

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΜΙΚΡΟΒΙΩΝ – ΜΟΡΙΑΚΗΣ
ΒΑΚΤΗΡΙΟΛΟΓΙΑΣ – ΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης από
ακατέργαστη γλυκερόλη και αιθανόλη**

**Production of bacterial cellulose from
crude glycerol and ethanol**

Τζημικά Φωτεινή του Ιωάννη

Λάρισα 2025

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Πατεράκη Χρυσάνθη (επιβλέπουσα): Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας
με έμφαση στη Βιοτεχνολογία

Γιαννούλη Περσεφόνη: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας και
Τεχνολογίας Τροφίμων

Μόσιαλος Δημήτριος: Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Επίκουρη Καθηγήτρια κυρία Χρυσάνθη Πατεράκη για τη δυνατότητα και την εμπιστοσύνη που μου έδωσε να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριο της Βιοτεχνολογίας Μικροβίων – Μοριακής Βακτηριολογίας – Ιολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Η συμβολή της στην παρούσα πτυχιακή εργασία ως επιβλέπουσα καθηγήτρια και οι συμβουλές της καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας εργασίας ήταν πολύτιμες.

Επιπλέον, θέλω να ευχαριστήσω τα μέλη της επιτροπής, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων κυρία Περσεφόνη Γιαννούλη και τον Καθηγητή Βιοτεχνολογίας Μικροβίων κύριο Δημήτριο Μόσιαλο.

Ένα ακόμα μεγάλο ευχαριστώ το οφείλω στην υποψήφια διδάκτορα Έφη Δουλοπούλου και στην ερευνήτρια Λίνα Ζογμπή. Τις ευχαριστώ ιδιαίτερα για όλη την στήριξή τους, τον χρόνο που διέθεσαν, τις συμβουλές, την προσοχή και την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν.

Φυσικά, ευχαριστώ όλη την ομάδα του εργαστηρίου, όχι μόνο για την βοήθειά τους αλλά και για το ευχάριστο κλίμα που επικρατούσε κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την αμέριστη υποστήριξη σε κάθε βήμα της φοιτητικής μου σταδιοδρομίας.

Περιεχόμενα

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ	2
Ευχαριστίες	3
Περίληψη	6
Abstract	7
1. Εισαγωγή.....	8
1.1 Βακτηριακή κυτταρίνη	8
1.2 Μικροοργανισμοί.....	9
1.3 Χρήση βακτηριακής κυτταρίνης.....	10
1.4 Ρόλος γλυκερόλης και αιθανόλης στην παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης	11
1.4.1 Γλυκερόλη ως πηγή άνθρακα	11
1.4.2 Αιθανόλη ως πηγή άνθρακα και ενέργειας.....	13
1.5 Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης από ακατέργαστη γλυκερόλη βιομηχανίας σαπουνιών.....	14
2. Σκοπός.....	16
3. Υλικά και μέθοδοι	17
3.1 Συνθήκες ανάπτυξης μικροοργανισμού	17
3.1.1 Παραγωγή προκαλλιέργειας.....	17
3.2 Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης.....	18
3.2.1 Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης από καθαρή γλυκερόλη	18
3.2.2 Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης από αιθανόλη	19
3.2.3 Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης από καθαρή γλυκερόλη και αιθανόλη.....	19
3.2.4 Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης από ακατέργαστη γλυκερόλη με/χωρίς αιθανόλη	20
3.2.5 Συνθήκες επώασης.....	20
3.3 Δειγματοληψία και καθαρισμός βακτηριακής κυτταρίνης	20
3.3.1 Χρονοδιάγραμμα δειγματοληψίας.....	20
3.3.2 Δειγματοληψία με φυγοκέντρωση	21
3.3.3 Δειγματοληψία με κόσκινο	21
3.3.4 Υπολογισμός καθαρού βάρους παραγόμενης βιομάζας	22
3.4 Αναλύσεις.....	23
3.4.1 Ανάλυση HPLC	23
3.4.2 Ανάλυση Free Amino Nitrogen	24
3.4.3 Ανάλυση προσδιορισμού ανόργανου φωσφόρου	25

4. Αποτελέσματα	26
4.1 Επίδραση καθαρής γλυκερόλης στην παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης	26
4.2 Επίδραση αιθανόλης στην παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης	32
4.3 Επίδραση καθαρής γλυκερόλης σε συνδυασμό με αιθανόλη στην παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης	36
4.4 Επίδραση ακατέργαστης γλυκερόλης από τη βιομηχανία σαπουνιών στην παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης	42
4.5 Συνολική σύγκριση αποδοτικότητας	43
5. Συζήτηση	45
6. Βιβλιογραφία	50

Περίληψη

Η παρούσα πτυχιακή εργασία διερευνά τη διαδικασία παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης μέσω βιώσιμων και οικονομικά αποδοτικών μεθόδων με χαμηλό περιβαλλοντικό αντίκτυπο. Έμφαση δίνεται στη χρήση γλυκερόλης ως κύριας πηγής άνθρακα και στην προσθήκη αιθανόλης ως δευτερεύουσας πηγής άνθρακα και ενέργειας.

Για την πειραματική διαδικασία, επιλέχθηκε το βακτήριο *Komagataeibacter sucrofermentans*, το οποίο έχει αποδειχθεί ικανό να παράγει βακτηριακή κυτταρίνη. Η διαδικασία της ζύμωσης έγινε σε θρεπτικό μέσο Hestrin-Schramm (HS medium) με pH στην τιμή 6, το οποίο περιλαμβάνει εκχύλισμα ζύμης που λειτουργεί ως πηγή αζώτου, άλατα σαν πηγή ανόργανων συστατικών.

Η βακτηριακή κυτταρίνη, παραγόμενη ως εξωπολυσακχαρίτης, χαρακτηρίζεται από υψηλή καθαρότητα, σημαντική ικανότητα κατακράτησης νερού και βιοσυμβατότητα. Τα χαρακτηριστικά αυτά την καθιστούν κατάλληλη για εφαρμογές στη βιοϊατρική και σε διάφορους βιομηχανικούς κλάδους.

Η πτυχιακή εργασία περιλαμβάνει μια σειρά πειραμάτων σε διάφορες συγκεντρώσεις γλυκερόλης (20-100 g/L) και αιθανόλης (1-10 g/L) για να αξιολογηθούν η παραγόμενη βιομάζα της βακτηριακής κυτταρίνης, ο ρυθμός κατανάλωσης της γλυκερόλης ως κύριας πηγής άνθρακα και της αιθανόλης ως δευτερεύουσας πηγής άνθρακα και ενέργειας, και η απόδοση παραγωγικότητας. Παρατηρήθηκε ότι σε αρχικές συγκεντρώσεις 20 g/L γλυκερόλης και 10 g/L αιθανόλης παράχθηκε η μέγιστη βιομάζα (6,02 g/L), αποδεικνύοντας με αυτόν τον τρόπο ότι ο συνδυασμός γλυκερόλης με αιθανόλη ενισχύει την παραγωγή. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι η υψηλή συγκέντρωση γλυκερόλης ενδέχεται να λειτουργήσει ανασταλτικά στην παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης, ενδεχομένως λόγω οσμωτικής πίεσης ή αναστολής του μεταβολισμού.

Αυτή η πτυχιακή εργασία συμβάλλει στην προώθηση της χρήσης βιομηχανικών αποβλήτων ως πρώτες ύλες στη βιομηχανία και αναδεικνύει την αναγκαιότητα εύρεσης καινοτόμων μεθόδων για τη χρήση ανανεώσιμων πηγών άνθρακα, ελαχιστοποιώντας ταυτόχρονα το περιβαλλοντικό αποτύπωμα. Τα αποτελέσματα της μελέτης παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες για τη βελτίωση της παραγωγικής διαδικασίας, την εύρεση των αποδοτικότερων συνθηκών ανάπτυξης και γενικότερα τη μελλοντική έρευνα στον τομέα αυτό.

Abstract

This thesis investigates the production process of bacterial cellulose through sustainable and cost-effective methods with low environmental impact. Emphasis is placed on the use of glycerol as the primary carbon source and the addition of ethanol as a secondary carbon and energy source.

For the experimental process, the bacterium *Komagataeibacter sucrofermentans*, which has been shown to be capable of producing bacterial cellulose, was selected. The fermentation process was carried out in Hestrin-Schramm (HS medium) nutrient medium with pH at 6, which includes yeast extract acting as a source of nitrogen, salts as a source of minerals.

Bacterial cellulose, produced as an exopolysaccharide, has properties such as high purity, high water retention capacity and biocompatibility, making it ideal for applications in areas such as bio-medicine and a variety of industries.

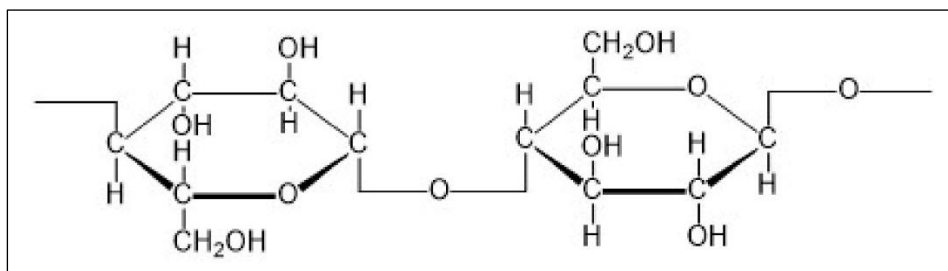
The thesis includes a series of experiments at various concentrations of glycerol (20-100 g/L) and ethanol (1-10 g/L) to evaluate the produced biomass of bacterial cellulose, the rate of consumption of glycerol as a primary carbon source and that of ethanol as a secondary carbon and energy source, and productivity performance. It was observed that at initial concentrations of 20 g/L of glycerol and 10 g/L of ethanol, the maximum biomass (6.02 g/L) was produced, thus demonstrating that the combination of glycerol and ethanol enhances production. Furthermore, it was found that high concentration of glycerol may act as an inhibitor of bacterial cellulose production, possibly due to osmotic pressure or inhibition of metabolism.

This thesis contributes to the promotion of the use of industrial waste as raw materials in industry and highlights the necessity of finding innovative methods to use renewable carbon sources while minimizing the environmental footprint. The results of the study provide useful information for improving the production process, finding the most efficient development conditions and, more generally, for future research in this field.

1. Εισαγωγή

1.1 Βακτηριακή κυτταρίνη

Η βακτηριακή κυτταρίνη, η οποία μελετάται στην παρούσα πτυχιακή εργασία είναι ένας πολυσακχαρίτης με γραμμική αλυσίδα από μερικές εκατοντάδες έως πάνω από δέκα χιλιάδες συνδεδεμένες μονάδες β (1→4) D-γλυκόζης που έχει οργανικό τύπο: $(C_6H_{10}O_5)_n$. Στην Εικόνα 1 απεικονίζεται η χημική δομή ενός μορίου βακτηριακής κυτταρίνης. Η δημιουργία πρωτεϊνιδίων πραγματοποιείται μέσω του σχηματισμού δεσμών υδρογόνου μεταξύ των παράλληλα προσανατολισμένων αλυσίδων γλυκάνης. Το υλικό έχει ευνοϊκά χαρακτηριστικά για το σχήμα, διαθέτει τρισδιάστατη πορώδη δομή, βελτιώνει την κρυσταλλικότητα και την καθαρότητα σε σύγκριση με την καθαρή κυτταρίνη και παρουσιάζει ιδιότητες ιξωδοελαστικής συμπεριφοράς και εφελκυστική αντοχή. (Joseph et al., 2024)



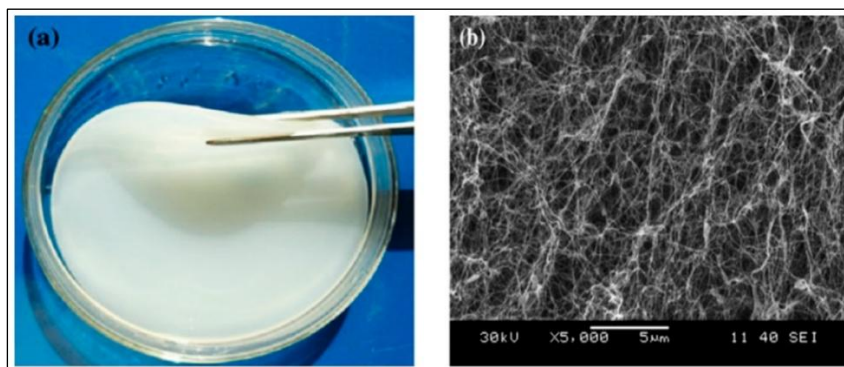
Εικόνα 1. Δομή της βακτηριακής κυτταρίνης (Joseph et al., 2024)

Η βακτηριακή κυτταρίνη, επιπλέον, περιέχει νανοϊνες σε σχήμα κορδέλας που συνδέονται μεταξύ τους μέσω ενός δικτύου δεσμών υδρογόνου (Εικόνα 2β). Η βακτηριακή κυτταρίνη παράγεται με τη βοήθεια βακτηρίων, μέσω μιας διαδικασίας βιοκατασκευαστικής συναρμολόγησης από σάκχαρα χαμηλού μοριακού βάρους, όπως η d-γλυκόζη, και απομονώνεται ως εξωπολυσακχαρίτης στη περιοχή ανάμεσα στον αέρα και το θρεπτικό μέσο. (Tayeb et al., 2018)

Η βακτηριακή κυτταρίνη διαθέτει ισχυρή αλλά ταυτόχρονα ευέλικτη δομή, έχει χαμηλό βαθμό πολυμερισμού, υψηλή καθαρότητα, υψηλό δείκτη κρυσταλλικότητας, ικανότητα κατακράτησης νερού, ελαστικότητα, διαπερατότητα, δυνατότητα μορφοποίησης και βιοσυμβατότητα. (Joseph et al., 2024)

Ως εκ τούτου, η κατανόηση της βιοσυνθετικής του διαδικασίας είναι σημαντική για την καλύτερη ρύθμιση των συνθηκών καλλιέργειας και την τροποποίηση της δομής και της κρυσταλλικότητας των νανοϊνών, που δύναται να προσδώσει νέες ιδιότητες, λειτουργίες και

βιομηχανικές εφαρμογές για τέτοιες βακτηριακής προέλευσης νανοκυτταρίνες. (Tayeb et al., 2018)



Εικόνα 2. Φύλλο υδρογέλη βακτηριακής κυτταρίνης που παράχθηκε μέσω στατικής μεθόδου καλλιέργειας σε τρισιδιάστατη δομή (a) και η μικροσκοπική της εικόνα (b) (Tayeb et al., 2018)

1.2 Μικροοργανισμοί

Η βακτηριακή κυτταρίνη συντίθεται εξωκυτταρικά από Gram-αρνητικά βακτήρια των οικογενειών *Gluconacetobacter*, *Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Sarcina*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Salmonella* και *Alcaligenes*. Κατά τη διάρκεια της βιοσύνθεσης, η βακτηριακή κυτταρίνη σχηματίζει ένα περίβλημα που αποτελείται από ένα τυχαίο μικροϊνδιακό δίκτυο αλυσίδων κυτταρίνης ευθυγραμμισμένων παράλληλα, διάσπαρτο ανάμεσα σε άμορφες περιοχές που καταλαμβάνει το 90% του συνολικού όγκου του υλικού. (Picheth et al., 2017)

Η παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης επηρεάζεται σημαντικά από διάφορες περιβαλλοντικές παραμέτρους, όπως τα επίπεδα φωσφορικών, γλυκερόλης, αλάτων, αζώτου και συνυποστρωμάτων όπως το κιτρικό οξύ. Η εξασφάλιση, επιπλέον, της κατάλληλης ρύθμισης των περιβαλλοντικών παραγόντων, όπως η θερμοκρασία και το pH μπορούν να επηρεάσουν την ανθεκτικότητα της βακτηριακής κυτταρίνης. Με σκοπό τη μεγιστοποίηση των αποδόσεων βακτηριακής κυτταρίνης, το εύρος του pH χρειάζεται να είναι 4,0 έως 7,0. Συμπληρωματικά, η θερμοκρασία επηρεάζει τα χαρακτηριστικά της κυτταρίνης και την απόδοση, με τα φυσιολογικά εύρη να είναι ευρύτερα και τα ιδανικά εύρη να είναι περιορισμένα. (Azeredo et al., 2019)

Γενικά, οι στατικές ζυμώσεις βασίζονται στο οξυγόνο, ενώ οι αναδευόμενες ζυμώσεις βελτιώνουν την κατανομή του οξυγόνου και την αποτελεσματικότητα της μεταφοράς. Η

θερμοκρασία, το pH, η έκθεση στο φως, οι πιέσεις διάτμησης, η διάρκεια και ο χρόνος ζύμωσης επηρεάζουν επίσης τις αποδόσεις παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης. (Joseph et al., 2024)

Για τα πειράματα επιλέχθηκε το βακτήριο *Komagataeibacter sucrofermentans*. Το βακτηριακό αυτό είδος ανήκει στο γένος *Komagataeibacter* και στην οικογένεια *Acetobacteraceae*, ενώ η επιστημονική ονομασία του δόθηκε από τους Toyosaki et al. (1996). Είναι ένα υποχρεωτικά αερόβιο, Gram αρνητικό βακτήριο που δεν έχει τη δυνατότητα κινητικότητας. Το κύτταρο του έχει σχήμα ράβδου, ενώ οι ιδανικές συνθήκες ανάπτυξης του είναι σε θερμοκρασία 22-37 °C. Το βακτήριο αυτό, τέλος έχει απομονωθεί από μαύρο κεράσι και προέρχεται από την Ιαπωνία με επίπεδο βιοασφάλειας 1 (BSL1).

1.3 Χρήση βακτηριακής κυτταρίνης

Η βακτηριακή κυτταρίνη λόγω της δομής της που έχει έναντι της φυτικής κυτταρίνης αξιοποιείται σε ποικίλους τομείς. Καταρχάς, είναι σημαντική η συνδρομή της στην βιο-ιατρική καθώς δεν προκαλεί αλλεργίες. Αναλυτικότερα, επειδή είναι μια λεπτή πορώδες ουσία ενδέχεται να διευκολύνει τη μετάδοση αντιβιοτικών ή άλλων φαρμάκων στο τραύμα, ενώ ταυτόχρονα λειτουργεί ως φυσικός φραγμός για την πρόληψη εξωτερικών λοιμώξεων. Επιπλέον, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υποκατάστατο του δέρματος στην αντιμετώπιση σοβαρών εγκαυμάτων και στην εφαρμογή μη υφασμένων καλυμμάτων για επίμονα τραύματα. (Joseph et al., 2024)

Η βακτηριακή κυτταρίνη είναι ένα φυσικό και βιοδιασπώμενο πολυμερές που βρίσκει εφαρμογή και σε διάφορους βιομηχανικούς τομείς, συμπεριλαμβανομένων αυτών της παραγωγής χαρτιού, καλλυντικών και τροφίμων. Αυτό συμβαίνει, διότι έχει υψηλή καθαρότητα και η ισχυρή δομή της εγγυείται ασφάλεια και ανθεκτικότητα κατά τη μηχανική επεξεργασία (Joseph et al., 2024).

Στη βιομηχανία παραγωγής χαρτιού η βακτηριακή κυτταρίνη συμμετέχει σαν ενισχυτικός παράγοντας στην βελτίωση της συνολικής ποιότητας, καθώς ενισχύει την ανθεκτικότητα κατά του σχισίματος και την συγκόλληση μεταξύ των ινών. (Tayeb et al., 2018)

Η βακτηριακή κυτταρίνη συναντάται στη βιομηχανία καλλυντικών ως συστατικό σε μάσκες προσώπου, αντιγηραντικές κρέμες, αντηλιακά, επιθέματα ματιών, προϊόντα περιποίησης μαλλιών. Αξιοποιείται σε αυτά τα καλλυντικά είδη επειδή η βακτηριακή κυτταρίνη διαθέτει

υψηλή ικανότητα συγκράτησης νερού, βιοσυμβατότητα και δυνατότητα να προσκολλιέται καλά στο δέρμα. Ως αποτέλεσμα, στο δέρμα προσδίδεται ενυδάτωση, αναζωογόνηση και θρέψη. (Pacheco et al., 2017)

Στη βιομηχανία τροφίμων, η βακτηριακή κυτταρίνη αξιοποιείται ως υποκατάστατο λιπαρών ουσιών για την παραγωγή πιο διαιτητικών σαλτσών, αλοιφών και επιδόρπιων. Η βακτηριακή κυτταρίνη, επομένως, βοηθά στη βελτίωση της πεπτικής υγείας, στην προώθηση του κορεσμού και στη μείωση της γλυκαιμικής απόκρισης των τροφίμων. (Chibrikov et al., 2022)

Συνοπτικά, οι εφαρμογές είναι κατηγοριοποιημένες επιγραμματικά παρακάτω στην Εικόνα 3.



• **Εφαρμογές στη βιο-ιατρική:**

- διάγνωση
- επίδεσμοι πληγών
- οδοντιατρικά εμφύτευμα
- ικρίωματα ιστού
- τεχνητό δέρμα
- χορήγηση φαρμάκων
- αγγειακά μοσχεύματα
- ικρίωματα νεύρων
- αναγέννηση χόνδρου
- αναγέννηση τεχνητού κερατοειδούς

• **Βιομηχανικές εφαρμογές:**

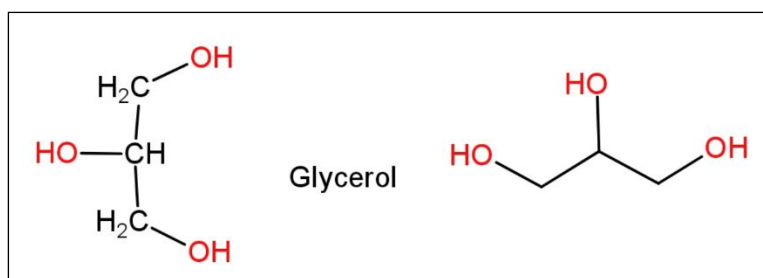
- επεξεργασία νερού
- βιομηχανική παραγωγή χαρτιού
- βιομηχανία τροφίμων
- βιομηχανεία καλλυντικών

Εικόνα 3. Εφαρμογές της βακτηριακής κυτταρίνης. (Joseph et al., 2024)

1.4 Ρόλος γλυκερόλης και αιθανόλης στην παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης

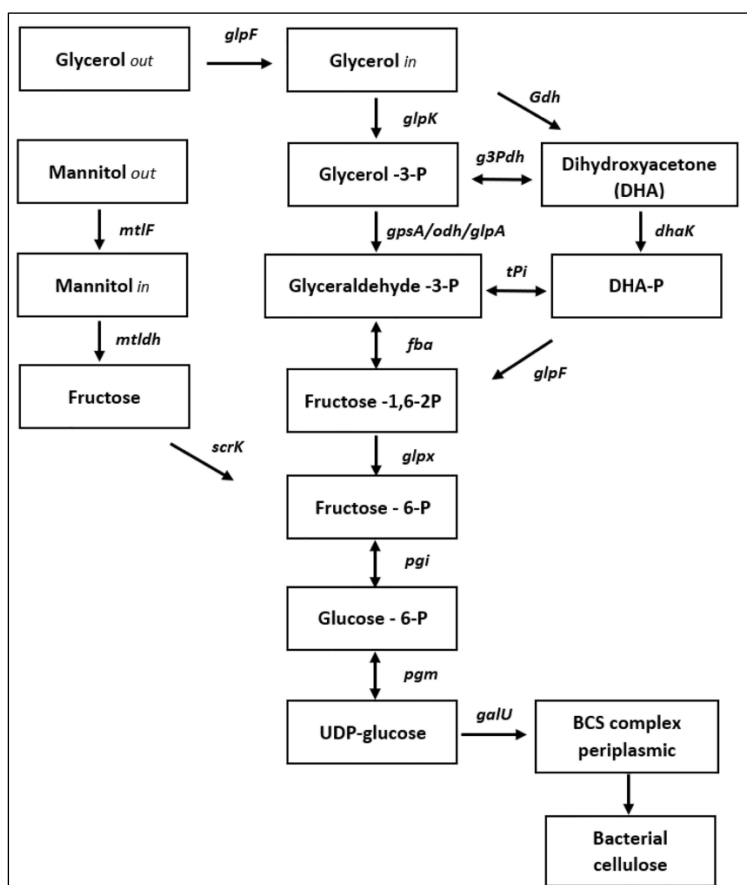
1.4.1 Γλυκερόλη ως πηγή άνθρακα

Η γλυκερόλη, ως ανεπιθύμητο και ρυπογόνο παραπροϊόν της παραγωγής βιοκαυσίμων, αξιοποιείται ως ανανεώσιμη πηγή άνθρακα στην παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης μέσω ζύμωσης σε μια προσπάθεια εξάλειψης του κινδύνου περιβαλλοντικής ρύπανσης. Επιπλέον, με τη χρήση της γλυκερόλης μειώνεται αισθητά και το κόστος παραγωγής, γεγονός που προβλημάτιζε όταν χρησιμοποιούνταν παραδοσιακές πρώτες ύλες. (Zikmanis et al., 2021)



Εικόνα 4. Χημική δομή της γλυκερόλης

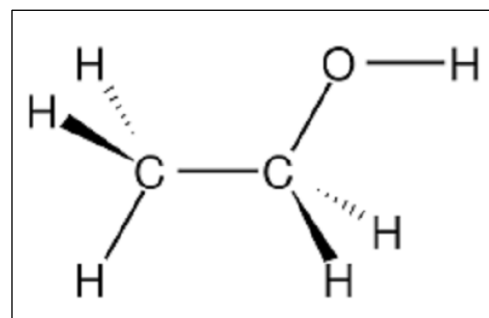
Η γλυκερόλη, όπως φανερώνεται στην Εικόνα 5, εισέρχεται εύκολα στο μεταβολικό δίκτυο των κυττάρων παραγωγής, με διευκολυνόμενη διάχυση, χωρίς την ανάγκη ενζυμικής ή χημικής παρεμβολής (όπως προκαταρκτική υδρολυτική επεξεργασία) (Zikmanis et al., 2021).



Εικόνα 5. Μεταβολικά μονοπάτια σύνθεσης βακτηριακής κυτταρίνης από γλυκερόλη και μαννιτόλη από βακτήρια οξικού οξέος. (Zikmanis et al., 2021)

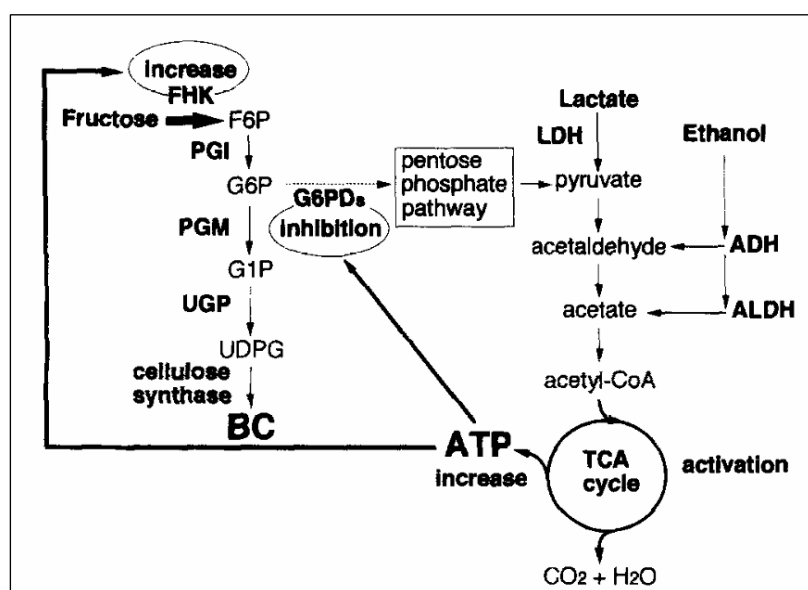
1.4.2 Αιθανόλη ως πηγή άνθρακα και ενέργειας

Η αιθανόλη χρησιμεύει ως πηγή ενέργειας για την παραγωγή ATP, βελτιώνοντας έτσι την αποτελεσματική χρήση της γλυκόζης για τη σύνθεση της κυτταρίνης. (Ryngajłło et al., 2019) Επειδή στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν βακτήρια γένους *Komagataeibacter*, η προσθήκη αιθανόλης στην παραγωγική διαδικασία έχει ως αποτέλεσμα τον μεταβολισμό της σε δύο στάδια. Πρωταρχικά, η αιθανόλη θα οξειδωθεί μερικώς στο κυτταρόπλασμα και θα παράγει οξικό οξύ, το οποίο θα αφομοιωθεί στο δεύτερο στάδιο (Montenegro-Silva et al., 2024).



Εικόνα 6. Χημική δομή της αιθανόλης

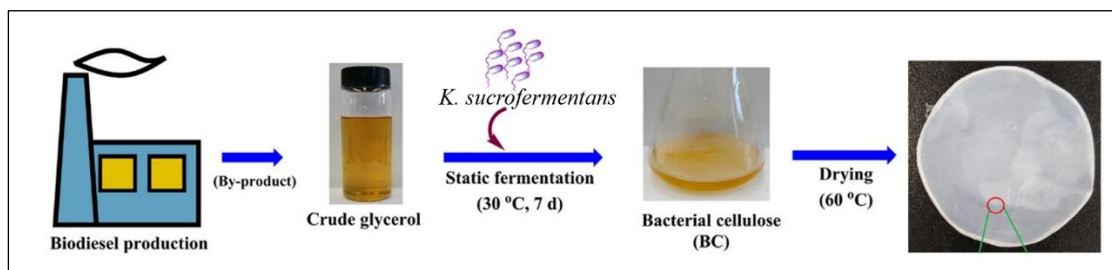
Το βιοσυνθετικό μονοπάτι προς την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης φαίνεται στην Εικόνα 7 και παρατηρείται ότι το παραγόμενο οξικό οξύ μεταβολίζεται τελικά στον κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος (TCA) σε CO₂ και H₂O. Ταυτόχρονα, το επιπλέον ATP που παράγεται από την οξείδωση αιθανόλης στον κύκλο TCA είναι ο ευεργετικός παράγοντας στην αύξηση της απόδοσης. Το ATP, ως ενεργειακό νόμισμα του κυττάρου, είναι απαραίτητο για τη σύνθεση βακτηριακής κυτταρίνης και ενδέχεται να διαδραματίζει ρυθμιστικό ρόλο, αναστέλλοντας τη δραστηριότητα των αφυδρογονασών της γλυκόζης-6-φωσφορικής. (Montenegro-Silva et al., 2024). Επιπλέον, η οξείδωση της αιθανόλης μπορεί να συμβεί σε ένα στάδιο στο κυτταρόπλασμα από την κυτταροσολική αλκοολική αφυδρογονάση (ADH) και την αφυδρογονάση της ακεταλδεΐδης (ALDH) με το μονοπάτι που φαίνεται στην Εικόνα 7 (Ryngajłło et al., 2019).



Εικόνα 7. Μηχανισμός παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης παρουσία αιθανόλης. (Naritomi et al., 1998)

1.5 Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης από ακατέργαστη γλυκερόλη βιομηχανίας σαπουνιών

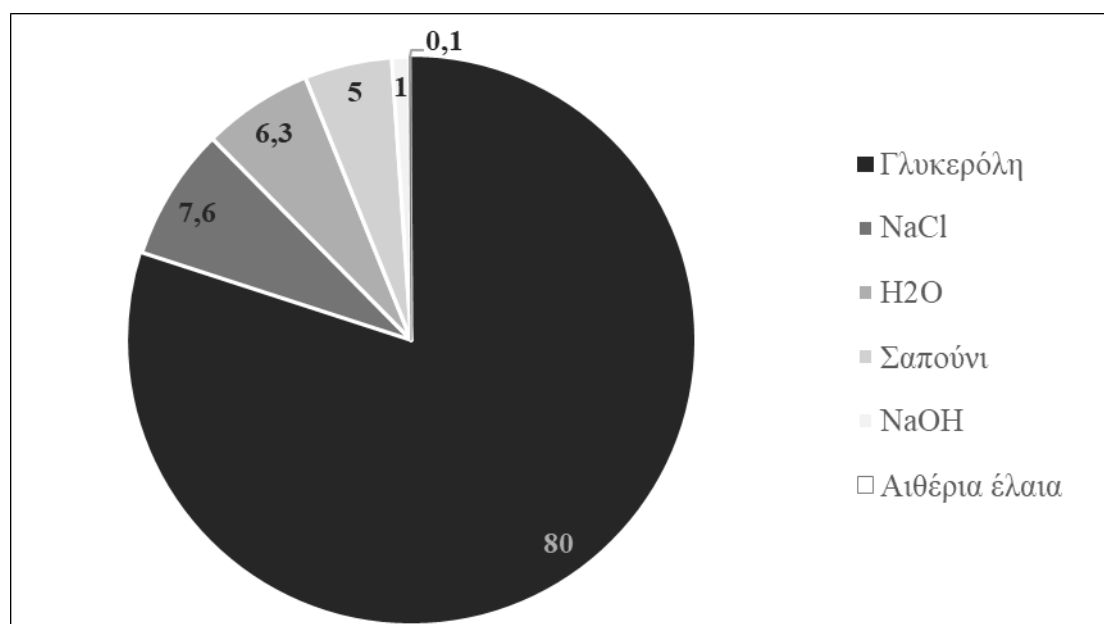
Η ακατέργαστη γλυκερόλη είναι ένα υποπροϊόν που σχηματίζεται κατά την αντίδραση μετεστεροποίησης για την παραγωγή βιοντίζελ από διάφορους βιομηχανικούς τομείς, εκ των οποίων είναι και αυτός της παραγωγής σαπουνιών (Kumar et al., 2019).



Εικόνα 8. Σχεδιάγραμμα απεικόνισης διαδικασίας άντλησης ακατέργαστης γλυκερόλης και μετέπειτα παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης. (Dikshit & Kim, 2020)

Η γλυκερόλη είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί και σε ακατέργαστη μορφή ως ανανεώσιμη πηγή άνθρακα για την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης. (Zikmanis et al., 2021) Αποτελεσματικά, η διαδικασία παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης μπορεί να γίνει οικονομικότερη και πιο φιλική προς το περιβάλλον.

Στη πειραματική διαδικασία, η ακατέργαστη γλυκερόλη είχε τις ποσοστιαίες αναλογίες που φαίνονται στο Γράφημα 1.



Γράφημα 1. Διαγραμματική απεικόνιση συστατικών ακατέργαστης γλυκερόλης βιομηχανίας σαπουνιών.

Η αντίδραση μετεστεροποίησης καταλύεται με τη χρήση υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) σε περιεκτικότητα 1%. Μετά τη μετεστεροποίηση, το νάτριο παραμένει σε φάση γλυκερόλης με τη μορφή αλάτων ή ιόντων. Γι' αυτό το λόγο, προστίθεται στο μέσο NaCl (περιεκτικότητα 7,6%) το οποίο μεταβάλλει τη φυσιολογική κατάσταση υπέρ της σύνθεσης λιπιδίων. Ως αποτέλεσμα, η παρουσία αυξημένης συγκέντρωσης αλατιού οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή υδατανθράκων και λιπιδίων στο κύτταρο ως οσμοπροστατευτικά. (Kumar et al., 2019).

2. Σκοπός

Η αυξανόμενη ζήτηση σε βακτηριακή κυτταρίνη, λόγω των εφαρμογών της σε πλήθος διαφορετικών τομέων που αφορούν τις βιομηχανίες και την βιο-ιατρική και συνεπώς η απαίτηση προς μεγαλύτερες ποσότητες έχει οδηγήσει στην ανάγκη για εύρεση οικονομικά αποδοτικότερων μεθόδων παραγωγής της. Παράλληλα, τα βιομηχανικά απόβλητα εξακολουθούν να συνιστούν σοβαρό περιβαλλοντικό κίνδυνο, ευαισθητοποιώντας ολοένα και μεγαλύτερο μέρος της κοινωνίας. Στο πλαίσιο αυτό, η παρούσα μελέτη επικεντρώνεται στη χρήση ακατέργαστης γλυκερόλης από τη βιομηχανία σαπουνιών ως ανανεώσιμη πηγή άνθρακα για την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης. Η εν λόγω προσέγγιση αποσκοπεί τόσο στη μείωση του κόστους παραγωγής όσο και στον περιορισμό του περιβαλλοντικού αποτυπώματος μέσω της ελαχιστοποίησης των εκπεμπόμενων ρύπων.

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε με στόχο την αναγνώριση των συνθηκών που ευνοούν τη μέγιστη παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης σε μικρότερο χρονικό διάστημα, καθώς και τη συγκριτική αξιολόγηση της απόδοσης καθαρής και ακατέργαστης γλυκερόλης ως πηγές άνθρακα. Προς την κατεύθυνση αυτή, έχουν ήδη σχεδιαστεί και υλοποιηθεί πολλές έρευνες που χρησιμοποιούν τη γλυκερόλη και την αιθανόλη μεμονωμένα με ποικίλες αρχικές συγκεντρώσεις. Ωστόσο, η παρούσα μελέτη έχει σκοπό να διερευνήσει και τον συνδυασμό των δύο πηγών άνθρακα μέσα από πειραματικές διεργασίες διαφορετικών αρχικών συγκεντρώσεων.

Τα αποτελέσματα της μελέτης, σε συνδυασμό με υφιστάμενες έρευνες, αναμένεται να συμβάλουν στην προώθηση της χρήσης βιομηχανικών παραπροϊόντων ως πρώτες ύλες για την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης. Τέλος, θα αναδειχθούν οι βέλτιστες αρχικές συνθήκες του θρεπτικού μέσου παραγωγής.

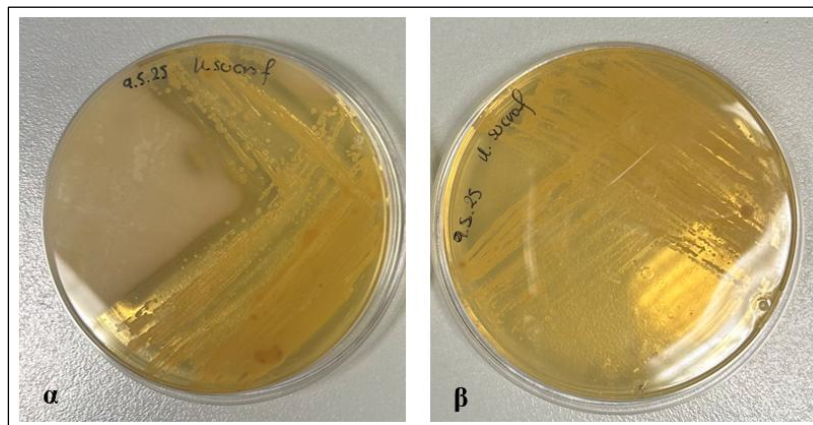
3. Υλικά και μέθοδοι

3.1 Συνθήκες ανάπτυξης μικροοργανισμού

Για την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης αξιοποιήθηκε ο μικροοργανισμός *Komagataeibacter sucrofermentans*, γνωστός για την ικανότητά του να συνθέτει κυτταρίνη σε αερόβιες συνθήκες. Η καλλιέργεια του μικροοργανισμού πραγματοποιήθηκε σε στερεά θρεπτικά μέσα HS και 105, σε θερμοκρασία 30 °C, υπό αποστειρωμένες συνθήκες (Εικόνα 9).

Πίνακας 1. Συγκεντρώσεις περιεχομένων των θρεπτικών μέσων που χρησιμοποιήθηκαν για τις στερεές καλλιέργειες ανάπτυξης του *Komagataeibacter sucrofermentans*.

Συστατικά	Θρεπτικό μέσο HS	Θρεπτικό μέσο 105
Γλυκόζη	20 g/L	100 g/L
Πεπτόνη	5 g/L	-
Na ₂ HPO ₄	2,7 g/L	-
Κιτρικό οξύ	1,15 g/L	-
Εκχύλισμα ζύμης	5 g/L	10 g/L
CaCO ₃	-	20 g/L
Βακτηριολογικό άγαρ	20 g/L	20 g/L



Εικόνα 9. *Komagataeibacter sucrofermentans* ανεπτυγμένος σε θρεπτικό μέσο 105 (α) και HS (β).

3.1.1 Παραγωγή προκαλλιέργειας

Για την πραγματοποίηση του εμβολιασμού στο επόμενο στάδιο, απαιτείται η ανάπτυξη προκαλλιέργειας. Η προκαλλιέργεια αναπτύχθηκε και αυτή σε κωνικές φιάλες, από τις οποίες η κάθε μια περιείχε: θρεπτικό μέσο HS χωρίς σάκχαρα, γλυκόζη με τελική συγκέντρωση στο διάλυμα ίση με 20 g/L που δρα ως πηγή άνθρακα, H₂O και ποσότητα του μικροοργανισμού *Komagataeibacter sucrofermentans* από ανεπτυγμένη στερεή καλλιέργεια που προστίθεται

τελευταίο στο διάλυμα με τη βοήθεια μικροβιολογικού κρίκου. Οι όγκοι από τα περιεχόμενα του διαλύματος της προκαλλιέργειας του πειράματος καταγράφονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2. Ποσότητες περιεχομένων της προκαλλιέργειας ανάπτυξης του *Komagataeibacter sucrofermentans*.

Θρεπτικό μέσο HS	40 mL
Γλυκόζη (270 g/L)	3,7 mL
H ₂ O	6,3 mL
Συνολικός όγκος	50 mL

Στη συνέχεια, οι κωνικές φιάλες επωάζονται για 24 ώρες σε αναδευτήρα επώασης με θερμοκρασία 30°C και αριθμό στροφών 220 rpm.

3.2 Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης

Η παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης έλαβε χώρα σε υγρές καλλιέργειες με θρεπτικό μέσο HS, χωρίς προσθήκη γλυκόζης με μετέπειτα προσθήκη σακχάρων. Διεξάχθηκαν, έτσι, διάφορες σειρές πειραμάτων αξιοποιώντας ως πηγή άνθρακα, τη γλυκερόλη και ως πηγή ενέργειας την αιθανόλη μεμονωμένα και συνδυαστικά. Το αρχικό pH στο διάλυμα του θρεπτικού μέσου HS είχε ρυθμιστεί για όλα τα πειράματα στη τιμή 6.

3.2.1 Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης από καθαρή γλυκερόλη

Για την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης από καθαρή γλυκερόλη πραγματοποιήθηκαν πολλαπλές σειρές πειραμάτων με αρχικές συγκεντρώσεις γλυκερόλης των 20 g/L, 40 g/L, 60 g/L, 80 g/L και 100 g/L. Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν κωνικές φιάλες όγκου 250 mL, οι οποίες περιείχαν: θρεπτικό μέσο HS χωρίς σάκχαρο, εμβόλιο (προκαλλιέργεια), H₂O και γλυκερόλη σε αναλογίες που φαίνονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3. Ποσότητες περιεχομένων των καλλιεργειών παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης από καθαρή γλυκερόλη διάφορων αρχικών συγκεντρώσεων.

	20 g/L γλυκερόλη	40 g/L γλυκερόλη	60 g/L γλυκερόλη	80 g/L γλυκερόλη	100 g/L γλυκερόλη
Θρεπτικό μέσο HS	40 mL	40 mL	40 mL	30 mL	30 mL
Εμβόλιο (προκαλλιέργεια)	4 mL	4 mL	4 mL	4 mL	4 mL
Γλυκερόλη (500 g/L)	2 mL	4 mL	6 mL	8 mL	10 mL
H ₂ O	4 mL	2 mL	-	8 mL	6 mL
Συνολικός όγκος	50 mL	50 mL	50 mL	50 mL	50 mL

3.2.2 Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης από αιθανόλη

Στη συγκεκριμένη σειρά πειραμάτων αξιοποιήθηκε για πηγή άνθρακα μόνο η αιθανόλη για την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης. Στον εμβολιασμό των κωνικών φιαλών, επομένως, εκτός από θρεπτικό μέσο HS χωρίς σάκχαρα, εμβόλιο (προκαλλιέργεια) και H₂O και προστέθηκε αιθανόλη καθαρότητας 99,8% (πυκνότητα=0,788-0,790 kg/L) σύμφωνα με τον Πίνακα 4.

Πίνακας 4. Ποσότητες περιεχομένων των καλλιιεργειών παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης από αιθανόλη διάφορων αρχικών συγκεντρώσεων.

	1 g/L αιθανόλη	5 g/L αιθανόλη
Θρεπτικό μέσο HS	40 mL	40 mL
Εμβόλιο (προκαλλιέργεια)	4 mL	4 mL
Αιθανόλη (99,8%)	63 μ L	315 μ L
H ₂ O	5937 μ L	5685 μ L
Συνολικός όγκος	50 mL	50 mL

3.2.3 Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης από καθαρή γλυκερόλη και αιθανόλη

Τέλος, εξετάστηκε η ταυτόχρονη χρήση της γλυκερόλης ως πηγή άνθρακα και της αιθανόλης ως δευτερεύον πηγή άνθρακα και πηγή ενέργειας. Τα πειράματα έγιναν με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης ίση με 20 g/L και διαφοροποιήσεις στην αρχική συγκέντρωση της αιθανόλης ανάμεσα στις τιμές 1, 5 και 10 g/L.

Στον Πίνακα 5 φαίνονται αναλυτικά οι ποσότητες των περιεχομένων των κωνικών φιαλών για κάθε περίπτωση ξεχωριστά.

Πίνακας 5. Ποσότητες περιεχομένων των καλλιιεργειών παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης από καθαρή γλυκερόλη και αιθανόλη διάφορων αρχικών συγκεντρώσεων.

	20 g/L γλυκερόλη + 1 g/L αιθανόλη	20 g/L γλυκερόλη + 5 g/L αιθανόλη	20 g/L γλυκερόλη + 10 g/L αιθανόλη
Θρεπτικό μέσο HS	40 mL	40 mL	40 mL
Εμβόλιο (προκαλλιέργεια)	4 mL	4 mL	4 mL
Γλυκερόλη (500 g/L)	2 mL	2 mL	2 mL
Αιθανόλη (99,8%)	63 μ L	315 μ L	630 μ L
H ₂ O	3937 μ L	3685 μ L	3370 μ L
Συνολικός όγκος	50 mL	50 mL	50 mL

3.2.4 Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης από ακατέργαστη γλυκερόλη με/χωρίς αιθανόλη

Τέλος, πραγματοποιήθηκε σειρά πειραμάτων, με αντικείμενο τη διερεύνηση της δυνατότητας αξιοποίησης της ακατέργαστης γλυκερόλης από τη βιομηχανία σαπουνιών ως πηγή άνθρακα, προκειμένου να εκτιμηθεί η αποδοτικότητά της στην παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης σε σύγκριση με αυτήν της καθαρής γλυκερόλης. Παράλληλα, εξετάστηκε η συνδυαστική δράση της ακατέργαστης γλυκερόλης με την αιθανόλη. Τα πειράματα διεξήχθησαν με αρχικές συγκεντρώσεις για την ακατέργαστη γλυκερόλη 40 g/L και για την αιθανόλη 5 g/L, με τις αντίστοιχες ποσότητες των συστατικών να παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6. Ποσότητες περιεχομένων των καλλιεργειών παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης από ακατέργαστη γλυκερόλη από βιομηχανία σαπουνιών με/χωρίς αιθανόλη.

	40 g/L ακατέργαστη γλυκερόλη	40 g/L ακατέργαστη γλυκερόλη + 5 g/L αιθανόλη
Θρεπτικό μέσο HS	40 mL	40 mL
Εμβόλιο (προκαλλιέργεια)	4 mL	4 mL
Ακατέργαστη γλυκερόλη (800 g/L)	2,5 mL	2,5 mL
Αιθανόλη (99,8%)	-	315 μ L
H ₂ O	3,5 mL	3185 μ L
Συνολικός όγκος	50 mL	50 mL

3.2.5 Συνθήκες επώασης

Η χρονική στιγμή του εμβολιασμού για όλες τις σειρές πειραμάτων θεωρείται T₀. Στη συνέχεια, οι κωνικές φιάλες τοποθετούνται σε φούρνο με σταθερή θερμοκρασία ρυθμισμένη στους 30 °C για στατική επώαση. Κατά τον εμβολιασμό, επίσης, για μελλοντική ανάλυση των συγκεντρώσεων στα περιεχόμενα του υγρού κρατείται 1 mL από κάθε κωνική φιάλη σε erppendorf και τοποθετείται στην κατάψυξη (-20 °C).

3.3 Δειγματοληψία και καθαρισμός βακτηριακής κυτταρίνης

3.3.1 Χρονοδιάγραμμα δειγματοληψίας

Από την χρονική στιγμή T₀ το πρώτο δείγμα μέτρησης λαμβάνεται μετά από 72 ώρες επώασης, με σκοπό να καταμετρηθεί η ποσότητα ανεπτυγμένης βιομάζας βακτηριακής κυτταρίνης. Μετέπειτα, πραγματοποιείται δειγματοληψία ανά 48 ώρες, για να παρατηρηθεί ο ρυθμός ανάπτυξης της βακτηριακής κυτταρίνης. Κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας κάθε

κωνική φιάλη αποτελεί ένα δείγμα και σε αυτή σημειώνεται η τιμή pH. Από το υγρό κάθε δείγματος, επίσης, διατηρούνται 2 mL σε erpendorf στους -20 °C για να αναλυθούν σε δεύτερο χρόνο οι συγκεντρώσεις της πηγής άνθρακα και ενέργειας, των προϊόντων και πιθανών παραπροϊόντων. Επιπροσθέτως, πριν την μέτρηση της βιομάζας προηγείται παρατήρηση του υγρού δείγματος μέσω οπτικού μικροσκοπίου για τον αποκλεισμό πιθανής επιμόλυνσης κατά την διαδικασία του εμβολιασμού.

3.3.2 Δειγματοληψία με φυγοκέντρηση

Αρχικά, η απομόνωση της παραγόμενης βακτηριακής κυτταρίνης γινόταν με τη χρήση φυγοκέντρησης. Για τον μετέπειτα υπολογισμό της παραγόμενης βιομάζας βακτηριακής κυτταρίνης έγινε χρήση προζυγισμένων falcons των 50 mL. Κάθε falcon αντιστοιχούσε σε ένα δείγμα, δηλαδή σε μια κωνική φιάλη και σε αυτό μεταγγιζόταν όλο το περιεχόμενο κάθε κωνικής φιάλης. Στη συνέχεια, υποβάλλονταν σε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στους 4 °C με ταχύτητα 7800 rpm. Μετά τον επιτυχή διαχωρισμό κυτταρίνης (ιζήματος) από το υπερκείμενο, η κυτταρίνη υπόκειται σε ακόμη τρεις (3) φυγοκεντρήσεις ίδιων συνθηκών όπως η πρώτη με τη διαφορά ότι εκτελούνται με απιονισμένο νερό. Με το πέρας αυτών, το υπερκείμενο απορρίπτεται και το falcon με την βακτηριακή κυτταρίνη τοποθετείται σε φούρνο των 60 °C για 48 ώρες με σκοπό την ξήρανση.

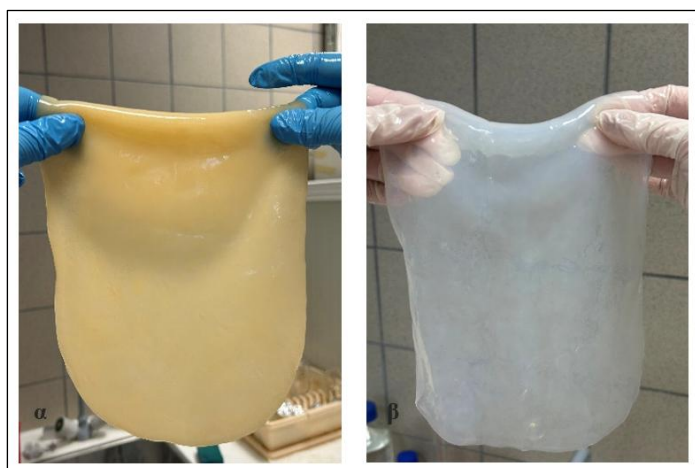
Όσον αφορά το υπερκείμενο που δημιουργήθηκε κατά την πρώτη φυγοκέντρηση, κρατείται από αυτό δείγμα των 2 mL σε erpendorf στους -20 °C για περαιτέρω μετρήσεις των προϊόντων και πιθανών παραπροϊόντων. Επιπλέον, καταγράφεται η τιμή pH στο υπερκείμενο, που αναμένεται να έχει μειωθεί από την αρχική και το υγρό παρατηρείται στο μικροσκόπιο για τον αποκλεισμό πιθανής επιμόλυνσης.

3.3.3 Δειγματοληψία με κόσκινο

Κατά την πορεία των εργαστηριακών πειραμάτων δοκιμάστηκε και ακόμα ένας τρόπος δειγματοληψίας. Και σε αυτόν, από το υγρό κάθε κωνικής φιάλης, μετριόταν η τιμή του pH, γινόταν επιβεβαίωση της καθαρότητας του δείγματος στο μικροσκόπιο και αποθηκεύονταν δείγμα 2 mL σε erpendorf στους -20 °C για μελλοντικές μετρήσεις.

Σε αυτόν τον τρόπο δειγματοληψίας χρησιμοποιήθηκε κόσκινο διαμέτρου 100 Mic για τον διαχωρισμό της βακτηριακής κυτταρίνης από το υπόλοιπο υγρό. Στη συνέχεια, η κυτταρίνη

ξεπλένεται με απιονισμένο νερό για την απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου που είχε παγιδευτεί στη δομή της βακτηριακής κυτταρίνης. Έπειτα, τοποθετούνται σε ποτήρι ζέσεως, στο οποίο προστίθεται NaOH συγκέντρωσης 1 M μέχρι να καλυφθεί ολόκληρη, με στόχο την απομάκρυνση των υπολειμμάτων των βακτηρίων. (Salinas et al., 2021) Το ποτήρι ζέσεως τοποθετήθηκε σε ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε ξέπλυμα της κυτταρίνης με τη βοήθεια του κόσκινου (100 Mic) και ανάδευση σε ποτήρι ζέσεως με απιονισμένο νερό για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η τελευταία διαδικασία επαναλαμβάνεται τουλάχιστον 3 φορές ώστε το pH να φτάσει το 7.

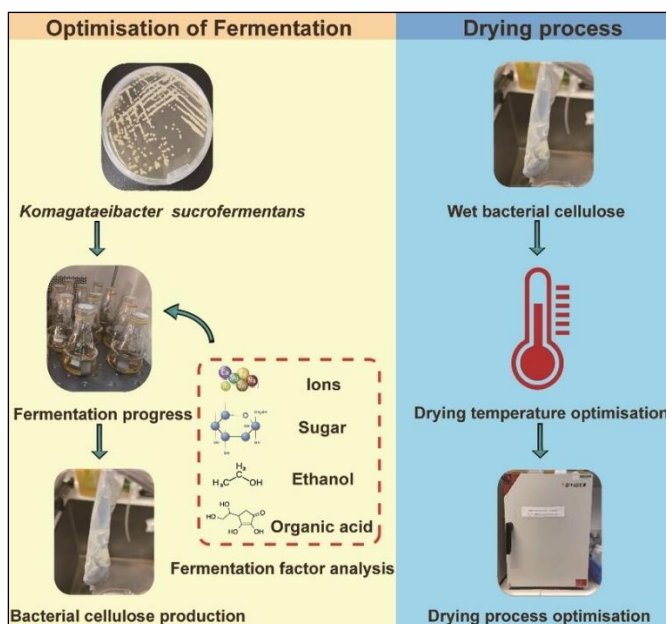


Εικόνα 10. Βακτηριακή κυτταρίνη πριν (α) και μετά (β) τις πλύσεις με NaOH 1 M και απιονισμένο H₂O.

Η βακτηριακή κυτταρίνη μετά τις πλύσεις απλώνεται σε προζυγισμένο γυάλινο τρυβλίο, το οποίο ξηραίνεται στον φούρνο των 60 °C για χρονικό διάστημα 48 ωρών.

3.3.4 Υπολογισμός καθαρού βάρους παραγόμενης βιομάζας

Τόσο τα falcons όσο και τα τρυβλία μετά το πέρας των 48 ωρών τοποθετούνται στον αποξηραντήρα για τουλάχιστον 30 λεπτά για να επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, και στις δύο περιπτώσεις αυτά ξαναζυγίζονται για να υπολογιστεί από τη διαφορά (μάζα falcon/τρυβλίου με κυτταρίνη μετά την ξήρανση - μάζα άδειου falcon/τρυβλίου) η βιομάζα της παραγόμενης βακτηριακής κυτταρίνης. Συγκεντρωτικά, ολόκληρη η διαδικασία παραγωγής βακτηριακής καλλιέργειας, βακτηριακής κυτταρίνης και η αποξήρανση αυτής απεικονίζονται στην Εικόνα 11.



Εικόνα 11. Οπτική απεικόνιση της συνολικής πειραματικής διαδικασίας. (Liu et al., 2024)

Από την τιμή της βιομάζας της παραγόμενης βακτηριακής κυτταρίνης, μετέπειτα, προκύπτουν η βακτηριακή κυτταρίνη σε g/L και η παραγωγικότητα βακτηριακής κυτταρίνης (BK) σε (g/L/μέρα) σύμφωνα με τους παρακάτω τύπους:

Βακτηριακή κυτταρίνη (g/L) = βιομάζα BC (g) / όγκο του θρεπτικού μέσου (mL) * 1000

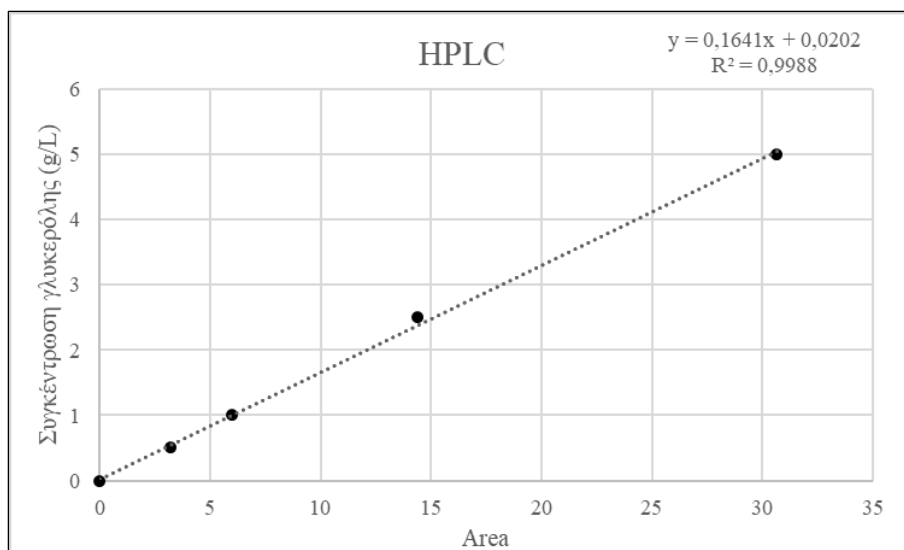
Παραγωγικότητα BK (g/L/μέρα) = βακτηριακή κυτταρίνη (g/L) / χρόνο ζύμωσης (μέρες)

3.4 Αναλύσεις

3.4.1 Ανάλυση HPLC

Η ανάλυση HPLC (High Performance Liquid Chromatography/Χρωματογραφία Υγρής Φάσης Υψηλής Απόδοσης) είναι μια αναλυτική τεχνική που εφαρμόστηκε για να προσδιοριστούν ποιοτικά και ποσοτικά οι ενώσεις μέσα στα διαλύματα που πάρθηκαν σε όλες τις σειρές πειραμάτων. Σε όλα τα δείγματα έγινε αραίωση 1:10 με H₂SO₄ 10 mM, εκτός από αυτά των σειρών πειραμάτων με 80 και 100 g/L γλυκερόλης στα οποία έγινε αραίωση 1:20. Για αυτήν την ανάλυση κατασκευάστηκαν πρότυπες καμπύλες για ανίχνευση συγκέντρωσης γλυκερόλης και αιθανόλης.

Η πρότυπη καμπύλη για τη γλυκερόλη έγινε σε δείγματα συγκεντρώσεων από 0,5 έως και 5 g/L και προέκυψε η εξίσωση $y = (0,1641 \cdot x) + 0,0202$ με $R^2 = 0,9988$, όπου x το Area που ανιχνεύτηκε και όπου y η συγκέντρωση της γλυκερόλης στο διάλυμα (Γράφημα 2).

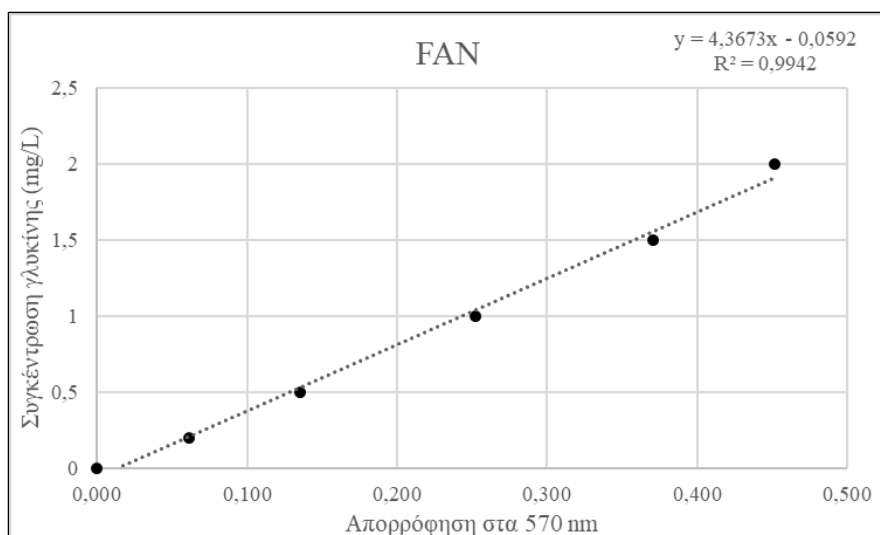


Γράφημα 2. Πρότυπη καμπύλη για ανίχνευση συγκέντρωσης γλυκερόλης.

3.4.2 Ανάλυση Free Amino Nitrogen

Η μέθοδος Free Amino Nitrogen (FAN) analysis χρησιμοποιείται για να μετρηθεί η ποσότητα των ελεύθερων αμινομάδων ($-NH_2$), που προέρχεται από ελεύθερα αμινοξέα και μικρά πεπτίδια. Στην παρούσα πειραματική διαδικασία ζύμωσης σε βακτηριακές καλλιέργειες η ανάλυση FAN θα ανιχνεύσει το ελεύθερο άζωτο, που περιέχονται στο εκχύλισμα ζύμης ($C_{αρχική} = 5$ g/L). Έτσι, στα δείγματα που πάρθηκαν την ημέρα του εμβολιασμού (T_0) έγινε αραίωση 1:250, στα δείγματα των ενδιάμεσων ημερών ζύμωσης έγινε αραίωση 1:100, ενώ στο τελευταίο δείγμα έγινε αραίωση 1:50.

Η πρότυπη καμπύλη σχηματίστηκε από δείγματα από 0,2 έως και 2 mg/L γλυκίνης και προέκυψε η εξίσωση $y = (4,3673 \cdot x) - 0,0592$ με $R^2 = 0,9942$, όπου x η παρατηρούμενη απορρόφηση στα 570 nm και όπου y η συγκέντρωση του αζώτου στο διάλυμα (Γράφημα 3).

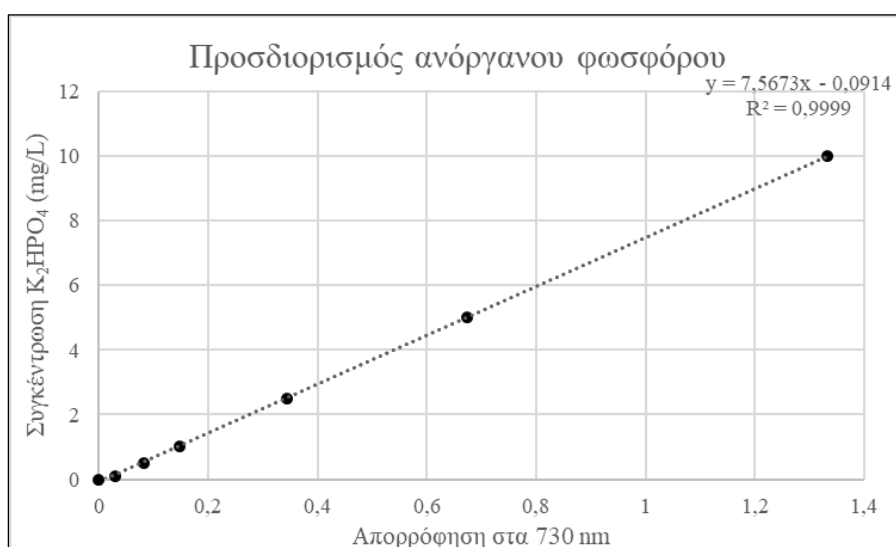


Γράφημα 3. Πρότυπη καμπύλη για ανίχνευση συγκέντρωσης αζώτου ελεύθερων αμινομάδων.

3.4.3 Ανάλυση προσδιορισμού ανόργανου φωσφόρου

Με την μέθοδο προσδιορισμού ανόργανου φωσφόρου θα καταμετρηθούν τα φωσφορικά ιόντα $(\text{PO}_4)^{3-}$ που περιέχονται τόσα στα αρχικά δείγματα όσο και σε αυτά κατά την πορεία της πειραματικής διαδικασίας. Στο θρεπτικό μέσο HS, φωσφορικά ιόντα συναντώνται στην χημική ένωση Na_2HPO_4 ($C_{\text{αρχική}}=2,7 \text{ g/L}$). Γι' αυτό, σε όλα τα δείγματα έγινε αραίωση 1:200.

Η πρότυπη καμπύλη έγινε σε δείγματα από 0,1 έως και 10 mg/L K_2HPO_4 και προέκυψε η εξίσωση $y=(7,5673 \cdot x)-0,0914$ με $R^2=0,9999$, όπου x η παρατηρούμενη απορρόφηση στα 730 nm και όπου y η συγκέντρωση του ανόργανου φωσφόρου στο διάλυμα (Γράφημα 4).



Γράφημα 4. Πρότυπη καμπύλη για ανίχνευση συγκέντρωσης ανόργανου φωσφόρου.

4. Αποτελέσματα

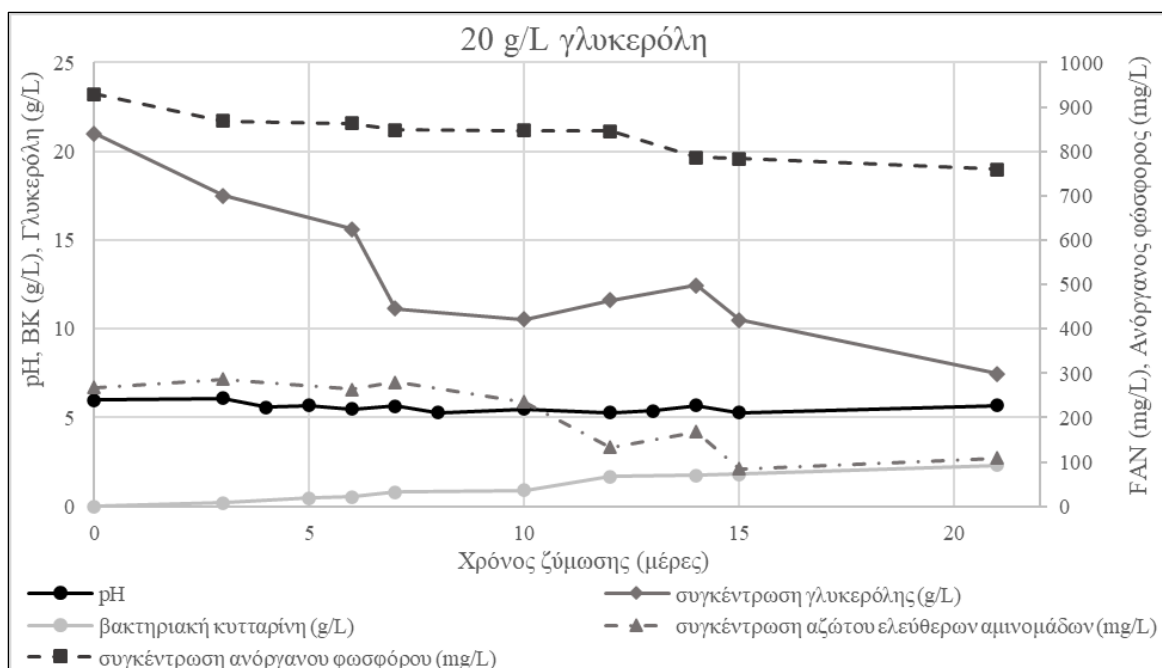
4.1 Επίδραση καθαρής γλυκερόλης στην παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης

Πρωτίστως, πραγματοποιήθηκαν πειράματα με μοναδική πηγή άνθρακα την καθαρή γλυκερόλη, σε πέντε διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις από 20 έως 100 g/L. Όταν η αρχική συγκέντρωση της γλυκερόλης ήταν 20, 40 και 60 g/L η μεγαλύτερη παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης και ταυτόχρονα η μεγαλύτερη κατανάλωση γλυκερόλης εντοπίστηκαν μετά την 15^η ημέρα ζύμωσης. Η μέγιστη συγκέντρωση βακτηριακής κυτταρίνης και η υψηλότερη παραγωγικότητα επιτεύχθηκαν στο πείραμα με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 40 g/L. Αντιθέτως, οι υψηλές συγκεντρώσεις γλυκερόλης (80 και 100 g/L) λειτούργησαν ανασταλτικά, παρεμποδίζοντας τον μικροοργανισμό από την κατανάλωση της πηγής άνθρακα και, συνεπώς, από την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης.

Πίνακας 7. Παρατηρούμενες μετρήσεις μέγιστης παραγόμενης βακτηριακής κυτταρίνης και παραγωγικότητας στην αντίστοιχη ημέρα ζύμωσης για κάθε αρχικές συγκεντρώσεις γλυκερόλης 20, 40, 60 80 και 100 g/L .

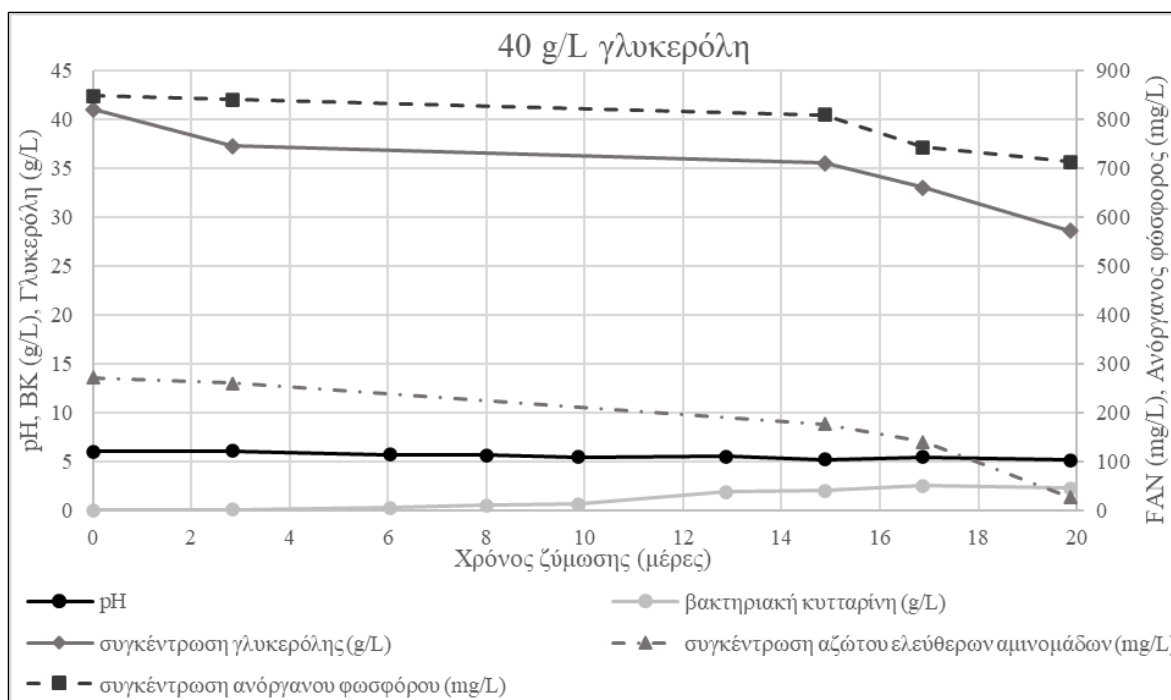
Αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης (g/L)	Βακτηριακή κυτταρίνη (g/L)	Παραγωγικότητα BK (g/L)/μέρα	Χρόνος ζύμωσης (μέρες)
20	2,32	0,11	21
40	2,5	0,15	16,88
60	1,88	0,11	16,88
80	-	-	-
100	-	-	-

Αναλυτικότερα, με αρχική συγκέντρωση της γλυκερόλης στα 20 g/L σημειώθηκε σχετικά σταθερή αύξηση της βακτηριακής κυτταρίνης κατά τη ζύμωση. Ωστόσο, από την συγκέντρωση της γλυκερόλης παρατηρείται μερική κατανάλωση της που δείχνει ότι σε αυτή τη χαμηλή συγκέντρωση, ο *K. sucrofermentans* ενδέχεται να τη μεταβολίζει για να παραγάγει βακτηριακή κυτταρίνη, αν και ίσως όχι ιδιαίτερα αποδοτικά. Η τελική συγκέντρωση γλυκερόλης την 21^η ημέρα ζύμωσης ήταν 7,47 g/L. Από την ανάλυση FAN φανερώνεται επίσης η μερική κατανάλωση του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων με τη μεγαλύτερη κατανάλωση την 15^η ημέρα ζύμωσης, όπου η συγκέντρωση ήταν 84,39 mg/L. Από την ανάλυση προσδιορισμού ανόργανου φωσφόρου φαίνεται ότι υπάρχει και σε αυτόν ελαφριά μείωση όσο εξελίσσεται η ζύμωση. Στο pH του διαλύματος προκλήθηκε μικρή πτώση με μέγιστη μεταβολή την μείωση του κατά 0,7 την 8^η ημέρα ζύμωσης (Γράφημα 5).



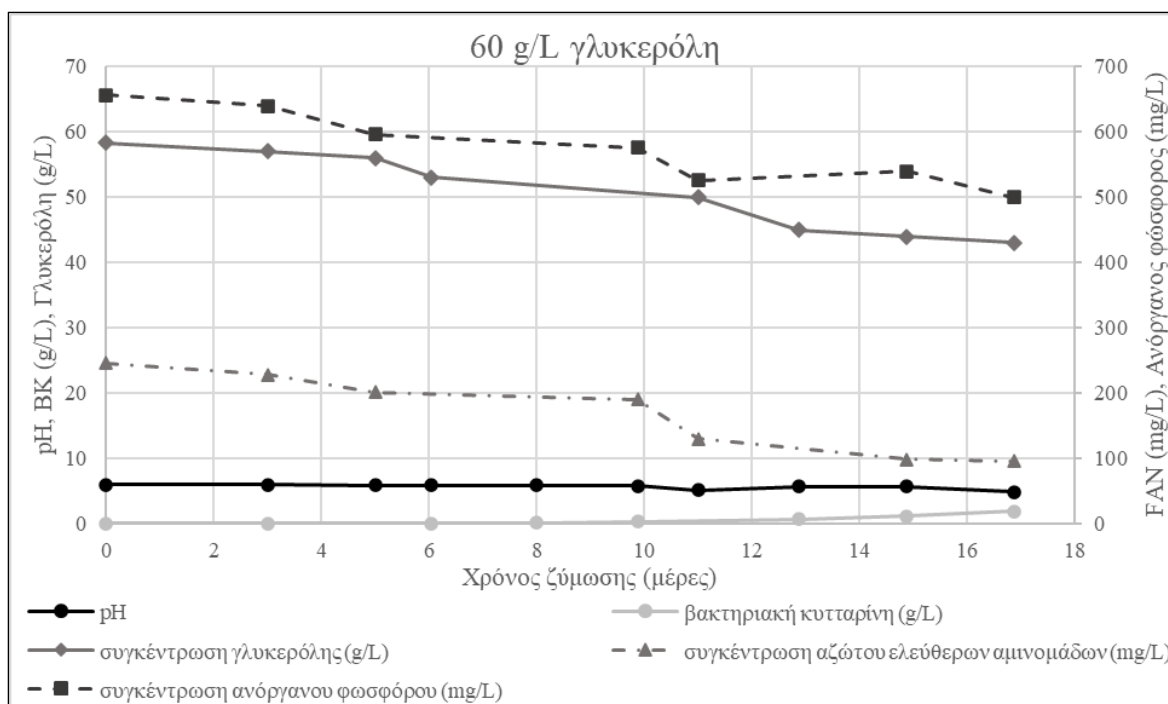
Γράφημα 5. Διάγραμμα σύγκρισης αποτελεσμάτων της ζύμωσης στα δείγματα από τα πειράματα με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 20 g/L.

Στο πείραμα με αρχική συγκέντρωση 40 g/L γλυκερόλης παρατηρήθηκε μετά την 10^η ημέρα ζύμωσης η σημαντική αύξηση στην παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης, ενώ από την 15^η ημέρα και μετά η βακτηριακή κυτταρίνη έφτανε πάνω από 2 g/L. Από τις μετρήσεις της συγκέντρωσης της πηγής άνθρακα και του αζώτου φαίνεται η σταδιακή κατανάλωση τους. Οι τελικές μετρήσεις την 20^η ημέρα ζύμωσης ήταν 28,56 g/L και 26,3 mg/L αντίστοιχα. Επομένως, συμπεραίνεται ότι σε αυτή τη πειραματική συνθήκη γίνεται καλύτερη κατανάλωση του υποστρώματος. Από τον προσδιορισμό του ανόργανου φωσφόρου φαίνεται, επιπλέον, η μικρή κατανάλωση του με την μεγαλύτερη κατανάλωση να ξεκινά μετά την 15^η ημέρα ζύμωσης. Για το pH παρατηρείται σχετικά μικρή πτώση, με μικρότερη ένδειξη το 5,1 την 20^η ημέρα ζύμωσης (Γράφημα 6).



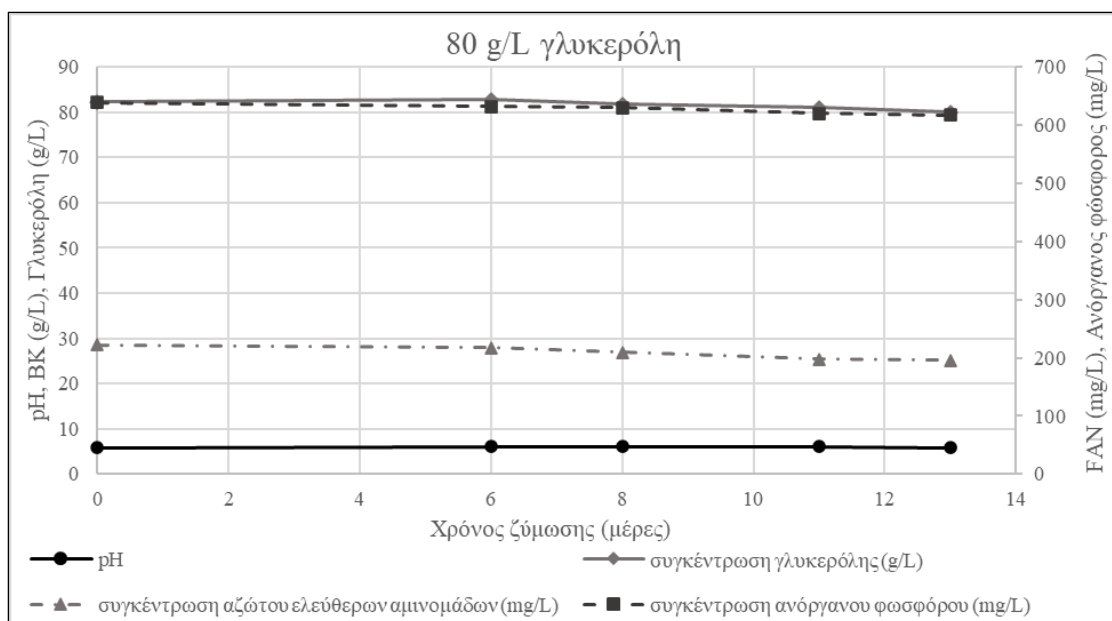
Γράφημα 6. Διάγραμμα σύγκρισης αποτελεσμάτων της ζύμωσης στα δείγματα από τα πειράματα με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 40 g/L.

Όσον αφορά το πείραμα με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 60 g/L παρατηρείται μικρή παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης, η οποία πλησιάζει τα 2 g/L την 17^η ημέρα ζύμωσης. Η πηγή άνθρακα, άρα αναμενόμενα καταναλώνεται με αργό ρυθμό και όχι πλήρως, φτάνοντας τα 43,05 g/L την 17^η ημέρα ζύμωσης. Η ίδια τάση παρατηρείται και στις συγκεντρώσεις του αζώτου και του ανόργανου φωσφόρου. Σημειώθηκε σημαντική πτώση του pH, καθώς έφτασε την τιμή 4,9 την 17^η ημέρα ζύμωσης (Γράφημα 7).



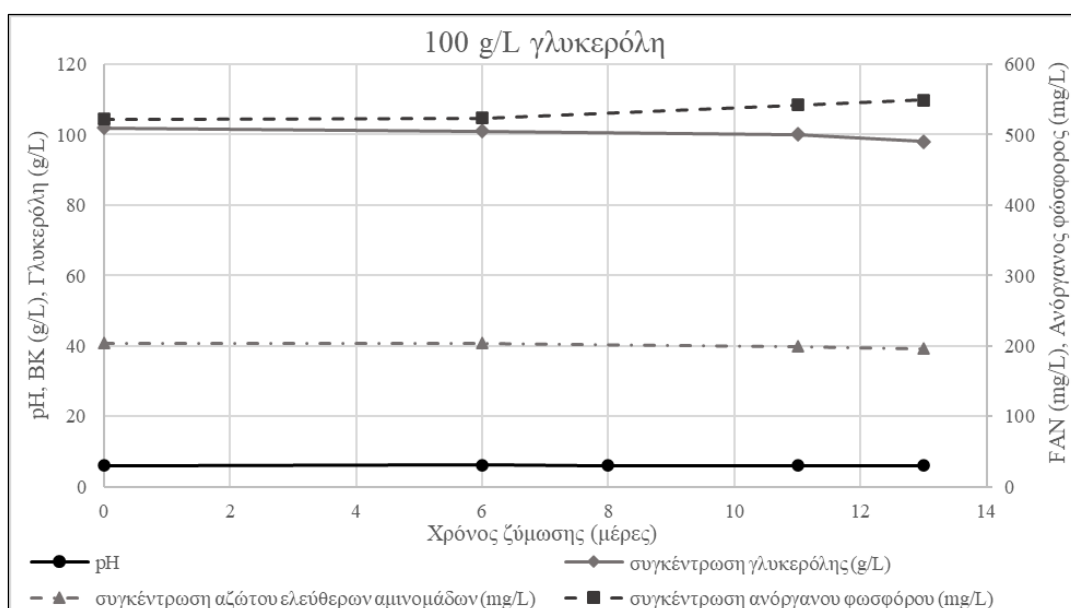
Γράφημα 7. Διάγραμμα σύγκρισης αποτελεσμάτων της ζύμωσης στα δείγματα από τα πειράματα με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 60 g/L.

Με την αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης στα 80 g/L, υπάρχει μικρή κατανάλωση της και μηδενική παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης, γεγονός που υποδεικνύει ότι η γλυκερόλη σε αυτή την συγκέντρωση πιθανώς αναστέλλει τον μικροοργανισμό, λόγω οσμωτικής πίεσης ή της συσσώρευσης μεταβολικών παραπροϊόντων. Ακόμα, είναι πιθανό το θρεπτικό μέσο HS να μην είναι επαρκές για να υποστηρίξει την ανάπτυξη σε τόσο υψηλή συγκέντρωση της πηγής άνθρακα (Γράφημα 8).



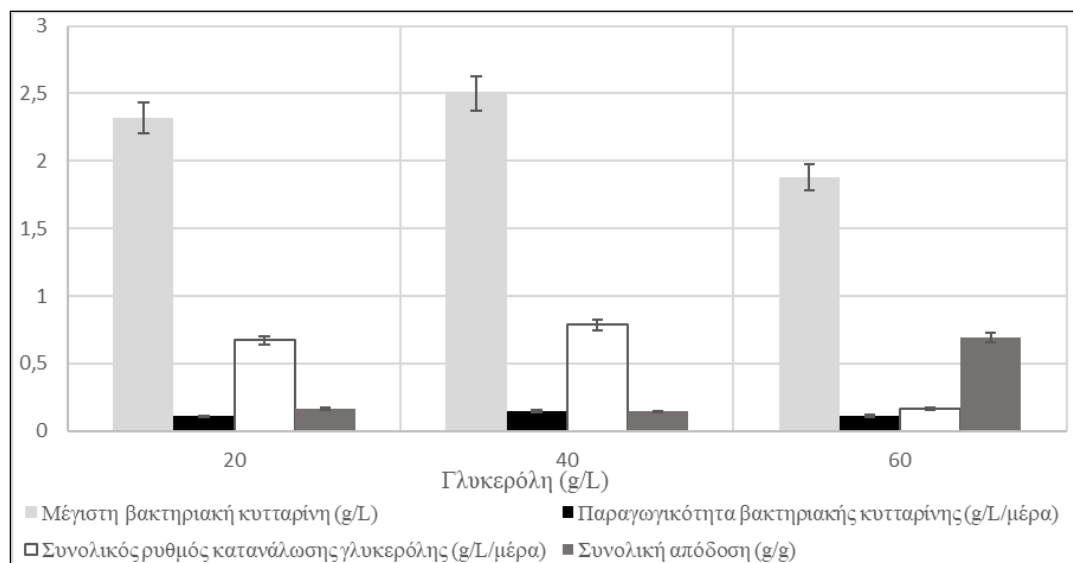
Γράφημα 8. Διάγραμμα σύγκρισης αποτελεσμάτων της ζύμωσης στα δείγματα από τα πειράματα με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 80 g/L.

Τέλος, στην υψηλότερη αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης των 100 g/L παρατηρείται σταθερότητα σε όλες τις μετρήσεις, με εξαίρεση τον προσδιορισμό του ανόργανου φωσφόρου, όπου καταγράφεται ελάχιστη αύξηση που δεν συνοδεύεται ωστόσο με παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης. Η μικρή αύξηση στην συγκέντρωση του ανόργανου φωσφόρου ενδεχομένως οφείλεται στην αναστολή της ανάπτυξης, στην αποδόμηση κυττάρων ή άλλες μη φυσιολογικές μεταβολές (Γράφημα 9).



Γράφημα 9. Διάγραμμα σύγκρισης αποτελεσμάτων της ζύμωσης στα δείγματα από τα πειράματα με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 100 g/L.

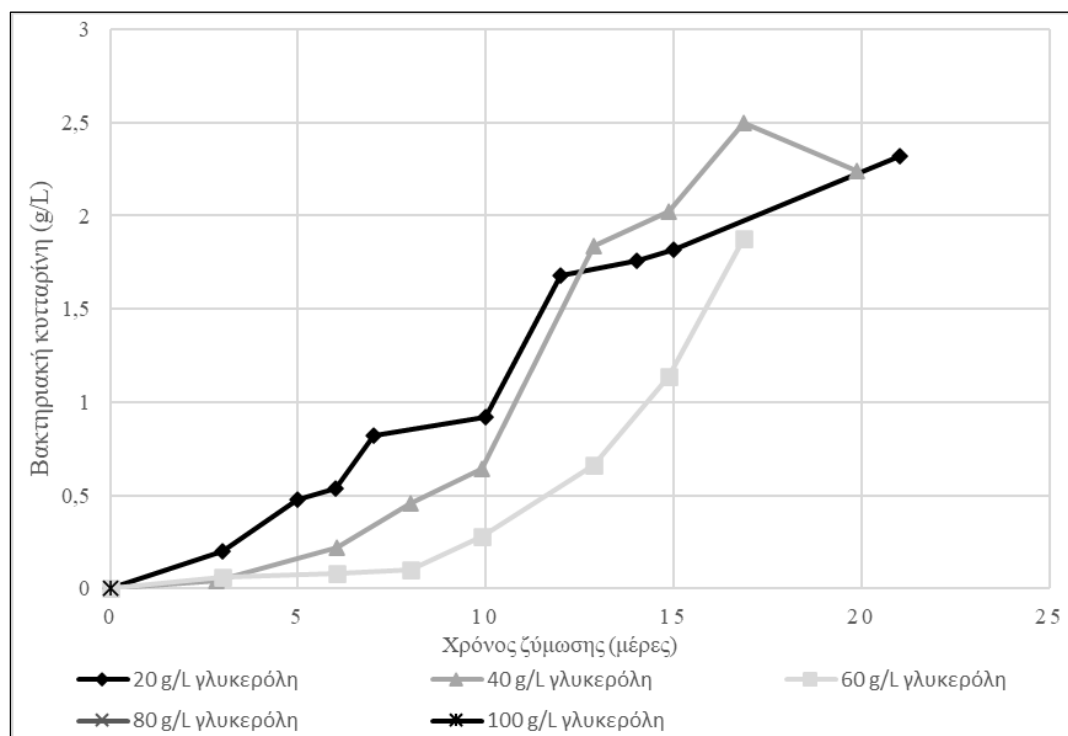
Στο Γράφημα 10 φαίνεται η σύγκριση μεταξύ των τριών διαφορετικών αρχικών συγκεντρώσεων γλυκερόλης που είχαν παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης. Από αυτό προκύπτει ότι η μέγιστη παραγόμενη βακτηριακή κυτταρίνη, η παραγωγικότητα και ο συνολικός ρυθμός κατανάλωσης της γλυκερόλης είναι βέλτιστα στο πείραμα με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 40 g/L. Η συνολική απόδοση παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης είναι μεγαλύτερη στο πείραμα με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 60 g/L, πιθανώς λόγω στρες.



Γράφημα 10. Διάγραμμα μέγιστης παραγόμενης βακτηριακής κυτταρίνης, παραγωγικότητας, ρυθμού κατανάλωσης της γλυκερόλης και απόδοσης παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης για αρχικές συγκεντρώσεις γλυκερόλης 20, 40 και 60 g/L.

Ακολουθώντας, εστιάζοντας μόνο στην παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης, η σύγκριση της ανάμεσα στις διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις γλυκερόλης φαίνεται στο Γράφημα 11. Από αυτό, προκύπτει ότι σε συγκέντρωση 20 g/L γλυκερόλης υπάρχει συνεχής αύξηση της παραγωγής κυτταρίνης, η οποία φτάνει τα 2,32 g/L την 21^η ημέρα, άρα παρατηρείται συνεχής και ικανοποιητική απόδοση παραγωγής. Στα 40 g/L γλυκερόλης παρατηρείται πιο γρήγορη αύξηση μέχρι την 15^η ημέρα (2,6 g/L). Ωστόσο, μετά από αυτό το χρονικό σημείο σημειώνεται πτώση, η οποία ενδεχομένως οφείλεται σε εξάντληση των θρεπτικών συστατικών ή στην εμφάνιση ανασταλτικών παραγόντων. Με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 60 g/L παρατηρείται αρχικά χαμηλή παραγωγή, η οποία αυξάνεται απότομα μετά την 15^η ημέρα, πιθανώς λόγω καθυστερημένης προσαρμογής των βακτηρίων στο περιβάλλον του θρεπτικού μέσου. Συνεπώς, η συγκέντρωση 40 g/L οδηγεί στη μέγιστη απόδοση, ενώ τα 60 g/L προσφέρουν σταθερή, προοδευτικά αυξανόμενη παραγωγή. Οι συγκεντρώσεις 80 και 100 g/L

οδηγούν σε πλήρη καταστολή παραγωγής κυτταρίνης, είτε λόγω μεταβολικής καταστολής είτε λόγω μεταβολικής εκτροπής προς άλλες μεταβολικές οδούς.



Γράφημα 11. Διάγραμμα βακτηριακής κυτταρίνης σε σχέση με τον χρόνο ζύμωσης στα δείγματα από τα πειράματα με αρχικές συγκεντρώσεις γλυκερόλης 20, 40, 60, 80 και 100 g/L.

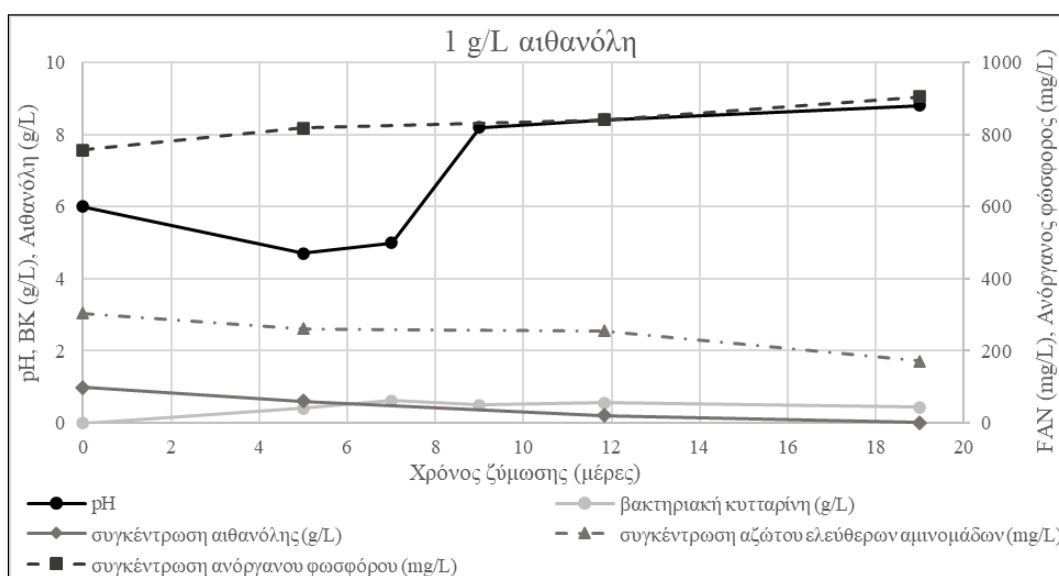
4.2 Επίδραση αιθανόλης στην παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης

Στη συνέχεια, η έρευνα επικεντρώθηκε στην επίδραση της αιθανόλης στην παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης. Η αιθανόλη στη βιοσύνθεση πολυσακχαριτών λειτουργεί ως πηγή άνθρακα και ενέργειας. Διεξήχθησαν πειραματικές διερευνήσεις προκειμένου να εξεταστεί η επίδραση δύο διαφορετικών αρχικών συγκεντρώσεων αιθανόλης (1 και 5 g/L) στη συνολική απόδοση της παραγόμενης βακτηριακής κυτταρίνης. Η σύγκριση των δύο αυτών συνθηκών αποσκοπεί στη διερεύνηση του ρόλου της αιθανόλης ως ενισχυτικού ή ανασταλτικού παράγοντα στη διαδικασία της βιοπαραγωγής.

Πίνακας 9. Παρατηρούμενες μετρήσεις μέγιστης παραγόμενης βακτηριακής κυτταρίνης και παραγωγικότητας στην αντίστοιχη ημέρα ζύμωσης για κάθε αρχική συγκέντρωση αιθανόλης.

Αρχική συγκέντρωση αιθανόλης (g/L)	Βακτηριακή κυτταρίνη (g/L)	Παραγωγικότητα ΒΚ (g/L)/μέρα	Χρόνος ζύμωσης (μέρες)
1	0,62	0,09	7
5	0,46	0,06	7

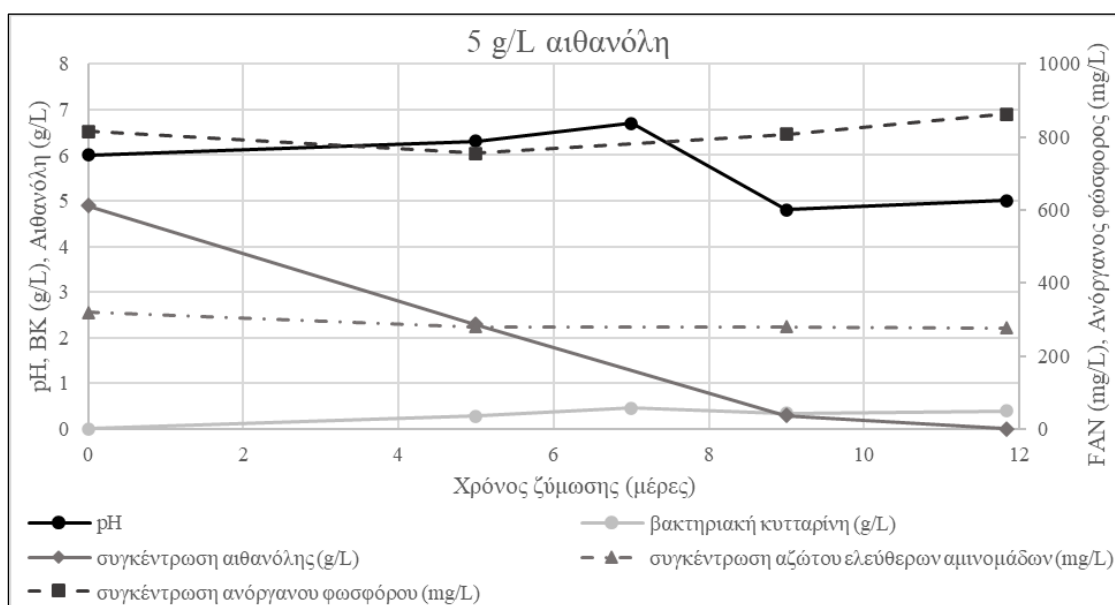
Αρχικά, κατά το πείραμα με αρχική συγκέντρωση αιθανόλης 1 g/L οι διακυμάνσεις στις παραμέτρους που μετρήθηκαν φαίνονται στο Γράφημα 12. Παρατηρείται ότι η συγκέντρωση της αιθανόλης μεταβάλλεται αντιστρόφως ανάλογα σε σχέση με την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης. Από τη συγκέντρωση του αζώτου φανερώνεται η αργή αλλά σταθερή κατανάλωση του, με μεγαλύτερη πτώση την 19^η ημέρα ζύμωσης στα 171,83 mg/L. Στην ανάλυση προσδιορισμού ανόργανου φωσφόρου, παρατηρείται γενικά μικρή αύξηση στη συγκέντρωση με την πάροδο του χρόνου. Τέλος, το pH αρχικά κατά τα δύο πρώτα δείγματα μειώθηκε από την αρχική ρύθμιση στο 6, ενώ μετά την 9^η ημέρα ζύμωσης αυξήθηκε εκθετικά σε τιμές πάνω από 8. Συμπεραίνεται, επομένως ότι η χρήση μικρής ποσότητας αιθανόλης (1 g/L) ευνοεί τη σταθερή παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης.



Γράφημα 12. Διάγραμμα σύγκρισης αποτελεσμάτων της ζύμωσης στα δείγματα από τα πειράματα με αρχική συγκέντρωση αιθανόλης 1 g/L.

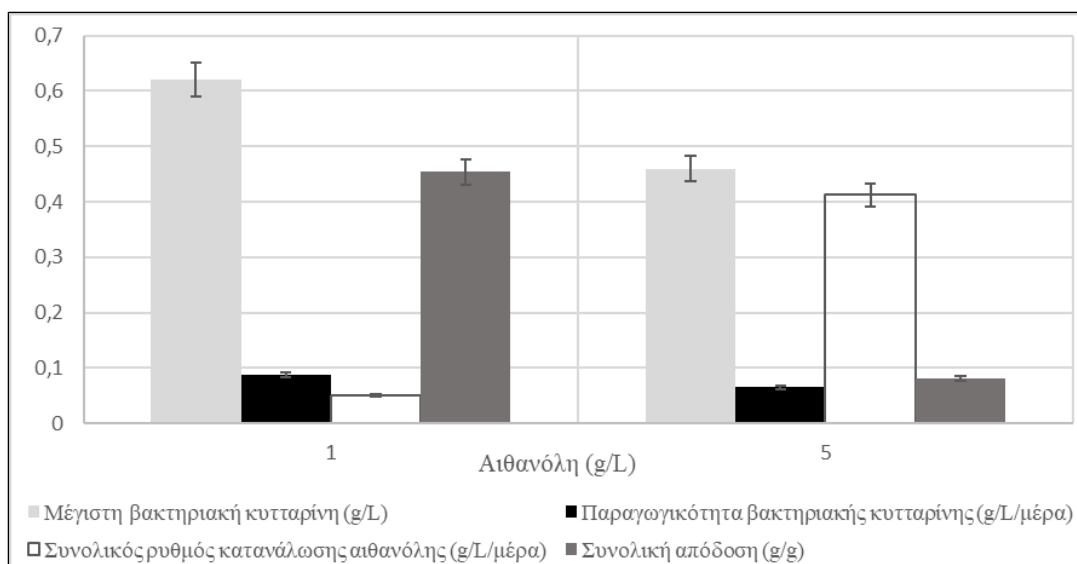
Στο Γράφημα 13 εξετάζεται η επίδραση της αιθανόλης σε μεγαλύτερη συγκέντρωση των 5 g/L. Η παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης φαίνεται να αυξάνεται μέχρι την 7^η ημέρα ζύμωσης, ενώ μετά παραμένει σταθερή γύρω σε 0,3-0,4 g/L. Ταυτόχρονα, παρατηρείται ραγδαία κατανάλωση της αιθανόλης τις πρώτες 7 ημέρες ζύμωσης, υποδηλώνοντας ότι σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, το βακτήριο αντιδρά με εντονότερο μεταβολισμό, πιθανώς λόγω αυξημένης διαθεσιμότητας άνθρακα και ενέργειας, χωρίς να επέρχεται τοξικότητα. Ωστόσο, η απότομη κατανάλωση ενδέχεται να προκαλέσει πτώση της απόδοσης λόγω συσσώρευσης μεταβολικών παραπροϊόντων. Όσον αφορά την ανάλυση FAN, μέσω αυτής φαίνεται ότι το άζωτο με την αυξημένη παρουσία αιθανόλης στο θρεπτικό δεν προτιμάται από το βακτήριο, καθώς η συγκέντρωση σχεδόν δεν μεταβάλλεται. Η ανάλυση προσδιορισμού ανόργανου φωσφόρου

έδειξε αρχική μείωση στη συγκέντρωσή του μέχρι την 5^η ημέρα ζύμωσης και μετά αύξησή της. Η αύξηση παρατηρείται, επομένως, όταν η παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης έχει σταθεροποιηθεί και πιθανώς μετά από αυτή τη χρονική στιγμή προκαλείται τοξικότητα ή καταστολή της μικροβιακής δραστηριότητας. Για το pH, φανερώναται ότι στην αρχή αυξάνεται μέχρι και κατά 0,7 μονάδες την 7^η ημέρα ζύμωσης, και μετά υπάρχει πτώση σε τιμές 4,8 και 5 την 9^η και 12^η ημέρα ζύμωσης, αντίστοιχα. Ως αποτέλεσμα, προκύπτει ότι η ζύμωση με υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης ευνοεί την ταχεία κατανάλωση, χωρίς όμως αυτή να μεταφράζεται απαραίτητα σε υψηλότερη απόδοση προϊόντος. Πιθανώς, σε υψηλότερες συγκεντρώσεις αιθανόλης, ο μεταβολισμός μετατοπίζεται προς κάλυψη ενεργειακών απαιτήσεων εις βάρος της βιοσύνθεσης της κυτταρίνης. Επιπλέον, η παρουσία μεγάλης ποσότητας αιθανόλης ενδέχεται να δρα ως ήπιος αναστολέας μεταβολικών μονοπατιών σύνθεσης κυτταρίνης.



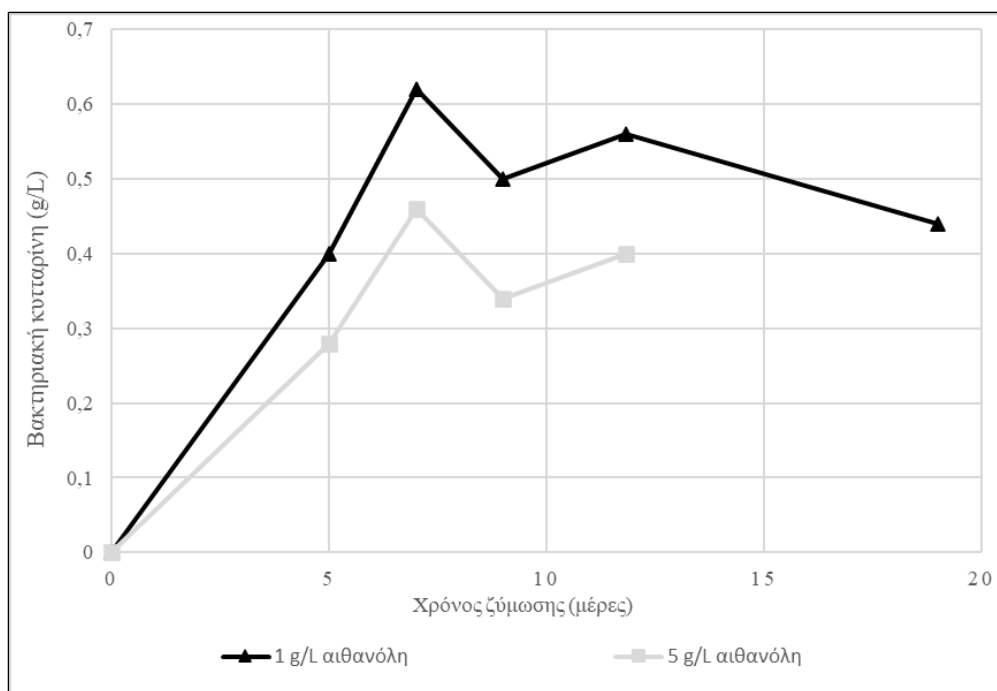
Γράφημα 13. Διάγραμμα σύγκρισης αποτελεσμάτων της ζύμωσης στα δείγματα από τα πειράματα με αρχική συγκέντρωση αιθανόλης 5 g/L.

Συγκεντρωτικά, η μέγιστη βακτηριακή κυτταρίνη, η βέλτιστη παραγωγικότητα και η καλύτερη συνολική απόδοση παρατηρείται κατά την χρήση 1 g/L αιθανόλης. Αντίθετα, ο συνολικός ρυθμός κατανάλωσης της αιθανόλης είναι υψηλότερος στο πείραμα με αρχική συγκέντρωση αιθανόλης 5 g/L στο θρεπτικό μέσο. Αυτό μπορεί να υποδηλώνει ότι, ενώ η αιθανόλη καταναλώνεται γρήγορα, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις της δεν ισοδυναμούν με μεγαλύτερη παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης, αλλά ο μικροοργανισμός μπορεί να την αξιοποιεί σε άλλα μεταβολικά μονοπάτια (Γράφημα 14).



Γράφημα 14. Διάγραμμα μέγιστης παραγόμενης βακτηριακής κυτταρίνης, παραγωγικότητας, ρυθμού κατανάλωσης της αιθανόλης και απόδοσης παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης για αρχικές συγκεντρώσεις αιθανόλης 1 και 5 g/L.

Η σύγκριση της παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης στις δύο διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις αιθανόλης 1 και 5 g/L φαίνεται στο Γράφημα 15. Παρατηρείται ότι και στις δύο περιπτώσεις, η παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης αυξάνεται αρχικά, με μέγιστη τιμή την 7^η ημέρα ζύμωσης. Μετά τη 7^η ημέρα, παρατηρείται μια μικρή μείωση στην απόδοση και για τις δύο καμπύλες, υποδεικνύοντας ότι οι συνθήκες παραγωγής φτάνουν σε ένα επίπεδο κορεσμού. Η παραγωγή κυτταρίνης είναι συστηματικά υψηλότερη με τη συγκέντρωση 1 g/L αιθανόλης σε όλες τις μετρήσεις, σε σύγκριση με την 5 g/L. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η αιθανόλη σε υψηλότερη συγκέντρωση (5 g/L) έχει ανασταλτική επίδραση στην παραγωγή κυτταρίνης, γεγονός που μπορεί να οφείλεται σε τοξικές επιδράσεις ή σε άλλες ανασταλτικές αλληλεπιδράσεις στο θρεπτικό μέσο.



Γράφημα 15. Διάγραμμα βακτηριακής κυτταρίνης στα δείγματα από τα πειράματα με αρχικές συγκεντρώσεις αιθανόλης 1 και 5 g/L.

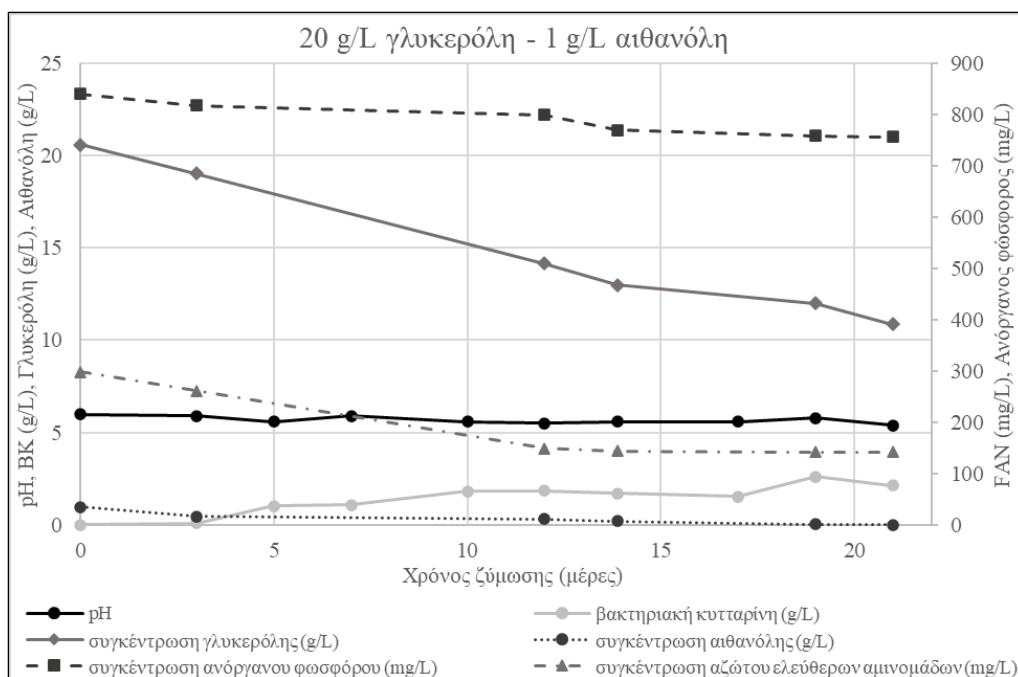
4.3 Επίδραση καθαρής γλυκερόλης σε συνδυασμό με αιθανόλη στην παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης

Στο επόμενο στάδιο της μελέτης, πραγματοποιήθηκαν πειράματα στα οποία η γλυκερόλη αξιοποιήθηκε σε σταθερή συγκέντρωση 20 g/L, ενώ προστέθηκαν διαβαθμισμένες συγκεντρώσεις αιθανόλης (0, 1, 5 και 10 g/L), με σκοπό να διερευνηθεί η συνδυαστική επίδραση των δύο πηγών άνθρακα. Η σύγκριση αυτών των συνθηκών αποσκοπεί στο να καθοριστεί εάν η προσθήκη αιθανόλης ενισχύει ή παρεμποδίζει τη δράση των βακτηρίων στην παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης όταν αυτή συνοδεύεται από γλυκερόλη. Μέσω αυτής της προσέγγισης επιδιώκεται να αξιολογηθεί ενδεχόμενη συνέργεια ή ανταγωνιστική δράση μεταξύ των δύο υποστρωμάτων, συμβάλλοντας στην κατανόηση του μεταβολικού μηχανισμού και στη βελτιστοποίηση των παραμέτρων παραγωγής.

Πίνακας 11. Παρατηρούμενες μετρήσεις μέγιστης παραγόμενης βακτηριακής κυτταρίνης και παραγωγικότητας στην αντίστοιχη ημέρα ζύμωσης για κάθε συνδυασμό αρχικών συγκεντρώσεων γλυκερόλης-αιθανόλης.

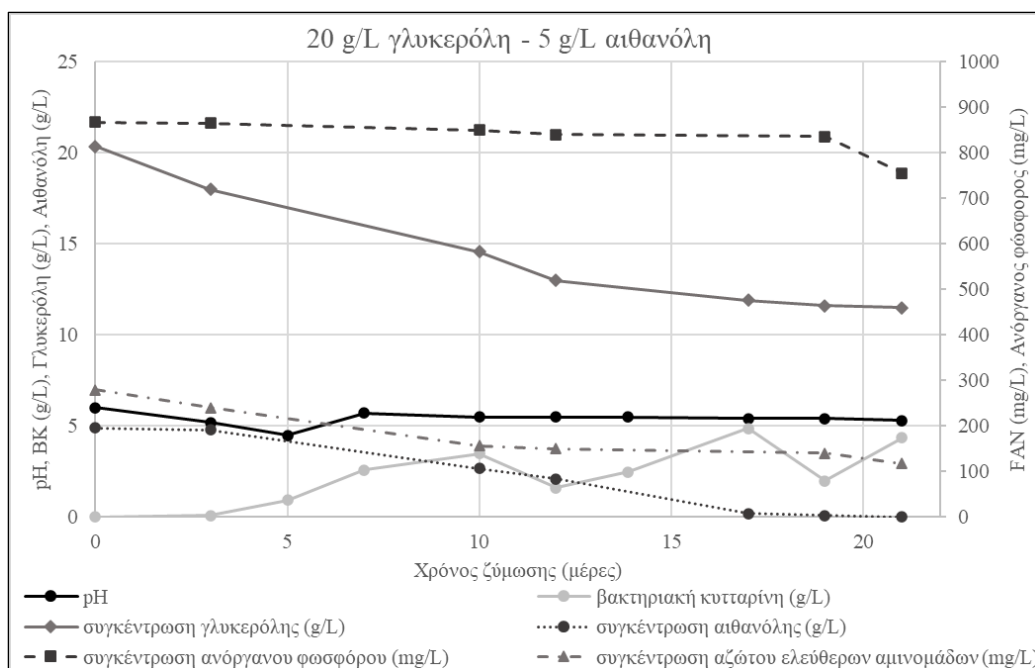
Αρχικές συγκεντρώσεις πηγών άνθρακα	Βακτηριακή κυτταρίνη (g/L)	Παραγωγικότητα ΒΚ (g/L/μέρα)	Χρόνος ζύμωσης (μέρες)
20 g/L γλυκερόλη – 0 g/L αιθανόλη	2,32	0,11	21
20 g/L γλυκερόλη – 1 g/L αιθανόλη	2,62	0,14	19
20 g/L γλυκερόλη – 5 g/L αιθανόλη	4,88	0,287	17
20 g/L γλυκερόλη – 10 g/L αιθανόλη	6,02	0,286	21

Αναλυτικότερα, στο πείραμα με 20 g/L γλυκερόλης και 1 g/L αιθανόλης, που παρουσιάζεται στο Γράφημα 16, παρατηρείται ότι η παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης αυξάνεται σημαντικά μετά την 5^η ημέρα ζύμωσης, φτάνοντας τα 2,62 g/L την 19^η ημέρα. Επομένως, η παρουσία αιθανόλης φαίνεται να ενισχύει τον μεταβολισμό, καθώς η παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης επιταχύνεται σε σχέση με την περίπτωση χρήσης μόνο γλυκερόλης ή μόνο αιθανόλης ως πηγής άνθρακα. Η γλυκερόλη που χρησιμοποιείται ως κύρια πηγή άνθρακα για τη σύνθεση κυτταρίνης και βιομάζας καταναλώνεται με αργό αλλά σταθερό ρυθμό, που παραπέμπει σε αργή και συνεχόμενη μεταβολική δραστηριότητα. Από την άλλη, παρατηρείται ολοκληρωτική κατανάλωση της αιθανόλης. Η γρήγορη κατανάλωση της αιθανόλης που δρα ως συν-υπόστρωμα και βοηθά στη ρύθμιση του μεταβολισμού (0,2 g/L έως την 13^η ημέρα ζύμωσης) δείχνει την προτίμηση της στα αρχικά στάδια. Ο ανόργανος φώσφορος παρουσιάζει ελαφρά μείωση στη συγκέντρωση του, η οποία είναι αναμενόμενη, αφού χρησιμοποιείται για παραγωγή μορίων ATP και νουκλεοτιδίων. Το άζωτο, όμως, παρατηρείται ότι καταναλώνεται σημαντικά, αντικατοπτρίζοντας την ενεργή πρωτεϊνοσύνθεση και την κυτταρική αύξηση. Το pH μειώνεται σταδιακά, φτάνοντας το 5,4 την 21^η ημέρα ζύμωσης. Η πτώση του pH είναι αναμενόμενη λόγω παραγωγής οργανικών οξέων ή κατανάλωσης αμμωνιακών ενώσεων.



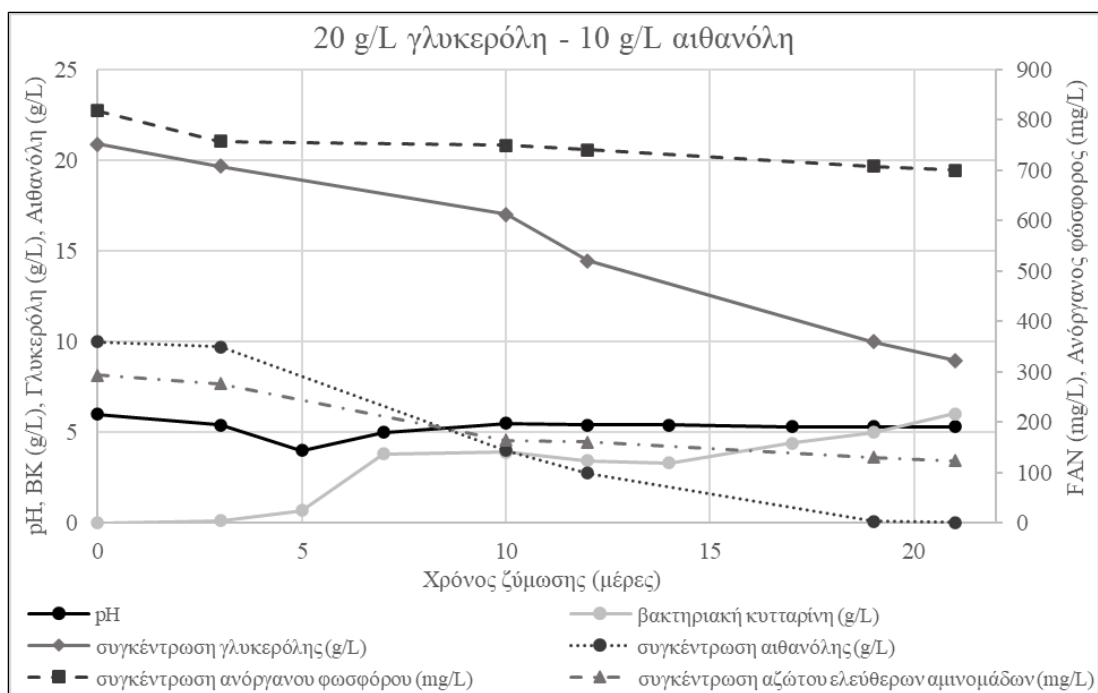
Γράφημα 16. Διάγραμμα σύγκρισης αποτελεσμάτων της ζύμωσης στα δείγματα από τα πειράματα με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 20 g/L και αιθανόλης 1 g/L.

Στο πείραμα με 20 g/L γλυκερόλης και 5 g/L αιθανόλης καταγράφηκε η υψηλότερη παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης. Σημειώνεται σημαντική αύξηση μεταξύ 5^{ης} και 10^{ης} ημέρας ζύμωσης από 0,94 σε 3,48 g/L, ενώ στη συνέχεια μεταξύ των ημερών 12 με 21, εμφανίζονται διακυμάνσεις. Συνεπώς, η ζύμωση χαρακτηρίζεται ως πολυφασική, ίσως λόγω της χρήσης δύο υποστρωμάτων. Από το Γράφημα 17 φαίνεται, επίσης, ότι η γλυκερόλη καταναλώνεται αργά και προοδευτικά, υποδεικνύοντας μερική κατανάλωση του υποστρώματος από τον μικροοργανισμό. Αντίθετα, η αιθανόλη καταναλώνεται ταχύτερα και κατά την 17^η ημέρα ζύμωσης έχει σχεδόν εξαφανιστεί, γεγονός που υποδηλώνει την προτίμησή της ως ενεργειακή πηγή. Όσον αφορά το άζωτο, γίνεται έντονη μείωση του στις πρώτες 10 ημέρες ζύμωσης με την τάση αυτή να συνεχίζεται μέχρι το τέλος της ζύμωσης, δείχνοντας την ενεργή σύνθεση πρωτεϊνών και βιομάζας. Παρά τη σημαντική παραγωγή βιομάζας, η κατανάλωση του ανόργανου φωσφόρου δεν είναι ιδιαίτερα έντονη, δηλώνοντας την επαρκή αρχική συγκέντρωσή του και την ικανοποιητική βιοδιαθεσιμότητά του στο θρεπτικό μέσο. Τέλος, το pH μειώνεται σταδιακά, από 6 σε 5,3 με μόνο μια παρέκκλιση από το φυσιολογικό την 5^η ημέρα ζύμωσης, που παρατηρείται απότομη πτώση στο 4,5. Αυτή η πτώση πιθανώς δικαιολογείται από τη δράση ρυθμιστικών συστημάτων ή την εξισορρόπηση κατανάλωσης και παραγωγής οξέων κατά τη ζύμωση.



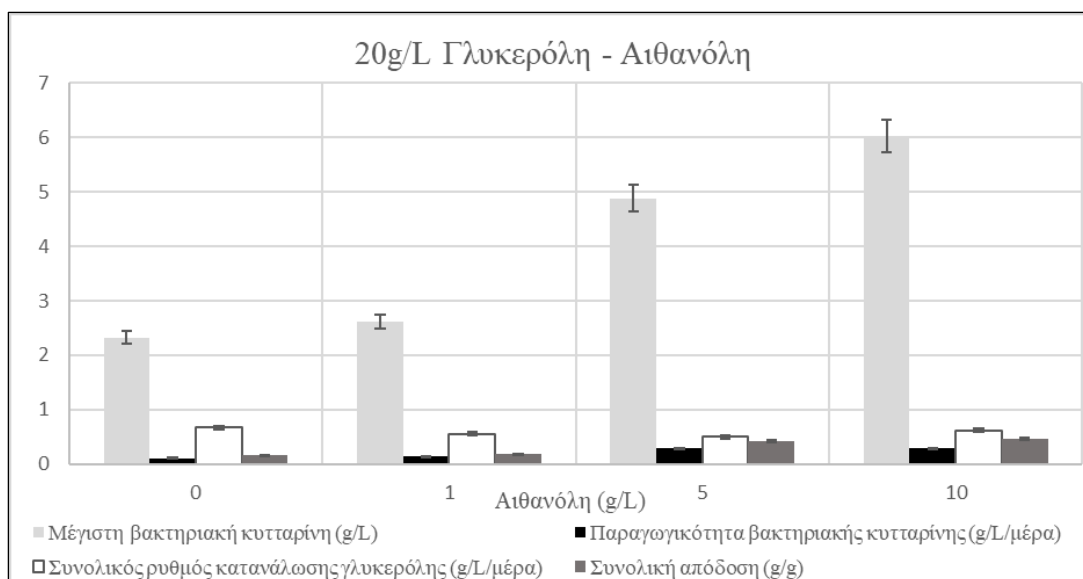
Γράφημα 17. Διάγραμμα σύγκρισης αποτελεσμάτων της ζύμωσης στα δείγματα από τα πειράματα με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 20 g/L και αιθανόλης 5 g/L.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε πείραμα με προσθήκη 20 g/L γλυκερόλης και 10 g/L αιθανόλης στο θρεπτικό μέσο, όπως αποτυπώνεται στο Γράφημα 18. Υπό αυτές τις συνθήκες, η παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης αυξήθηκε εκθετικά από την 3^η έως την 7^η ημέρα ζύμωσης, φτάνοντας τα 3,8 g/L. Στη συνέχεια, παρέμεινε σχετικά σταθερή μεταξύ της 10^{ης} και 14^{ης} ημέρας, ενώ ακολούθησε νέα αύξηση από την 14^η έως την 21^η ημέρα, με κορύφωση στα 6,02 g/L, που αποτελεί τη μέγιστη τιμή όλων των πειραμάτων. Η γλυκερόλη καταναλώθηκε με σταθερό ρυθμό, ωστόσο σημαντικά υπολείμματα παρέμειναν στο τέλος της ζύμωσης. Η παράλληλη παρουσία αιθανόλης ενδέχεται να οδήγησε σε μερική αξιοποίηση της γλυκερόλης ως πηγής άνθρακα. Αντίθετα, η αιθανόλη καταναλώθηκε πλήρως έως τη 19^η ημέρα, γεγονός που υποδηλώνει προτίμησή της από τον μικροοργανισμό ως υπόστρωμα. Το άζωτο και ο ανόργανος φώσφορος παρουσίασαν μέτρια μείωση στις συγκεντρώσεις τους, υποδεικνύοντας ότι δεν αποτέλεσαν περιοριστικούς παράγοντες και ήταν επαρκώς διαθέσιμοι στο θρεπτικό μέσο. Όσον αφορά το pH, παρατηρήθηκε απότομη πτώση τις πρώτες πέντε ημέρες ζύμωσης, με τη μεγαλύτερη μεταβολή να καταγράφεται την 5^η ημέρα (από pH 6 σε pH 4), πιθανώς λόγω παραγωγής οργανικών οξέων. Στη συνέχεια, το pH ανέκαμψε σε τιμές μεταξύ 5,3 και 5,5, παραμένοντας σχεδόν σταθερό. Η σταθεροποίηση του pH υποδηλώνει απουσία συσσώρευσης επιπλέον όξινων μεταβολιτών και ισορροπία μεταξύ παραγωγής και κατανάλωσης μεταβολικών προϊόντων.



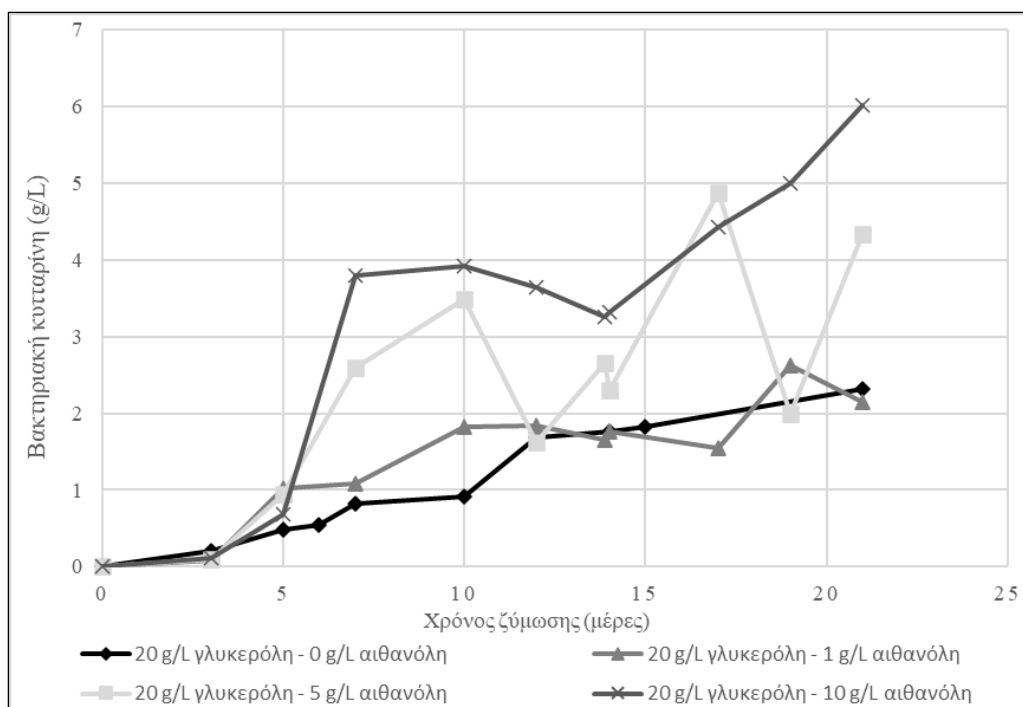
Γράφημα 18. Διάγραμμα σύγκρισης αποτελεσμάτων της ζύμωσης στα δείγματα από τα πειράματα με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 20 g/L και αιθανόλης 10 g/L.

Η επίδραση της αιθανόλης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (0, 1, 5 και 10 g/L), με σταθερή συγκέντρωση γλυκερόλης (20 g/L), παρουσιάζεται στο Γράφημα 19. Η μέγιστη παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης καταγράφεται στο πείραμα με 10 g/L αιθανόλης, φτάνοντας τα 6,02 g/L. Στο ίδιο πείραμα παρατηρείται και η υψηλότερη συνολική απόδοση παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης, με τιμή 0,47 g κυτταρίνης ανά g υποστρώματος. Η βέλτιστη παραγωγικότητα επιτυγχάνεται στο πείραμα με 5 g/L αιθανόλης, όπου καταγράφηκε τιμή 0,287 g/L/μέρα. Τέλος, ο υψηλότερος συνολικός ρυθμός κατανάλωσης γλυκερόλης παρατηρείται στην περίπτωση όπου η γλυκερόλη χρησιμοποιείται ως μοναδική πηγή άνθρακα, με ρυθμό 0,67 g/L/μέρα.



Γράφημα 19. Διάγραμμα μέγιστης παραγόμενης βακτηριακής κυτταρίνης, παραγωγικότητας, ρυθμός κατανάλωσης της γλυκερόλης και απόδοσης παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης για αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 20 g/L μαζί με συγκεντρώσεις αιθανόλης των 0, 1, 5 και 10 g/L.

Για την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης στα πειράματα που εξετάζουν τον συνδυασμό των δυο πηγών άνθρακα σχεδιάστηκε το Γράφημα 20. Όταν χρησιμοποιείται μόνο γλυκερόλη στο πείραμα η παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης είναι σταθερή με σταδιακή αύξηση, καθώς δεν υπάρχουν διαθέσιμοι για τα βακτήρια επιπρόσθετοι εξωτερικοί διεγέρτες για τον μικροοργανισμό. Με την προσθήκη 1 g/L αιθανόλης στο θρεπτικό μέσο παρατηρείται επιταχυνόμενη απόδοση μέχρι περίπου τη 12^η ημέρα ζύμωσης, η οποία στη συνέχεια σταθεροποιείται ή μειώνεται ελαφρώς. Συνεπώς, η παραγωγή σε αυτήν την περίπτωση υπερτερεί αρχικά της αντίστοιχης χωρίς αιθανόλη, αλλά δεν παρουσιάζει αισθητά υψηλότερη τελική απόδοση. Αντίθετα, η προσθήκη 5 g/L αιθανόλης προκαλεί σημαντική ενίσχυση της παραγωγής, με απότομη αύξηση της βακτηριακής κυτταρίνης έως 4,88 g/L την 15^η ημέρα ζύμωσης. Ωστόσο, οι έντονες διακυμάνσεις στην παραγόμενη ποσότητα υποδηλώνουν πιθανή μεταβολική προσαρμογή του μικροοργανισμού στο εμπλουτισμένο υπόστρωμα. Τέλος, στο πείραμα με 20 g/L γλυκερόλης και 10 g/L αιθανόλης, καταγράφεται η υψηλότερη συνολικά απόδοση, που φτάνει τα 6,02 g/L την 21^η ημέρα ζύμωσης. Συμπεραίνεται, επομένως, ότι η αιθανόλη δρα ως ισχυρός επαγωγέας για την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης, τουλάχιστον στην παρούσα συγκέντρωση γλυκερόλης.



Γράφημα 20. Διάγραμμα βακτηριακής κυτταρίνης στα δείγματα από τα πειράματα με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 20 g/L μαζί με συγκεντρώσεις αιθανόλης των 0, 1, 5 και 10 g/L.

4.4 Επίδραση ακατέργαστης γλυκερόλης από τη βιομηχανία σαπουνιών στην παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης

Ακολουθώντας, εξετάστηκε η παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης είτε χρησιμοποιώντας αποκλειστικά την ακατέργαστη γλυκερόλη από τη βιομηχανία σαπουνιών ως πηγή άνθρακα είτε σε συνδυασμό με αιθανόλη. Οι συνθήκες ανάπτυξης που δοκιμάστηκαν ήταν 40 g/L ακατέργαστης γλυκερόλης και 40 g/L ακατέργαστης γλυκερόλης με 5 g/L αιθανόλης. Ο συνολικός χρόνος ζύμωσης ήταν 60 ημέρες. Μετά την ολοκλήρωση της ζύμωσης, καταγράφηκε εξαιρετικά χαμηλή παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης (μερικά mg/L) και για τις δύο συνθήκες ανάπτυξης. Το φαινόμενο αυτό αποδίδεται στην υψηλή περιεκτικότητα της ακατέργαστης γλυκερόλης σε σαπούνι, το οποίο λειτουργεί ανασταλτικά στο μεταβολισμό του βακτηρίου προς την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης.

Ως λύση στη μειωμένη παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης σε αυτά τα πειράματα προτείνεται πριν τη χρήση της ακατέργαστης γλυκερόλης, ο καθαρισμός της και κατά συνέπεια η απομάκρυνση των προσμίξεων. Σε διάφορες μελέτες έχει τονιστεί η αξία του καθαρισμού της ακατέργαστης γλυκερόλης, για την αύξηση της αποδοτικότητας και διότι η βακτηριακή κυτταρίνη βρίσκει εφαρμογή στους τομείς των τροφίμων και των φαρμάκων. (Ardi et al., 2014; Kumar et al., 2019)

Ένας γενικός καθαρισμός της ακατέργαστης γλυκερόλης αποτελείται από τρία στάδια. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την απομάκρυνση του σαπουνιού και των μετάλλων, που επιτυγχάνεται μέσω καταβύθισης κατά την οξίνιση, όπου το σαπούνι μετατρέπεται σε ελεύθερα λιπαρά οξέα και τα μέταλλα καταβυθίζονται με τη μορφή αλάτων. Στο επόμενο στάδιο, η γλυκερόλη συμπυκνώνεται μέσω εξάτμισης, κατά την οποία αφαιρείται η αλκοόλη από το ρεύμα της γλυκερόλης. Το τελικό στάδιο είναι η καθαριστική επεξεργασία, η οποία μπορεί να επιτευχθεί στον επιθυμητό βαθμό με συνδυασμό μεθόδων, όπως η ιοντοανταλλαγή, η απόσταξη υπό κενό, η τεχνολογία μεμβρανών και η προσρόφηση. (Kumar et al., 2019)

Πιο αναλυτικά, στο πρώτο στάδιο του καθαρισμού, η οξίνιση περιλαμβάνει μια χημική αντίδραση με τη χρήση ισχυρού οξέος για την απομάκρυνση του καταλύτη (NaOH) και του σαπουνιού. Τα αδιάλυτα ελεύθερα λιπαρά οξέα, που παράγονται, απομονώνονται στην επιφάνεια και μπορούν να απομακρυνθούν, ενώ τα ανόργανα άλατα κατακρημνίζονται στον πυθμένα και αφαιρούνται με διήθηση. Μια ακόμη μελέτη σημείωσε ότι κατά τον καθαρισμό με οξίνιση σε pH 1 χρησιμοποιώντας φωσφορικό οξύ, η πυκνότητα, το ιξώδες, το pH και τα μεταλλικά στοιχεία των καθαρισμένων δειγμάτων γλυκερόλης ήταν πολύ κοντά σε αυτά της καθαρής γλυκερόλης που διατίθεται εμπορικά. (Nanda & Ambekar, 2014)

Για το δεύτερο στάδιο καθαρισμού της γλυκερόλης αναφέρεται ότι η αποστείρωση είναι επαρκής για την απομάκρυνση της αλκοόλης από το ρεύμα της γλυκερόλης όταν η συγκέντρωσή της είναι κάτω από 20% (κατά βάρος), ενώ μόνο για υψηλότερες συγκεντρώσεις απαιτείται η απόσταξη υπό κενό. (Kumar et al., 2019)

Τελικά, έχει τονιστεί η αποδοτικότητα του συνδυασμού διάφορων τεχνικών για την καθαριστική επεξεργασία, συμπεριλαμβανομένων της τεχνικής διαχωρισμού φάσεων για την απομάκρυνση των γλυκεριδίων, των ελεύθερων λιπαρών οξέων και της διφασικής εκχύλισης για την επίτευξη υψηλής καθαρότητας γλυκερόλης. (Xiao et al., 2013)

4.5 Συνολική σύγκριση αποδοτικότητας

Συνολικά, τα αποτελέσματα όλων των πειραματικών σειρών καταδεικνύουν σημαντικά ευρήματα αναφορικά με την επίδραση της συγκέντρωσης των πηγών άνθρακα στην παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης και στην κατανάλωση των θρεπτικών συστατικών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.

Συγκεκριμένα, η μέγιστη παραγόμενη βακτηριακή κυτταρίνη καταγράφηκε στο πείραμα με αρχική συγκέντρωση 20 g/L καθαρής γλυκερόλης και 10 g/L αιθανόλης, όπου έφτασε τα 6,02 g/L. Ωστόσο, η υψηλότερη παραγωγικότητα παρατηρήθηκε στο πείραμα με αρχική συγκέντρωση 20 g/L καθαρής γλυκερόλης και 5 g/L αιθανόλης (0,287 g/L ανά ημέρα).

Από την ανάλυση FAN προκύπτει ότι η μέγιστη κατανάλωση ελεύθερου αζώτου εντοπίζεται στο πείραμα με αρχική συγκέντρωση 40 g/L καθαρής γλυκερόλης, όπου η τελική συγκέντρωση του μειώθηκε στα 26,3 mg/L, υποδεικνύοντας την εκτεταμένη χρήση του συγκεκριμένου θρεπτικού συστατικού κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.

Επιπλέον, από τις μετρήσεις της συγκέντρωσης των πηγών άνθρακα, της κατανάλωσης τους και της απόδοσης παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης ανά ημέρα φαίνεται ότι η προσθήκη αιθανόλης σε καλλιέργειες με αρχική συγκέντρωση 20 g/L γλυκερόλης επηρεάζει θετικά τη σταθερότητα της κατανάλωσης γλυκερόλης, καθώς παρατηρείται σταδιακή μείωση της συγκέντρωσής της, σε αντίθεση με τις διακυμάνσεις που σημειώνονται όταν χρησιμοποιείται μόνο γλυκερόλη. Η αιθανόλη καταναλώθηκε σχεδόν πλήρως κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, γεγονός που υποδεικνύει ότι ο *Komagataeibacter sucrofermentans* είναι σε θέση να χρησιμοποιήσει την αιθανόλη ως συν-υπόστρωμα και ρυθμιστικό μεταβολικό παράγοντα, ενδεχομένως βελτιώνοντας την κατεύθυνση του μεταβολισμού προς την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων υποδεικνύουν ότι η γλυκερόλη αποτελεί σταθερά αποδοτική πηγή άνθρακα, ιδιαίτερα σε μέτριες συγκεντρώσεις, εξασφαλίζοντας υψηλή παραγωγικότητα. Αντιθέτως, η αιθανόλη, παρότι παρουσιάζει υψηλή απόδοση σε χαμηλές συγκεντρώσεις, περιορίζεται από την τοξικότητά της και τη γρήγορη κατανάλωση από τον μικροοργανισμό. Ο συνδυασμός γλυκερόλης και αιθανόλης αποδείχθηκε ως η πιο αποδοτική στρατηγική, προσφέροντας υψηλές τιμές παραγόμενης βακτηριακής κυτταρίνης, συνολικής απόδοσης και παραγωγικότητας.

5. Συζήτηση

Μετά την ολοκλήρωση των πειραμάτων, τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με ευρήματα προηγούμενων βιβλιογραφικών μελετών αναφορικά με την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης. Ο Πίνακας 13 παρουσιάζει αυτή τη σύγκριση, ανάλογα με την πηγή άνθρακα στο θρεπτικό μέσο, μεταξύ των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης και των δεδομένων της διεθνούς βιβλιογραφίας.

Πίνακας 13. Σύγκριση αποτελεσμάτων βακτηριακής κυτταρίνης βιβλιογραφικής ανασκόπησης με αυτά της παρούσας μελέτης.

Πηγή άνθρακα	Συγκέντρωση πηγής άνθρακα (g/L)	Βακτηριακή κυτταρίνη (g/L)	Πηγή
Γλυκερόλη	20	2,32	Παρούσα μελέτη
		5,92	Wang & Zhong (2022)
		2,3	Dikshit & Kim (2020)
		5,68	Jin et al. (2019)
		3,8	Thorat & Dastager (2018)
		1,8	Ye et al. (2023)
		1,2	S. Wang et al. (2018)
		2,87	Adnan et al. (2015)
		1,9	Lee et al. (2021)
		2,0	Santos et al. (2013)
	40	2,5	Παρούσα μελέτη
		2,6	Dikshit & Kim (2020)
		3,2	Jin et al. (2019)
		7,1	Thorat & Dastager (2018)
		3,85	Cielecka et al. (2021)
	60	1,88	Παρούσα μελέτη
		3,4	Dikshit & Kim (2020)
		8,7	Thorat & Dastager (2018)
		1,083	Lu et al. (2011)
	80	0	Παρούσα μελέτη
		1,6	Dikshit & Kim (2020)
	100	0	Παρούσα μελέτη

		1,4	Dikshit & Kim (2020)
Αιθανόλη	1	0,62	Παρούσα μελέτη
		2,31	Park et al. (2003)
	5	0,46	Παρούσα μελέτη
		0,4	M. Liu et al. (2018)
		0,23	Montenegro-Silva et al. (2024)

Η σύγκριση των αποτελεσμάτων στην παρούσα διπλωματική εργασία με τα βιβλιογραφικά δεδομένα είναι ουσιώδης για την ερμηνεία της αποδοτικότητας της καλλιέργειας. Συγκρίνοντας τις τιμές από τα πειράματα με χρήση γλυκερόλης ως πηγή άνθρακα σε αρχική συγκέντρωση 20 g/L, παρατηρείται ότι η παραγόμενη βακτηριακή κυτταρίνη ήταν 2,32 g/L, ενώ το βιβλιογραφικό εύρος είναι 1,2 – 5,92 g/L. Άρα, η βακτηριακή κυτταρίνη που προέκυψε στην παρούσα μελέτη είναι κοντά στον μέσο όρο των βιβλιογραφικών δεδομένων για την ίδια συγκέντρωση γλυκερόλης.

Έπειτα, παρατηρείται ότι με την αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης της γλυκερόλης στην παρούσα μελέτη η βακτηριακή κυτταρίνη μειώνεται σταδιακά, καθώς με 40 g/L γλυκερόλης παράγεται 2,5 g/L, με 60 g/L γλυκερόλης παράγεται 1,88 g/L και με 80 & 100 g/L γλυκερόλης δεν υπήρχε παραγωγή. Η μείωση της απόδοσης στις υψηλότερες συγκεντρώσεις γλυκερόλης επιβεβαιώνεται και από δεδομένα της βιβλιογραφίας. Επιπλέον, η υψηλότερη βακτηριακή κυτταρίνη παρατηρείται στη βιβλιογραφία γύρω στα 40-60 g/L γλυκερόλης, γεγονός που συμπίπτει με τα αποτελέσματα της πτυχιακής που έδειξαν την συγκέντρωση 40 g/L ως την αποδοτικότερη στα πειράματα με χρήση γλυκερόλης ως μοναδική πηγή άνθρακα. Τέλος, προκύπτει το συμπέρασμα ότι η αυξημένη συγκέντρωση γλυκερόλης πιθανόν αναστέλλει την παραγωγή κυτταρίνης λόγω αυξημένης ωσμωτικής πίεσης ή προκαλούμενης παρεμβολής στον μεταβολισμό, καθώς και από την βιβλιογραφική ανασκόπηση φαίνεται η μείωση της βακτηριακής κυτταρίνης σε συγκεντρώσεις γλυκερόλης 80 & 100 g/L. Επίσης, ενδέχεται να δυσχεραίνεται η διαλυτότητα του οξυγόνου που είναι σημαντική για αερόβιους οργανισμούς όπως ο *Komagataeibacter sucrofermentans*.

Όσον αφορά την αιθανόλη ως μοναδική πηγή άνθρακα για την παραγωγή άνθρακα παρατηρείται ότι τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης ήταν 0,62 & 0,46 g/L για 1 & 5 g/L αιθανόλης αντίστοιχα. Υπάρχει μεγάλη διαφοροποίηση στην έρευνα των Park et al. (2003) με αρχική συγκέντρωση αιθανόλης 1 g/L, όπου είναι εξαιρετικά υψηλή (2,31 g/L). Αυτό πιθανώς οφείλεται σε χρήση διαφορετικού και πιο αποδοτικού σε αιθανόλη στελέχους, σε βελτιωμένες

συνθήκες αερισμού και pH, που αυξάνουν την κατανάλωση αιθανόλης προς την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης. Συμπερασματικά, οι τιμές που πάρθηκαν από την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης με αιθανόλη σύμφωνα με τη βιβλιογραφία είναι ανταγωνιστικές, δείχνοντας ικανοποιητική μετατροπή της αιθανόλης σε βιομάζα, ειδικά για χαμηλές συγκεντρώσεις.

Σε δεύτερο επίπεδο, έγινε η σύγκριση πάνω στις τιμές του ρυθμού κατανάλωσης της γλυκερόλης της παρούσας μελέτης σε σχέση με βιβλιογραφικές τιμές που έχουν καταγραφεί από ήδη υπάρχουσες έρευνες. Αυτά φαίνονται συγκεντρωτικά στον Πίνακα 14.

Πίνακας 14. Σύγκριση αποτελεσμάτων ρυθμού κατανάλωσης πηγών άνθρακα βιβλιογραφικής ανασκόπησης με αυτά της παρούσας μελέτης .

Πηγή άνθρακα	Συγκέντρωση πηγής άνθρακα (g/L)	Ρυθμός κατανάλωσης πηγών άνθρακα (g/L/μέρα)	Πηγή
Γλυκερόλη	20	0,67	Παρούσα μελέτη
		12,41	Rackov et al. (2025)
		6,7	Hsieh et al. (2016)
		0,192	Lee et al. (2021)
		0,89	Tsouko et al. (2015)
		1,54	Santos et al. (2013)
		0,24	Mangayil et al. (2020)
		1,2	T. Lu et al. (2019)
		0,48	Thorat and Dastager (2018)
		3,36	Volova et al. (2018)
	40	0,79	Παρούσα μελέτη
		1,632	Li et al. (2020)
	60	0,16	Παρούσα μελέτη
		1,194	Yilmaz and Goksungur (2024)
		15,648	Aswini et al. (2020)

Η σύγκριση των πειραματικών αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης με αντίστοιχα δεδομένα της βιβλιογραφίας ανέδειξε ορισμένες αποκλίσεις ως προς τον ρυθμό κατανάλωσης της πηγής

άνθρακα. Οι διαφορές αυτές είναι αναμενόμενες και μπορούν να ερμηνευθούν μέσω πλήθους παραγόντων, οι οποίοι σχετίζονται τόσο με τις πειραματικές συνθήκες όσο και με την κατεύθυνση της κάθε μελέτης.

Καταρχάς, καθοριστικό ρόλο διαδραματίζει η μικροβιακή βιοποικιλότητα, καθώς διαφορετικά στελέχη ακόμη και του ίδιου είδους εμφανίζουν σημαντικές μεταβολικές διαφορές, οι οποίες επηρεάζουν τον ρυθμό κατανάλωσης της πηγής άνθρακα. Επιπλέον, αρκετές βιβλιογραφικές μελέτες κάνουν χρήση γενετικά τροποποιημένων μικροοργανισμών, οι οποίοι έχουν ενισχυμένες βιοσυνθετικές ικανότητες, οδηγώντας σε σημαντικά υψηλότερες αποδόσεις σε σχέση με φυσικά ή περιβαλλοντικά απομονωμένα στελέχη.

Περαιτέρω διαφοροποίηση παρατηρείται εξαιτίας των διαφορετικών θρεπτικών συνθηκών που εφαρμόζονται. Παράγοντες όπως η συγκέντρωση του άνθρακα, η παρουσία αζώτου ή φωσφόρου, η θερμοκρασία, το pH καλλιέργειας, καθώς και η ένταση αερισμού και ανάδευσης, επηρεάζουν δραστικά τόσο τον ρυθμό ανάπτυξης όσο και τη βιοσύνθεση της βακτηριακής κυτταρίνης.

Συνεπώς, η παρατηρούμενη απόκλιση των τιμών στην παρούσα πτυχιακή εργασία έναντι των αναφερόμενων στη βιβλιογραφία δεν υποδηλώνει ποιοτική υστέρηση, αλλά αντανακλά τη φυσιολογική μεταβλητότητα των αποτελεσμάτων σε διαφορετικά ερευνητικά πλαίσια. Τα δεδομένα της παρούσας μελέτης συνιστούν αξιόπιστη εκτίμηση των αποδόσεων υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες καλλιέργειας και συνεισφέρουν σημαντικά στη συνολική κατανόηση των δυνατοτήτων αξιοποίησης της γλυκερόλης ως πηγής άνθρακα.

Τέλος, όσον αφορά τις πειραματικές διεργασίες στις οποίες αξιοποιήθηκε ο συνδυασμός γλυκερόλης με αιθανόλης δεν υπάρχουν προγενέστερες έρευνες για την σύγκριση των αποτελεσμάτων. Ωστόσο, σύμφωνα με τα πειραματικά δεδομένα που προέκυψαν στην παρούσα μελέτη, αποκαλύπτεται ότι η ταυτόχρονη χρήση τους ενισχύει την αποδοτικότητα, προσφέροντας μια οικονομικά και περιβαλλοντικά καινοτόμα λύση.

Συνολικά, τα αποτελέσματα όλων των σειρών πειραμάτων επισημαίνουν τη σημασία της επιλογής της πηγής άνθρακα στη ρύθμιση της βιοσύνθεσης της βακτηριακής κυτταρίνης.

Οι μελλοντικές προοπτικές και η ερευνητική δραστηριότητα που αφορά την αξιοποίηση της ακατέργαστης γλυκερόλης από ποικίλους βιομηχανικούς τομείς ως ανανεώσιμη πηγή άνθρακα προσανατολίζονται στην ανάπτυξη καινοτόμων τεχνολογιών, ικανών να μετατρέψουν τα εν λόγω απόβλητα πολύτιμους πόρους. Μελλοντικές μελέτες θα μπορούσαν να επικεντρωθούν

στη συνδυαστική αξιοποίηση της ακατέργαστης γλυκερόλης με αιθανόλη, δεδομένου ότι η συμβολή της τελευταίας ως συμπληρωματική πηγή άνθρακα και ενέργειας αναδείχθηκε μέσω της αποδοτικότητάς της στην παρούσα διπλωματική εργασία.

6. Βιβλιογραφία

- Adnan, A., Nair, G.R., Lay, M.C., Swan, J.E., & Umar, Roslan. (2015). Glycerol as a cheaper carbon source in bacterial cellulose (BC) production by *Gluconacetobacter xylinus* DSM46604 in batch fermentation system. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 19(5), 1131–1136.
- Ardi, Aroua, M., & Hashim, N. A. (2014). Progress, prospect and challenges in glycerol purification process: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 42, 1164–1173. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.10.091>
- Aswini, K., Gopal, N. O., & Uthandi, S. (2020). Optimized culture conditions for bacterial cellulose production by *Acetobacter senegalensis* MA1. *BMC Biotechnology*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12896-020-00639-6>
- Azeredo, H. M. C., 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. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2019.00007>
- Brugnoli, M., Robotti, F., La China, S., Anguluri, K., Haghighi, H., Botton, S., Ferrari, A., & Gullo, M. (2021). Assessing effectiveness of *Komagataeibacter* strains for producing surface-microstructured cellulose via guided assembly-based biolithography. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98705-2>
- Chibrikov, V., Pieczywek, P. M., & Zdunek, A. (2022). Tailor-Made Biosystems - Bacterial Cellulose-Based Films with Plant Cell Wall Polysaccharides. *Polymer Reviews*, 63(1), 40–66. <https://doi.org/10.1080/15583724.2022.2067869>
- Cielecka, I., Ryngajłło, M., Maniukiewicz, W., & Bielecki, S. (2021). Highly Stretchable Bacterial Cellulose Produced by *Komagataeibacter hansenii* SI1. *Polymers*, 13(24), 4455. <https://doi.org/10.3390/polym13244455>
- Dikshit, P. K., & Kim, B. S. (2020). Bacterial cellulose production from biodiesel-derived crude glycerol, magnetic functionalization, and its application as carrier for lipase immobilization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 153, 902–911. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.047>
- Hsieh, J., Wang, M., Lai, J., & Liu, H. (2016). A novel static cultivation of bacterial cellulose production by intermittent feeding strategy. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 63, 46–51. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2016.03.020>

- Iguchi, M., Yamanaka, S., & Budhiono, A. (2000). Bacterial cellulose—a masterpiece of nature's arts. *Journal of Materials Science*, 35(2), 261–270. <https://doi.org/10.1023/a:1004775229149>
- Jin, Y. H., Lee, T., Kim, J. R., Choi, Y., & 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. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2019.03.017>
- Joseph, A., Umamaheswari, S., & Vassou, M. C. (2024). Bacterial cellulose: A versatile biomaterial for biomedical application. *Carbohydrate Research*, 552, 109350. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2024.109350>
- Kumar, L. R., Yellapu, S. K., Tyagi, R., & Zhang, X. (2019). A review on variation in crude glycerol composition, bio-valorization of crude and purified glycerol as carbon source for lipid production. *Bioresource Technology*, 293, 122155. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122155>
- Lee, S., Abraham, A., Lim, A. C. S., Choi, O., Seo, J. G., & Sang, B. (2021). Characterisation of bacterial nanocellulose and nanostructured carbon produced from crude glycerol by *Komagataeibacter sucrofermentans*. *Bioresource Technology*, 342, 125918. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125918>
- Li, Z., Chen, S., Cao, X., Li, L., Zhu, J., & Yu, H. (2020). Effect of pH Buffer and Carbon Metabolism on the Yield and Mechanical Properties of Bacterial Cellulose Produced by *Komagataeibacter hansenii* ATCC 53582. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(3), 429–438. <https://doi.org/10.4014/jmb.2010.10054>
- Liu, M., Liu, L., Jia, S., Li, S., Zou, Y., & Zhong, C. (2018). Complete genome analysis of *Gluconacetobacter xylinus* CGMCC 2955 for elucidating bacterial cellulose biosynthesis and metabolic regulation. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24559-w>
- Liu, Z., Siddique, F., Wei, Y., Haque, M. A., Na, L., Yang, X., & Lin, C. S. K. (2024). Efficient Production of Bacterial Cellulose Using *Komagataeibacter sucrofermentans* on Sustainable Feedstocks Development. *ChemSusChem*. <https://doi.org/10.1002/cssc.202401578>
- Lu, T., Gao, H., Liao, B., Wu, J., Zhang, W., Huang, J., Liu, M., Huang, J., Chang, Z., Jin, M., Yi, Z., & Jiang, D. (2019). Characterization and optimization of production of bacterial cellulose from strain CGMCC 17276 based on whole-genome analysis. *Carbohydrate Polymers*, 232, 115788. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115788>

- Lu, Z., Zhang, Y., Chi, Y., Xu, N., Yao, W., & Sun, B. (2011). Effects of alcohols on bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* 186. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(10), 2281–2285. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0692-8>
- Mangayil, R., Rissanen, A. J., Pammo, A., Guizelini, D., Losoi, P., Sarlin, E., Tuukkanen, S., & Santala, V. (2020). Characterization of a novel bacterial cellulose producer for the production of eco-friendly piezoelectric-responsive films from a minimal medium containing waste carbon. *Cellulose*, 28(2), 671–689. <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03551-6>
- Mauro, F., Corrado, B., De Gregorio, V., Lagreca, E., Di Natale, C., Vecchione, R., & Netti, P. A. (2024). Exploring the evolution of bacterial cellulose precursors and their potential use as cellulose-based building blocks. *Scientific Reports*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-62462-9>
- Montenegro-Silva, P., Ellis, T., Dourado, F., Gama, M., & Domingues, L. (2024). Enhanced bacterial cellulose production in *Komagataeibacter sucrofermentans*: impact of different PQQ-dependent dehydrogenase knockouts and ethanol supplementation. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s13068-024-02482-9>
- Nanda, A., & Ambekar, S. (2014). Retrosigmoid approach for resection of petroclival meningioma. *Neurosurgical FOCUS*, 36(v1supplement), 1. <https://doi.org/10.3171/2014.v1.focus13440>
- Naritomi, T., Kouda, T., Yano, H., & Yoshinaga, F. (1998). Effect of ethanol on bacterial cellulose production from fructose in continuous culture. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 85(6), 598–603. [https://doi.org/10.1016/s0922-338x\(98\)80012-3](https://doi.org/10.1016/s0922-338x(98)80012-3)
- Pacheco, G., De Mello, C. V., Chiari-Andréo, B. G., Isaac, V. L. B., Ribeiro, S. J. L., Pecoraro, É., & Trovatti, E. (2017). Bacterial cellulose skin masks—Properties and sensory tests. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 17(5), 840–847. <https://doi.org/10.1111/jocd.12441>
- Park, J. K., Jung, J. Y., & Park, Y. H. (2003). Cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* in a medium containing ethanol. *Biotechnology Letters*, 25(24), 2055–2059. <https://doi.org/10.1023/b:bile.0000007065.63682.18>
- Picheth, G. F., Pirich, C. L., Sierakowski, M. R., Woehl, M. A., Sakakibara, C. N., De Souza, C. F., Martin, A. A., Da Silva, R., & De Freitas, R. A. (2017). Bacterial cellulose in biomedical applications: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104, 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.171>

- Podstawka, A. (n.d.). *Komagataeibacter sucrofermentans* | Type strain | DSM 15973, BCC 7227, JCM 9730, LMG 18788, BPR 2001, ATCC 700178, BCRC 80162, CECT 7291, CIP 106078 | BacDiveID:95. © Adam Podstawka. <https://www.bacdiver.dsmz.de/strain/95>
- Rackov, N., Janßen, N., Akkache, A., Drotleff, B., Beyer, B., Scoppola, E., Vrana, N. E., Hengge, R., Bidan, C. M., & Hathroubi, S. (2025). Bacterial cellulose: enhancing productivity and material properties through repeated harvest. *Biofilm*, 100276. <https://doi.org/10.1016/j.biofilm.2025.100276>
- Riseh, R. S., Fathi, F., Vatankhah, M., Hassanisaadi, M., & Kennedy, J. F. (2025). Cellulose Regulation in Plant-Pathogen Interactions: A Review. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 102740. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2025.102740>
- Ryngajłło, M., Jacek, P., Cielecka, I., Kalinowska, H., & Bielecki, S. (2019). Effect of ethanol supplementation on the transcriptional landscape of bionanocellulose producer *Komagataeibacter xylinus* E25. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(16), 6673–6688. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09904-x>
- Salinas, C., Sordelli, A., Martínez, L., Villoldo, G., Bernal, C., Pérez, Cerrutti, P., & Foresti, M. (2021). Production of bacterial cellulose tubes for biomedical applications: Analysis of the effect of fermentation time on selected properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 189, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.08.011>
- Santos, S. M., Carbajo, J. M., & Villar, J. C. (2013). The Effect of Carbon and Nitrogen Sources on Bacterial Cellulose Production and Properties from *Gluconacetobacter sucrofermentans* CECT 7291 Focused on its use in Degraded Paper Restoration. *BioResources*, 8(3). <https://doi.org/10.15376/biores.8.3.3630-3645>
- Tayeb, A., Amini, E., Ghasemi, S., & Tajvidi, M. (2018). Cellulose Nanomaterials—Binding Properties and Applications: A review. *Molecules*, 23(10), 2684. <https://doi.org/10.3390/molecules23102684>
- Thorat, M. N., & Dastager, S. G. (2018). High yield production of cellulose by a *Komagataeibacter rhaeticus* PG2 strain isolated from pomegranate as a new host. *RSC Advances*, 8(52), 29797–29805. <https://doi.org/10.1039/c8ra05295f>
- Tsouko, E., Kourmentza, C., Ladakis, D., Kopsahelis, N., Mandala, I., Papanikolaou, S., Paloukis, F., Alves, V., & Koutinas, A. (2015). Bacterial Cellulose Production from Industrial Waste and by-Product Streams. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(7), 14832–14849. <https://doi.org/10.3390/ijms160714832>

- Volova, T. G., Prudnikova, S. V., Sukovaty, A. G., & Shishatskaya, E. I. (2018). Production and properties of bacterial cellulose by the strain *Komagataeibacter xylinus* B-12068. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(17), 7417–7428. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9198-8>
- Wang, S., Han, Y., Chen, J., Zhang, D., Shi, X., Ye, Y., Chen, D., & Li, M. (2018). Insights into Bacterial Cellulose Biosynthesis from Different Carbon Sources and the Associated Biochemical Transformation Pathways in *Komagataeibacter* sp. W1. *Polymers*, 10(9), 963. <https://doi.org/10.3390/polym10090963>
- Wang, X., & Zhong, J. (2022). Improvement of bacterial cellulose fermentation by metabolic perturbation with mixed carbon sources. *Process Biochemistry*, 122, 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.08.022>
- Xiao, Y., Xiao, G., & Varma, A. (2013). A Universal Procedure for Crude Glycerol Purification from Different Feedstocks in Biodiesel Production: Experimental and Simulation Study. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 52(39), 14291–14296. <https://doi.org/10.1021/ie402003u>
- Ye, J., Li, J., Wang, Q., Wang, X., Wang, S., Wang, H., & Xu, J. (2023). Bacterial cellulose production by a strain of *Komagataeibacter rhaeticus* isolated from residual loquat. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 107(5–6), 1551–1562. <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12407-5>
- Yilmaz, M., & Goksungur, Y. (2024). Optimization of Bacterial Cellulose Production from Waste Figs by *Komagataeibacter xylinus*. *Fermentation*, 10(9), 466. <https://doi.org/10.3390/fermentation10090466>
- Zikmanis, P., Kolesovs, S., Ruklisha, M., & Semjonovs, P. (2021). Production of bacterial cellulose from glycerol: the current state and perspectives. *Bioresources and Bioprocessing*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00468-1>