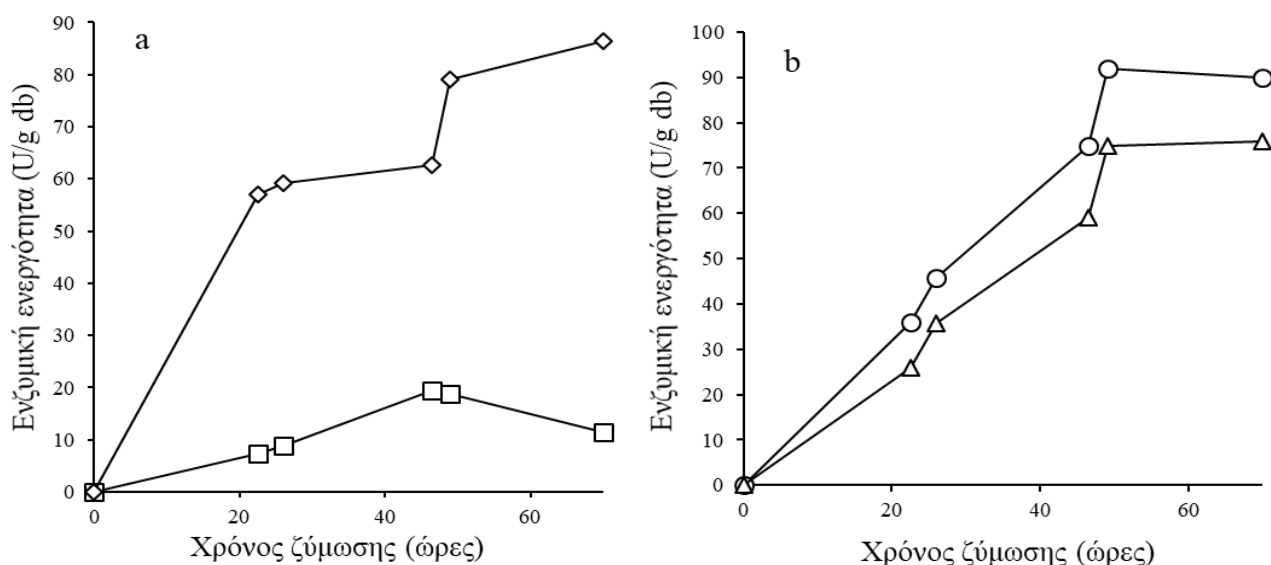
Η ζύμωση στερεής κατάστασης πραγματοποιήθηκε με σκοπό την παραγωγή αμυλολυτικών (α-αμυλάσες, β-αμυλάσες και γλυκοαμυλάσες) και πρωτεολυτικών ενζύμων από το μύκητα *Aspergillus awamori* κατά την καλλιέργεια του σε θρεπτικό υπόστρωμα αποτελούμενο από παραπροϊόντα άλεσης σιτηρών. Τα παραγόμενα ένζυμα χρησιμοποιήθηκαν για την υδρόλυση του πτύρου σίτου και την μετατροπή του σε θρεπτικό υπόστρωμα κατάλληλο για την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης.

Η ζύμωση στερεής κατάστασης διήρκτησε 70 ώρες αποτελούμενη από καλλιέργεια του μύκητα *Aspergillus awamori* σε 10 κωνικές φιάλες. Η παραλαβή των προαναφερθέντων ενζύμων και η χρησιμοποίησή τους στην υδρόλυση του πτύρου σίτου πραγματοποιήθηκε χωρίς την απομάκρυνση των στερεών ώστε να αξιοποιηθούν όλα τα παραχθέντα ένζυμα.



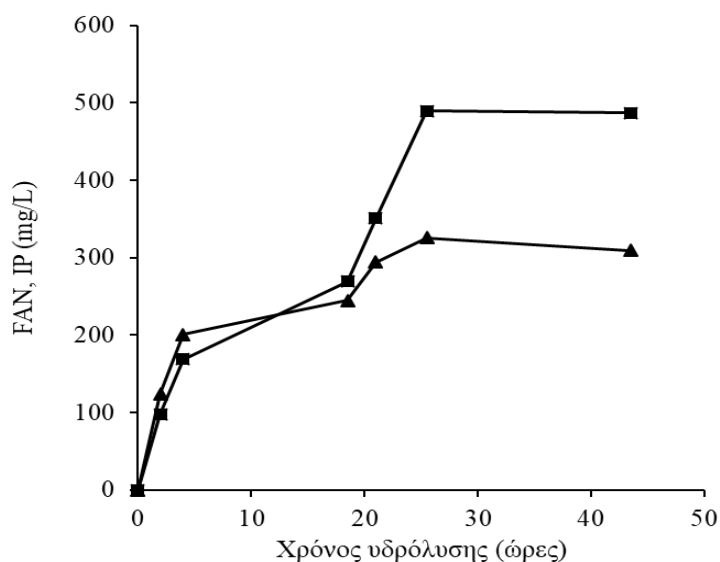
Εικόνα 7 Καλλιέργεια στερεής κατάστασης με το μύκητα *Aspergillus awamori* σε πτύρο σίτου για 48 ώρες (a) και για 70 ώρες (b)

Στην παραπάνω εικόνα απεικονίζονται κωνικές φιάλες στις 48 ώρες της ζύμωσης στερεής κατάστασης (Εικόνα 7a) και μετά την ολοκλήρωση της ζύμωσης στερεής κατάστασης (Εικόνα 7b) σε επωαστικό θάλαμο με θερμοκρασία καλλιέργειας 30 °C. Όπως παρατηρείται από την Εικόνα 7 το πτύρο σίτου αρχίζει να παίρνει ανοιχτό πράσινο χρώμα στις 48 ώρες της ζύμωσης και πιο σκούρο στις 70 ώρες ζύμωσης. Η δημιουργία του χρώματος οφείλεται στην ανάπτυξη του μύκητα.



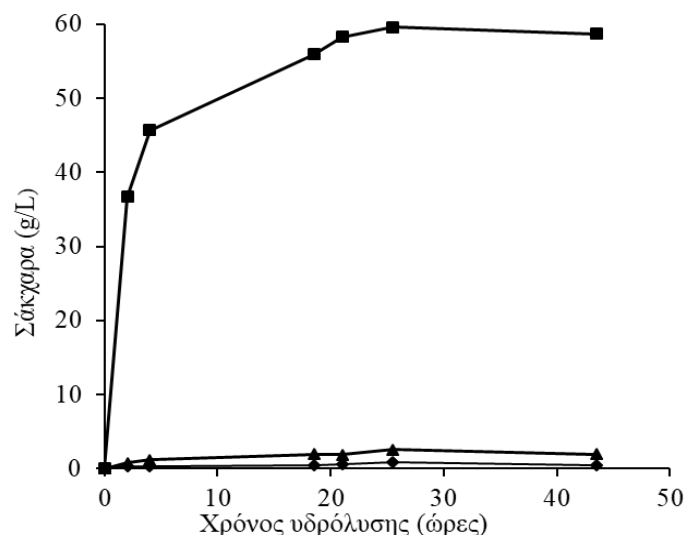
Διάγραμμα 1 Παραγωγή (a) γλυκοαμυλάσης (□) και μαλτάσης (◇) (b) φυτάσης (○) και πρωτεάσης (△) κατά τη ζύμωση στερεής κατάστασης με *A. awamori* σε πίτυρο σίτου.

Σε πρώτο στάδιο προσδιορίστηκε η ενζυμική ενεργότητα της γλυκοαμυλάσης, της μαλτάσης, της πρωτεάσης και της φυτάσης. Όπως φαίνεται από το Διάγραμμα 1a η μέγιστη ενζυμική ενεργότητα της γλυκοαμυλάσης παρουσιάστηκε στις 46,5 ώρες ζύμωσης και ήταν 19,5 U/ g ξηρής μάζας ενώ της μαλτάσης ήταν 86,4 U/ g ξηρής μάζας στο τέλος της ζύμωσης. Από το Διάγραμμα 1b παρατηρείται πως η μέγιστη ενζυμική ενεργότητα της φυτάσης ήταν 91,9 U/ g ξηρής μάζας στις 49 ώρες ζύμωσης και της πρωτεάσης ήταν 75,9 U/ g ξηρής μάζας στο τέλος της ζύμωσης.



Διάγραμμα 2 Παραγωγή FAN (▲) και IP (■) κατά τη διάρκεια της ενζυμικής υδρόλυσης του πιτύρου σίτου

Το Διάγραμμα 2 παρουσιάζει το παραγόμενο FAN και IP κατά την ενζυμική υδρόλυση του πιτύρου σίτου στους 55 °C χρησιμοποιώντας αρχική συγκέντρωση πιτύρου σίτου 140 g/L και pH 5,5. Η συγκέντρωση των στερεών περιλαμβάνει όλα τα στερεά που χρησιμοποιούνται στη ζύμωση στερεής κατάστασης μαζί με ακατέργαστο πίτυρο σίτου. Οι αρχικές συγκεντρώσεις FAN και IP αφαιρέθηκαν για να εκτιμηθεί το FAN και το IP που προέρχεται από την υδρόλυση του πιτύρου σίτου. Η μέγιστη παραγωγή FAN ήταν 325,7 mg/L και η μέγιστη παραγωγή IP ήταν 489,3 mg/L στις 25,5 ώρες υδρόλυσης.



Διάγραμμα 3 Παραγωγή γλυκόζης (■) , ξυλόζης (▲) και αραβινόζης (◆) κατά τη διάρκεια της ενζυμικής υδρόλυσης του πιτύρου σίτου

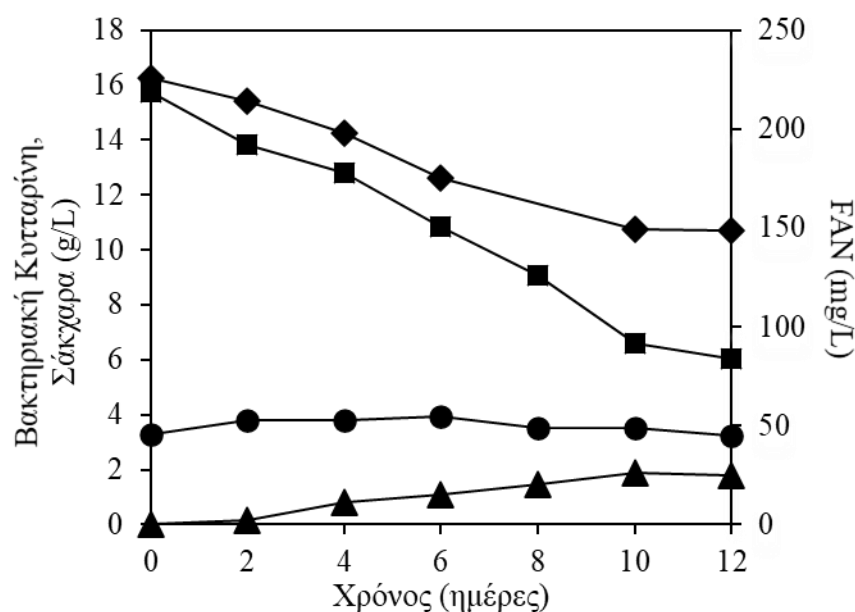
Όπως φαίνεται από το Διάγραμμα 3 από τις πρώτες ώρες πραγματοποιείται υδρόλυση μεγάλου μέρους του αμύλου του πιτύρου σίτου προς σχηματισμό γλυκόζης. Πιο συγκεκριμένα κατά τις 4 πρώτες ώρες υδρόλυσης φαίνεται πως έχουν παραχθεί 45,71 g/L γλυκόζης. Η μέγιστη παραγωγή σακχάρων πραγματοποιήθηκε στις 25,5 ώρες υδρόλυσης όπου η μέγιστη συγκέντρωση σακχάρων ήταν 62,9 g/L (γλυκόζη: 57,53 g/L, ξυλόζη: 2,54 g/L και αραβινόζη: 0,81 g/L).

Στην υδρόλυση χρησιμοποιήσαμε 140 g/L πίτυρο σίτου και μετά από 25,5 ώρες υδρόλυσης πετύχαμε τη μέγιστη συγκέντρωση γλυκόζης 57,53 g/L. Με βάση τη σύσταση η οποία προσδιορίστηκε στο προηγούμενο στάδιο, η περιεκτικότητα του πιτύρου σίτου σε άμυλο είναι 26,6% (w/w) και της κυτταρίνης 25,7% (w/w) επομένως πετύχαμε 100% απόδοση σε γλυκόζη.

4.3 Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης σε συνθετικό υπόστρωμα προσομοιωμένο στο υδρόλυμα του πιτύρου σίτου

Σε πρώτο στάδιο μελετήθηκε η παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης σε υπόστρωμα συνθετικών σακχάρων προσομοιωμένο ως προς την πηγή άνθρακα του υδρολύματος από πίτυρο σίτου. Η ζύμωση με το μικροβιακό στέλεχος *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM 15973 διήρκεσε 12 ημέρες. Στο Διάγραμμα 4 απεικονίζεται η παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης και η κατανάλωση των σακχάρων και του

αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων. Η μέγιστη παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης (1,87 g/L) επιτεύχθηκε μετά από 10 ημέρες ζύμωσης με απόδοση 0,10 g βακτηριακής κυτταρίνης ανά g ολικών σακχάρων και παραγωγικότητα 0,19 g/L/ημέρα. Η βιομετατροπή των ολικών σακχάρων από το βακτηριακό στέλεχος υπολογίστηκε 48,2 g καταναλωθέντων σακχάρων/100 g ολικών σακχάρων ενώ η κατανάλωση του αζώτου ελεύθερων αμινομάδων ήταν 80 mg/L.



Διάγραμμα 4 Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης (▲), κατανάλωση γλυκόζης (■), κατανάλωση C5 και C6 σακχάρων (ξυλόζη, μαννόζη, αραβινόζη και γαλακτόζη) (●) και κατανάλωση FAN (◆) κατά την διάρκεια ζυμώσεων διαλείποντος έργου με το βακτηριακό στέλεχος *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM 15973 σε υπόστρωμα συνθετικών σακχάρων προσομοιωμένο στο υδρόλυμα του πιτύρου σίτου

Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 4 το βακτηριακό στέλεχος κατανάλωνε σταθερά τη γλυκόζη ενώ τα υπόλοιπα σάκχαρα (ξυλόζη, μαννόζη, αραβινόζη και γαλακτόζη) δεν καταναλώθηκαν καθ'όλη τη διάρκεια της ζύμωσης. Η ικανότητα συγκράτησης νερού ήταν 144,6 g νερού ανά g βακτηριακής κυτταρίνης.

4.4 Ζυμώσεις διαλείποντος έργου σε ενζυμικό υδρόλυμα πιτύρου σίτου προς παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης

4.4.1 Αξιολόγηση της επίδρασης των διαφορετικών τιμών pH

Ο έλεγχος του pH κατά τη διάρκεια της ζύμωσης θεωρείται μια σημαντική παράμετρος στην αποδοτικότητα των ζυμώσεων. Τιμές pH χαμηλότερες του 4,0 οδηγούν σε χαμηλές συγκεντρώσεις βακτηριακής κυτταρίνης λόγω συσσώρευσης διάφορων οξέων στο θρεπτικό υγρό της ζύμωσης όπως γλυκονικό, οξικό και γαλακτικό οξύ (Chawla et al., 2009) που δρουν ανταγωνιστικά στην αξιοποίηση της πηγής άνθρακα και επιπλέον επιβραδύνουν ή/και καταστέλλουν την ανάπτυξη του μικροοργανισμού οδηγώντας στην μείωση της δυνατότητάς του να παράγει βακτηριακή κυτταρίνη. Στόχος του συγκεκριμένου σετ πειραμάτων ήταν να ερευνηθεί η επίδραση διαφορετικών τιμών pH (4,5, 5,2, 6) στην παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης. Αρχικά, η ρύθμιση του pH (5 M NaOH) γινόταν από τα αρχικά στάδια της ζύμωσης όταν αυτό μεταβαλλόταν (συνήθως μειωνόταν). Με αυτόν τον τρόπο παρατηρήθηκε ότι η μεμβράνη του πολυμερούς δεν δύναται να πολυμεριστεί λόγω πιθανούς αρνητικής επίδρασης του σχηματιζόμενου άλατος μετά την προσθήκη του NaOH. Στην συνέχεια εφαρμόστηκε στρατηγική κατά την οποία η ρύθμιση του pH στην επιθυμητή τιμή γινόταν από την δεύτερη μέρα της ζύμωσης και έπειτα, ώστε να επιτραπεί ο σχηματισμός του πολυμερούς χωρίς παρεμβολές από εξωτερικούς παράγοντες. Ως θρεπτικό υπόστρωμα της ζύμωσης χρησιμοποιήθηκε το ενζυμικό υδρόλυμα του πιτύρου σίτου το οποίο προσαρμόστηκε ώστε η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων να είναι 20 g/L και το άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων και πεπτιδίων να είναι 350 mg/L.

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 4, η μεγαλύτερη παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης επιτεύχθηκε στη ζύμωση με τη ρύθμιση του pH στο 6 με τελική συγκέντρωση 3,2 g/L ενώ, η μικρότερη παραγωγή (1,96 g/L) παρατηρήθηκε στην περίπτωση της τιμής pH 4,5. Σε όλες τις ζυμώσεις το βακτηριακό στέλεχος κατανάλωσε άζωτο ελεύθερων αμινομάδων σε εύρος 111,2 έως 191,4 mg/L. Η βιομετατροπή των ολικών σακχάρων στην περίπτωση των δύο χαμηλότερων τιμών pH κυμάνθηκε μεταξύ 51,1 έως 57,1 g καταναλωθέντων σακχάρων/ 100 g ολικών σακχάρων, ενώ, στην περίπτωση του pH 6 το ποσοστό βιομετατροπής ήταν 69,1 g καταναλωθέντων σακχάρων/ 100 g ολικών σακχάρων. Οι αποδόσεις των ζυμώσεων κυμάνθηκαν από 0,10 έως 0,16 g βακτηριακής κυτταρίνης ανά g ολικών σακχάρων και οι τιμές παραγωγικότητας από 0,25 έως 0,41 g/L/ημέρα. Η ικανότητα συγκράτησης νερού ήταν περίπου 160 g νερού

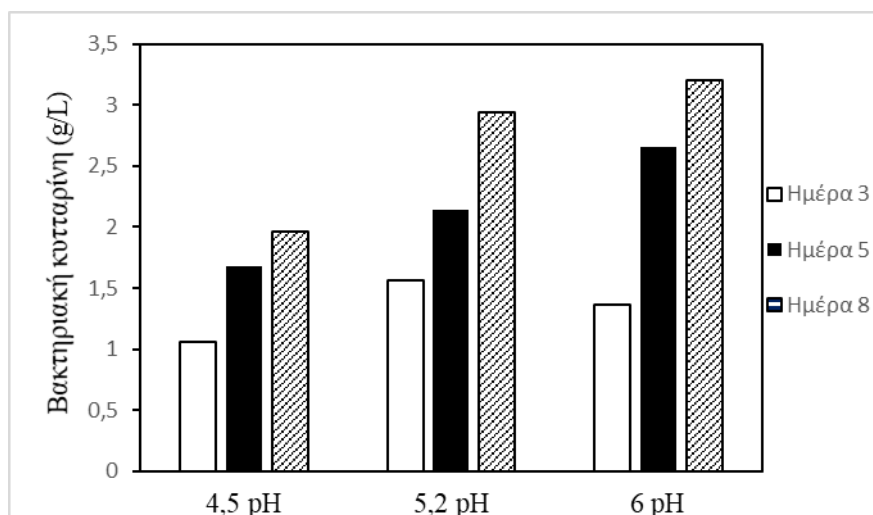
ανά g βακτηριακής κυτταρίνης τόσο στην περίπτωση της ρύθμισης του pH στο 4,5 όσο και στο 5,2. Στην περίπτωση του μεγαλύτερου pH η ικανότητα συγκράτησης νερού ήταν μικρότερη (138,9 g νερού ανά g βακτηριακής κυτταρίνης). Η ικανότητα συγκράτησης νερού είναι ένα από τα σημαντικότερα φυσικά χαρακτηριστικά της βακτηριακής κυτταρίνης κυρίως λόγω των εφαρμογών της στον τομέα της βιοϊατρικής. Οι διαφορετικές τιμές της ικανότητας συγκράτησης νερού σε κάθε δείγμα σχετίζονται με το πορώδες της επιφάνειας επαφής, η οποία μεταβάλλεται κάτω από διαφορετικές συνθήκες ζύμωσης. Όσο μεγαλύτερη είναι η επιφάνεια και το μέγεθος των πόρων του πολυμερούς τόσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα νερού που μπορεί να συγκρατήσει η μήτρα της βακτηριακής κυτταρίνης.

Πίνακας 4 Επίδραση των διαφορετικών τιμών pH στην παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης

pH	Βακτηριακή Κυτταρίνη (g/L)	Απόδοση ¹ (% w/w)	Παραγωγικότητα (g/L/d)	Κατανάλωση σακχάρων (% w/w) ²	Ικανότητα συγκράτησης νερού (g/g) ³
4,5	1,96	0,10	0,25	51,1	160,9
5,2	2,94	0,15	0,37	57,1	160,1
6	3,20	0,16	0,41	69,1	138,9

¹ σε ολικά σάκχαρα, ² g καταναλωθέντων σακχάρων/ 100 g ολικών σακχάρων, ³ g νερού/ g βακτηριακής κυτταρίνης

Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 5 η συγκέντρωση της βακτηριακής κυτταρίνης αυξανόταν σταδιακά καθ'όλη τη διάρκεια της ζύμωσης (3, 5 και 8 ημέρες ζύμωσης) σε όλες τις περιπτώσεις που εξετάστηκαν. Η παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης με τη ρύθμιση του pH στο 6 ήταν 38,7% μεγαλύτερη από αυτή με τη ρύθμιση του pH στο 4,5 και 8,1% μεγαλύτερη από αυτή με τη ρύθμιση του pH στο 5,2.



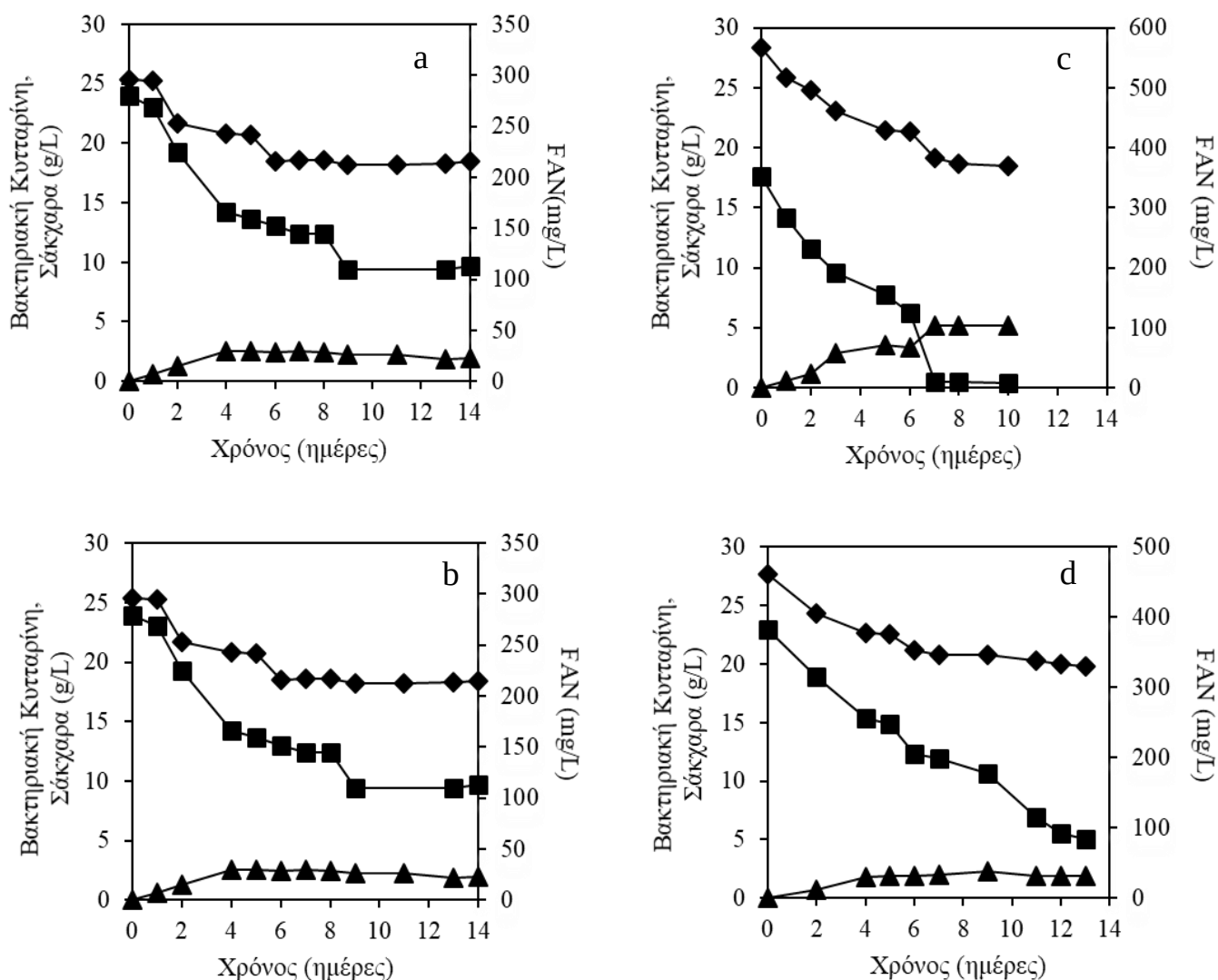
Διάγραμμα 5 Παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης κατά τη διάρκεια της ζύμωσης σε διαφορετικές τιμές pH

4.4.2 Αξιολόγηση της επίδρασης των διαφορετικών συγκεντρώσεων αζώτου

Σε αυτό το στάδιο, πραγματοποιήθηκαν 4 σειρές πειραμάτων με θρεπτικό υπόστρωμα το αμυλοπρωτεϊνούχο υδρόλυμα. Οι ζυμώσεις διήρκεσαν από 10 έως 14 ημέρες και μελετήθηκε η παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης με τη χρήση τεσσάρων διαφορετικών λόγων άνθρακα προς FAN (30, 20, 14, 10). Ο λόγος ρυθμιζόταν στο επιθυμητό επίπεδο με την προσθήκη εκχυλίσματος ζύμης ενώ η βακτηριακή πεπτόνη παρέμενε σταθερή στα 5 g/L. Το άζωτο ως το κύριο συστατικό των πρωτεϊνών, είναι απαραίτητο στον κυτταρικό μεταβολισμό καθώς αποτελεί το 8-14% της ξηρής μάζας των βακτηρίων (Chawla et al., 2009).

Όπως απεικονίζεται στο Διάγραμμα 6, η μέγιστη παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης έφτασε τα 5,18 g/L με απόδοση 0,29 g βακτηριακής κυτταρίνης ανά g ολικών σακχάρων και παραγωγικότητα 0,70 g/L/ημέρα σε λόγο άνθρακα προς FAN ίσο με 14. Περαιτέρω μείωση του λόγου είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της συγκέντρωσης της βακτηριακής κυτταρίνης (3,74 g/L). Μία εξήγηση για το φαινόμενο αυτό, είναι ότι παράλληλα με την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης συμβαίνουν και άλλες διεργασίες στο περιβάλλον της ζύμωσης, όπως είναι η κυτταρική αύξηση. Σύμφωνα με τους Brown et al. (1976), η παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης και η κυτταρική αύξηση συμβαίνουν ταυτόχρονα και ανταγωνίζονται για την πηγή άνθρακα στον *Gluconacetobacter xylinus*. Συνεπώς, όταν αυξάνεται η συγκέντρωση του αζώτου θα μπορούσε να ευνοείται η κυτταρική ανάπτυξη εις βάρος της

παραγωγής της βακτηριακής κυτταρίνης. Ίδια τάση παρατηρήθηκε και σε μεγαλύτερους λόγους άνθρακα προς FAN με τη βακτηριακή κυτταρίνη να κυμαίνεται μεταξύ 2,3 έως 2,5 g/L.



Διάγραμμα 6 Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης (▲), κατανάλωση σακχάρων (■), και κατανάλωση FAN (◆) κατά την διάρκεια ζυμώσεων διαλείποντος έργου με το βακτηριακό στέλεχος *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM 15973 σε υδρολύματα προερχόμενα από αμυλοπρωτεϊνούχα απόβλητα της βιομηχανίας τροφίμων. (a) λόγος άνθρακα προς FAN₃₀, (b) λόγος άνθρακα προς FAN₂₀, (c) λόγος άνθρακα προς FAN₁₄, (d) λόγος άνθρακα προς FAN₁₀

Σύμφωνα με τον Πίνακα 5 όσο μειωνόταν ο λόγος άνθρακα προς FAN αυξανόταν η κατανάλωση του FAN. Η μεγαλύτερη βιομετατροπή σακχάρων (97,5 g καταναλωθέντων σακχάρων/100 g ολικών σακχάρων) παρατηρήθηκε στην περίπτωση λόγου άνθρακα προς FAN ίσο με 14 ενώ στις άλλες περιπτώσεις η κατανάλωση σακχάρων κυμάνθηκε από 60 έως 78 g καταναλωθέντων σακχάρων/100 g ολικών σακχάρων. Η ικανότητα συγκράτησης νερού σε λόγους άνθρακα προς FAN 30 και 20 ήταν περίπου 114 g νερού ανά g βακτηριακής κυτταρίνης ενώ στο λόγο άνθρακα προς FAN 20 ήταν 145 g νερού ανά g βακτηριακής κυτταρίνης. Η πιο χαμηλή τιμή ικανότητας συγκράτησης νερού (74,48 g νερού ανά g βακτηριακής κυτταρίνης) εντοπίστηκε σε λόγο άνθρακα προς FAN ίσο με 14.

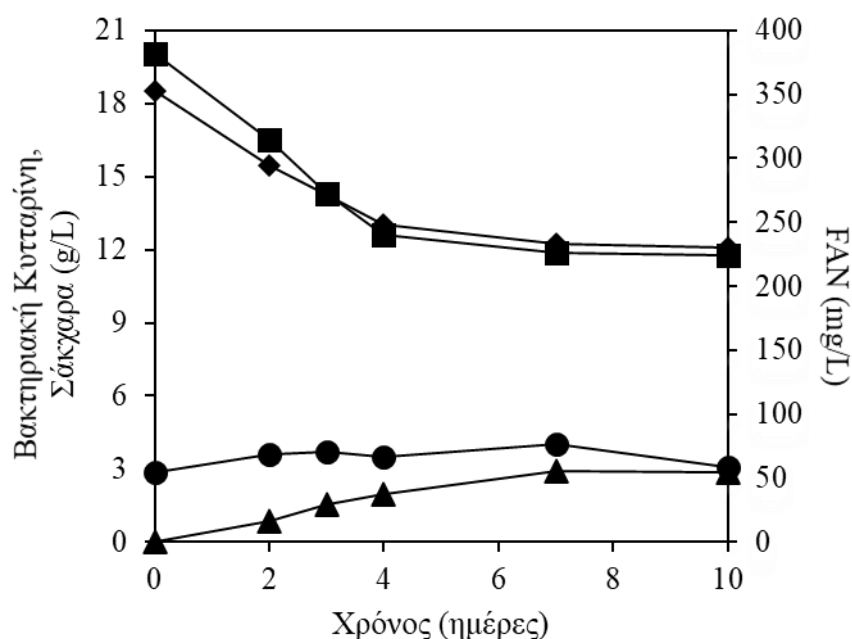
Πίνακας 5 Επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων αζώτου στην παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης

C/FAN	Βακτηριακή Κυτταρίνη (g/L)	Απόδοση ¹ (% w/w)	Παραγωγικότητα (g/L/d)	Κατανάλωση σακχάρων (% w/w) ²	FAN ³ καταναλωθέν(mg/ L)	Ικανότητα συγκράτησης νερού (g/g) ⁴
30	2,50	0,10	0,63	59,5	80,9	114,2
20	2,26	0,10	0,25	77,8	127,8	145,8
14	5,18	0,29	0,70	97,5	197,4	74,5
10	3,74	0,16	0,40	75,0	250,2	114,9

¹ σε ολικά σάκχαρα, ² g καταναλωθέντων σακχάρων/ 100 g ολικών σακχάρων, ³ FAN: Free Amino Nitrogen, ⁴ g νερού/ g βακτηριακής κυτταρίνης

4.4.3 Αξιολόγηση της επίδρασης του αερισμού σε στατικούς βιοαντιδραστήρες

Στο συγκεκριμένο στάδιο της πειραματικής μελέτης η παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης πραγματοποιήθηκε σε στατικούς βιοαντιδραστήρες με επιφάνεια 15×15 cm² και παροχή αερισμού 0,25 vvm κατά τη δεύτερη ημέρα ζύμωσης. Αξιολογήθηκε η επίδραση της παροχής αέρα στην παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης (Διάγραμμα 7).



Διάγραμμα 7 Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης (▲), κατανάλωση γλυκόζης (■), κατανάλωση C5 και C6 σακχάρων (ξυλόζη, μαννόζη, αραβινόζη και γαλακτόζη) (●) και κατανάλωση FAN (◆) κατά την διάρκεια ζυμώσεων διαλείποντος έργου με το βακτηριακό στέλεχος *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM 15973 σε υδρολύματα προερχόμενα από αμυλοπρωτεϊνούχα απόβλητα της βιομηχανίας τροφίμων με παροχή οξυγόνου σε στατικούς βιοαντιδραστήρες

Όπως φαίνεται από το Διάγραμμα 7 η μέγιστη παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης (2,94 g/L) επιτεύχθηκε στις 7 ημέρες ζύμωσης με απόδοση 0,13 g βακτηριακής κυτταρίνης ανά g ολικών σακχάρων και παραγωγικότητα 0,42 g/L/ημέρα. Η βιομετατροπή της γλυκόζης από το βακτηριακό στέλεχος ανήλθε σε 41,2 g καταναλωθείσας γλυκόζης/ 100 g ολικών σακχάρων ενώ παρατηρήθηκε ότι τα C5 και C6 σάκχαρα (ξυλόζη, μαννόζη, αραβινόζη και γαλακτόζη) δεν καταναλώθηκαν καθόλη τη διάρκεια της ζύμωσης. Η ικανότητα συγκράτησης νερού της μεμβράνης του πολυμερούς προσδιορίστηκε ίση με 86,3 g νερού ανά g βακτηριακής κυτταρίνης.

Όπως φάνηκε συνολικά από την πορεία της ζύμωσης η παροχή αερισμού δεν είχε ιδιαίτερη επίδραση στην παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης. Η αύξηση της συγκέντρωσης της βακτηριακής κυτταρίνης ήταν μόνο 15% μεγαλύτερη σε σύγκριση με το πείραμα σε λόγο άνθρακα προς FAN ίσο με 30 χωρίς παροχή αερισμού. Ο

Komagataeibacter sucrofermentans είναι υποχρεωτικά αερόβιος μικροοργανισμός, και απαιτεί υποχρεωτικά οξυγόνο για την ανάπτυξη του και την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης. Παρ'όλα αυτά φαίνεται πως υπό συνθήκες υψηλής παροχής αερισμού, ευνοείται η κυτταρική αύξηση εις βάρος της παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης (Parte et al., 2020).

4.5 Ανάλυση ιδιοτήτων βακτηριακής κυτταρίνης και νανοκυτταρίνης

4.5.1 Ανάλυση μορφολογίας μέσω SEM

Τα δείγματα της βακτηριακής κυτταρίνης και της βακτηριακής νανοκυτταρίνης αναλύθηκαν μέσω SEM ώστε να χαρακτηριστούν μορφολογικά (Εικόνα 8). Όπως φαίνεται από την Εικόνα 8a η βακτηριακή κυτταρίνη χαρακτηρίζεται από ένα οργανωμένο και συνεχές δίκτυο μικροϊνιδίων με διάμετρο (D) ινιδίων να κυμαίνεται από 45,8 έως 73,1 nm, μήκος (L) αρκετών μικρομέτρων και αναλογία L/D μεγαλύτερη από 13. Το ίδιο εύρος διαστάσεων παρατηρήθηκε και στην περίπτωση της βακτηριακής νανοκυτταρίνης (Εικόνα 8b).

Πίνακας 6 Μορφολογικά χαρακτηριστικά βακτηριακής κυτταρίνης και βακτηριακής νανοκυτταρίνης μετά από υδρόλυση

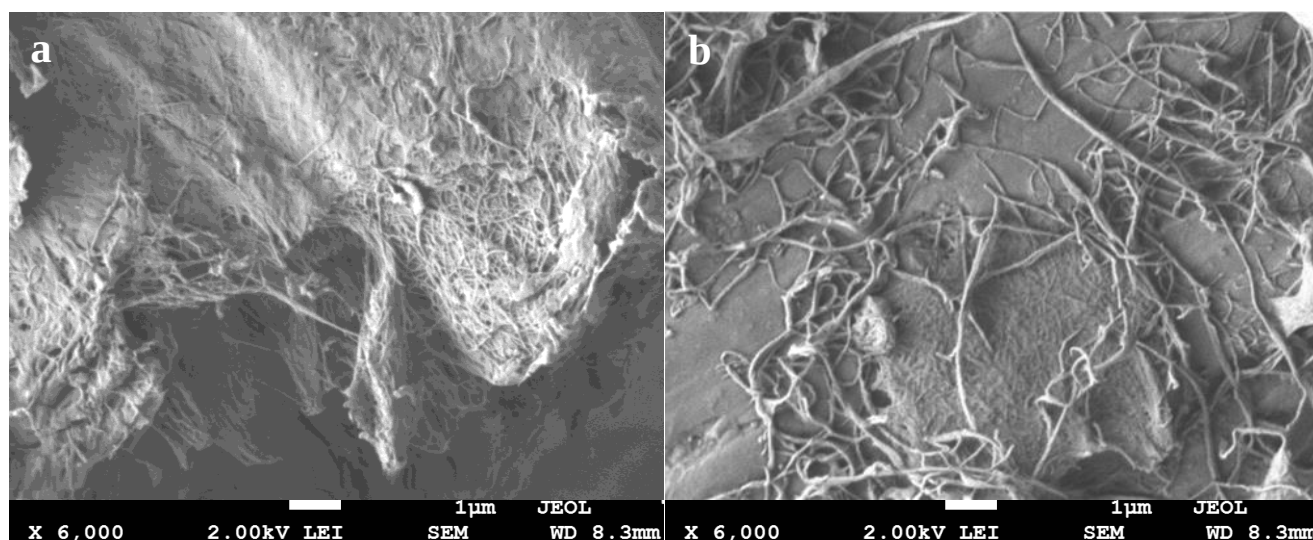
	Συνθήκες υδρόλυσης	Μήκος (nm)	Διάμετρος (nm)	L/D αναλογία	Βιβλιογραφία
BC ¹			25		Yan et al. (2017)
BCNs ²	50% H ₂ SO ₄ (w/w), 3h, 500 rpm		14,3		
BC ¹		Αρκετά μικρόμετρα	50-100		Andritsou et al. (2011)
BC ¹			18-35		Mohammadkazemi et al. (2014)
BC ¹			67,5		Vasconcelos et al. (2017)
BCNs ²	50% H ₂ SO ₄ (w/w), 1 h, 500 rpm	622	33,7	20,1	
BC ¹		Αρκετά μικρόμετρα	45,8-73,1	>13	Παρούσα μελέτη

BCNs ²	50% H ₂ SO ₄ (w/v), 24 h, 500 rpm	Αρκετά μικρόμετρα	45,8-73,1	>13
-------------------	--	----------------------	-----------	-----

¹ Βακτηριακή κυτταρίνη, ² Βακτηριακή νανοκυτταρίνη

Οι νανοδομές που σχηματίζουν τα μικροϊνίδια της βακτηριακής κυτταρίνης (Εικόνα 4a) διασυνδέονται μεταξύ τους σχηματίζοντας ένα τρισδιάστατο δίκτυο που χαρακτηρίζεται από υψηλό πορώδες το οποίο συνεπάγεται με μεγάλη επιφάνεια επαφής και υψηλή ικανότητα συγκράτησης νερού. Μετά την υδρόλυση (Εικόνα 4b) , παρατηρήθηκε διάσπαση των κρυσταλλικών μικροϊνιδίων με αποτέλεσμα τη δημιουργία μικρότερων σε μήκος μικροϊνιδίων των νανοκρυστάλλων της βακτηριακής κυτταρίνης.

Η ευρύτερη βιβλιογραφία (Πίνακας 6) αναφέρει τιμές διαμέτρου των ινιδίων της βακτηριακής κυτταρίνης ίσες με 67,5 nm (Vasconcelos et al., 2017), 25 nm (Yan et al., 2017), 18 έως 35 nm (Mohammadkazemi et al., 2015) και 50 έως 100 nm (Andritsou et al., 2018). Οι τιμές μήκους που έχουν αναφερθεί κυμαίνονται από 622 nm έως αρκετά μικρόμετρα. Τα προαναφερθέντα αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία με αυτά της παρούσας μελέτης. Η αναλογία L/D των νανοκρυστάλλων είναι μια σημαντική παράμετρος, και πιο συγκεκριμένα όταν η αναλογία L/D είναι μεγαλύτερη από 13 οι νανοδομές κρίνονται κατάλληλες ως παράγοντες ενίσχυσης σε μήτρες πολυμερών (Vasconcelos et al., 2017).



Εικόνα 8 Μικρογραφίες SEM της βακτηριακής κυτταρίνης (a) που παρήχθη σε υδρόλυμα πιτύρου σίτου με το βακτηριακό στέλεχος *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM 15973 και βακτηριακής νανοκυτταρίνης (b) που προέκυψε από κατεργασία με θειικό οξύ έπειτα από υδρόλυση 32 ωρών (όλες οι μικρογραφίες αντιστοιχούν σε 6k μεγέθυνση).

4.5.2 Ανάλυση του δυναμικού επιφάνειας

Το δυναμικό επιφάνειας χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της παρουσίας επιφανειακών φορτίων. Οι μετρήσεις του δυναμικού επιφάνειας τόσο της βακτηριακής κυτταρίνης όσο και της βακτηριακής νανοκυτταρίνης μετά από υδρόλυση 24 και 32 ωρών έδωσαν αρνητική τιμή. Τα ινίδια της βακτηριακής κυτταρίνης είναι αρνητικά φορτισμένα ανεξάρτητα από το pH του εναιωρήματος στο οποίο διαλύονται (Paximada et al., 2016). Πιο συγκεκριμένα, τα εναιωρήματα της βακτηριακής κυτταρίνης έδειξαν δυναμικό επιφάνειας -19,1 mV που είναι χαμηλότερη κατά απόλυτη τιμή σε σύγκριση με άλλες μελέτες (Yan et al., 2017; Zhai et al., 2020) (Πίνακας 7). Γενικά τα υδατικά διαλύματα θεωρούνται απόλυτα σταθερά όταν η απόλυτη τιμή του δυναμικού επιφάνειας είναι υψηλότερη από 30 mV καθώς οι ισχυρές δυνάμεις απόθησης θα μπορούσαν να αποτρέψουν τη συσσωμάτωση μεταξύ των μορίων (Yan et al., 2016).

Τα εναιωρήματα της βακτηριακής νανοκυτταρίνης μετά από 24 και 32 ώρες υδρόλυσης έδωσαν υψηλότερη τιμή δυναμικού επιφάνειας (κατά απόλυτη τιμή) κατά 44,5% και 45,5%, αντίστοιχα (-27, 6 mV και -27,8 mV, αντίστοιχα). Η υψηλότερη τιμή δυναμικού επιφάνειας στην περίπτωση της βακτηριακής νανοκυτταρίνης πιθανότατα να οφείλεται στις περισσότερες καρβοξυλικές ομάδες που προέκυψαν λόγω της όξινης υδρόλυσης, παρεμποδίζοντας έτσι τη συσσωμάτωση των νανομορίων μεταξύ τους (Zhai et al., 2020).

Πίνακας 7 Δυναμικό επιφάνειας βακτηριακής κυτταρίνης και βακτηριακής νανοκυτταρίνης μετά από υδρόλυση

Συνθήκες υδρόλυσης	Δυναμικό επιφάνειας (mV)	Βιβλιογραφία
-----------------------	--------------------------------	--------------

BC ¹		-26,5	
BCNs ²	50% H ₂ SO ₄ (w/w), 3h, 500 rpm	-34,8	Yan et al. (2017)
BC ¹		-21,4	
BCNs ²	3M HCl 4h, 200 rpm	-39,5	Zhai et al. (2020)
BCNs ²	50% H ₂ SO ₄ (w/w), 1 h, 500 rpm	-33.6 ± 1.5	Vasconcelos et al. (2017)
BC ¹		-19,1	
BCNs ²	50% H ₂ SO ₄ (w/v), 24 h, 500 rpm	-27,6	Παρούσα μελέτη
BCNs ²	50% H ₂ SO ₄ (w/v), 32 h, 500 rpm	-27,8	

¹ Βακτηριακή κυτταρίνη, ² Βακτηριακή νανοκυτταρίνη

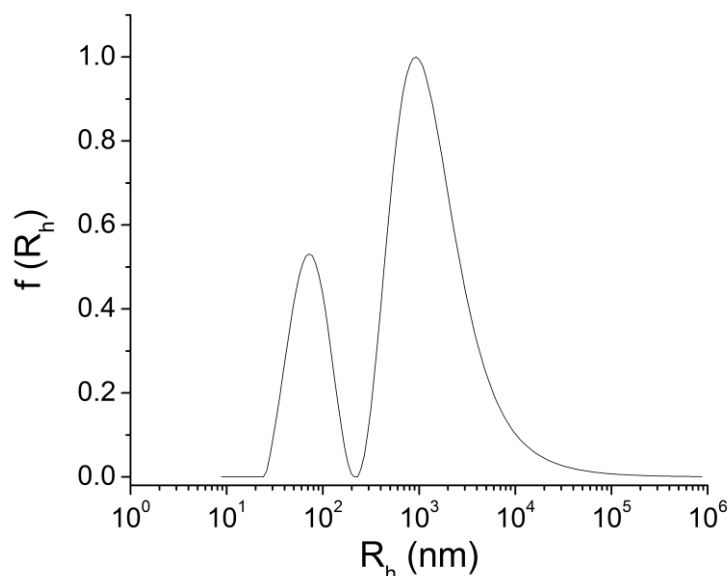
4.5.3 Στατική και Δυναμική Σκέδαση φωτός

Η μέθοδος της σκέδασης φωτός, πραγματοποιήθηκε με σκοπό την εύρεση του μεγέθους των σωματιδίων της βακτηριακής νανοκυτταρίνης. Η στατική σκέδαση φωτός παρέχει τη γυροσκοπική ακτίνα (Rg) καθώς και το μοριακό τους βάρος. Το μοριακό βάρος των σωματιδίων δεν ήταν εφικτό να προσδιοριστεί, καθώς η ακριβής συγκέντρωση της βακτηριακής νανοκυτταρίνης στο εναιώρημα δεν είναι γνωστή, λόγω απωλειών κατά τη διαδικασία φιλτραρίσματος του δείγματος (0,45 nm pore size hydrophilic membranes). Σε αυτά τα πειράματα δεν προκύπτει κατανομή ενός μόνο πληθυσμού οπότε η στατική σκέδαση φωτός παρέχει τιμές που δεν αντιπροσωπεύουν κάποιο συγκεκριμένο πληθυσμό από τους δύο.

Στη δυναμική σκέδαση φωτός αναλύθηκε η κατανομή υδροδυναμικών ακτινών (Rh) με CONTIN Analysis σε γωνία σκέδασης 90°. Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 8 εμφανίζονται δύο κορυφές. Η πρώτη κορυφή αντιστοιχεί σε υδροδυναμική ακτίνα

σωματιδίων μεγέθους 72 nm ενώ η δεύτερη κορυφή αναφέρεται σε υδροδυναμική ακτίνα σωματιδίων μεγέθους 931 nm.

$$R_h = 73 \text{ nm} / 931 \text{ nm}$$



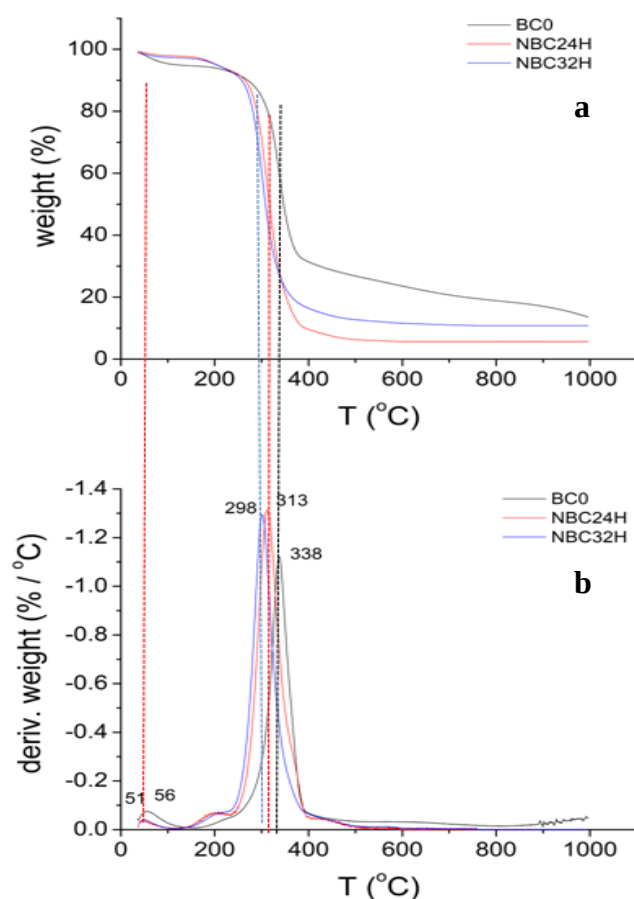
Διάγραμμα 8 CONTIN ανάλυση με γωνία σκέδασης 90° της βακτηριακής νανοκυτταρίνης που προέκυψε από κατεργασία με θειικό οξύ έπειτα από υδρόλυση 32 ωρών που παρήχθη σε υδρόλυμα πιτύρου σίτου με το βακτηριακό στέλεχος *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM 15973

Επειδή η ανάλυση είναι σταθμισμένη με τη σκεδαζόμενη ένταση (η οποία εξαρτάται από τη μάζα και το σχήμα των σωματιδίων) ο αριθμός των σωματιδίων της κορυφής που αντιστοιχεί σε μεγάλα σωματίδια είναι πολύ μικρότερος από τον αριθμό σωματιδίων της κορυφής που αντιστοιχεί σε μικρά σωματίδια (μπορεί και ~1000 φορές). Αυτό σημαίνει ότι παρόλο που το δείγμα φιλτραρίστηκε τα σωματίδια δημιούργησαν συσσωματώματα μετά το φιλτράρισμα ή τα ήδη υπάρχοντα συσσωματώματα άλλαξαν σχήμα λόγω της χαλαρής σύνδεσης μεταξύ τους και πέρασαν από το φίλτρο.

4.5.4 Θερμοσταθμική ανάλυση TGA/ Παράγωγα θερμοβαρυτικών ιχνών DTG

Τα δείγματα της βακτηριακής κυτταρίνης και της βακτηριακής νανοκυτταρίνης μετά από την χημική υδρόλυση αναλύθηκαν ως προς την θερμοσταθμική τους συμπεριφορά (Thermogravimetric analysis- TGA) σε συνδυασμό με τα παράγωγα των θερμοβαρυτικών ιχνών (Derivative thermogravimetric traces-DTG) (Διάγραμμα 9).

Σύμφωνα με την TGA ανάλυση (Διάγραμμα 9a) η θερμοκρασία αποσύνθεσης ήταν 338 °C στην περίπτωση της βακτηριακής κυτταρίνης και 313 °C και 298 °C στην περίπτωση της βακτηριακής νανοκυτταρίνης μετά από 24 και 32 ώρες υδρόλυσης, αντίστοιχα. Όπως είναι φανερό, η θερμοκρασία αποσύνθεσης της βακτηριακής κυτταρίνης είναι υψηλότερη σε σχέση με της βακτηριακής νανοκυτταρίνης. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στην παρουσία θεικών ομάδων στην επιφάνεια της βακτηριακής νανοκυτταρίνης εξαιτίας των αντιδράσεων υδρόλυσης με H_2SO_4 οι οποίες προάγουν τον σχηματισμό νανοδομών με χαμηλή θερμική σταθερότητα. Είναι φανερό πως η εισαγωγή φορτισμένων θεικών ομάδων θα μπορούσε να μειώσει τη θερμική σταθερότητα των νανοϊνιδίων της βακτηριακής κυτταρίνης (Roman et al., 2004).



Διάγραμμα 9 Θερμοσταθμική ανάλυση (Thermogravimetric analysis- TGA) (a) και παράγωγα θερμοβαρυτικών ιχνών (Derivative thermogravimetric traces-DTG) (b) της βακτηριακής κυτταρίνης (μαύρο) που παρήχθη σε υδρόλυμα πιτύρου σίτου με το βακτηριακό στέλεχος *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM 15973 και βακτηριακής νανοκυτταρίνης που προέκυψε από κατεργασία με θειικό οξύ έπειτα από υδρόλυση 24 (κόκκινο) και 32 (μπλε) ωρών

Όσον αφορά στην DTG ανάλυση παρουσιάστηκαν τρία διαστήματα απώλειας μάζας των δειγμάτων (Διάγραμμα 9b). Πιο συγκεκριμένα, το πρώτο διάστημα εμφανίζεται κάτω από τους 180 °C και οφείλεται στην διαδικασία εξάτμισης του υπολειπόμενου νερού από την μήτρα των πολυμερών. Το δεύτερο διάστημα παρουσιάζεται μεταξύ 220 °C και 400 °C και συνδέεται με φαινόμενα αποσύνθεσης κυτταρίνης συμπεριλαμβανομένου της αφυδάτωσης, της αποσύνθεσης και του αποπολυμερισμού γλυκοσιδικών αλυσίδων της κυτταρίνης. Τέλος, κατά το τελευταίο διάστημα μεταξύ 450 °C έως 600 °C σχετίζεται με φαινόμενα οξείδωσης και διάσπασης υπολειμμάτων άνθρακα καταλήγοντας σε μόρια αέριας μορφής μικρού μοριακού βάρους (Vasconcelos et al., 2017).

Πίνακας 8 Θερμοκρασία αποσύνθεσης της βακτηριακής κυτταρίνης και της βακτηριακής νανοκυτταρίνης μετά από υδρόλυση

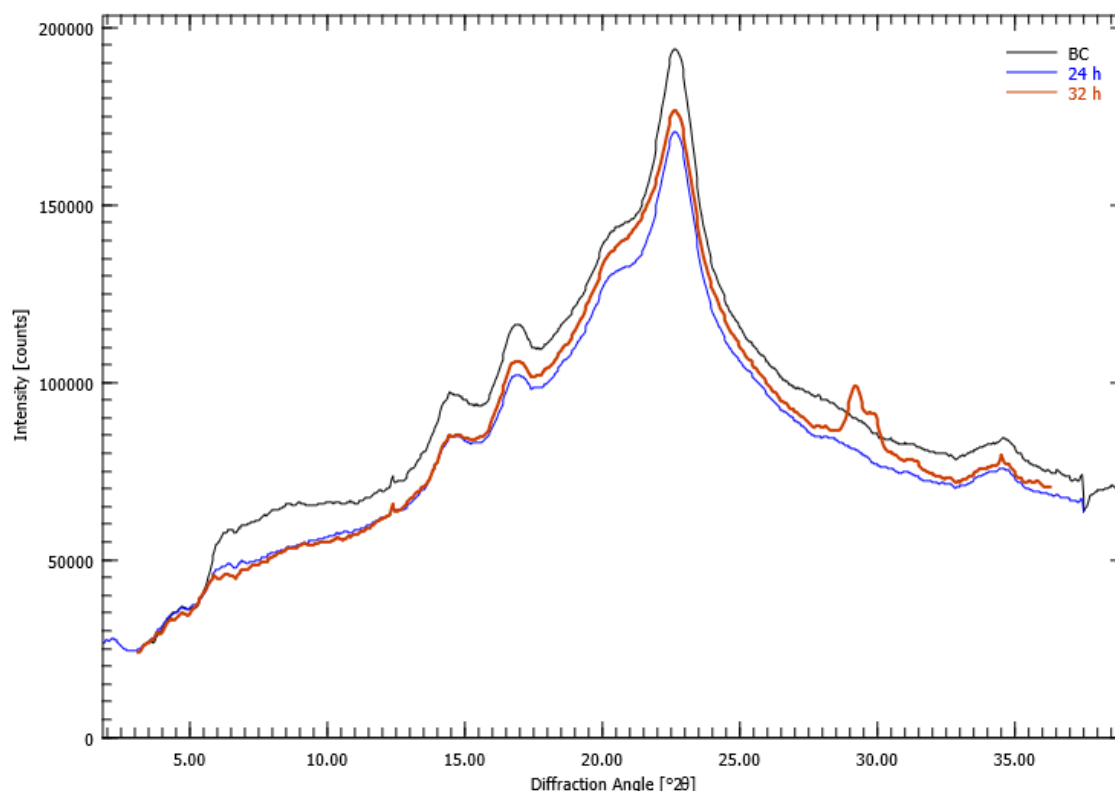
Συνθήκες υδρόλυσης		Θερμοκρασία αποσύνθεσης (°C)	Βιβλιογραφία
BC ¹		305	Yan et al. (2017)
BCNs ²	50% H ₂ SO ₄ (w/w), 3h, 500 rpm	350	
BC ¹		315.8 ± 0.3	Andritsou et al. (2011)
BC ¹		335	Vasconcelos et al. (2017)
BCNs ²	50% H ₂ SO ₄ (w/w), 1 h, 500 rpm	223	
BC ¹		338	Παρούσα μελέτη

BCNs ²	50% H ₂ SO ₄ (w/v), 24 h, 500 rpm	313
BCNs ²	50% H ₂ SO ₄ (w/v), 32 h, 500 rpm	298

¹ Βακτηριακή κυτταρίνη, ² Βακτηριακή νανοκυτταρίνη

4.5.5 Φασματοσκοπία περίθλασης ακτινών-X (X-Ray Diffractometry, XRD) και δείκτης κρυσταλλικότητας

Για τον προσδιορισμό της κρυσταλλικής δομής των δειγμάτων της βακτηριακής κυτταρίνης και της βακτηριακής νανοκυτταρίνης που προέκυψε μετά από υδρόλυση 24 και 32 ωρών ελήφθησαν τα διαγράμματα περίθλασης ακτινών-X (Διάγραμμα 10). Σε όλα τα δείγματα της βακτηριακής κυτταρίνης και της βακτηριακής νανοκυτταρίνης εμφανίζονται τρεις κορυφές περίθλασης με γωνία 2θ σε 14,5°, 16,9° και 22,7°, οι οποίες συνήθως αποδίδονται σε κρυσταλλικά επίπεδα 101, 10-1 και 200, αντίστοιχα. Η κυτταρίνη τύπου I_α, η οποία είναι η επικρατέστερη στην βακτηριακή κυτταρίνη χαρακτηρίζεται από την παρουσία αυτών των τριών κορυφών περίθλασης (Vasconcelos et al., 2017).



Διάγραμμα 10 Φάσματα περίθλασης ακτινών-X της βακτηριακής κυτταρίνης (μαύρο) που παρήχθη σε υδρόλυμα πιτύρου σίτου με το βακτηριακό στέλεχος *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM 15973 και βακτηριακής νανοκυτταρίνης που προέκυψε από κατεργασία με θειικό οξύ έπειτα από υδρόλυση 24 (μπλέ) και 32 (κόκκινο) ωρών

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα (Πίνακας 9) ο δείκτης κρυσταλλικότητας της βακτηριακής κυτταρίνης ήταν 81,8% ενώ της βακτηριακής νανοκυτταρίνης μετά από 24 και 32 ώρες υδρόλυσης ήταν 90,1% και 91,69%, αντίστοιχα. Η αύξηση της κρυσταλλικότητας μετά από την όξινη υδρόλυση (10,1% αύξηση μετά από 24 ώρες υδρόλυσης και 12,1% μετά από 32 ώρες υδρόλυσης) οφείλεται στην μείωση της άμορφης περιοχής, καθώς αυτή η περιοχή είναι πιο εύκολα προσβάσιμη από τα μόρια του οξέος (Vasconcelos et al., 2017). Συγκρίνοντας τη βακτηριακή νανοκυτταρίνη μετά από 24 ώρες υδρόλυσης και τη βακτηριακή νανοκυτταρίνη μετά από 32 ώρες υδρόλυσης δεν παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στο βαθμό κρυσταλλικότητας (1,8%).

Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης έρχονται σε συμφωνία με αυτά της ευρύτερης βιβλιογραφίας (Πίνακας 9) στην οποία αναφέρονται τιμές δείκτη κρυσταλλικότητας μεταξύ 75,1% και 86,9% όσον αφορά στη βακτηριακή κυτταρίνη και μεταξύ 89,6 % και 91% στην περίπτωση της βακτηριακής νανοκυτταρίνης.

Πίνακας 9 Δείκτης κρυσταλλικότητας της βακτηριακής κυτταρίνης και της βακτηριακής νανοκυτταρίνης μετά από υδρόλυση

Συνθήκες υδρόλυσης		Δείκτης κρυσταλλικότητας (%)	Βιβλιογραφία
BC ¹		75,1	
BCNs ²	50% H ₂ SO ₄ (w/w), 3h, 500 rpm	89,6	Yan et al. (2017)
BC ¹		86,9 ± 2,23	Andritsou et al. (2011)
BC ¹		79	
BCNs ²	50% H ₂ SO ₄ (w/w), 1 h, 500 rpm	91	Vasconcelos et al. (2017)
BC ¹		81,8	
BCNs ²	50% H ₂ SO ₄ (w/v), 24 h, 500 rpm	90,1	Παρούσα μελέτη
BCNs ²	50% H ₂ SO ₄ (w/v), 32 h, 500 rpm	91,69	

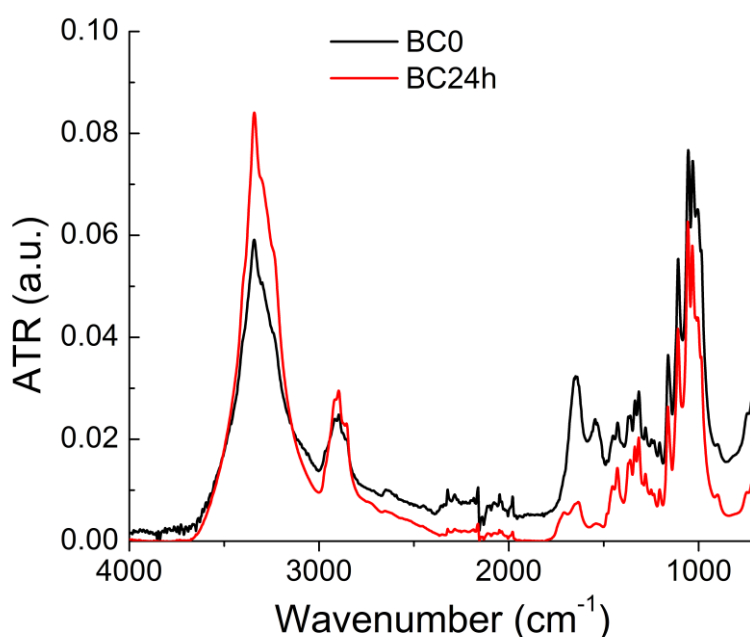
¹ Βακτηριακή κυτταρίνη, ² Βακτηριακή νανοκυτταρίνη

4.5.6 Φασματοσκοπία Υπερύθρου Μετασχηματισμού Fourier

Τα φάσματα FT-IR της βακτηριακής κυτταρίνης και της βακτηριακής νανοκυτταρίνης μετά από υδρόλυση 24 ωρών παρουσίασαν τυπικές ζώνες δόνησης μορίων κυτταρίνης (Διάγραμμα 11) συμπεριλαμβανομένου των ζωνών που εμφανίζονται μεταξύ 3600-3000 (εκτάσεις των ομάδων O-H), 2895 cm⁻¹ (C-H εκτάσεις στην σκελετική αλυσίδα της κυτταρίνης), 1694-1581 cm⁻¹ (δεσμευμένη υγρασία ή αμιδικοί δεσμοί λόγω σύνδεσης με υπολείμματα πρωτεϊνών που υπάρχουν στο θρεπτικό μέσο

της ζύμωσης), $1493\text{-}1396\text{ cm}^{-1}$ (H-C-H, O-C-H κάμπυες δόνησης εντός του επιπέδου), 1315 cm^{-1} (CH_2 δονήσεις ταλάντωσης σε C6 άνθρακες), $1296\text{-}1219\text{ cm}^{-1}$ (κάμπυες δόνησης εκτός του επιπέδου των C-O-H σε C6 άνθρακες), 1205 cm^{-1} και 1162 cm^{-1} (συμμετρικές και ασύμμετρες δονήσεις έκτασης από C-O-C αντίστοιχα), 1056 cm^{-1} , 1003 cm^{-1} , 986 cm^{-1} (C-C, C-OH, C-H δονήσεις δακτυλίου και πλευρικής ομάδας), 1107 cm^{-1} (C-O-C (1-4) γλυκοσιδικοί δεσμοί), 898 cm^{-1} (C-O-C, CC-O, C-C-H δονήσεις παραμόρφωσης και έκτασης) (Andritsou et al., 2018; Vasconcellos et al., 2017; Nagalakshmaiah et al., 2016).

Πιο συγκεκριμένα οι κορυφές 744 cm^{-1} και 3340 cm^{-1} είναι χαρακτηριστικές της παρουσίας του τύπου I_α κρυσταλλικών ζωνών απορρόφησης και αντιστοιχούν σε κυτταρινικά αλλόμορφα τύπου I_α και I_β γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τους Andritsou et al. (2018). Όσον αφορά στο δείγμα βακτηριακής κυτταρίνης ύστερα από 24 ώρες υδρόλυσης, η κορυφή στα 744 cm^{-1} θα μπορούσε να αντιστοιχεί σε συμμετρικές δονήσεις δεσμών C O S που σχετίζονται με C O SO_3 ομάδες ως απόρροια της διαδικασίας υδρόλυσης με πυκνό θειικό οξύ. Οι Vasconcellos et al. (2017) αναφέρουν ζώνη απορρόφησης στα 807 cm^{-1} σε δείγματα νανοκρυστάλλων βακτηριακής κυτταρίνης μετά από υδρόλυση με θειικό οξύ.



Διάγραμμα 11 Φάσμα υπερύθρου βακτηριακής κυτταρίνης (BC0) και βακτηριακής νανοκυτταρίνης (BC24h) μετά από υδρόλυση 24 ωρών που παρήχθη σε υδρόλυμα

πιτύρου σίτου με το βακτηριακό στέλεχος *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM
15973

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι το βακτηριακό στέλεχος *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM 15973 ήταν αρκετά αξιόλογο αφού μπόρεσε να μεταβολίσει ικανοποιητικά τα θρεπτικά υποστρώματα σε όλες τις συνθήκες καλλιέργειας που μελετήθηκαν.
- Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με διαφορετικό pH φάνηκε πως η μέγιστη παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης (3,2 g/L) επιτεύχθηκε όταν το pH του θρεπτικού μέσου ρυθμίστηκε στο 6. Η απόδοση της ζύμωσης ήταν 0,16 g βακτηριακής κυτταρίνης/ g ολικών σακχάρων με παραγωγικότητα 0,41 g/L/ ημέρα.
- Η μέγιστη συγκέντρωση της βακτηριακής κυτταρίνης που επιτεύχθηκε στα πειράματα με τους διαφορετικούς λόγους άνθρακα προς άζωτο ελεύθερων αμινομάδων ήταν 5,2 g/L στην περίπτωση που ο λόγος άνθρακα προς άζωτο ελεύθερων αμινομάδων ήταν ίσος με 14. Η απόδοση της ζύμωσης ήταν 0,29 g βακτηριακής κυτταρίνης/ g ολικών σακχάρων με παραγωγικότητα 0,70 g/L/ ημέρα. Η περαιτέρω μείωση του λόγου είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της συγκέντρωσης της βακτηριακής κυτταρίνης.
- Η παροχή αερισμού φάνηκε να μην επηρεάζει ιδιαίτερα την αποδοτικότητα της ζύμωσης καθώς η μέγιστη συγκέντρωση βακτηριακής κυτταρίνης που επιτεύχθηκε στην περίπτωση όπου οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε στατικούς βιοαντιδραστήρες με παροχή αερισμού ήταν 2,9 g/L.
- Η ανάλυση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης έδειξε την καταλληλότητα της νανοκυτταρίνης ως παράγοντα ενίσχυσης σε μήτρες πολυμερών. Πιο συγκεκριμένα φάνηκε πως η νανοκυτταρίνη η οποία προέκυψε μετά από 24 ώρες υδρόλυσης με θειικό οξύ είχε διάμετρο 25,8-73,1 nm και αναλογία μήκους/διαμέτρου μεγαλύτερη από 13.
- Χρησιμοποιώντας τη φασματοσκοπία περίθλασης ακτινών-X, τα δείγματα της βακτηριακής κυτταρίνης μετά από υδρόλυση 24 ωρών με θειικό οξύ εμφάνισαν μεγαλύτερο δείκτη κρυσταλλικότητας (90,1%) σε σχέση με τα δείγματα της βακτηριακής κυτταρίνης (81,8%) .

- Από τη θερμοσταθμική ανάλυση TGA φάνηκε πως η μέγιστη θερμοκρασία αποσύνθεσης της βακτηριακής κυτταρίνης ήταν 338 °C ενώ της βακτηριακής κυτταρίνης μετά από υδρόλυση 24 ωρών με θειικό οξύ ήταν 313 °C.
- Τα φάσματα FT-IR της βακτηριακής κυτταρίνης υπέδειξαν την παρουσία των δύο αλλόμορφων I_α και I_β.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Akoglu, A., Cakir, I., Karahan, A. G., & LUTFU, M. (2018). Effects of bacterial cellulose as a fat replacer on some properties of fat-reduced mayonnaise. *Romanian Biotechnological Letters*, 23(3), 13674.
2. Al-Abdallah, W., & Dahman, Y. (2013). Production of green biocellulose nanofibers by *Gluconacetobacter xylinus* through utilizing the renewable resources of agriculture residues. *Bioprocess and biosystems engineering*, 36(11), 1735-1743.
3. Allen, R. J. L. (1940). The estimation of phosphorus. *Biochemical Journal*, 34(6), 858-865.
4. Alonso, E. (2018). The role of supercritical fluids in the fractionation pretreatments of a wheat bran-based biorefinery. *The Journal of Supercritical Fluids*, 133, 603-614.
5. Andritsou, V., De Melo, E. M., Tsouko, E., Ladakis, D., Maragkoudaki, S., Koutinas, A. A., & Matharu, A. S. (2018). Synthesis and characterization of bacterial cellulose from citrus-based sustainable resources. *ACS omega*, 3(8), 10365-10373.
6. Apprich, S., Tirpanalan, O., Hell, J., Reisinger, M., Böhmendorfer, S., Siebenhandl-Ehn, S., ... & Kneifel, W. (2014). Wheat bran-based biorefinery 2: Valorization of products. *LWT-Food Science and Technology*, 56(2), 222-231.
7. Azeredo, H., Barud, H., Farinas, C. S., Vasconcellos, V. M., & Claro, A. M. (2019). Bacterial cellulose as a raw material for food and food packaging applications. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 3, 7.
8. Bielecki, S., Krystynowicz, A., Turkiewicz, M., & Kalinowska, H. (2005). Bacterial cellulose. *Biopolymers Online: Biology• Chemistry• Biotechnology• Applications*, 5.
9. 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*, 40(3), 397-414.
10. Brett, C. T. (2000). Cellulose microfibrils in plants: biosynthesis, deposition, and integration into the cell wall.

11. Brown, R. M., Willison, J. H., & Richardson, C. L. (1976). Cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: visualization of the site of synthesis and direct measurement of the in vivo process. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(12), 4565-4569.
12. Bruker (2012). Program name(s). Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA.
13. Budhwar, S., Chakraborty, M., Sethi, K., & Chatterjee, A. (2020). Antidiabetic properties of rice and wheat bran—A review. *Journal of Food Biochemistry*, e13424.
14. Cacicedo, M. L., Castro, M. C., Servetas, I., Bosnea, L., Boura, K., Tsafrakidou, P., ... & Castro, G. R. (2016). Progress in bacterial cellulose matrices for biotechnological applications. *Bioresource technology*, 213, 172-180.
15. Campano, C., Balea, A., Blanco, A., & Negro, C. (2016). Enhancement of the fermentation process and properties of bacterial cellulose: a review. *Cellulose*, 23(1), 57-91.
16. 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.
17. Chen, L., Hong, F., Yang, X. X., & Han, S. F. (2013). Biotransformation of wheat straw to bacterial cellulose and its mechanism. *Bioresource technology*, 135, 464-468.
18. Chen, P. S., Toribara, T. T., & Warner, H. (1956). Microdetermination of phosphorus. *Analytical chemistry*, 28(11), 1756-1758.
19. Cheng, Z., Yang, R., Liu, X., Liu, X., & Chen, H. (2017). Green synthesis of bacterial cellulose via acetic acid pre-hydrolysis liquor of agricultural corn stalk used as carbon source. *Bioresource technology*, 234, 8-14.
20. Choi, S. M., & Shin, E. J. (2020). The Nanofication and Functionalization of Bacterial Cellulose and Its Applications. *Nanomaterials*, 10(3), 406.
21. Corral, M. L., Cerrutti, P., Vázquez, A., & Califano, A. (2017). Bacterial nanocellulose as a potential additive for wheat bread. *Food Hydrocolloids*, 67, 189-196.

22. Czaja, W. K., Young, D. J., Kawecki, M., & Brown, R. M. (2007). The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. *biomacromolecules*, 8(1), 1-12.
23. Deroover, L., Tie, Y., Verspreet, J., Courtin, C. M., & Verbeke, K. (2020). Modifying wheat bran to improve its health benefits. *Critical reviews in food science and nutrition*, 60(7), 1104-1122.
24. Döbelin, N., Kleeberg, R., „Profex: a graphical user interface for the Rietveld refinement program BGMN, *Journal of Applied Crystallography* 48 (2015), 1573-1580. doi:10.1107/S1600576715014685
25. Fadel, M., AbdEl-Halim, S., Sharada, H., Yehia, A., & Ammar, M. (2020). Production of Glucoamylase, α -amylase and Cellulase by *Aspergillus oryzae* F-923 Cultivated on Wheat Bran under Solid State Fermentation. *Journal of Advances in Biology & Biotechnology*, 8-22.
26. Fardet, A. (2010). New hypotheses for the health-protective mechanisms of whole-grain cereals: what is beyond fibre?. *Nutrition research reviews*, 23(1), 65-134.
27. Foresti, M. L., Vázquez, A., & Boury, B. (2017). Applications of bacterial cellulose as precursor of carbon and composites with metal oxide, metal sulfide and metal nanoparticles: A review of recent advances. *Carbohydrate Polymers*, 157, 447-467.
28. Fu, L., Zhang, J., & Yang, G. (2013). Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair. *Carbohydrate polymers*, 92(2), 1432-1442.
29. Gallegos, A. M. A., Carrera, S. H., Parra, R., Keshavarz, T., & Iqbal, H. M. (2016). Bacterial cellulose: A sustainable source to develop value-added products—A review. *BioResources*, 11(2), 5641-5655.
30. George, J., Ramana, K. V., & Bawa, A. S. (2011). Bacterial cellulose nanocrystals exhibiting high thermal stability and their polymer nanocomposites. *International Journal of Biological Macromolecules*, 48(1), 50-57.
31. Gorgieva, S., & Trček, J. (2019). Bacterial cellulose: Production, modification and perspectives in biomedical applications. *Nanomaterials*, 9(10), 1352.

32. Gupta, V. K., Carrott, P. J. M., Singh, R., Chaudhary, M., & Kushwaha, S. (2016). Cellulose: a review as natural, modified and activated carbon adsorbent. *Bioresource technology*, 216, 1066-1076.
33. Güzel, M., & Akpınar, Ö. (2019). Production and characterization of bacterial cellulose from citrus peels. *Waste and biomass valorization*, 10(8), 2165-2175.
34. Hornung, M., Ludwig, M., Gerrard, A. M., & Schmauder, H. P. (2006). Optimizing the production of bacterial cellulose in surface culture: Evaluation of substrate mass transfer influences on the bioreaction (Part 1). *Engineering in Life Sciences*, 6(6), 537-545.
35. Hussain, Z., Sajjad, W., Khan, T., & Wahid, F. (2019). Production of bacterial cellulose from industrial wastes: a review. *Cellulose*, 26(5), 2895-2911.
36. Ishihara, M., Matsunaga, M., Hayashi, N., & Tišler, V. (2002). Utilization of D-xylose as carbon source for production of bacterial cellulose. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(7), 986-991.
37. Jin, Y. H., Lee, T., Kim, J. R., Choi, Y. E., & Park, C. (2019). Improved production of bacterial cellulose from waste glycerol through investigation of inhibitory effects of crude glycerol-derived compounds by *Gluconacetobacter xylinus*. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 75, 158-163.
38. Jozala, A. F., de Lencastre-Novaes, L. C., Lopes, A. M., de Carvalho Santos-Ebinuma, V., Mazzola, P. G., Pessoa-Jr, A., ... & Chaud, M. V. (2016). Bacterial nanocellulose production and application: a 10-year overview. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(5), 2063-2072.
39. Keshk, S. M. (2014). Bacterial cellulose production and its industrial applications. *J Bioprocess Biotech*, 4(150), 2.
40. Keshk, S. M., & El-Kott, A. F. (2017). Natural bacterial biodegradable medical polymers: Bacterial cellulose. In *Science and Principles of Biodegradable and Bioresorbable Medical Polymers* (pp. 295-319). Woodhead Publishing.
41. Koutinas, A. A., Arifeen, N., Wang, R., & Webb, C. (2007). Cereal-based biorefinery development: Integrated enzyme production for cereal flour hydrolysis. *Biotechnology and bioengineering*, 97(1), 61-72.
42. Koutinas, A., Belafi-Bako, K., Kabiri-Badr, A., Toth, A., Gubicza, L., & Webb, C. (2001). Enzymatic hydrolysis of polysaccharides: hydrolysis of

- starch by an enzyme complex from fermentation by *Aspergillus awamori*. *Food and bioproducts processing*, 79(1), 41-44.
43. Kuszmann, J (2006). Introduction to Carbohydrates, In: *Organic Chemistry of Sugars*, Daniel E. Levy & Peter E. Fugendi (Ed.), CRC Press, New York, Ch. 2, pp. 44-71
 44. Lee, K. Y., Buldum, G., Mantalaris, A., & Bismarck, A. (2014). More than meets the eye in bacterial cellulose: biosynthesis, bioprocessing, and applications in advanced fiber composites. *Macromolecular bioscience*, 14(1), 10-32.
 45. Li, Z., Wang, L., Hua, J., Jia, S., Zhang, J., & Liu, H. (2015). Production of nano bacterial cellulose from waste water of candied jujube-processing industry using *Acetobacter xylinum*. *Carbohydrate polymers*, 120, 115-119.
 46. Lie, S. (1973). The EBC-ninhydrin method for determination of free alpha amino nitrogen. *Journal of the Institute of Brewing*, 79(1), 37-41.
 47. Lin, D., Liu, Z., Shen, R., Chen, S., & Yang, X. (2020). Bacterial cellulose in food industry: Current research and future prospects. *International Journal of Biological Macromolecules*.
 48. Luo, M. T., Zhao, C., Huang, C., Chen, X. F., Huang, Q. L., Qi, G. X., ... & Chen, X. D. (2017). Efficient using durian shell hydrolysate as low-cost substrate for bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus*. *Indian journal of microbiology*, 57(4), 393-399.
 49. Melikoglu, M., Lin, C. S. K., & Webb, C. (2013). Kinetic studies on the multi-enzyme solution produced via solid state fermentation of waste bread by *Aspergillus awamori*. *Biochemical Engineering Journal*, 80, 76-82.
 50. Miller, G. L. (1959). Modified DNS method for reducing sugars. *Anal Chem*, 31(3), 426-428.
 51. Mohammadkazemi, F., Azin, M., & Ashori, A. (2015). Production of bacterial cellulose using different carbon sources and culture media. *Carbohydrate polymers*, 117, 518-523.
 52. Mohan, S. R. (2016). Strategy and design of Innovation Policy Road Mapping for a waste biorefinery. *Bioresource technology*, 215, 76-83.
 53. Mohan, S. V., Dahiya, S., Amulya, K., Katakojwala, R., & Vanitha, T. K. (2019). Can circular bioeconomy be fueled by waste biorefineries—A closer look. *Bioresource Technology Reports*, 7, 100277.

54. Mohite, B. V., & Patil, S. V. (2014). A novel biomaterial: bacterial cellulose and its new era applications. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 61(2), 101-110.
55. Nagalakshmaiah, M., Elkissi, N., & Dufresne, A. (2016). Structural morphology of cellulose nanocrystals extracted from chilli leftover and their reinforcement in cariflex-IR rubber latex.
56. Nara, S. and Komiya, T. (1983), Studies on the Relationship Between Water-saturated State and Crystallinity by the Diffraction Method for Moistened Potato Starch. *Starch/Stärke*, 35: 407-410. doi:10.1002/star.19830351202
57. Ng, C. C., & Shyu, Y. T. (2004). Development and production of cholesterol-lowering Monascus-nata complex. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(9), 875-879.
58. Onipe, O. O., Jideani, A. I., & Beswa, D. (2015). Composition and functionality of wheat bran and its application in some cereal food products. *International Journal of Food Science & Technology*, 50(12), 2509-2518.
59. Pang, M., Huang, Y., Meng, F., Zhuang, Y., Liu, H., Du, M., ... & Cai, T. (2020). Application of bacterial cellulose in skin and bone tissue engineering. *European Polymer Journal*, 122, 109365.
60. Papagiannopoulos, A., & Vlassi, E. (2019). Stimuli-responsive nanoparticles by thermal treatment of bovine serum albumin inside its complexes with chondroitin sulfate. *Food Hydrocolloids*, 87, 602-610.
61. Paximada, P., Dimitrakopoulou, E. A., Tsouko, E., Koutinas, A. A., Fasseas, C., & Mandala, I. G. (2016). Structural modification of bacterial cellulose fibrils under ultrasonic irradiation. *Carbohydrate polymers*, 150, 5-12.
62. Picheth, G. F., Pirich, C. L., Sierakowski, M. R., Woehl, M. A., Sakakibara, C. N., de Souza, C. F., ... & de Freitas, R. A. (2017). Bacterial cellulose in biomedical applications: A review. *International journal of biological macromolecules*, 104, 97-106.
63. Qiu, K., & Netravali, A. N. (2014). " Green" composites based on bacterial cellulose produced using novel low cost carbon source and soy protein resin. In *Recent Advances in Adhesion Science and Technology in Honor of Dr. Kash Mittal* (pp. 193-208). CRC Press.

64. Qiu, K., & Netravali, A. N. (2014). A review of fabrication and applications of bacterial cellulose based nanocomposites. *Polymer Reviews*, 54(4), 598-626.
65. Revin, V., Liyaskina, E., Nazarkina, M., Bogatyreva, A., & Shchankin, M. (2018). Cost-effective production of bacterial cellulose using acidic food industry by-products. *brazilian journal of microbiology*, 49, 151-159.
66. Roman, M., & Winter, W. T. (2004). Effect of sulfate groups from sulfuric acid hydrolysis on the thermal degradation behavior of bacterial cellulose. *Biomacromolecules*, 5(5), 1671-1677.
67. Schramm, M., & Hestrin, S. (1954). Factors affecting production of cellulose at the air/liquid interface of a culture of *Acetobacter xylinum*. *Microbiology*, 11(1), 123-129.
68. Schrecker, S. T., & Gostomski, P. A. (2005). Determining the water holding capacity of microbial cellulose. *Biotechnology letters*, 27(19), 1435-1438.
69. Sharma, C., & Bhardwaj, N. K. (2019). Bacterial nanocellulose: Present status, biomedical applications and future perspectives. *Materials Science and Engineering: C*, 104, 109963.
70. Shi, Z., Zhang, Y., Phillips, G. O., & Yang, G. (2014). Utilization of bacterial cellulose in food. *Food hydrocolloids*, 35, 539-545.
71. Son, H. J., Heo, M. S., Kim, Y. G., & Lee, S. J. (2001). Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial cellulose by a newly isolated *Acetobacter*. *Biotechnology and applied biochemistry*, 33(1), 1-5.
72. Thomas, P., Duolikun, T., Rumjit, N. P., Moosavi, S., Lai, C. W., Johan, M. R. B., & Fen, L. B. (2020). Comprehensive review on nanocellulose: Recent developments, challenges and future prospects. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 103884.
73. Tsouko, E., Kachrimanidou, V., Dos Santos, A. F., Lima, M. E. D. N. V., Papanikolaou, S., de Castro, A. M., ... & Koutinas, A. A. (2017). Valorization of by-products from palm oil mills for the production of generic fermentation media for microbial oil synthesis. *Applied biochemistry and biotechnology*, 181(4), 1241-1256.
74. Ul-Islam, M., Ullah, M. W., Khan, S., & Park, J. K. (2020). Production of bacterial cellulose from alternative cheap and waste resources: A step for cost

- reduction with positive environmental aspects. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 37, 925-937.
75. Ullah, H., Santos, H. A., & Khan, T. (2016). Applications of bacterial cellulose in food, cosmetics and drug delivery. *Cellulose*, 23(4), 2291-2314.
 76. Ullah, M. W., Manan, S., Kiprono, S. J., Ul-Islam, M., & Yang, G. (2019). Synthesis, Structure, and Properties of Bacterial Cellulose. *Nanocellulose: From Fundamentals to Advanced Materials*, 81-113.
 77. Vasconcelos, N. F., Feitosa, J. P. A., da Gama, F. M. P., Morais, J. P. S., Andrade, F. K., de Souza, M. D. S. M., & de Freitas Rosa, M. (2017). Bacterial cellulose nanocrystals produced under different hydrolysis conditions: Properties and morphological features. *Carbohydrate polymers*, 155, 425-431.
 78. Wang, J., Tavakoli, J., & Tang, Y. (2019). Bacterial cellulose production, properties and applications with different culture methods—A review. *Carbohydrate polymers*, 219, 63-76.
 79. Yan, H., Chen, X., Feng, M., Shi, Z., Zhang, W., Wang, Y., ... & Lin, Q. (2019). Entrapment of bacterial cellulose nanocrystals stabilized Pickering emulsions droplets in alginate beads for hydrophobic drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 177, 112-120.
 80. Yan, H., Chen, X., Li, J., Feng, Y., Shi, Z., Wang, X., & Lin, Q. (2016). Synthesis of alginate derivative via the Ugi reaction and its characterization. *Carbohydrate polymers*, 136, 757-763.
 81. Yan, H., Chen, X., Song, H., Li, J., Feng, Y., Shi, Z., ... & Lin, Q. (2017). Synthesis of bacterial cellulose and bacterial cellulose nanocrystals for their applications in the stabilization of olive oil pickering emulsion. *Food Hydrocolloids*, 72, 127-135.
 82. Zhai, X., Lin, D., Li, W., & Yang, X. (2020). Improved characterization of nanofibers from bacterial cellulose and its potential application in fresh-cut apples. *International Journal of Biological Macromolecules*, 149, 178-186.