



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ

ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

I. Κουρκουτάς



Αλεξανδρούπολη 2010

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΑΣΚΗΣΗ 1.....	3
Παραγωγή Μονοκυτταρικής Πρωτεΐνης. Αερόβια Παραγωγή Ζυμών.....	3
ΑΣΚΗΣΗ 2.....	7
Ακίνητοποίηση Ζυμών σε Φυσικά Υποστρώματα	7
ΑΣΚΗΣΗ 3.....	13
Τεχνολογία Ζυμώσεων με Ακίνητοποιημένες Ζύμες	13

ΑΣΚΗΣΗ 1

Παραγωγή Μονοκυτταρικής Πρωτεΐνης (Single Cell Production). Αερόβια Παραγωγή Ζυμών.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Πολλά ζυμωμένα τρόφιμα περιέχουν σημαντικές ποσότητες μικροβιακής βιομάζας, όπως ζύμες (ψωμί, προϊόντα αρτοποιίας, κλπ), βακτήρια (γιαούρτι, ορισμένα είδη τυριών, κλπ) και μύκητες (ορισμένα είδη τυριών, κλπ). Η μικροβιακή βιομάζα μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ως επιπρόσθετη πηγή πρωτεϊνών και βιταμινών σε ζωοτροφές.

Για την παραγωγή μονοκυτταρικής πρωτεΐνης χρησιμοποιούνται φθηνές πρώτες ύλες όπως:

1. Υδατάνθρακες

Υπάρχει μεγάλη ποικιλία πηγών υδατανθράκων

- α) μελάσα, παραπροϊόν βιομηχανίας ζάχαρης,
- β) τυρόγαλα, παραπροϊόν γαλακτοβιομηχανίας,
- γ) υγρά απόβλητα χαρτοβιομηχανίας,
- δ) υδρολύματα αμύλου, κυτταρίνης κλπ.

2. Αλκοόλες

Αλκοόλες όπως η μεθανόλη μπορούν να χρησιμοποιηθούν από διάφορους μικροοργανισμούς για παραγωγή μονοκυτταρικής πρωτεΐνης.

3. Μεθάνιο

Είναι διαθέσιμο με πολύ χαμηλό κόστος σε διάφορες περιοχές του πλανήτη. Καθώς είναι αέριο δεν παραμένουν υπολείμματα στο τελικό προϊόν.

4. Υδρογονάνθρακες (C4-C24)

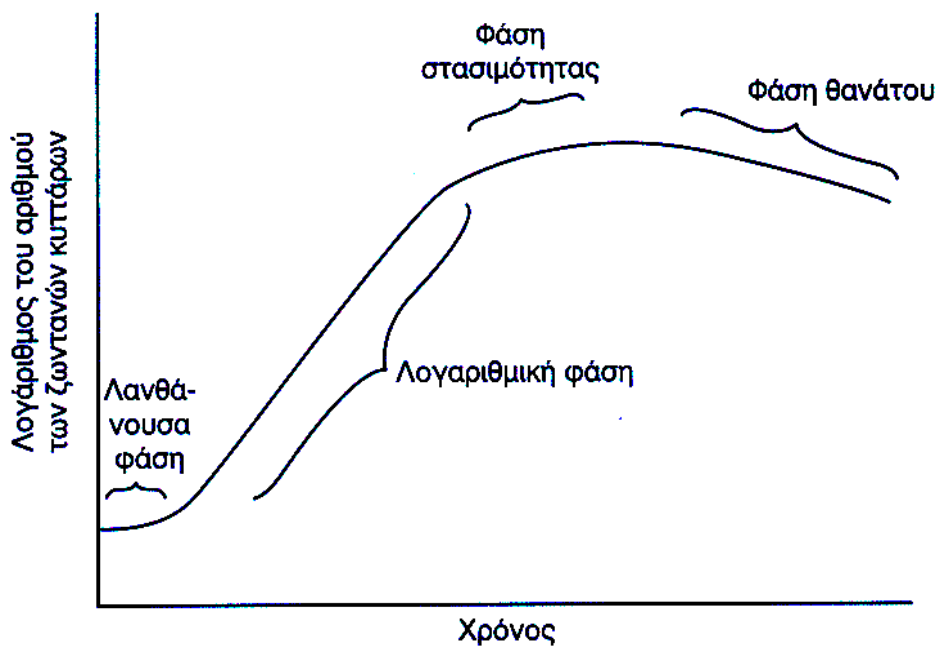
Οι υδρογονάνθρακες μπορούν να μεταβολιστούν από διάφορους μικροοργανισμούς. Το χρονικό διάστημα 1955 – 1972 η παραγωγή μονοκυτταρικής πρωτεΐνης από υδρογονάνθρακες αποτέλεσε αντικείμενο

έρευνας αλλά μετά την πετρελαϊκή κρίση του 1973 οι έρευνες εγκαταλείφθηκαν.

Καμπύλη ανάπτυξης

Στην καμπύλη ανάπτυξης ενός μικροοργανισμού διακρίνονται τέσσερις φάσεις (Σχήμα 1).

- α) λανθάνουσα φάση (lag phase),
- β) λογαριθμική φάση (exponential phase) ανάπτυξης,
- γ) φάση στασιμότητας (stationary phase),
- δ) φάση θανάτου (death phase).



Σχήμα 1. Φάσεις ανάπτυξης μιας μικροβιακής καλλιέργειας.

Κατά τη λανθάνουσα φάση τα κύτταρα προσαρμόζονται στο νέο περιβάλλον και ο αριθμός ανάπτυξης είναι ελάχιστος. Στη λογαριθμική φάση παρατηρείται έντονη ανάπτυξη των κυττάρων καθώς τα θρεπτικά υλικά στον βιοαντιδραστήρα καταναλώνονται η ανάπτυξη περιορίζεται και τελικά σταματά (φάση στασιμότητας), ενώ ο μικροβιακός πληθυσμός είναι μέγιστος και σταθερός. Καθώς συνεχίζεται η κατανάλωση των θρεπτικών υλικών περισσότερα κύτταρα πεθαίνουν από αυτά που παράγονται.

Παραγωγή ζύμης αρτοποιίας

Οι παρακάτω συνθήκες απαιτούνται για την παραγωγή ζύμης αρτοποιίας:

1. Αερόβιες συνθήκες
2. Χαμηλή συγκέντρωση υποστρώματος (περιεκτικότητα σακχάρου <math><4\text{ }^{\circ}\text{Be}</math>).
3. Εύρος pH 5-6.
4. Εύρος θερμοκρασίας 28-30°C.

Η συγκέντρωση σακχάρων στις βιομηχανικές ζυμώσεις μετριέται συνήθως με σακχαρόμετρα σε μονάδες Baume ($^{\circ}\text{Be}$) ή Brix.

Η κλίμακα $^{\circ}\text{Be}$ ορίζεται από την πυκνότητα του νερού (0°Be) και από την πυκνότητα του πυκνού θειικού οξέος (66°Be). Η κλίμακα $^{\circ}\text{Be}$ έχει μεγάλη πρακτική σημασία, καθώς οι βαθμοί $^{\circ}\text{Be}$ αντιστοιχούν με αλκοολικούς βαθμούς, **εφόσον όλο το περιεχόμενο σάκχαρο μετατραπεί σε αλκοόλη.**

Ως **αλκοολικός βαθμός** ορίζονται τα mL αιθανόλης/100mL διαλύματος.

Με την πρόοδο της ζύμωσης οι $^{\circ}\text{Be}$ μειώνονται, γεγονός που οφείλεται στην μείωση των σακχάρων και κατά συνέπεια επηρεάζεται το ειδικό βάρος.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

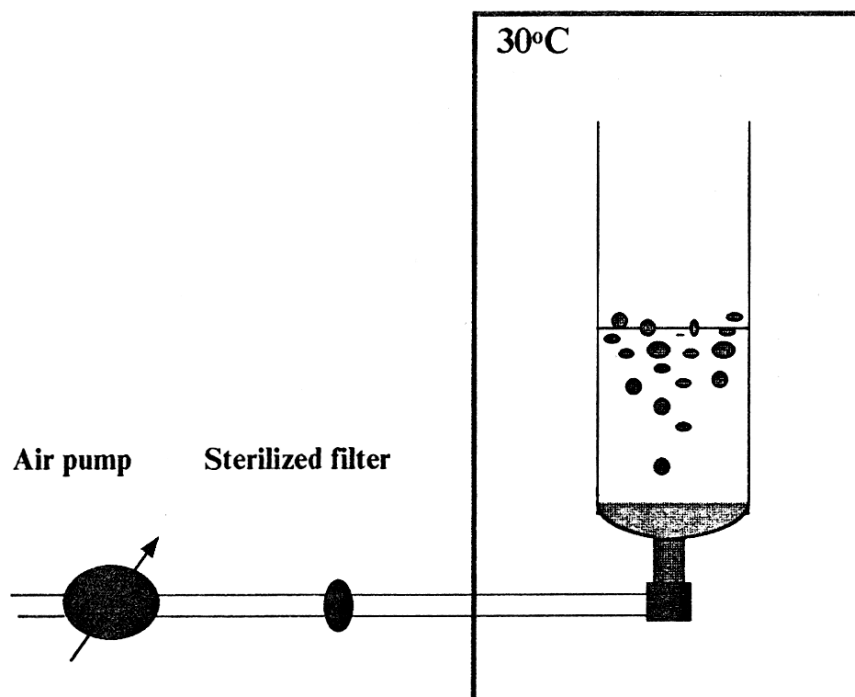
Υλικά και συσκευές

- Γυάλινος βιοαντιδραστήρας
- Be μετρο
- Θερμόμετρο
- Συσκευή παροχής αέρα
- Βακτηριοστατικό φίλτρο
- Θερμοθάλαμος (28-30°C)
- Φυγόκεντρος
- Ζυγός
- Μελάσα (ή οποιοδήποτε άλλο σακχαρούχο υπόστρωμα)
- Πιεστή ζύμη αρτοποιίας (70% υγρασία)
- KH_2PO_4 και $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (θρεπτικά άλατα)

- Δονητής (vortex)
- Συσκευή αποστείρωσης

Πειραματική διαδικασία

Η μελάσα (1.5L) αραιώνεται μέχρι 4°Be, προστίθεται 0.1% KH_2PO_4 και $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ και το μείγμα αποστειρώνεται στους 121°C για 15min. Στη συνέχεια, η αραιωμένη μελάσα προστίθεται σε αποστειρωμένο βιοντιδραστήρα (2L), διασπείρονται 30g πιεστής ζύμης αρτοποιίας, διαβιβάζεται αποστειρωμένος αέρας και το όλο σύστημα θερμοστατείται στους 28-30°C. Εάν χρειαστεί προστίθεται ποσότητα αντιαφριστικού. Μετά από 24h το υγρό ζύμωσης φυγοκεντρείται και ζυγίζεται η βιομάζα που παράχθηκε.



Σχήμα 2. Σύστημα παραγωγής ζύμης αρτοποιίας.

ΑΣΚΗΣΗ 2

Ακίνητοποίηση Ζυμών σε Φυσικά Υποστρώματα

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ως τεχνική ακίνητοποίησης θα μπορούσε να οριστεί μια διαδικασία η οποία περιορίζει ένα βιολογικό καταλύτη, ένα ένζυμο, ένα πολυενζυμικό σύστημα ή ένα κύτταρο μέσα σε ένα σύστημα του αντιδραστήρα και το εμποδίζει να εισαχθεί στην κινητή φάση και να μεταφερθεί από το υπόστρωμα ή το προϊόν, με αποτέλεσμα να επιτρέπει εύκολη επαναχρησιμοποίησή του. Το ενδιαφέρον προς την ακίνητοποίηση των ενζύμων και κυττάρων για μικροβιακή παραγωγή χρήσιμων βιοχημικών προϊόντων είναι έντονο τις τελευταίες δεκαετίες. Έτσι η χρήση ακίνητοποιημένων κυττάρων και ενζύμων βρήκε πολλές εφαρμογές και παράλληλα είναι αντικείμενο μελέτης πολλών ερευνητών.

Για να χρησιμοποιηθεί ένα υπόστρωμα ως φορέας ακίνητοποίησης, πρέπει να τηρούνται ορισμένες προϋποθέσεις:

- α) Διατήρηση της ζωτικότητας των ακίνητοποιημένων κυττάρων. Η βιολογική δράση των ακίνητοποιημένων κυττάρων δεν πρέπει να μεταβάλλεται με την ακίνητοποίηση.
- β) Ο βιοκαταλύτης πρέπει να διατηρεί ικανοποιητική μηχανική, χημική και βιολογική σταθερότητα. Δεν πρέπει να είναι ευαίσθητος στη δράση ενζύμων, διαλυτών, μεταβολών της πίεσης ή δυνάμεων αποκοπής (shear force).
- γ) Ο βιοκαταλύτης πρέπει να είναι ή να παρασκευάζεται από φθηνά υλικά και να υπόκειται εύκολα σε διαδικασίες ανάπτυξης βιομηχανικής κλίμακας (scale-up).
- δ) Το πορώδες του βιοκαταλύτη πρέπει να είναι αμετάβλητο και ελεγχόμενο. Η ελεύθερη μετακίνηση των υποστρωμάτων, προϊόντων και αερίων είναι βασική για αποδοτική λειτουργία των ακίνητοποιημένων κυττάρων (KNORR 1987).

Ακίνητοποίηση κυττάρων

Έχουν αναπτυχθεί πολλές μέθοδοι ακίνητοποίησης κυττάρων τα τελευταία χρόνια. Αυτές μπορούν να διακριθούν στις παρακάτω κατηγορίες ανάλογα με το φυσικό μηχανισμό ακίνητοποίησης:

1. Ακίνητοποίηση σε επιφάνεια

Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται οι μέθοδοι ακίνητοποίησης που αποσκοπούν στην ακίνητοποίηση των κυττάρων στην επιφάνεια του υποστρώματος. Η ακίνητοποίηση των κυττάρων στην επιφάνεια γίνεται είτε με φυσική προσρόφηση, είτε με συγκράτηση λόγω δυνάμεων ηλεκτροστατικής φύσεως, είτε τέλος, με συγκράτηση λόγω ομοιοπολικών δεσμών που αναπτύσσονται μεταξύ της επιφάνειας του κυττάρου και του φορέα. Το πάχος του φιλμ των κυττάρων κυμαίνεται από μόνο ένα στρώμα κυττάρων μέχρι ενός φιλμ πάχους ενός χιλιοστού ή και περισσότερο.

Τα συστήματα όπου τα κύτταρα ακίνητοποιούνται με προσρόφηση σε μια επιφάνεια ή σε ένα φορέα είναι πολύ δημοφιλή λόγω της ευκολίας της ακίνητοποίησης. Η δύναμη με την οποία τα κύτταρα ακίνητοποιούνται σε ένα υπόστρωμα εξαρτάται από τον τύπο των κυττάρων και του υποστρώματος. Τα ακίνητοποιημένα κύτταρα αποκολλώνται εύκολα και καθίσταται έτσι, ένα είδος ισοροπίας μεταξύ των ακίνητοποιημένων και των ελευθέρων κυττάρων, ακόμα και στα αρχικά στάδια της διεργασίας. Καθώς δεν υπάρχει κάποιο είδος μεμβράνης μεταξύ των κυττάρων και του διαλύματος, αυτός ο τύπος ακίνητοποίησης δεν είναι κατάλληλος για διεργασίες όπου απαιτείται το προϊόν να είναι ελεύθερο κυττάρων. Το πάχος του φιλμ των κυττάρων που προσκολλώνται στο υπόστρωμα εξαρτάται από τη ροή της τροφοδοσίας, όταν έχουμε συνεχή διεργασία, με αποτέλεσμα να είναι εξαιρετικά δύσκολο να ελεγχθεί με ακρίβεια. Συνεπώς, το βιοφίλμ που σχηματίζεται είναι ανομοιογενές και εκτίθεται σε περιορισμούς που εξαρτώνται από τις ιδιότητες των θρεπτικών υλικών, καθώς και από το σχηματισμό καναλιών νερού στο στρώμα των κυττάρων μέσα στις εσωτερικές διόδους του φορέα ακίνητοποίησης. Ακόμα όμως και με αυτά τα μειονεκτήματα, το είδος αυτό της ακίνητοποίησης χρησιμοποιείται συχνά στη βιομηχανία (KAREL et al 1985, FREEMAN and LILLY 1998).

2. Παγίδευση σε πορώδες υλικό

Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο ακίνητοποίησης, τα κύτταρα, είτε (α) αφήνονται να διεισδύσουν στο πορώδες υπόστρωμα μέχρι η κινητικότητά τους να παρεμποδιστεί από την παρουσία άλλων κυττάρων, είτε (β) το

πορώδες υλικό σχηματίζεται *in situ* μέσα σε καλλιέργεια των κυττάρων που πρόκειται να ακίνητοποιηθούν.

Στην πρώτη περίπτωση, τα κύτταρα ακίνητοποιούνται μέσα στο πορώδες υλικό και παρεμποδίζονται από τυχόν αποκόλλησή τους. Στη δεύτερη περίπτωση, το πολυμερές είτε ζελατινοποιείται απευθείας στο επιθυμητό σχήμα και μέγεθος, είτε ζελατινοποιείται σε μεγάλα τεμάχια, τα οποία στη συνέχεια τεμαχίζονται στις κατάλληλες διαστάσεις. Τα πιο συνήθη έχουν σχήμα χάντρας με διάμετρο 1-5 mm και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοκαταλύτες σε αντιδραστήρες πακεταρισμένης ή ρευστοποιημένης κλίνης. Η διατήρηση της κυτταρικής βιωσιμότητας επιτρέπει τη χρήση του βιοκαταλύτη σε αντιδράσεις πολλών σταδίων και σε αντιδράσεις που απαιτούν συνένζυμα. Έχει ευρεθεί ότι η ακίνητοποίηση μικρού αριθμού κυττάρων στα πολυμερή και η ανάπτυξή τους στη συνέχεια μέσα στο πολυμερές βελτιώνει την ποιότητα του βιοκαταλύτη (KAREL et al 1985).

Χαρακτηριστικά παραδείγματα υποστρωμάτων αυτών των περιπτώσεων είναι τα αλγινικά (ADLERCREUTZ et al 1985, KLOOSTERMAN and LILLY 1986) και η καραγεννάνη (PARA and BARATTI 1988). Η ανάπτυξη των ακίνητοποιημένων κυττάρων σε αυτά τα πολυμερή εξαρτάται από τους περιορισμούς που επιβάλλει το πορώδες του πολυμερούς. Στην περίπτωση των αλγινικών και της καραγεννάνης, η διείδυση του οξυγόνου στα πολυμερή αποτελεί τον περιοριστικό παράγοντα στην ανάπτυξη των κυττάρων. Το εύρος αποτελεσματικής διείδυσης του οξυγόνου έχει εκτιμηθεί 0.08-0.10 mm για την περίπτωση της καραγεννάνης (HUANG et al 1990) και 0.1-0.15 mm για τις πέρλες αλγινικών (OGBONNA et al 1991). Αυτή η ανόμοια ανάπτυξη των κυττάρων δημιουργεί έναν ανομοιογενή πληθυσμό μέσα στο πολυμερές. Πιο συγκεκριμένα, τα κύτταρα που βρίσκονται κοντά στην επιφάνεια πιθανόν να έχουν μια διαφορετική μεταβολική συμπεριφορά σε σχέση με τα κύτταρα που βρίσκονται στο εσωτερικό του πολυμερούς, όπου βρίσκονται σε συνθήκες περιορισμένου ή καθόλου οξυγόνου (FREEMAN and LILLY 1998).

3. Δημιουργία συσσωματωμάτων από τα κύτταρα

Η δημιουργία συσσωματωμάτων από τα κύτταρα μπορεί να θεωρηθεί ως ακίνητοποίηση κυττάρων. Η μεγάλη μάζα του συσσωματώματος δίνει τη δυνατότητα για χρήση σε αντιδραστήρες που έχουν σχεδιαστεί για ακίνητοποιημένα κύτταρα, όπως γεμισμένης στήλης (packed bed reactor), ρευστοποιημένης κλίνης (fluidised beds) και συνεχούς λειτουργίας με ανάδευση (CSTR). Η δημιουργία συσσωματωμάτων από τα κύτταρα της

ζύμης είναι ιδιότητα μόνο συγκεκριμένων στελεχών. Συσσωματώματα δημιουργούν κυρίως μύκητες και φυτικά κύτταρα. Η δημιουργία συσσωματωμάτων μικροοργανισμών οι οποίοι δε σχηματίζουν από μόνοι τους συσσωματώματα, μπορεί να επιτευχθεί με προσθήκη διάφορων αντιδραστηρίων τα οποία βοηθούν την όλη διεργασία (KAREL et al 1985).

4. Μηχανική συγκράτηση

Η μηχανική συγκράτηση των κυττάρων μπορεί να επιτευχθεί είτε με τη χρήση μεμβράνης, είτε με τον εγκλωβισμό των κυττάρων σε μικροκάψουλα, είτε τέλος, με την ακίνητοποίηση των κυττάρων στην επιφάνεια αλληλεπίδρασης δύο μη αναμίξιμων υγρών. Ο τρόπος αυτός ακίνητοποίησης είναι ιδανικός όταν απαιτείται τελικό προϊόν απαλλαγμένο από κύτταρα ή από κάποια μεγάλου μοριακού βάρους ουσία. Αυτά τα πλεονεκτήματα βέβαια, αντισταθμίζονται από το γεγονός ότι είναι δύσκολη η επίτευξη της μηχανικής συγκράτησης των κυττάρων και ότι η μεταφορά των θρεπτικών ουσιών, ιδίως αυτών που δεν έχουν μεγάλη διαλυτότητα, από τον κύριο όγκο του διαλύματος στα κύτταρα, είναι προβληματική (KAREL et al 1985).

Πλεονεκτήματα χρήσης ακίνητοποιημένων κυττάρων.

Πολλά πλεονεκτήματα έχουν αποδοθεί τα τελευταία χρόνια στη χρήση ακίνητοποιημένων κυττάρων, είτε ως ακίνητοποιημένα ένζυμα, είτε ως συστήματα ολόκληρων ζωντανών κυττάρων για παραγωγή προϊόντων ζύμωσης. Το μεγαλύτερο ποσοστό της έρευνας ασχολείται με απλές εφαρμογές και προσπαθεί να αποδείξει τα πλεονεκτήματα των ακίνητοποιημένων κυττάρων έναντι των παραδοσιακών ζυμώσεων με ελεύθερα κύτταρα. Μερικά από αυτά αναφέρονται παρακάτω:

- α) Βελτιωμένη απόδοση παραγωγής λόγω επαναχρησιμοποίησης του βιοκαταλύτη, ανακύκλωσης των ενζύμων και συνενζύμων, υψηλών ρυθμών αντίδρασης και απομάκρυνσης των αναστολέων από το σύστημα.
- β) Δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης του βιοκαταλύτη λόγω ακίνητοποίησης του μικροοργανισμού στο φορέα.
- γ) Επιτάχυνση του ρυθμού ζύμωσης λόγω επίτευξης υψηλών συγκεντρώσεων βιομάζας και χρήση κυττάρων που δεν βρίσκονται στη φάση ανάπτυξης των κυττάρων.

δ) Υψηλή παραγωγικότητα λόγω της δυνατότητας χρησιμοποίησης των βιοκαταλυτών σε συνεχείς διαδικασίες και απομάκρυνσης των προϊόντων και των ανεπιθύμητων μεταβολικών παραπροϊόντων που δρουν ως αναστολείς.

ε) Διατήρηση σταθερών και ενεργών βιοκαταλυτών λόγω διαχωρισμού της ανάπτυξης των κυττάρων από την παραγωγή του προϊόντος εξ' αιτίας της ακίνητοποίησης των κυττάρων σε κάποιο φορέα.

στ) Βελτιωμένος έλεγχος της παραγωγικής διαδικασίας στα συστήματα συνεχούς ζύμωσης λόγω διαχωρισμού του προϊόντος και απομάκρυνσης των αναστολέων.

ζ) Προϊόν απαλλαγμένο κυττάρων λόγω του φυσικού διαχωρισμού του βιοκαταλύτη από το προϊόν.

Επίδραση της ακίνητοποίησης στους μικροοργανισμούς.

Σε πολλές περιπτώσεις έχει αναφερθεί αλλαγή της μεταβολικής δραστηριότητας μικροοργανισμών κατά την ακίνητοποίησή τους σε κάποιο φορέα. Οι πιθανοί λόγοι για αυτή την αλλαγή δεν είναι ακόμα σαφείς. Η αλλαγή αυτή είναι άμεσα συνδεδεμένη με το γεγονός ότι το μικροπεριβάλλον στο οποίο βρίσκονται τα ακίνητοποιημένα κύτταρα συχνά διαφέρει από το περιβάλλον μιας καλλιέργειας ελευθέρων κυττάρων και αφορά κυρίως την αλλαγή της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης, την αλλαγή της μορφολογίας του κυττάρου, την επίδραση της επιφανειακής τάσης και της οσμωτικής πίεσης στο μεταβολισμό του κυττάρου και την διάχυση των υποστρωμάτων και των προϊόντων από και προς το κύτταρο.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Υλικά και συσκευές

- Υγρή καλλιέργεια ζύμης
- Φυσικό υπόστρωμα ακίνητοποίησης
- Βιοαντιδραστήρας
- Βε μετρο
- Θερμόμετρο

Πειραματική διαδικασία

Για την ακινήτοποίηση των κυττάρων ζύμης που παράχθηκαν από την Άσκηση 1 σε φυσικά υποστρώματα (φρούτα, απολιγνισμένη κυτταρίνη, πελλέτες γλουτένης, κλπ), η κατάλληλη ποσότητα τεμαχισμένου υλικού τοποθετείται στον γυάλινο βιοαντιδραστήρα (1L), ο οποίος περιέχει την καλλιέργεια της ζύμης. Το μίγμα αφήνεται για τουλάχιστον 8h στους 28-30°C. Κατόπιν, ο ακινήτοποιημένος βιοκαταλύτης ξεπλένεται αρκετές φορές με θρεπτικό υγρό ίδιας σύστασης με αυτό το οποίο πρόκειται να χρησιμοποιηθεί στην αλκοολική ζύμωση (Άσκηση 3).

ΑΣΚΗΣΗ 3

Τεχνολογία Ζυμώσεων με Ακίνητοποιημένες Ζύμες

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στην Ελλάδα ως πρώτες ύλες για την παραγωγή πόσιμου οινοπνεύματος χρησιμοποιούνται κυρίως μελάσα, εκχύλισμα σταφίδας, αμυλούχες πρώτες ύλες κλπ.

Στην περίπτωση της μελάσας το pH ρυθμίζεται στην τιμή 4,7 με προσθήκη θειικού οξέος. Επίσης συνήθως προστίθεται 0.5g/L KH_2PO_4 .

Η εκχύλιση της σταφίδας γίνεται στους 72°C για τέσσερις ώρες με την κατάλληλη προσθήκη νερού.

Η συγκέντρωση σακχάρων μετριέται συνήθως με σακχαρόμετρα σε μονάδες Baume (°Be) ή Brix. Η κλίμακα °Be ορίζεται από την πυκνότητα του νερού (0°Be) και από την πυκνότητα του πυκνού θειικού οξέος (66°Be). Η κλίμακα °Be έχει μεγάλη πρακτική σημασία, καθώς οι βαθμοί °Be του γλεύκους αντιστοιχούν με αλκοολικούς βαθμούς στο κρασί, **εφόσον όλο το περιεχόμενο σάκχαρο μετατραπεί σε αλκοόλη**. Πρακτικά 17g/L σακχάρου αντιστοιχούν με $\approx 1^\circ\text{Be}$.

Η παρακολούθηση της ζύμωσης γίνεται συνήθως με προσδιορισμό του °Be.

Ως αλκοολικός βαθμός ορίζονται τα mL αιθανόλης στα 100mL διαλύματος.

Με την πρόοδο της ζύμωσης οι °Be μειώνονται, γεγονός που οφείλεται στην μείωση των σακχάρων προς παραγωγή αλκοόλης και κατά συνέπεια επηρεάζεται το ειδικό βάρος.

Συστήματα συνεχούς διεργασίας

Τα συστήματα συνεχούς λειτουργίας παρουσιάζουν πλεονεκτήματα όπως:

1. Αυξημένη παραγωγικότητα.
2. Βελτιωμένος έλεγχος της παραγωγικής διαδικασίας.
3. Μειωμένο κόστος λειτουργίας.
4. Εύκολος χειρισμός συστήματος.

Υπάρχουν όμως και σημαντικά μειονεκτήματα όπως:

1. Αυξημένο κόστος επένδυσης.
2. Προβλήματα συντήρησης ακίνητοποιημένων βιοκαταλυτών σε περιόδους που δεν υπάρχει παραγωγή.

Κινητικοί παράμετροι

Στις βιομηχανικές ζυμώσεις είναι χρήσιμος ο υπολογισμός ορισμένων κινητικών παραμέτρων όπως:

- Ο ρυθμός αραίωσης (dilution rate), που υπολογίζεται διαιρώντας την παροχή του υγρού σε σύστημα συνεχούς διεργασίας με τον υγρό (ή ολικό) όγκο του αντιδραστήρα.
- Η απόδοση σε αιθανόλη (ethanol yield factor), που είναι ο λόγος g αιθανόλης/ g χρησιμοποιούμενων σακχάρων.
- Η παραγωγικότητα αιθανόλης (ethanol productivity), που εκφράζεται ως g αιθανόλης/ (L h) και στην περίπτωση συστήματος συνεχούς λειτουργίας υπολογίζεται βάσει του υγρού όγκου πολλαπλασιάζοντας το ρυθμό αραίωσης επί τη συγκέντρωση αιθανόλης.
- Η απόδοση σε βιομάζα (biomass yield factor), που είναι ο λόγος g ξηρού βάρους βιομάζας/ g χρησιμοποιούμενων σακχάρων.
- Η παραγωγικότητα βιομάζας (biomass productivity), που είναι ο λόγος g ξηρού βάρους βιομάζας/ (L h).
- Το % μετατροπής (% conversion), που υπολογίζεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$\frac{(\text{Αρχική συγκέντρωση σακχάρου} - \text{Τελική συγκέντρωση σακχάρου}) \times 100}{\text{Αρχική συγκέντρωση σακχάρου}}$$

Αρχική συγκέντρωση σακχάρου

Πίνακας 1. Παράδειγμα κινητικών παραμέτρων αλκοολικής ζύμωσης μελάσας με ακίνητοποιημένα κύτταρα σε βιοαντιδραστήρα συνεχούς λειτουργίας.

Ρυθμός αραίωσης (h ⁻¹)	Χρόνος ζύμωσης (h)	Αρχική συγκέντρωση σακχάρου (g/L)	Τελική συγκέντρωση σακχάρου (g/L)	Συγκέντρωση αιθανόλης (g/L)	Παραγωγικότητα αιθανόλης (gL ⁻¹ h ⁻¹)	Μετατροπή (%)	Απόδοση σε αιθανόλη
0.13	48	117.5	69.0	20	2.5	41.3	0.41
0.27	24	117.5	76.3	18	4.9	35.1	0.43
0.55	24	117.5	95.3	9	5.1	18.7	0.42
0.13	48	171.5	100.2	28	3.6	41.6	0.40
0.26	24	171.5	137.4	14	3.5	19.9	0.40

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Πειραματική διαδικασία

Τοποθετούμε την κατάλληλη ποσότητα βιοκαταλύτη στον βιοαντιδραστήρα και προσθέτουμε την απαιτούμενη ποσότητα μελάσας. Προσδιορίζουμε τον αρχικό °Be. Λαμβάνονται μετρήσεις του °Be καθημερινά έως το τέλος της ζύμωσης. Με βάση τις μετρήσεις συμπληρώνεται ένας πίνακας αντίστοιχος του Πίνακα 1 και οι τιμές παρουσιάζονται γραφικά.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ADLERCREUTZ, A.L.; HOLST, O.; MATTIASSON, B. Characterization of *Gluconobacter oxydans* immobilized in calcium alginate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1985**, 22, 1-7.
- HUANG, J.; HOOIJMANS, C.M.; BRIASCO, C.A.; GERAATS, S.G.M.; LUYBEN, K.C.A.; THOMAS, D.; BARBOTIN, J.N. Effect of free-cell growth parameters on oxygen concentration profiles in gel-immobilized recombinant *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1990**, 33, 619-623.
- KAREL, S.F.; LIBICKI, S.B.; ROBERTSON, C.R. The immobilization of whole cells: Engineering Principles. *Chem. Engin. Sci.* **1985**, 40(8), 1321-1354.
- KLOOSTERMAN, J.; LILLY, M.D. Pilot plant production of prednisolone using calcium alginate immobilized *Arthrobacter simplex*. *Biotechnol. Bioeng.* **1986**, 28, 1390-1395.
- KNORR, D. *Food Biotechnology*, Knorr, D. Ed., Biotechnology Group, Department of Food Science, University of Delaware, Newark, Delaware, **1987**.
- OGBONNA, J.C.; MATSUMURA, M.; KATAOKA, H. Effective oxygen-action of immobilized cells through reduction in bead diameters: A review. *Process Biochem.* **1991**, 26, 109-121.
- PARA, G.; BARATTI, J. Synthesis of L-DOPA by immobilized cells of *Erwinia herbicola*. *Biocatalysis.* **1988**, 2, 39-50.