The Optimal condition for production of bacterial cellulose from date syrup by *Acetobacter xylinun* SA1

دراسة الظروف المثلى لانتاج السيليلوز البكتيري من عصير التمربأستخدام بكتريا*A. xylinum.* SA1 المعزولة محليا

* سنان محمد جاسم ** الهام اسماعيل الشمري
**أستاذ مساعد/كلية الزراعة/جامعة بغداد
*البحث مستل من رسالة للباحث الاول

المستخلص

درست الظروف المثلى لإنتاج السيليلوز من العزلة *A. xylinum.* SA1 باستخدام عصير التمر وسطا للإنتاج فوجد أن تركيز10% هو الأفضل للسكريات الكلية الموجودة في عصير التمر ، حيث بلغت كمية السيليلوز المنتجة 4.2 غم / لتر ، وأثبتت الدراسة أن أفضل رقم هيدروجيني ابتدائي للوسط هو 6.5 وبإنتاج بلغ 4.5 غم/ لتر ، وأفضل درجة حرارة لإنتاج السيليلوز من البكتريا هي 30 ْم ، وتبين أن استخدام حجم اللقاح 8% أدى إلى أحداث زيادة في كمية السيليلوز المنتجة بلغت 6.4 غم/لتر ، في حين لوحظ أن استخدام حاضنة هزازة بسرعة 150 دورة/الدقيقة تسبب في خفض الإنتاج إلى 3.9 غم/لتر مع مراعاة الظروف المثلى المذكورة أعلاه .

درس تأثير تدعيم وسط الإنتاج الطبيعي ببعض السكريات المتعددة الذائبة والتي اشتملت على كل من كاربوكسي مثيل سيليلوز(CMC) وآلاكار والجينات الصوديوم فوجد أن تدعيم الوسط بالكاربوكسي مثيل سيليلوز بتركيز 0.3% أدى إلى حصول زيادة واضحة في كمية السيليلوز المنتجة بلغت 10.9 غم/لتر ولوحظ أن أعلى إنتاجية للسيليلوز تتحقق في اليوم الرابع عشر من الحضن إذ بلغت كمية الإنتاج 18.4 غم/لتر.

Abstract

In this experiment , the optimal conditions for the production of cellulose from *Acetobacter xylinun* SA1 strain was studied using date syrup as amedia of production . It found that the concentration of 10% was the best for the total polysaccharides which were found in the date syrup. Moreover, the mount of cellulose production was 4.2g/l. Also this study proved that the best pH for cellulose production was 6.5 as the cellulose production 4.5g/l.Furthermore, the best tempreture for the production of cellulose from bacteria was 30 c°. This study also showed that using of 8% of inoculation volume led to an increase in the amount of cellulose production 6.4g/l . In contrast, it was noted that the use of a vibrator at 150rpm/ min decreased the cellulose production 3.9g/l.

Some soluble polysaccharides which included carboxy methyl cellulose (cmc) and agar and sodium algenate were added to the media as a trial of following their impact. It found that the addition of carboxy methyl cellulose at a concentration of 0.3% led to a pronounced increase in the amount of cellulose production 10.9g/l. In addition, it was noted that the highest productivity of cellulose was 18.7g/l at 14 day of the incubation.

المقدمة

تعد بكتريا *Gluconacetobacter xylinum* من أفضل الانواع البكتيرية لانتاج السيليلوز على المستوى التجاري بأستخدام مواد متنوعة في الانتاج، تعد الظروف البيئية من النقاط المهمة المؤثرة في انتاج السيليلوز كما " ونوعا" اضافة إلى التأثير في الصفات المورفولوجية (الشكلية) له (20). وقد درس تأثير العديد منها في انتاج السيليلوز من قبل بكتريا *A. xylinum* ، منها مصدر الكاربون والنتروجين ودرجة الحرارة والرقم الهيدروجيني ومدة الحضن والتهوية وغيرها من الظروف البيئية الاخـــرى (31) .

يختلف السيليلوز المنتج من بكتريا *A . xylinum* عن غيره من أنواع السيليلوز المنتجة من مصادر أخرى ، بالعديد من المزايا المفيدة من الناحية التجارية والتصنيعية والتقنية ، حيث يتميز السيليلوز البكتيري بنقاوته العالية وخلوه من اللكنين والهيميسيليلوز أو أي من السكريات المتعددة الأخرى ، على عكس ما يمر به السيليلوز النباتي من معاملات كيميائية قاسية لإزالة اللكنين والهيميسيليلوز وغيرها من المركبات الأخرى مما يؤثر سلبا على خواصه التركيبية إضافة للمضار البيئية الناجمة عن

استخدام كميات كبيرة من المواد الكيميائية الخطرة في عمليات التنقية ، فضلا عما تكلفه تلك المواد من تكلفه اقتصادية مقارنة بالسيليلوز البكتيري الذي يمر بخطوات بسيطة جدا وغير مكلفة للتخلص من خلايا البكتريا وبقايا الوسط . (;1513 ;33) .

يتميز السيليلوز البكتيريبقابليته العاليةعلى حمل الماء التي قد تصل إلى أكثر من 100 مرة من وزنه مما يجعله مناسبا" لترشيح الغرويات أو الجزيئات التي تتراوح حجومها ما بين الدقيقة(micro)إلى الدقيقة جدا" (ultra)في المحاليل الغروية ، و يتميز بقابلية ترطيب عالية مما فتح الا الأبواب أمام الكثير من التطبيقات الجديدة له (30;11 ;12) كما و يتميزبقوة الشد العالية، والإبعاد الثابتة والمتانة والمرونة والقدرة الجيدة على الاحتفاظ بالشكل(5 ; 20; 27) ، ومن الخواص الأخرى تميزه بدرجة عالية من البلورة إذ يبلغ معامل البلورة أكثر من 60% تقريباً (10 ; 36).وتتميز أغشية السيليلوز البكتيري بأنها رقيقة جدا" وذات ألياف دقيقة جدا"مما يجعلها تمتلك تركيباً مشابهاً لشبكة الكولاجين (9; 23)، إضافة لقدرته العالية على التحلل البيولوجي. (17) .ومن الخواص المهمة الأخرى التي يتميز بها السيليلوز البكتيري في إمكانية التحكم بمسامية الأغشية السيليلوزية الناتجة من خلال التحكم بالظروف المزرعية لعملية الإنتاج باستعمال مصادر كربونية مختلفة أو باستعمال أوساط زرعية اصطناعية تحتوي على مكونات لا عضوية فقط (;5 28).و يتميز السيليلوز البكتيري بالثبات الحراري ولا سيما القاعدي منه إذ يتحمل درجة حرارة تتراوح ما بين 343 م^0 إلى 370 م^0، في حين أن السيليلوز البكتيري الاعتيادي (غير القاعدي) يكون اقل ثباتا" إذ وجد انه يقاوم درجة حرارة 298 م^0 كأعلى درجة حرارة (13; 12). ومن الخواص المهمة هي عدم سمية السيليلوز البكتيريوانه غير مسبب للحساسية (29) ، والشفافية العالية التي يمتاز بها أي لا يحتاج إلى معاملة كيميائية ، ودرجة بلمرة عالية (38; 12) .كذلك من الممكن التغيير من خصائص السيليلوز وذلك بإضافة بعض المواد إلى وسط الإنتاج أو عن طريق التغيير في الظروف البيئية للإنتاج . على سبيل المثال، كإضافة كاربوكسي مثيل سيليلوز (CMC) خلال مرحلة التشكيل وليس بعد الإنتاج والذي سوف يزيد من قدرة السيليلوز على الاحتفاظ بالماء 1000 مرة من وزنه الجاف، وكذلك المحافظة على هيكل السيليلوز وبتكلفة اقل (22). وقد أظهرت العديد من الأبحاث القدرة على إنتاج السليلوز في الشكل المحدد سلفا، انطلاقا من مبدأ تجمع السيليلوز على السطح السائل قريبا من الهواء فإن الواجهة تحدد شكل الغشاء السيليلوزي ، فقد استطاع الباحثان (39) تشكيل قوالب لإنتاج السيليلوز مصنوعة من السليكون نفاذة للأوكسجين مغمورة داخل الوسط الغذائي السائل إذ تتجمع حولها بكتريا *xylinumA.*المنتجة للسيليلوز ، إذ من السهولة القيام بهذا العمل لتحقيق أي شكل مطلوب.

هدف البحث الى دراسة الظروف المثلى لانتاج اكبر كمية ممكنة من السيليلوز بأستخدام عصير التمر وسطا للانتاج من العزلة المحلية*Acetobacter xylinum* .SA1المعزولة من ام الخلفي مختبرلت كلية الزراعة / جامعة بغداد،لما يمتلكه هذا النوع من السيليلوز من خواص كيميائية وفيزيائية وتركيبية فريدة تميزه عن غيره من أنواع السيليلوز الاخرى(8) .

المواد وطرائق العمل

***تعيين الظروف المثلى لإنتاج السيليلوز من عصير التمر**

درس تأثير عدد من العوامل لتحديد الظروف المثلى لإنتاج السيليلوز من العزلة *Acetobacter. xylinum* SA1 باستخدام عصير التمر وسطا للإنتاج تضمنت تركيز المواد السكرية الكلية والرقم الهيدروجيني الابتدائي لوسط الإنتاج ودرجة الحرارة والتهوية وتأثير ومدة الحضن وحجم اللقاح.

1-تحضير عصير التمر(وسط الانتاج الطبيعي)

حضر عصير التمر حسب الطريقة التي اوردها (24), مع إجراء بعض التحويرات الطفيفة إذ وزن 200 غم من التمر ألزهدي منزوع النوى وأضيف إليه 500 مليلتر من الماء المقطر المغلي ووضع في خلاط كهربائي لمدة دقيقة واحدة على السرعة البطيئة وثلاث دقائق على السرعة القصوى ورشح من خلال طبقتين من الشاش، واستعمل العصير بعد تخفيفه إلى التركيز 8 بركس كوسط لإنتاج السيليلوز باستخدام جهاز Abbe-Refractometer ، بعد توزيعه في دوارق سعة 300 مليلتر وبواقع 100 مليلتر في كل دورق وعقم بالمؤصدة حسب الطريقة المذكور سابقا . وأجريت بعض التحليلات الكيميائية لعصير التمر قبل الشروع باستخدامه وبمكررين وهي على النحو الأتي :

***تقدير السكريات الكلية والمختزلة**

قدرت السكريات الكلية والمختزلة في عصير التمر بطريقة لين – أينون وحسب ما ورد في (4).

***تقدير البروتين**

تم تقدير البروتين بطريقة كلدال Kyeldahl حسب ما ورد في (4).

***تقدير الرطوبة**

استخدم الفرن الهوائي عند درجة 105م^0 حتى ثبات الوزن في تقدير الرطوبة حسب الطريقة المذكورة في (4) باستخدام المعادلة الآتية:

نسبة الرطوبة=(وزن الإطباق فارغة + العينة قبل التجفيف)- (وزن الإطباق + العينة بعد التجفيف
———————————————————————— ×100-
وزن العينة

***تقدير الرماد**

قدر الرماد بحرق العينات في جهاز الترميد Muffle Furnace وعلى 550م° حسب الطريقة المذكورة في(4) وباستخدام المعادلة الآتية:

(وزن البوتقة + العينة قبل الاحتراق)- (وزن البوتقة فارغة)
نسبة الرماد% =---×100
وزن العينة

2-تنشيط العزلة البكتيرية

نشطت العزلة المحلية *A. xylinum* SA1 المعزولة من ام الخل في مختبرات كلية الزراعة / جامعة بغداد والمحفوظة بـ Tomato serum medium بالتجميد بعد اضافة الكليسيرول المعقم لها ، على وسط HS – MEDIUM والحضن مدة 24 ساعة بدرجة حرارة30 C° .

3-تحديد التركيز الأمثل لمصدر الكاربون لإنتاج السيليلوز

لتحديد التركيز الأمثل من المواد الكاربوهيدراتية الكلية الموجودة في وسط الإنتاج الطبيعي المتمثل بعصير التمر لإنتاج السيليلوز من العزلة *A. xylinum* SA1 استعملت تراكيز مختلفة تراوحت ما بين 6% إلى 14% بتخفيف عصير التمر بالماء المقطر وبفارق 2%

4-تحديد الرقم الهيدروجيني الابتدائي الامثل لوسط إنتاج السيليلوز

حضر وسط الإنتاج (عصير التمر) بأرقام هيدروجينية مختلفة تراوحت ما بين 4-8 بفارق درجة واحدة من وسط لأخر بأستخدام (0.5،NaOH مولاري و 0.5 HCl مولاري) لتحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل لإنتاج السيليلوز مع الأخذ بنظر الاعتبار التركيز الأمثل لمصدر الكاربون المنتخب من التجربة السابقة .

5-تحديد درجة الحرارة المثلى لإنتاج السيليلوز

حضن وسط الإنتاج الطبيعي الملقح بالبكتريا قيد الدراسة بدرجات حرارية مختلفة تراوحت من 20-40 م^0 بفارق 5 درجات حرارية من وسط لأخر وحضنت مدة 7 أيام لتحديد درجة الحرارة المثلى لإنتاج السيليلوز مع مراعاة الظروف المثلى المتحققة من التجارب السابقة.

6-تحديد حجم اللقاح الامثل لإنتاج السيليلوز

لقح وسط الانتاج الطبيعيبإحجام مختلفة من اللقاح(*A.xylinum* SA1) تراوحت من 2-12 مليلتر وبفارق 2 مليلتر من لقاح لأخر يحتوي المليلتر الواحد منه على 10^6 خلية / مليلتر مع مراعاة الظروف المثلى المتحققة في التجارب السابقة.

7-تأثير التهوية في إنتاج السيليلوز

حضن وسط الإنتاج الطبيعي الملقح بالبكتريا في حاضنة هزازة على سرعة 150 دورة / دقيقة لدراسة تأثير التهوية في إنتاج السيليلوز مع مراعاة الظروف المثلى المتحققة في التجارب السابقة وقورنت النتائج مع الإنتاج في المزرعة الساكنة .

8-تأثير إضافة بعض المركبات الكيميائية في إنتاج السيليلوز

* تأثير إضافة بعض السكريات المتعددة الذائبة في إنتاج السيليلوز
* أضيف كاربوكسي مثيل سيليلوزCMC وبعض السكريات الذائبة والتي شملت الجينات الصوديوم والاكار بتركيز 0.1 % إلى وسط الإنتاج الطبيعي. كلا على انفراد لمعرفة تأثيرها في إنتاج السيليلوز مع مراعاة الظروف المثلى المتحققة في التجارب السابقة.
* تحديد التركيز الأمثل من كاربوكسي مثيل سيليلوز (CMC) في إنتاج السيليلوز

أضيف CMC لوسط الإنتاج الطبيعي . بتراكيز مختلفة تراوحت ما بين (0-1) وبفارق 0.2% من تركيز إلى أخر مع مراعاة الظروف المثلى المتحققة في التجارب السابقة.

* تحديد زمن الحضن الأمثل لإنتاج السيليلوز

حضن وسط الإنتاج الطبيعي الملقح بالعزلة *A. Xylinum* SA1 الأكفأ لإنتاج السيليلوز مدة 20 يوماً مع مراعاة الظروف المحددة في ضوء التجارب السابقة ، قدرت كمية السيليلوز مع متابعة التغيرات الحاصلة في وسط الإنتاج من تركيز السكريات المتبقية والتغيير في الرقم الهيدروجيني للوسط وتقدير الكتلة الحيوية كل 48 ساعة من الحضن ، حيث قدرت كمية السيليلوز ،كما قدر تركيز السكريات المتبقية ، وقيست التغيرات في الرقم الهيدروجيني للوسط باستخدام جهاز pH metter ، وقدر الوزن الجاف للخلايا (4)، واستخرجت كفاءة الإنتاج على النحو الآتي .

$$\text{كفاءة الإنتاج} = \frac{\text{وزن السيليلوز الناتج}}{\text{وزن السكر المستهلك}} \times 100$$

النتائج والمناقشة

1- تعيين الظروف المثلى لإنتاج السيليلوز من بكتريا*SA1 xylinumAcetobacter*

تعد الظروف البيئية واحدة من أهم العوامل المؤثرة في الإنتاج الحيوي . لذلك كان لابد من دراستها للوصول إلى الظروف المثلى من الإنتاج التي تؤمن لنا اكبر كمية من السيليلوز باستعمال وسط الإنتاج المحضر من التمر الزهدي .

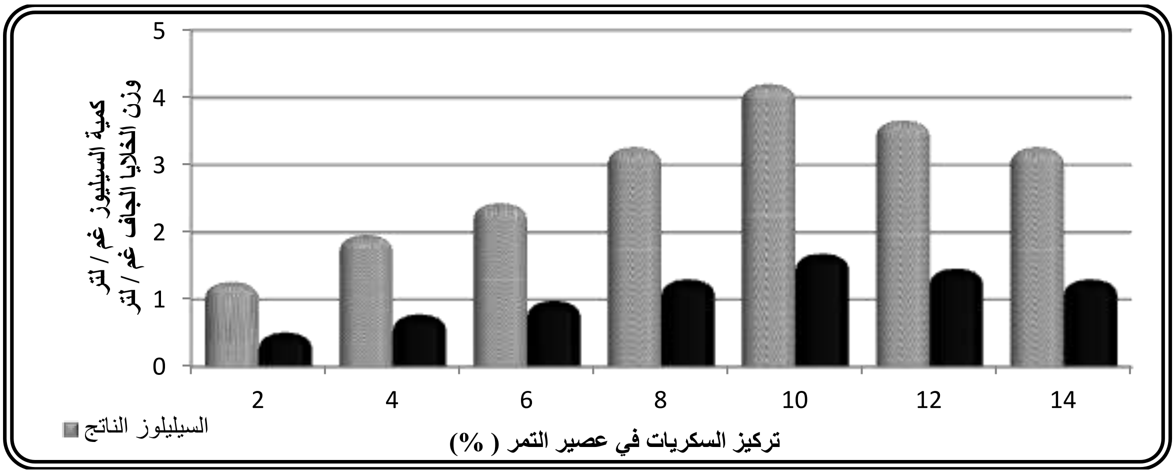
2- تحديد التركيز الأمثل لمصدر الكاربون في عصير التمر

يبين الشكل(1) كمية السيليلوز المنتجة والوزن الجاف لخلايا بكتريا *xylinumAcetobacter* SA1 ، وباستعمال تراكيز مختلفة من السكريات الكلية في عصير التمر تراوحت مابين 2-14 % ، إذ تبين انه بزيادة تركيز السكريات الكلية في وسط الإنتاج تزداد كمية السيليلوز المنتجة وقد بلغت أعلى قيمها 4.2 غم/ لتر عند التركيز 10% . وقد أشار (24)إلى ان عصير التمر مادة غنية بالسكريات الأحادية ويحتوي تقريبا على نسب متساوية من الكلوكوز و الفركتوز الأمر الذي يجعل ايض البكتريا يتجه نحو تخليق السيليلوز لكون الكلوكوز المادة المحفزة لإفراز أنزيم UDPGLc pyrophosphorylase بالإضافة إلى أن وجود الفركتوز الذي يظهر فعالية عالية لإنزيم Phosphoglucoisomerase ، وتمتلك نظام Phosphotransferases المعتمد على Phosphoenolpyruvrate ، إذ يحفز النظام تحول الفركتوز إلى Fructose - 1- phosphate ثم إلى Fructose – 1, 6- biphosphate وبعدها يتحول إلى سكر الكلوكوز .

إضافة إلى احتواء عصير التمر على العديد من الفيتامينات والمعادن التي تساعد في نمو البكتريا والقيام بالفعاليات الايضية لإنتاج السيليلوز حيث تزداد هذه المكونات المهمة بزيادة تركيز عصير التمر (6).

ويوضح الشكل (1) انخفاض في كمية السيليلوز المنتجة عند تراكيز السكريات الأعلى من 10%، إذ انخفضت كمية السيليلوز إلى3.66 غم/ لتر و 3.26 غم/لتر عند التركيز بين 12% و14% على التوالي ، وقد عزا كل مـــن(16; 32)السبب إلى انه زيادة تركيز عصير التمر سبب زيادة في لزوجة الوسط مما اثر سلبا في نشاط البكتريا ، إضافة إلى إن زيادة تركيز الكلوكوز في وسط الإنتاج أدى إلى أكسدة جزء كبير منه إلى حامض الكلوكونك الذي أدى بدوره إلى خفض الرقم الهيدروجيني للوسط مما اثر سلبا على نشاط البكتريا وإنتاج السيليلوز من خلال تأثيره المثبط لفعالية أنزيم UDPGLc pyrophosphorylase المسؤول عن تخليق السيليلوز . ويلاحظ من الشكل(1) تزامن زيادة الوزن الجاف للخلايا مع زيادة كمية السيليلوز المنتجة ، إذ وصل أعلى وزن للخلايا الجافة 1.68 غم /لتر عند التركيز 10% مع ملاحظة انخفاض الوزن الجاف للخلايا بزيادة تركيز السكر وانخفاض كمية السيليلوز المنتجة .

وقد أكدت(1) على التأثير السلبي وعدم ملاءمة التراكيز العالية من السكر في نمو ونشاط اغلب أنواع البكتريا وبالتالي التأثير في مقدار الكتلة الحيوية النامية.

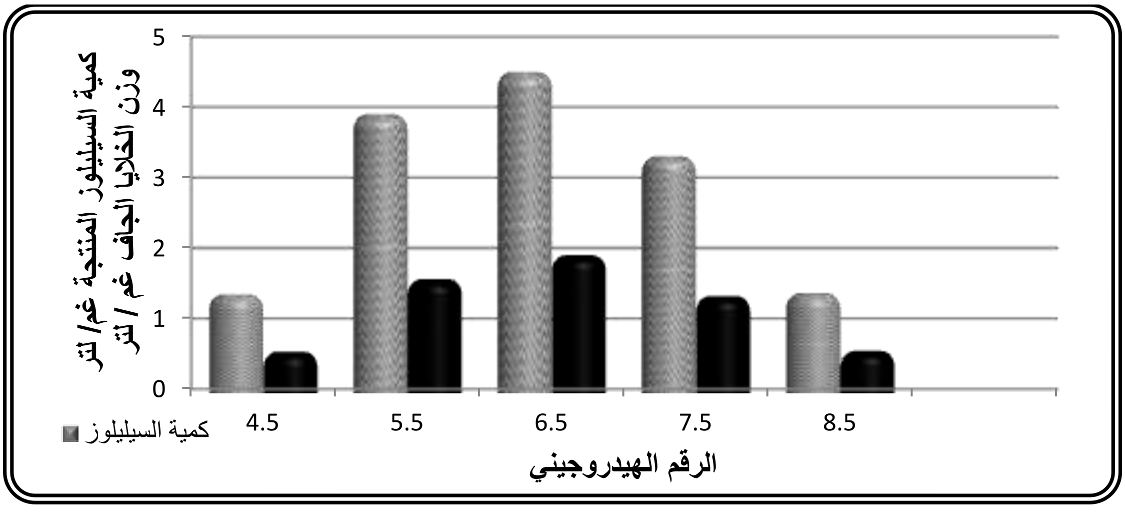


الشكل(1):تأثير تراكيز مختلفة من السكريات الكلية في عصير التمر على إنتاج السيليلوز من العزلة *A.xylinum* SA1ووزن الخلايا الجافة عند الحضن بدرجة حرارة 30مْ ومدة حضن 7 أيام وبرقم هيدروجيني 6 .

3-تحديد الرقم الهيدروجيني الابتدائي الأمثل لوسط إنتاج السيليلوز

يوضح الشكل(2)تأثير استعمال أرقام هيدروجينية مختلفة لوسط الإنتاج في كمية السيليلوز المنتجة، إذ بلغت كميته (1.36, 3.3, 4.5, 3.9, 1.34)غم / لتر للأرقام الهيدروجينية (4.5, 5.5, 6.5, 8.5,7.5) على التوالي. إي إن أعلى كمية للسيليلوز بلغت 4.5غم / لتر عند الرقم الهيدروجيني الابتدائي 6.5، الذي انتخب ليمثل الرقم الهيدروجيني الأمثل لوسط الإنتاج في التجارب اللاحقة وقد ذكر (19) أن البكتريا المنتجة للسيليلوز تمتلك القابلية على إنتاجه في أرقام هيدروجينية تتراوح مابين 4.5 -7.5 مع ملاحظة التفاوت في كمية السيليلوز المنتجة ولقد بينت الشمري ،(2007) أن الأرقام الهيدروجينية المثالية لإنتاج السيليلوز من بكتريا *Acetobacter xylinum* FEA 48 تتراوح مابين 6-7 ومابين 6 -7.5 عند استخدام الفركتوز والكلوكوز كمصادر للكاربون وأعلى إنتاجية كانت عند الأرقام الهيدروجينية 6.5 و 7 على التوالي .وبين كل من (24; 25) أن الرقم الهيدروجيني الابتدائي الأفضل لإنتاج السيليلوز باستخدام عصير التمر هو 6.8. في حين أشار (26) أن الرقم الهيدروجيني المرتفع إلى أكثر من 7.5 والمنخفض إلى اقل من 4.5 يؤدي إلى قلة إنتاج السيليلوز حيث يؤدي إلى النمو البطيء للبكتريا في بداية التخمر مما يؤدي إلى انخفاض معدلات النمو .

بين الشكل(2) وزن الخلايا الجافة للأرقام الهيدروجينية (4.5, 5.5, 6.5, 8.5,7.5) المستعملة وكانت النتائج (0.54, 1.32, 1.9, 1.56, 0.53) غم / لتر على التوالي إذ ازداد وزن الخلايا الجافة بارتفاع الرقم الهيدروجيني وان أعلى عدد خلايا بكتيرية كان عند الرقم الهيدروجيني 6.5 حيث بلغ 1.9 غم / لتر وبدأ بعدها بالانخفاض عند ازدياد قيمة الرقم الهيدروجيني .

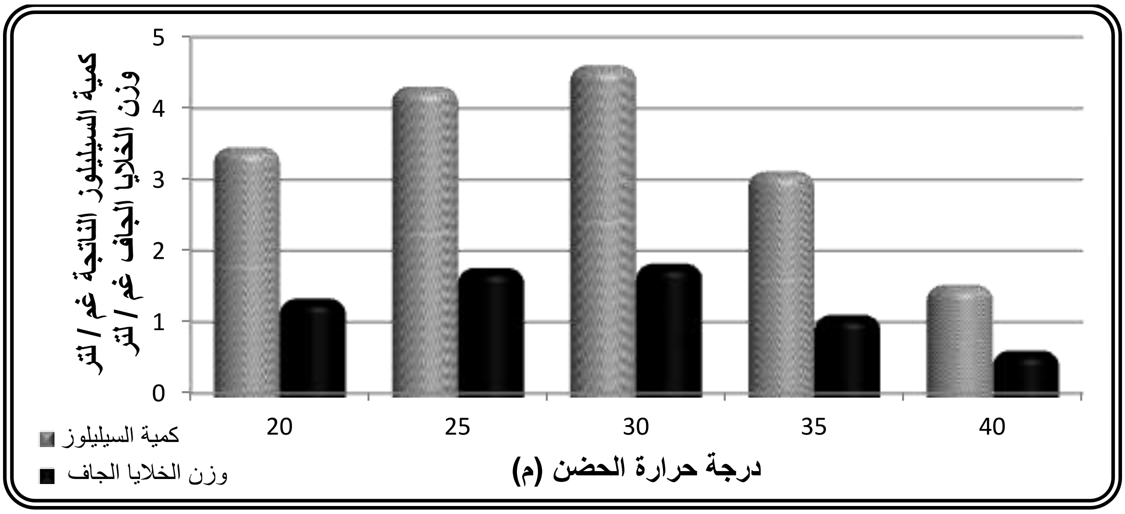


الشكل (2): تأثير الرقم الهيدروجيني الابتدائي لوسط الإنتاج على إنتاج السيليلوز من بكتريا *A.xylinum* SA1 ووزن الخلايا الجافة بدرجة حرارة 30مْ ومدة حضن 7 أيام .

4-تحديد درجة الحرارة المثلى لإنتاج السيليلوز

يوضح الشكل(3)كمية السيليلوز المنتجة من العزلة *A.xylinum* SA1 عند الحضن بدرجات حرارية مختلفة ، إذ بلغت النتائج (3.45, 4.3, 4.6, 3.11, 1.52) غم /لتر عند الدرجات الحرارية (20, 25, 30, 35, 40) مْ على التوالي ، إذ إن أعلى إنتاجية هي 4.6غم /لتر عند 30 مْ وقد اتفقت النتائج مع الكثير من الدراسات حول درجة الحرارة المثلى لإنتـــــــاج السيليلوز (2; 2524;).

وفيما يخص درجات الحرارة المنخفضة فكان إنتاج السيليلوز منخفضا بسبب قلة نمو البكتريا وكذلك عدم توفير الظروف المثلى للقيام بالفعاليات الحيوية لتلك البكتريا ، لذا فان الحصول على إنتاجية جيدة في درجات حرارة منخفضة يتطلب إطالة مدة التخمر وهذا ما أكـــده (8) . مما يتيح فرصة اكبر لحدوث التلوث ، إضافة إلى الخسائر الاقتصادية المترتبة على ذلك ولقد توصل (21)إلى أن إنتاج السيليلوز بدرجة حرارة 37 م^0 كان منخفضا جدا بسبب عدم ملاءمة درجة الحرارة لنمو هذه البكتريا ونشاطها ، أما في درجات الحرارة المرتفعة عن 45 م^0 فما فوق فقدت البكتريا قدرتها على النمو بسبب تأثير الحرارة العالية على مكونات الخلية من الأحماض النووية والبروتين . بينما كان وزن الخلايا الجافة (1.33, 1.76, 1.82, 1.1, 0.6) غم / لتر وعند درجة الحرارة 30 مْ بلغ وزن الخلايا الجافة 1.82 غم / لتر كما موضح (الشكل 3) .

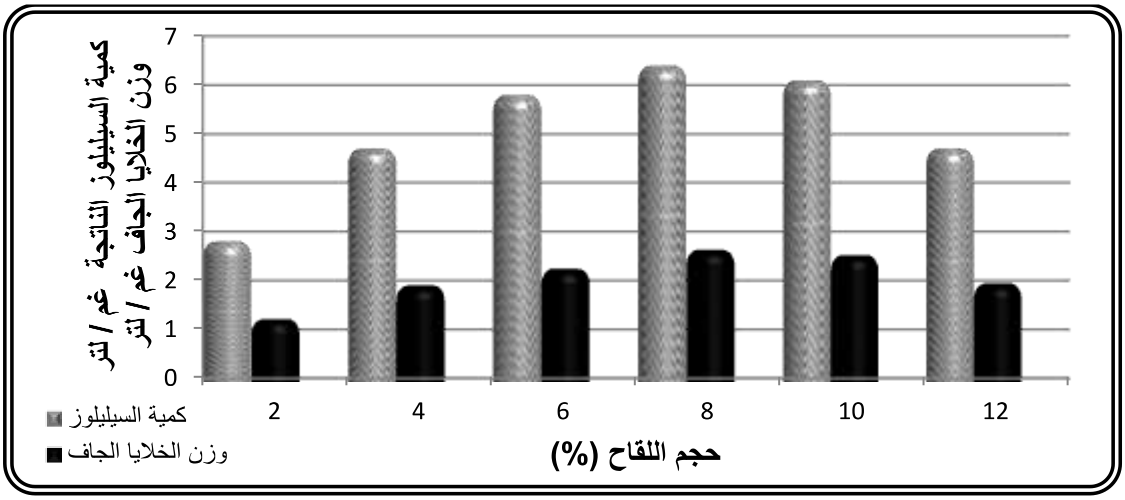


الشكل(3): تأثير درجة حرارة الحضن على إنتاج السيليلوز من بكتريا *A.xylinum* SA1 ووزن الخلايا الجافة باستخدام عصير التمر وسطا للانتاج عند رقم هيدروجيني ابتدائي 6.5 ومدة حضن 7 أيام .

5-تحديد حجم اللقاح الأمثل لإنتاج السيليلوز

يبين الشكل (4)كمية السيليلوز المنتجة باستعمال حجوم لقاح مختلفة من بكتريا *A.xylinum* SA1 ، وبلغت كمية السيليلوز المنتجة (4.7,6.1, 6.4, 5.8, 4.7, 2.8)غم / لتر لحجوم اللقاح (2, 4, 6, 8, 12,10) % على التوالي ،أي أن أعلى كمية للسيليلوز كانت 6.4غم /لتر عند استعمال حجم اللقاح 8% ، والذي كان 5% عند الشروع بهذه الدراسة ، وبلغ عدد الخلايا البكتيرية الحية فيه 10^6 خلية / مل ، وهذا يتفق مع ما توصل إليه (37) عند استخدامه للوسط القياسي HS-medium في إنتاج السيليلوز من بكتريا *Acetobacter xylinum* . وقد توصلت (2) إلى حجم اللقاح الأمثل والبالغ 9%، بحيث يحتوي المل الواحد على 10^6 خلية / مل، والذي أعطى كمية سيليلوز (8.34 و 6.38) غم/لتر بعد أن كانت كميته (6.96 و 4.69) غم / لتر بحجم اللقاح 5% باستخدام الفركتوز والكلوكوز بتركيزي 4% و 3% على التوالي.

أما وزن الخلايا الجافة فكانت النتائج (1.21 ,1.9 ,2.24 ,2.63, 2.52 ,1.94)غم / لتر إذ ظهر أن وزن الخلايا الجافة عند حجم اللقاح 8% أكثر من تلك عند استعمال 10 % و12% على الرغم من زيادة حجم اللقاح ، وهو نفسه حجم اللقاح الذي أعطى أعلى إنتاجية للسيليلوز ويعزى ذلك إلى احتمال حدوث تنافس على العناصر الغذائية وبالتالي عرقلة نمو بعض خلايا البكتريا لكثرة عددها، إذ يجب أن يكون هناك تناسب بين حجم اللقاح وحجم الوسط الزرعي، وكذلك في حالة استعمال أحجام كبيرة من اللقاح مثل 12% فان الكثافة العالية للبكتريا في اللقاح أدت إلى انخفاض الرقم الهيدروجيني بشكل سريع بسبب إنتاج الحامض بفعل ايض البكتريا رافقه انخفاض في كمية السيليلوز المنتجة وفي وزن الخلايا الجاف. وقد أشارت الخفاجي ،(1990) إلى أن لحجم اللقاح المضاف أهمية كبيرة ، وان كان معدا" بشكل جيد جدا" فليس من المفضل البدء بكمية صغيرة من اللقاح حيث انه يؤدي إلى تغير العملية التصنيعية أو احتمال توقفها نتيجة لتحلل الخلايا القليلة المضافة، ومن جهة أخرى فان حجم وسط الإنتاج ونوع الإحياء المستعملة يحددان كمية اللقاح الواجب إضافتها.



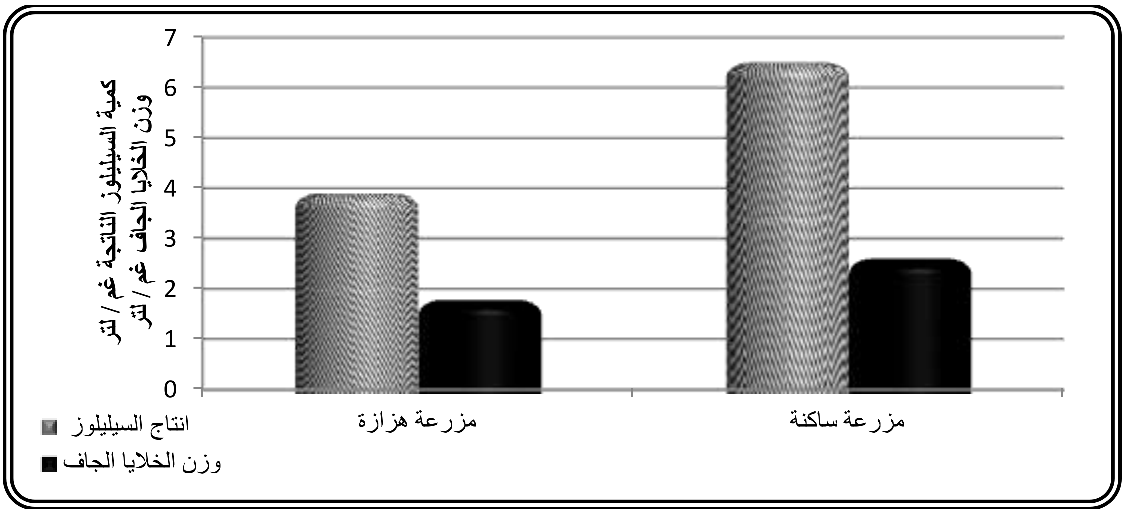
الشكل(4) : تأثير حجم اللقاح على إنتاج السيليلوز من بكتريا *A.xylinum* SA1 ووزن الخلايا الجافة باستخدام عصير التمر وسطا للإنتاج برقم هيدروجيني ابتدائي 6.5 والحضن بدرجة حرارة 30 م^0 لمدة 7 أيام .

6-تأثير التهوية في إنتاج السيليلوز

أجريت هذه التجربة مع مراعاة الظروف المثلى السابقة ، يبين الشكل(5) تأثير التهوية في إنتاج السيليلوز من العزلة *A.xylinum* SA1 إذ أظهرت النتائج انخفاضا واضحا في كمية السيليلوز المنتجة في المزارع الهزازة والبالغة 3.9غم/لتر مقارنة مع كمية السيليلوز المنتجة في المزارع الساكنة والبالغة 6.5 غم / لتر. مما يشير إلى التأثير السلبي للتهوية في إنتاج السيليلوز من العزلة المستحصل عليها في هذه الدراسة ، وقد عزا (35) السبب إلى أن مستوى الأوكسجين المذاب في الوسط عالٍ جدا مما أدى إلى زيادة محتوى حامض الكلوكونيك في الوسط نتيجة سرعة أكسدة الكلوكوز، والذي أدى إلى خفض الرقم الهيدروجيني وصولا إلى الرقم الهيدروجيني غير الملائم لإنتاج السيليلوز .

وهذا أيضا ما أكده(18) إذ أشار إلى التأثير السلبي للتهوية على إنتاج السيليلوز من بكتريا *Acetobacter xylinum* من خلال خفض الرقم الهيدروجيني لوسط الإنتاج بسبب زيادة معدل نمو البكتريا الناتج من مزج مكونات الوسط في أثناء التهوية ، كما وأكد أفضلية إنتاج السيليلوز من الوسط الحاوي على 10 % أوكسجين من ذلك الحاوي على نسبة 25% أوكسجين ، إذ تزيد الإنتاجية في الأول بمقدار 20% عن الإنتاجية في الثاني . واتفقت هذه النتيجة مع الشمري، (2007) التي عزت السبب لقلة إنتاج السيليلوز في المزارع المتحركة (الهزازة) إلى توليد الطفرات السالبة لإنتاج السيليلوز $^{-1}$ cel في المزارع المتحركة أو ذات التهوية.

أما الوزن الجاف للخلايا فقد بلغ (1.78 , 2.6) غم / لتر في المزارع الهزازة والساكنة على التوالي (الشكل 5)، ويمكن الاستنتاج من النتائج المبينة على أن وجود التهوية دفع البكتريا نحو مسار النمو السريع في وقت قصير وإنتاج الحامض وسرعة أكسدة الكلوكوز إلى حامض الكلوكونيك مؤديا إلى خفض الرقم الهيدروجيني وبالتالي خفض كمية السيليلوز المنتج . هناك القليل من الدراسات التي حصلت على عزلات من بكتريا *Acetobacter* لها القدرة على إنتاج السيليلوز في المزارع الهزازة بكميات اكبر مقارنة بالمزارع الساكنة ومن هذه الدراسات قام بها (34) والتي حصلوا فيها على العزلة *Acetobacter xylinum* sub sp.*Sucrofermentanse* BPR 2001 ذات الإنتاجية العالية للسيليلوز في المزارع الهزازة .



الشكل (5): تأثير التهوية على إنتاج السيليلوز من بكتريا *A.xylinum* SA1 ووزن الخلايا الجافة باستخدام عصير التمر وسطا للإنتاج برقم هيدروجيني ابتدائي 6.5 والحضن بدرجة حرارة 30 م^{0} لمدة 7 أيام .

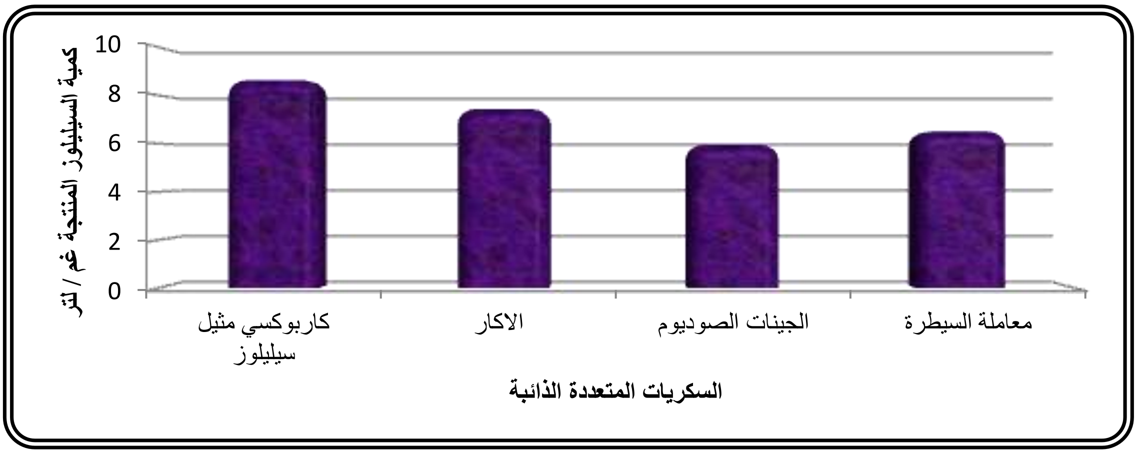
7-تأثير إضافة بعض السكريات المتعددة الذائبة في إنتاج السيليلوز

درس تأثير إضافة بعض أنواع السكريات المتعددة الذائبة إلى وسط الإنتاج الطبيعي التي اشتملت على كل من كاربوكسي مثيل سيليلوز(CMC) والاكار(Agar) والجينات الصوديوم (NaAlg) وبتركيز 0.1%لكل واحد منهم على انفراد في إنتاج السيليلوز من العزلة المحلية *A.xylinum* SA1 ، إذ أظهرت النتائج الموضحة في الشكل (6) إن إضافة كاربوكسي مثيل سيليلوز(CMC) و الاكار(Agar) إلى وسط الإنتاج الطبيعي قد أحدث زيادة في إنتاج السيليلوز، بلغت أقصاها بوجود الكاربوكسي مثيل سيليلوز (CMC) في الوسط ثم بوجـــود الاكار(Agar) ، إذ بلغت كـــمية السيليلوز المنتجة 8.64 غم/لتر و 7.44 غم/لتر علـــى التوالي ، أما عند إضافة الجينات الصوديوم (NaAlg) فقد أدى ذلك إلى خفض كمية السيليلوز المنتجة والبالغة 5.95 غم /لتر عند المقارنة بالوسط الخالي من إضافته والبالغة 6.5 غم/لتر، باستعمال وسط الإنتاج الطبيعي مع مراعاة الظروف المثلى المتحققة من النتائج السابقة .

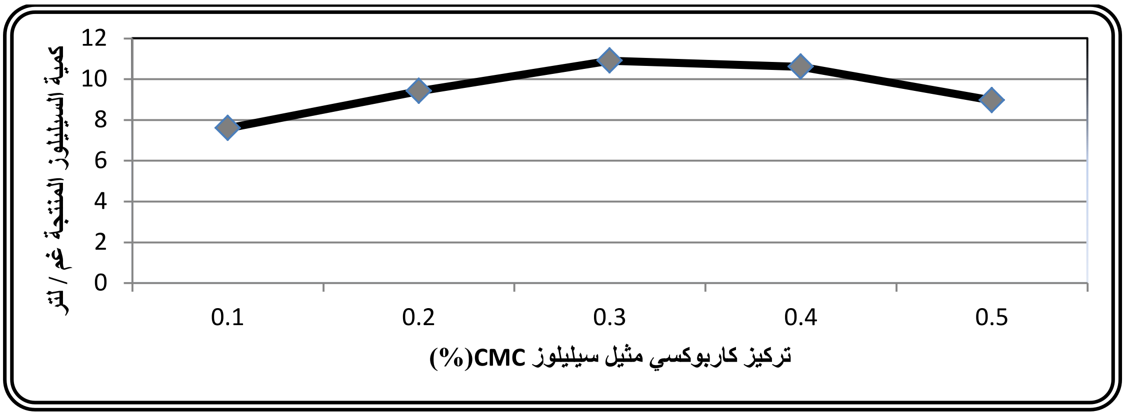
وقد أعزا (7) السبب إلى استهلاك تلك المواد من بكتريا *Acetobacter xylinum* في إنتاج الطاقة اللازمة لنمو السيليلوز وبنائه بدلا من استهلاك الكلوكوز في إنتاج الطاقة واستغلاله من البكتريا في إنتاج السيليلوز . في حين أشار (7) إلى أن إضافة الاكار إلى حد معين يحدث زيادة في أعداد الخلايا مقارنة بالوسط غير الحاوي على اكار وقد فسر ذلك بان وجود الاكار يمنع من تكتل السيليلوز مما يعطي حرية أكثر للخلايا في النمو والتكاثر ، وأوضح أن إضافة الاكار لا تؤثر على المسارات الايضية للبكتريا وإنما للاكار تأثير فزيوكيميائي على الوسط المضاف إليه .

ويوضح الشكل (6) التأثير السلبي لإضافة الجينات الصوديوم (NaAlg) في كمية السيليلوز المنتجة من العزلة *A.xylinum* SA1، وهذا ما أكده (22) عند إضافة الجينات الصوديوم بنسبة 0.2% إلى وسط HS- medium إذ بلغ الإنتاج 0.8 غم / لتر بعد أن كان 1.3 غم/لتر في الوسط الخالي منه ، بينما وجدت (3) أن إضافة الجينات الصوديوم بنسبة 0.2% إلى وسط الإنتاج الطبيعي الحاوي على المولاس لم يؤثر على الإنتاج بشكل ملحوظ . وعلى هذا الأساس وللوقوف على أفضل نسبة من كاربوكسي مثيل سيليلوز(CMC) أجريت دراسة باستخدام مستويات مختلفة تراوحت من (0.1 - 0.5 %) وبفارق 0.1 % لهذه المادة حيث أوضحت نتائج الدراسة في الشكل (7) أن أعلى إنتاجية للسيليلوز كانت بإضافة كاربوكسي مثيل سيليلوز(CMC) بتركيز 0.3% حيث بلغت كمية السيليلوز المنتجة 10.9 غم / لتر. مع مراعاة الظروف المثلى المتحققة من النتائج السابقة .

في حين أشار (22) إلى زيادة إنتاجية السيليلوز بإضافة كاربوكسي مثيل سيليلوز(CMC) بتركيز 0.5% إلى 8.2 غم/لتر ، في المزارع الهزازة مقارنة مع الإنتاجية البالغة 1.3 غم/ لتر في الوسط الخالي منها. وأكدت (3) على زيادة إنتاج السيليلوزمن بكتريا *A.xylinum* AJ3 عند إضافة 0.2% كاربوكسي مثيل سيليلوز(CMC) إلى المولاس كوسط للإنتاج ، حيث بلغ الإنتاج 3 غم / لتر مقارنة بالوسط الخالي من الإضافة والبالغ 1.58 غم/ لتر. وأشار الباحثون أنفسهم إلى أن زيادة تركيز كاربوكسي مثيل سيليلوز(CMC)عن 0.5% في وسط الإنتاج يؤدي إلى تثبيط نمو بكتريا *Acetobacter xylinum* وذلك لزيادة لزوجة الوسط .



الشكل (6) تأثير إضافة بعض انواع السكريات المتعددة الذائبة على إنتاج السيليلوز من بكتريا *A.xylinum* SA1باستخدام عصير التمر وسطا للإنتاج وبتركيز 10% برقم هيدروجيني ابتدائي 6.5 والحضن بدرجة حرارة 30 م^{0} لمدة 7 أيام .



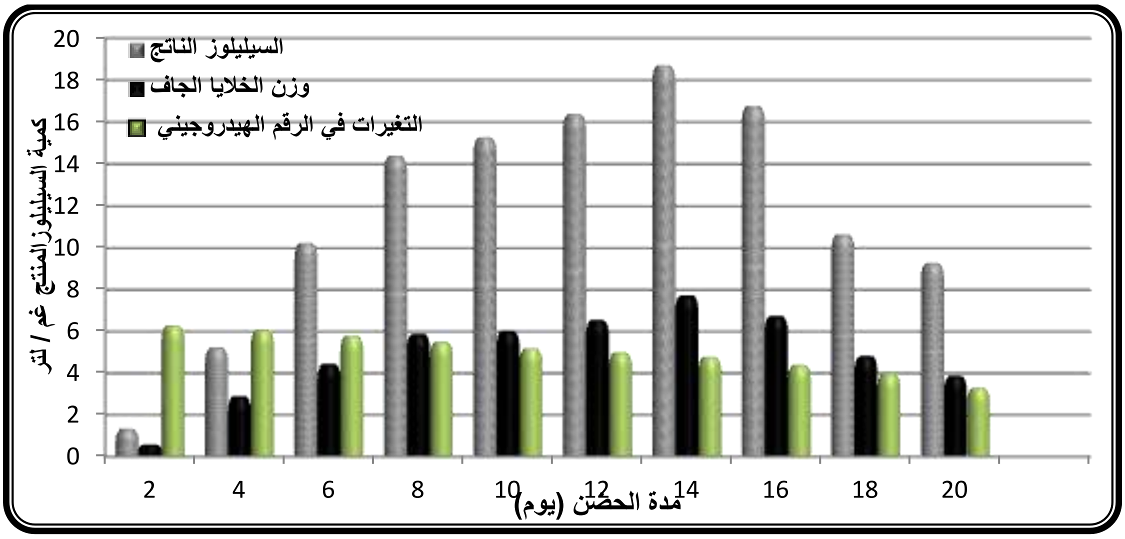
الشكل (7): تأثير التراكيز المختلفة من كاربوكسي مثيل سيليلوز(CMC) في إنتاج السيليلوز من البكتريا *A.xylinum* SA1 باستعمال عصير التمر وسطا طبيعيا للإنتاج وبتركيز 10% وبدرجة حرارة 30 م^0 ورقم هيدروجيني ابتدائي 6.5 ولمدة 7 أيام .

8-تحديد زمن الحضن الأمثل لإنتاج السيليلوز

درست التغيرات الحاصلة في كمية السيليلوز المنتجة والوزن الجاف للخلايا والتغير في الرقم الهيدروجيني وتحديد كفاءة الإنتاج للعزلة *A.xylinum* SA1 خلال مدة الحضن التي استمرت 20 يوماً في عصير التمر المستخدم وسطاً طبيعياً للإنتاج ، أخذت القراءات لهذه المتغيرات كل 48 ساعة لحين انتهاء مدة الحضن مع مراعاة الظروف المثلى الأخرى المحددة من التجارب السابقة . يوضح الشكل (8) التزايد المستمر في كمية السيليلوز المنتجة والوزن الجاف للخلايا مع تزايد مدة الحضن وبلغ أقصاها 18.7 غم/لتر بعد 14 يوماً من الحضن ، وبعد ذلك بدأت كمية السيليلوز المنتجة والوزن الجاف للخلايا بالانخفاض إلى نهاية مدة الحضن إذ بلغت كمية السيليلوز المنتجة من بكتريا *A.xylinum* SA1 خلال مدة الحضـــن المدروسة (5.24, 10.24, 14.4, 15.28 , 16.4,1.35, 18.7, 16.78, 10.66, 9.29)غم / لتر على التوالي، تتفق النتائج المستحصل عليها في هذه التجربة مع ما توصل إليـــه (25) عند استبداله للكلوكوز بعصير التمر بتركيز 10 بركس كمصدر وحيد للكربون في وسط الإنتاج القياسي للسيليلوز HS- medium المعروف. وقد يعلل الانخفاض الحاصل في كمية السيليلوز المنتجة بعد 14 يوماً من الحضن إلى احتمالية امتلاك البكتريا لفعالية ضعيفة على تحليل السيليلوز في المراحل المتأخرة من الحضن واستخدامه مصدراً للكاربون بعد استهلاك السكريات الموجودة في الوسط ، وأوضح (12) أن طول مدة التخمر تودي إلى انخفاض الرقم الهيدروجيني وبالتالي توقف نمو البكتريا وإنهاء عملية إنتاج السيليلوز. ويلاحظ أن هنالك توافقاً زمنياً بين الزيادة في كمية السيليلوز المنتجة وزيادة أعداد الخلايا ، إذ بلغ الوزن الجاف للخلايا خلال مدة الحضن 2.91 , 4.46 , 5.89 , 6.03 , 6.56 , 7.74 ,6.75 ,4.83 ,3.88 (0.58,) غم / لتروأعلى وزن تم الحصول عليه 7.74 غم / لتر بعد 14 يوماً من الحضن كما مبين في(الشكل 8).

ولقد كانت نتائج التغيرات الحاصلة في الرقم الهيدروجيني طوال مدة الحضن هي 5.8 ,5.5 ,5.2 , 5 , 4.8 ,4.4 , 4 , 3.3 (6.1,6.3,) على التوالي خلال العشرين يوماً من الحضن حيث يعزا هذا الانخفاض في الرقم الهيدروجيني إلى نشاط البكتريا وتكوين المنتجات الايضية وأكسدة الكلوكوز إلى حامض الكلوكونك والذي يؤدي إلى قلة نشاط البكتريا وبالتالي قلة إنتاجها للسيليلوز هذا ما أكده (14).

ولوحظ أن كمية السكريات الكلية المستهلكة بعد 14 يوماً من مدة الحضن بلغت 53.3 غم / لتر بعد أن كانت 62.50 غم / لتر قبل الشروع بالحضن مما يعني أن كفاءة الإنتاج قد بلغت 35% أي إن البكتريا تستهلك 84.8% من مصدر الكاربون المتوفر في الوسط للإنتاج السيليلوز والطاقة للقيام بالفعاليات الحيوية .وفي اليوم العشرين بلغت كمية السكريات المستهلكة 60.5 غم / لتر وبكفاءة إنتاج بلغت 17.4% بسبب أكسدة الكلوكوز إلى حامض الكلوكونك .



الشكل (8) : التغيرات الحاصلة في وسط إنتاج السيليلوز (كمية السيليلوز المنتج ، الوزن الجاف للخلايا ، التغييرات في الرقم الهيدروجيني) باستخدام بكتريا *A.xylinum* SA1 والحضن بدرجة حرارة 30 م^0 وبرقم هيدروجيني 6.5 .

التوصيات:

1- استخدام تقنيات التطفير الوراثي والهندسة الوراثية لغرض تطوير العزلات التي تم انتخابها وخاصة العزلة *Acetobacter xylinum* SA1 لإبدائها كفاءة جيدة في إنتاج السيليلوز لغرض زيادة الإنتاج .
2- إنتاج السيليلوز من بكتريا *Acetobacter xylinum* باستعمال بدائل محلية أخرى.
3- دراسة حول إدخال السيليلوز المنتج في الصناعات الغذائية والطبية والصيدلانية
4- إجراء دراسات حول تأثير بعض العوامل التي لم تسنح الفرصة لدراستها كتدعيم وسط الإنتاج بمصدر نتروجيني طبيعي كشراب الذرة CSL .
5- دراسة إمكانية تطبيق هذه التقنية على النطاق التجاري بعد ثبوت نجاحها على النطاق المختبري .

المصادر

1- الخفاجي ، زهرة محمود.(1990).التقنية الحيوية.مطابع دار الحكمة للطباعة والنشر ، جامعة بغداد.

2- الشمري ، الهام إسماعيل ،(2007). إنتاج السيليلوز البكتيري من العزلة المحلية *Acetobacter xylinum* FEA48 ودراسة بعض خواصه واستخداماته في الصناعات الغذائية . أطروحة دكتوراه – كلية الزراعة. جامعة بغداد.

3- الشمري ، الهام إسماعيل ،(2011). إنتاج السيليلوز من المولاس باستخدام بكترياAcetobacter xylinum AJ3 . مجلة الزراعة العراقية (البحثية). مجلد 16عدد 1 ص 138-146 .

4- A.O.A.C. (2008) . Official Methods of Analysis 16th ed. Association of Official Analytical Chemists International Arligton, Virginia,U.S.A.

5- Aase Bodin .(2007) . Sebastian concaro, mats brittberg, paul gatenholm, bacterial cellulose as a potential meniscus implant, Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, Volume 1 Issue 5, Pages 406 – 408.

6- Al-Saidy, M.A.; Al-Dujaili, K.A. and Majced, A.M. (1982) . Evalution of data syrup (dibs) as a substitute for table sugar in bread making .J . of Biological Research Center , Baghdad , 13 (1): 93-107.

7- Bae, S.; Sugano, Y.; and shoda, J. (2004) . Improvement of bacterial cellulose production by addition of agar in ajar fermentor., J. Biosci. Bioeng., 97: 33-38.

8- Barbara, S. S.; Sebastian, P. and Dariusz, D. (2008). Characteristics of Bacterial Cellulose Obtained from *Acetobacter Xylinum* Culture for Application in Papermaking, fibres & textiles in Eastern Europe, Vol. 16, No. 4 (69) pp. 108-111.

9- Bielecki, S.; Krystynowicz , A .; Turkiewicz , M. and Kalinowska , H. (2005) . "Bacterial Cellulose" In Polysaccharides and polyamides in the food industry Production and patents ., edited by Al-Exdnder Steinb Jchel , Sany Ki Rhee .culture. Cellulose., 5: 187-200.

10- Brigid, A.; Mckenna, D.; Mikkelsen, J.; Bernhard, W.; Michael, J.; Gidley, N. and Menzies, W. (2009) . Mechanical and structural properties of native and alkalitreated bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter xylinum* strain ATCC 53524, Cellulose.,16:1047–1055.

11- Brown, Jr. R. M. (1991). Advances in Cellulose Biosynthesis. Ed. Chum, H. L., Polymers from Biobased Materials. New Jersey. Doyes Data Corp.

12- Chawla, P. R.; Ishwar, B. B.; Shrikant A. S. and Rekha, S. S. (2009). Fermentative Production of Microbial Cellulose, Food Technol. Biotechnol. 47 (2) 107–124.

13- George, K,V. Ramana, S.N. Sabapathy, A.S. Bawa. (2005) . Physico- mechanical properties of chemically treated bacterial (Acetobacter xylinum) cellulose membrane, World J. Microbiol. Biotechnol. 21: 1323–1327.

14- Goh, W.N.; Rosma, A.; Kaur, B.; Fazilah, A.; Karim, A.A. and Rajeev, B. (2012). Fermentation of black tea broth (Kombucha): I. Effects of sucrose concentration and fermentation time on the yield of microbial cellulose. International Food Research Journal 19(1): 109-117.

15- Hutchens, S. (2004). Synthesis and initial characterization of Calcuim. Deficient Hydroxyaptit-bacterial Cellulose coposite.M.Sc Athesis- The University of Tennessee, Knoxville.

16- Ishihara, M.; Matsunaga, M.; Hayashi, N. and Tisler, V. (2002). Utilization of Dxylose as carbon source for production of bacterial cellulose., Enzyme Microb. Technol. 31: 986-991.

17- Jia Yuan-Yuan, Tang Wei-Hua, Li Fei, Jia Shi-Ru . (2007) . Performance Improvement for Biomedical Material-Bacterial Cellulose, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin, P.R. China.

18- Jonas, R. and Farah L .F. (1997) . Production and Application of Microbial Cellulose., Journal of Polymer Degradation and Stability., 59,: 101-106.

19-Keshk, S. and Sameshima, K. (2005). Evaluation of different carbon sources for bacterial cellulose production., Afr. J. Biotechnol. 4: 478-482.

20 -Kristoffer Drotz . (2008) . Production Optimization and Biomechanics of Biosynthetic Blood Vessels made of Bacterial Cellulose, Thesis for the Degree of Master of Science, Diploma Thesis n°350, Chalmers University of Technology, Goteborg, Sweden .

21- Krystynowicz, A. S.; Turkiewicz, M. and Kalinowska, H . (2005). "Bacterial Cellulose" In Polysaccharides and polyamides in the food industry :, Production , and patents . edited by Al-Exdnder Steinb Jchel , Sany Ki Rhee.

22- Kuan, C .; Jeffrey, M. and Ali, D. (2009) . Effect of different additives on bacterial cellulose production by Acetobacter xylinum and analysis of material property., Department of Agricultural and Biological Engineering, The Pennsylvania State University, University Park, PA 16802, USA., 16:1033–1045.

23- Marc A. M.; Po-Yu Chen, Albert Yu-Min Lin, Yasuaki Seki, . (2008) . Biological materials Structure and mechanical properties, Progress in Materials Science., 53 :1–206.
24- Marzieh, M. N.and Ali,R.Y.(2010). Investigation of Physicochemical Properties of the Bacterial Cellulose Produced by Gluconacetobacter xylinus from Date Syrup ., World Academy of Science, Engineering and Technology 68; 1248- 1253.
25- Marzieh, M. N. and Ali, R. Y. (2011). Biotechnological production of cellulose by Gluconacetobacter xylinus from agricultural waste., Iranian journal of biotechnology, vol. 9:94-101.
26- Mikkelsen, D.; Flanagan, B.M.; Dykes, G.A. and Gidley, M.J . (2009). Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by Gluconacetobacter xylinus strain ATCC 53524. J. Appl. Microbiol.107: 576-583.
27- Norhayati binti pa'E . (2009) . Rotary discs reactor for enhanced production of microbial cellulose., Master of Engineering (Bioprocess), Universiti Teknologi Malaysia.
28- Retegi, A.; Gabilondo, N .; Pena, C. and Zuluaga, R. (2010). Bacterial cellulose films with controlled microstructure–mechanical property relationships, Cellulose., 17:661–669.
29-Schmitt, D.F.; Frankos, V.H.; Westland, J. and zoetis, T.(1991). Toxicologic evaluation of cellulose fiber: genotoxicity.,Pyrogenicity, acute and Sub . chronictoxicity.J.Am. Coll. Toxicol., 10:451-554.
30-Schrecker, P. and Gostomski, S. (2005). Determining the water holding capacity of microbial cellulose, Biotechnol. Lett., 27 :1435-1438.
31-Sherif , A.; Keshk, S.; Taha, M.; Razek, A.; and Kazuhiko Sameshima. (2006). Bacterial Cellulose Production from Beet Molasses ., African Journal of Biotechnology Vol., 5 (17). pp. 1519-1523.
32-Sherif M.A.S. Keshk and Kazuhiko, S . (2005). Evaluation of different carbon sources for bacterial cellulose production, African Journal of Biotechnology Vol. 4 (6), pp. 478-482.
33-Shuai, Z. and Jin L . (2011) . Preparation and Properties of Bacterial Cellulose/Alginate Blend Bio-Fibers. Journal of Engineered Fibers and Fabrics Volume 6, Issue 3:69-72.
34-Toyosaki, H.,; Naritomi, T.; seto, A.; Matsuoko, M.; Tsuchida, T. and Yoshinga, F. ,(1995). Screening of Bacterial cellulose-producing Acetobacter Strains Suitable for Agitated culture Biosci. Biochem. Biotech., 59 (8): 1498-1502.
35-Vandamme, E.J.; DeBaets, S.; Vanbaelan, A.; Joris, K. and DeWulf, P. (1997). Improved Production of bacterial Cellulose and Its Application Potential. Journal of Polymer Degradation and Stability. 59, 93-99.
36-Wanichapichart, S.; Kaewnopparat, P.; Buaking, K. and Puthai, W. (2002). Characterization of cellulose membranes produced by Acetobacter xylinum, J. Sci. Technol. 24 ,855–862.
37-Weihua ,T.; Shiru , J.; Yuanyuan, J. and Hongjiang, Y. (2010) . The influence of fermentation conditions and post-treatment methods on porosity of bacterial cellulose membrane., World J Microbiol Biotechnol ., 26:125-131.
38-White , D . G and Brown, JR. R.M. (1989) . " Prospects for the commercialization of the biosynthesis of microbial Cellulose " In: Cellulose and Wood . Chemistry and Technology . Schuerch (ed.) New York: Wiley ., 573-590.
39-White ,A.R. and Brown Jr, R.M. (1981). Enzymatic hydrolysis of cellulose:Visual characterization of the process, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 78 :1047–1051.
40-Zhao, L .; Sun, D. and Hu, L . (2007) . Effect of addition of sodium alginate on bacterial cellulose production by Acetobacter xylinum., J Ind Microbiol Biotechnol., 34(7):483–489.