



**ΤΜΗΜΑ ΟΙΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΠΟΤΩΝ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ & ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ**  
**ΖΥΜΩΣΕΩΝ**

**ΤΙΤΛΟΣ:** Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης από οξικά βακτήρια

**ΣΚΟΠΟΣ:**

Η θεματική ενότητα αυτή αποσκοπεί να καταστήσει το σπουδαστή ικανό να παράγει προϊόντα με τη χρήση οξικών βακτηρίων.

**ΣΤΟΧΟΙ:**

Με την ολοκλήρωση της θεματικής ενότητας ο σπουδαστής θα είναι σε θέση να :

1. κατανοήσει το μεταβολισμό των οξικών βακτηρίων
2. μελετά την κινητική παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης
3. γνωρίζει εναλλακτικούς τρόπους αξιοποίησης οινολογικών αποβλήτων

**ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΘΕΜΑΤΙΚΗΣ ΕΝΟΤΗΤΑΣ**

Στην άσκηση αυτή μελετάται η παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης από στέμφυλα λευκής οινοποίησης. Η βακτηριακή κυτταρίνη είναι ένα προϊόν το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ένα μεγάλο φάσμα εφαρμογών.

Ως πηγή σακχάρων για την δημιουργία σακχαρούχου διαλύματος που χρησιμοποιήσαμε ως υπόστρωμα επιλέξαμε τα στέμφυλα. Τα στέμφυλα είναι υπόλειμμα της οινοποιητικής διαδικασίας και μέχρι σήμερα αξιοποιούνται ως ζωοτροφές, οργανικά λιπάσματα, παραγωγή αλκοόλης και αποστάγματος κ.α.

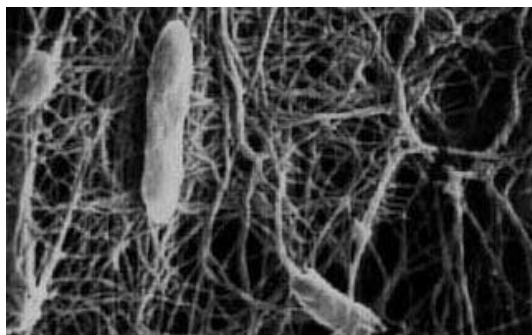
Το βακτήριο που θα χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή ανήκει στο γένος *Acetobacter xylinum*. Η αξιοποίηση των στέμφυλων μπορεί να θεωρηθεί ως ένα σημαντικό οικονομικό αλλά και οικολογικό γεγονός εφόσον εκμεταλλεύεται ένα μέρος από τα απόβλητα ενός οινοποιείου.

Τα στέμφυλα που προέρχονται από την οινοποίηση περιέχουν ένα ποσοστό σακχάρων το οποίο δεν απομακρύνθηκε κατά την πίεση αυτών για την παραλαβή του μούστου. Η συγκέντρωση των σακχάρων αυτών ποικίλει ανάλογα με τον βαθμό πίεσης των σταφυλιών, ο οποίος εξαρτάται από το είδος του τελικού προϊόντος που επιθυμεί να παράγει ο οινολόγος. Τα σάκχαρα που περιέχουν τα στέμφυλα είναι δυνατόν να αξιοποιηθούν αφού εκχυλιστούν.

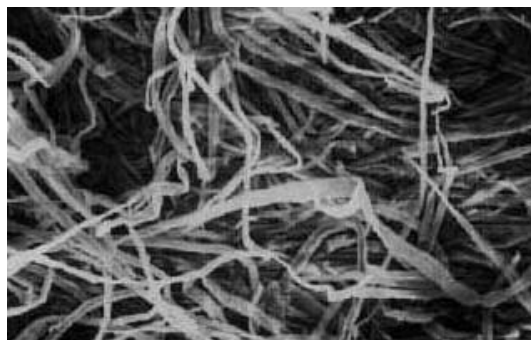
**Περιληπτικές σημειώσεις**

Η κυτταρίνη είναι το βιοπολυμερές που απαντάται πιο συχνά στη γη και πολύ σημαντικό για την παγκόσμια οικονομία. Η κυτταρίνη είναι το μεγαλύτερο συστατικό του βαμβακιού (πάνω από 94%) και του ξύλου (πάνω από 50%). Μαζί το βαμβάκι και το ξύλο είναι οι μεγαλύτεροι πόροι για όλα τα προϊόντα κυτταρίνης όπως χαρτί, υφαντά, υλικά κατασκευής, αλλά και παραγώγων κυτταρίνης όπως σελοφάν, τεχνητή μετάξα και οξικό άλας κυτταρίνης.

Παραδοσιακά η κυτταρίνη συλλέγεται από φυτικούς πόρους. Η βακτηριακή κυτταρίνη έχει το πλεονέκτημα ότι δεν περιέχει λιγνίνη.



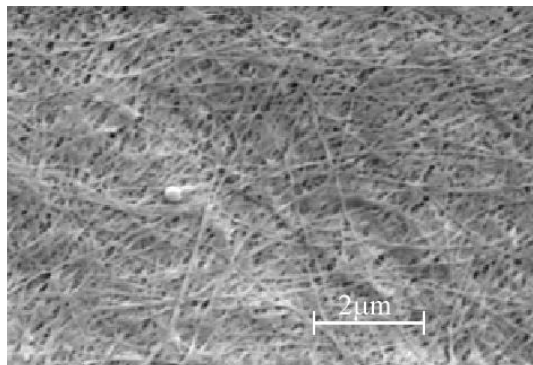
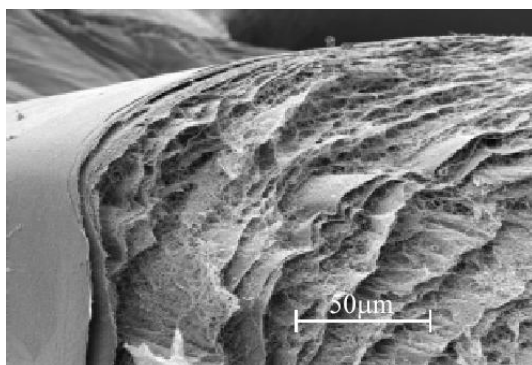
Βακτηριακή κυτταρίνη (x20.000)



Φυτική κυτταρίνη

### Βακτηριακή κυτταρίνη

Η κυτταρίνη (  $\beta$ -1,4-γλυκάνη) είναι ένα από τα πιο άφθονα πολυμερή στη φύση. Βρίσκεται σαν ένα δομημένο συστατικό, συχνά συνδεδεμένο με άλλα πολυμερή (πηκτίνη, λιγνίνη, αραβινάνη, κ.α) στα κυτταρικά τοιχώματα των φυτών, algae και επίσης σε μερικά κατώτερα ζώα (Tunicata) και σε μερικά γένη βακτηρίων όπως τα *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Sarcina*. Μόνο μερικά είδη βακτηρίων, ταξικά είναι συγγενή με το γένος *Acetobacter xylinum* (βακτήρια οξικού οξέος), που εξωκυτταρικά εκκρίνουν την συνθεμένη κυτταρίνη σαν ινίδια.

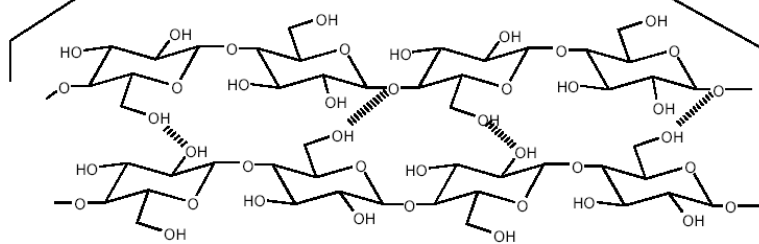
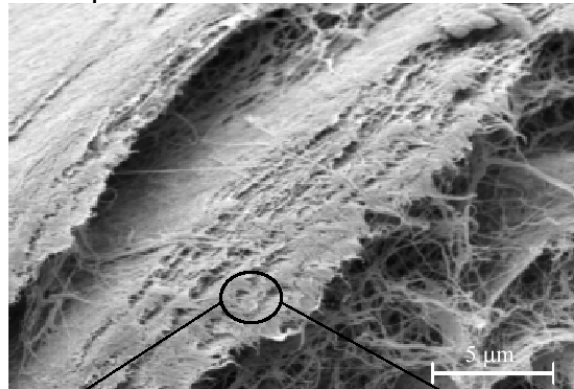


Μικρογραφία βακτηριακής κυτταρίνης

Η φυτική κυτταρίνη χρησιμοποιείται από βιομηχανίες χαρτιού και υφαντών που απαιτούν μια σημαντική βιομάζα ξύλου. Ωστόσο η παραγωγή κυτταρίνης από το *Acetobacter spp* είναι ένας ενδιαφέρων εναλλακτικός τρόπος παραγωγής υλικών που προέρχονται από φυτά, γιατί η βακτηριακή κυτταρίνη έχει μια καθαρή και κρυσταλλική μορφή.

Λόγω της καθαρότητας της και στα ιδιαίτερα φυσικό-χημικά χαρακτηριστικά της, μια ευρεία κλίμακα από ειδικές εφαρμογές της βακτηριακής κυτταρίνης μπορούν να μελετηθούν στα πεδία των τροφίμων και της ιατρικής, ενώ μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για μεγάλη ποσότητα χαρτιού και στον τομέα των υφαντών. Δυστυχώς, η ισχύουσα τιμή της

βακτηριακής κυτταρίνης παραμένει πολύ υψηλή έτσι ώστε να γίνει καταναλωτικά ελκυστική.



Μικρογραφία και χημικός τύπος κυτταρίνης

### Χαρακτηριστικά της βακτηριακής κυτταρίνης

Η μικροβιακή κυτταρίνη απαρτίζεται από μοναδικά χαρακτηριστικά τα οποία την κάνουν να υπερτερεί έναντι άλλων κυτταρινών. Ένα από τα μοναδικά αυτά χαρακτηριστικά της καθαρής κυτταρίνης είναι ότι είναι πολύ ανθεκτική σε ξηρή μορφή. Επίσης άλλο ένα χαρακτηριστικό είναι ότι μπορεί να προσροφήσει 100 φορές το βάρος της σε νερό, άλλα χαρακτηριστικά της βακτηριακής κυτταρίνης είναι τα παρακάτω:

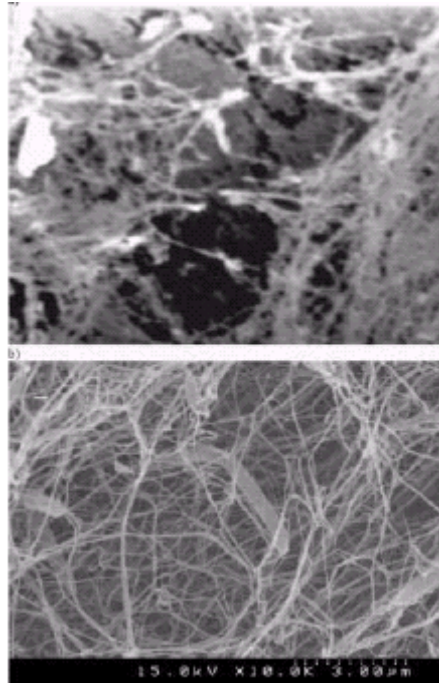
- Παρουσιάζει μεγάλη καθαρότητα
- Είναι το μόνο συνθετικό βιοπολυμερές
- Δεν περιέχει λιγνίνη ή ημικυτταρίνη
- Είναι μια βιοδιασπώμενη και πλήρως ανακυκλώσιμη ύλη
- Διακρίνεται από μεγάλη μηχανική αντοχή
- Έχει μεγάλο βαθμό κρυσταλλικότητας
- Έχει μεγάλη ελαστικότητα
- Έχει μικρό βάρος
- Παρουσιάζει ιδιαίτερη απορροφητικότητα σε υγρή μορφή
- Εμφανίζει αξιοσημείωτη χωρητικότητα στη συγκράτηση νερού
- Έχει υψηλή υγρή αντοχή και επιλεκτικό πορώδες
- Παράγεται σε ιδιαίτερα λεπτές, μικρού μεγέθους και εύκολα ορατές μεμβράνες
- Έχει ικανότητα δημιουργίας δυναμικών ινών και μεμβρανών
- Είναι δυνατή η απευθείας προσαρμογή της ενώ παράγεται
- Μπορεί να ελεγχθεί το μοριακό βάρος και η κρυσταλλικότητα της κατά την παραγωγή της

## **Το βακτήριο *Acetobacter xylinum***

Το βακτήριο *Acetobacter xylinum* ανήκει στα οξικά βακτήρια Αναπτύσσεται συνήθως στο ζύθο, στο γλεύκος, στο ξύδι και σε άλλα υγρά.

Το *Acetobacter xylinum* είναι ένα μη φωτοσυνθετικό, gram αρνητικό, αερόβιο βακτήριο και μοναδικό στον τρόπο σύνθεσης κυτταρίνης. Το *Acetobacter xylinum* μετατρέπει γλυκόζη, φρουκτόζη, γλυκερόλη και άλλα οργανικά συστατικά σε καθαρή κυτταρίνη. Ένα κύτταρο του *Acetobacter* έχει μια γραμμική σειρά πόρων από την οποία το σύνολο των αλυσίδων με πολυμερή γλυκάνια περιστρέφεται, δημιουργώντας μικροϊνίδια. Συμπλέγματα μικροϊνιδίων έχουν ως αποτέλεσμα μια σύνθετη δομή γνωστή ως ταινία (ribbon). Ένας μεγάλος αριθμός ταινιών σχηματίζει σταδιακά μια ζελατινοειδή μεμβράνη, γνωστή και ως δερμάτιο (Brown). Η ταινία αυτή μπορεί να παρατηρηθεί άμεσα με μικροσκόπιο. Η ζελατινοειδής μεμβράνη έχει πάχος μέχρι 1 εκατοστό, και είναι δύσκολα ρηγνυόμενη. Με την πάροδο του χρόνου αναπτυσσόμενη μπορεί να αποκτήσει πάχος μέχρι 30 εκ. Η μεμβράνη αυτή αποτελείται από καθαρή κυτταρίνη και παγιδευμένα σε αυτή κύτταρα.

Το *Acetobacter xylinum* είναι ένα από τα πιο δραστήρια βακτήρια που παράγουν κυτταρίνη στη φύση. Ένα και μόνο κύτταρο του μπορεί να μετατρέψει 108 μόρια γλυκόζης σε κυτταρίνη την ώρα (Brown). Το *Acetobacter* είναι το σύστημα μοντέλο για την μελέτη των ενζύμων και των γονιδίων που σχετίζονται με τη βιοσύνθεση της κυτταρίνης.

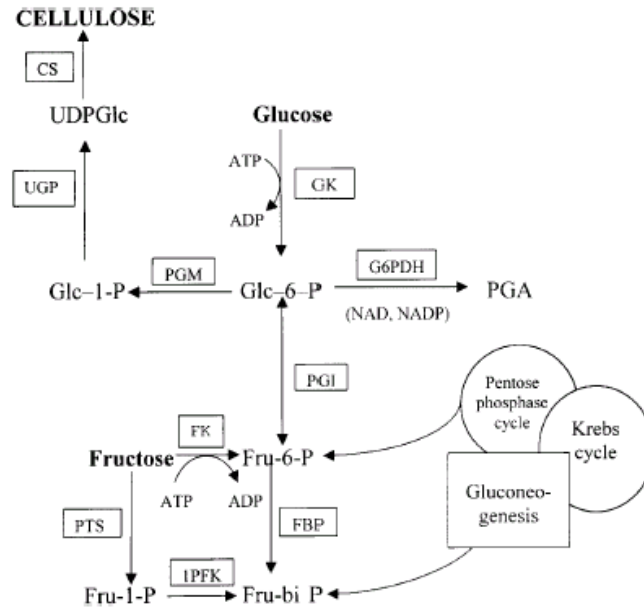


Φωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο βακτηριακής κυτταρίνης και κυττάρου κυτταρίνης

## **Βιοχημεία της σύνθεσης βακτηριακής κυτταρίνης - Μεταβολισμός άνθρακα στο *Acetobacter Xylinum***

Υπάρχουν δυο κύριες μεταβολικές οδοί που είναι σε λειτουργία το βακτήριο *Acetobacter xylinum*:

- A) ο κύκλος φωσφορικής πεντόζης για την οξειδωση των υδρογονανθράκων και
- B) ο κύκλος του Krebs για την οξειδωση των οργανικών οξέων και των συγγενικών σύνθετων.



Μεταβολικές οδοί του άνθρακα στο *A.xylinum*

### Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης

- Στέλεχος του μικροοργανισμού (βακτηρίου)
- πηγή άνθρακα (είδος σακχάρου)
- παρουσία αιθανόλης (σε χαμηλή συγκέντρωση)
- pH
- θερμοκρασία
- πηγή αζώτου
- οξυγόνο

### Εφαρμογές της βακτηριακής κυτταρίνης

Βιομηχανίες τροφίμων

- Nata de coco
- Kombucha
- Άλλες εφαρμογές – διογκωτικό σε τρόφιμα – δεν έχει θερμίδες

Βιομηχανίες υγείας και φροντίδας – Βιομηχανίες καλλυντικών

- Προϊόντα επούλωσης τραυμάτων
- Άλλες εφαρμογές

Προϊόντα χαρτιού

Ακουστικά συστήματα (ηχεία)

Επιπλέον εφαρμογές

- Φίλτρα
- Υλικά ένδυσης

## ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΜΕΡΟΣ

Γίνεται εκχύλιση ποσότητας ομογενοποιημένων λευκών στεμφύλων με προσθήκη απιονισμένου νερού, σε υδατόλουτρο στους 60° C για 30 ώρες. Στη συνέχεια το σακχαρούχο διάλυμα χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα, αφού πρώτα γίνουν οι παρακάτω ανλύσεις:

1. Προσδιορισμός ολικής οξύτητας
2. Προσδιορισμός πτητικής οξύτητας
3. Προσδιορισμός pH
4. Προσδιορισμός αναγωγικών σακχάρων με την μέθοδο DNS
5. Προσδιορισμός αιθανόλης
6. Μέτρηση βάρους κυτταρίνης

Ακολουθεί εμβολιασμός με ποσότητα κυτταρίνης στην οποία έχουν εγκλωβιστεί βακτήρια και η οποία διατηρείται στο εργαστήριο.

Μετά από διάστημα μιας εβδομάδας παρατηρούμε την παραγωγή του φιλμ βακτηριακής κυτταρίνης, όπως στο παρακάτω παράδειγμα.



Παραγωγή βακτηριακής κυτταίνης

Επαναλαμβάνουμε όλες τις αρχικές αναλύσεις και υπολογίζουμε την απόδοση και την παραγωγικότητα σε κυτταρίνη.

Η κυτταρίνη καθαρίζεται, ξηραίνεται και υπολογίζεται το ξηρό της βάρος.

## ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ – ΑΠΑΝΤΗΣΕΙΣ

1. Ποιο βακτήριο χρησιμοποιείται για την παραγωγή κυτταρίνης
  - *Acetobacter xylinum*
2. Ποιοι παράγοντες επηρεάζουν την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης
  - πηγή άνθρακα (είδος σακχάρου)
  - παρουσία αιθανόλης
  - pH
  - θερμοκρασία
  - πηγή αζώτου
  - οξυγόνο

3. Ποιες είναι η εφαρμογές της βακτηριακής κυτταρίνης
- Βιομηχανίες τροφίμων
- Nata de coco
  - Kombucha
  - Άλλες εφαρμογές
- Βιομηχανίες υγείας και φροντίδας – Βιομηχανίες καλλυντικών
- Προϊόντα επούλωσης τραυμάτων
  - Άλλες εφαρμογές
- Προϊόντα χαρτιού
- Ακουστικά συστήματα (ηχεία)
- Επιπλέον εφαρμογές
- Φίλτρα
  - Υλικά ένδυσης
4. Σε ποιο είδος κυτταρίνης περιέχεται και λυγνίνη
- Στη φυτική κυτταρίνη
5. Ποια είναι τα χαρακτηριστικά της βακτηριακής κυτταρίνης
- Παρουσιάζει μεγάλη καθαρότητα
  - Είναι το μόνο συνθετικό βιοπολυμερές
  - Δεν περιέχει λιγνίνη ή ημικυτταρίνη
  - Είναι μια βιοδιασπώμενη και πλήρως ανακυκλώσιμη ύλη
  - Διακρίνεται από μεγάλη μηχανική αντοχή
  - Έχει μεγάλο βαθμό κρυσταλλικότητας
  - Έχει μεγάλη ελαστικότητα
  - Έχει μικρό βάρος
  - Παρουσιάζει ιδιαίτερη απορροφητικότητα σε υγρή μορφή
  - Εμφανίζει αξιοσημείωτη χωρητικότητα στη συγκράτηση νερού
  - Έχει υψηλή υγρή αντοχή και επιλεκτικό πορώδες
  - Παράγεται σε ιδιαίτερα λεπτές, μικρού μεγέθους και εύκολα ορατές μεμβράνες
  - Έχει ικανότητα δημιουργίας δυναμικών ινών και μεμβρανών
  - Είναι δυνατή η απευθείας προσαρμογή της ενώ παράγεται
  - Μπορεί να ελεγχθεί το μοριακό βάρος και η κρυσταλλικότητα της κατά την παραγωγή της

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. MILLER G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 1959, 31, 426-428.
2. Henry R. Bungay, Gonzalo C. Serafica, 2000. "Production of microbial cellulose", patent number US6071727.
3. A.Krystynowicz, W.Czaja, A.Witkorosa-Jezierska, M.Goncalves-Miskiewicz, M.Turkiewicz, S.Bielecki, 2002. "Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose", *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 29, 189-195.
4. R.M.Brown. "Microbial cellulose: a new resource for wood, paper, textiles, food and specialty products", Jr. Department of botany, <http://www.botany.utexas.edu/facstaff/facpages/mbrown/position1.htm>.

5. Rainer Jonas, Luiz F.Farah, 1998. "Production and application of microbial cellulose", Elsevier Science Ltd, Polymer degradation and stability 59, 93-99.
6. R.B. Lo Curto, M.M. Tripodo, 2001. "Yeast production from virgin grape marc", Bioresource Technology,78, 5-9.
7. Chao Y, T Ishida, Y Sugano and M Shoda. 2000. Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* in a 50 L internal – loop airlift reactor. Biotechnol Bioeng 68 (3): 345-352.
8. Sakairi N, H Asano, M Ogawa, N Nishi and S Tokura. 1998. A method for direct harvest of bacterial cellulose filaments during continuous cultivation of *Acetobacter xylinum*. Carbohydr Polym 35: 233-237.
9. S.Bielecki, A.Krystynowicz, M.Turkiewicz, H.Kalinowska. "Bacterial cellulose".
10. H.O'Neill, B.R.Evans, J.Woodward, 2002. "Bacterial cellulose membranes", Merit review and peer evaluation.

#### **ΣΧΕΤΙΚΕΣ ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΕΣ**

<http://www.herbalmedies.com>

[http:// www.gaiasearch.co.2a/kombucha.html](http://www.gaiasearch.co.2a/kombucha.html)

<http://www.kombuchatea.co.uk>

<http://www.pinoysupermart.com>

[http:// www.geosites.com](http://www.geosites.com)

<http://www.rpi.edu>

<http://www.psrc.usm.edu>