



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ

ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Ι. Κουρκουτάς



Αλεξανδρούπολη 2025

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Παραγωγή Μονοκυτταρικής Πρωτεΐνης - Αερόβια Παραγωγή Ζυμών .	3
ΑΣΚΗΣΗ 2	8
Ακίνητοποίηση Κυττάρων Σακχαρομύκητα σε Φυσικά Υποστρώματα.	8
ΑΣΚΗΣΗ 3	13
Τεχνολογία Ζυμώνσεων με Ακίνητοποιημένες Ζύμες	13
ΑΣΚΗΣΗ 4	15
Ανάλυση Προϊόντων Ζύμωσης με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)	15
ΑΣΚΗΣΗ 5	19
Υπολογισμός Κινητικών Παραμέτρων Ζύμωσης.....	19
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	23

ΑΣΚΗΣΗ 1

Παραγωγή Μονοκυτταρικής Πρωτεΐνης - Αερόβια Παραγωγή Ζυμών

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο συνεχώς αυξανόμενος παγκόσμιος πληθυσμός, η κλιματική αλλαγή, και η περιορισμένη διαθεσιμότητα γεωργικής γης εντείνουν την πίεση στις αλυσίδες εφοδιασμού τροφίμων. Μέχρι το 2050, ο παγκόσμιος πληθυσμός προβλέπεται να φτάσει τα 9,7 δισεκατομμύρια, ενώ η ζήτηση τροφίμων αναμένεται να αυξηθεί κατά 56%. Η κατανάλωση πρωτεϊνών έχει σημειώσει σημαντική αύξηση και θα συνεχίσει να αυξάνεται, καθιστώντας επιτακτική την αναζήτηση εναλλακτικών πηγών πρωτεΐνης, λόγω των περιβαλλοντικών επιπτώσεων και των υγειονομικών ανησυχιών που σχετίζονται με τις πρωτεΐνες ζωικής προέλευσης.

Η μονοκυτταρική πρωτεΐνη (Single-Cell Protein, SCP) αποτελεί μια μικροβιακή πρωτεΐνη που παράγεται από υπολείμματα τροφίμων, βιομηχανικά και γεωργικά απόβλητα, προσφέροντας μια βιώσιμη, οικονομικά αποδοτική και θρεπτική εναλλακτική λύση. Αποτελείται από αποξηραμένα μικροβιακά κύτταρα, όπως ζύμες, φύκη, μύκητες ή βακτήρια, και περιέχει πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, λίπη, βιταμίνες, και μέταλλα. Σε σύγκριση με τις συμβατικές πηγές πρωτεΐνης, όπως το γάλα, το κρέας, το ψάρι και τα αυγά, η SCP είναι φθηνότερη στην παραγωγή και μπορεί να καλλιεργηθεί σε υπολείμματα αποβλήτων, συμβάλλοντας στην αντιμετώπιση της παγκόσμιας έλλειψης πρωτεΐνης, ιδιαίτερα σε οικονομικά ευάλωτες περιοχές.

Διάφοροι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούνται για την παραγωγή SCP:

- Ζύμες (*Candida*, *Saccharomyces*): Περιέχουν 40-60% πρωτεΐνη, έχουν υψηλή διατροφική αξία και πλούσια περιεκτικότητα σε λυσίνη.
- Βακτήρια (*Brevibacterium*, *Lactobacillus*): Περιέχουν 50-65% πρωτεΐνη και είναι ευρέως αποδεκτά για διατροφική χρήση.
- Μύκητες (*Fusarium*, *Aspergillus*): Περιέχουν 31-43% πρωτεΐνη, αλλά ορισμένα είδη είναι τοξικά και ακατάλληλα για κατανάλωση.
- Φύκη (*Spirulina*, *Chlorella*): Περιέχουν 41-62% πρωτεΐνη και είναι ιδιαίτερα πλούσια σε θρεπτικά συστατικά.

Η μονοκυτταρική πρωτεΐνη αποτελεί μια υποσχόμενη λύση για τη μελλοντική διατροφική ασφάλεια, παρέχοντας μια βιώσιμη εναλλακτική έναντι των συμβατικών πηγών πρωτεΐνης, με χαμηλότερο περιβαλλοντικό αποτύπωμα και υψηλή θρεπτική αξία.

Παράλληλα, πολλά ζυμωμένα τρόφιμα περιέχουν σημαντικές ποσότητες μικροβιακής βιομάζας, όπως οι ζύμες που χρησιμοποιούνται στο ψωμί και τα προϊόντα αρτοποιίας (*Saccharomyces cerevisiae*), τα βακτήρια που συμμετέχουν στην

παραγωγή γιαουρτιού και ορισμένων τυριών (*Lactobacillus* spp.), καθώς και οι μύκητες που συμβάλλουν στην ωρίμανση συγκεκριμένων ειδών τυριών (π.χ. *Penicillium camemberti*). Παράλληλα, η μικροβιακή βιομάζα μπορεί να αξιοποιηθεί ως συμπληρωματική πηγή πρωτεϊνών και βιταμινών στις ζωοτροφές, ενισχύοντας τη θρεπτική αξία τους και υποστηρίζοντας βιώσιμες πρακτικές στη ζωική παραγωγή.

Οι κύριες πηγές που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή SCP περιλαμβάνουν:

1. Αγροτικά και Λιγνοκυτταρινούχα Απόβλητα

- Γεωργικά υπολείμματα (κυτταρίνη, ημικυτταρίνη, λιγνίνη)
- Απόβλητα φρούτων (π.χ. φλούδα πορτοκαλιού, φλούδα μπανάνας, υπολείμματα μάνγκο, απόβλητα ανανά)
- Υδρολύματα αραβόσιτου
- Πολτός άχυρου ρυζιού
- Πίτυρο σιταριού
- Ημικυτταρίνη (υποπροϊόν ζαχαροκάλαμου)

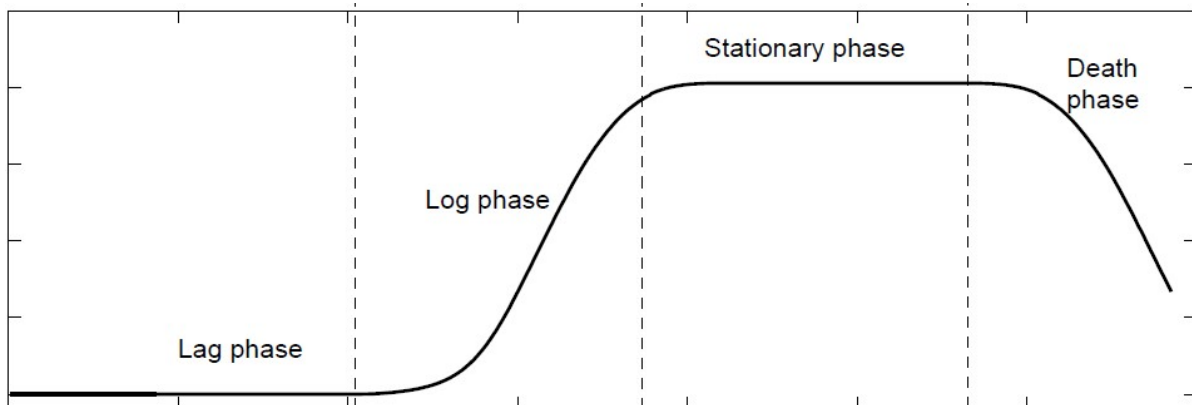
2. Βιομηχανικά Απόβλητα και Παραπροϊόντα Τροφίμων

- Απόβλητα βιοκαυσίμων (χρησιμοποιούνται ως πηγή άνθρακα για την ανάπτυξη ζυμών)
- Απόβλητα πατατοποιίας και γλυκερόλη
- Μελάσα (παραπροϊόν βιομηχανίας ζάχαρης)
- Υποπροϊόντα γαλακτοκομικής βιομηχανίας (π.χ. τυρόγαλο)
- Σκόνη πιπεριάς (προερχόμενη από τη βιομηχανική επεξεργασία καψανθίνης) (Kumar et al., 2023).

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
3. Εύρος pH 5 – 6.
4. Εύρος θερμοκρασίας 28 – 30 °C.

Η συγκέντρωση σακχάρων στις βιομηχανικές ζυμώσεις 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 θεικού οξέος (66 °Be).

Η κλίμακα °Be έχει μεγάλη πρακτική σημασία, καθώς οι βαθμοί °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 °Be μειώνονται, γεγονός που οφείλεται στην μείωση των σακχάρων και κατά συνέπεια επηρεάζεται το ειδικό βάρος.

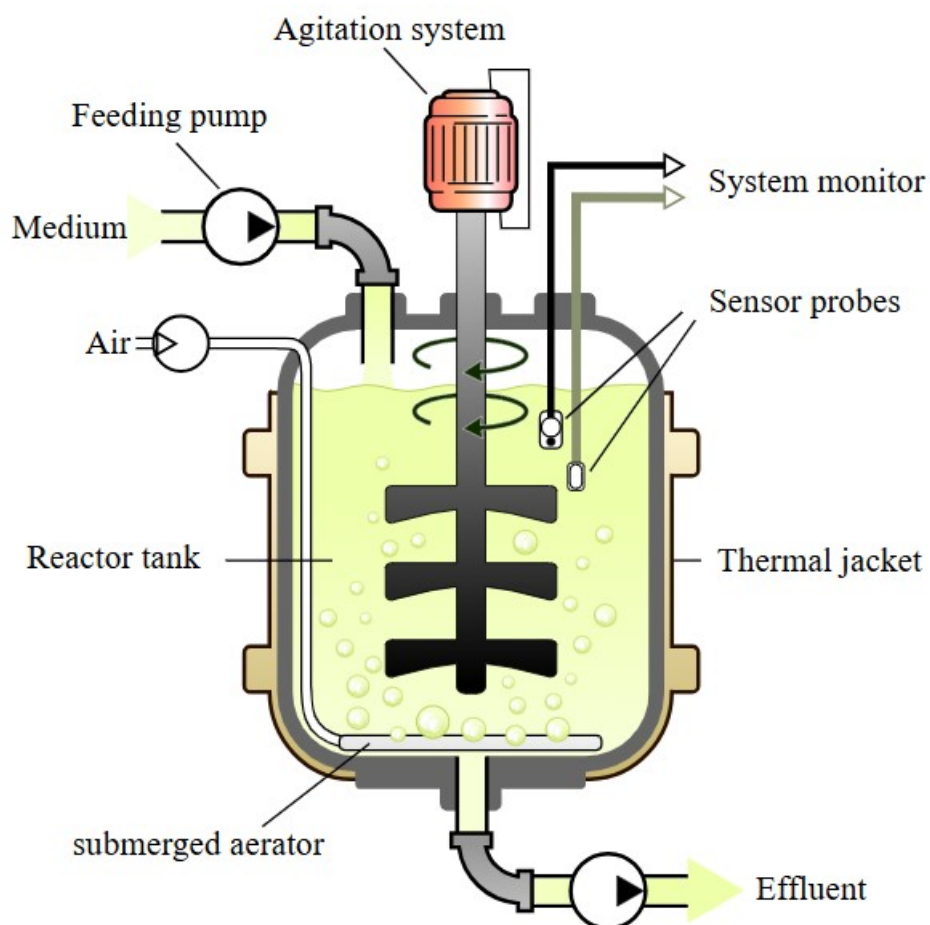
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

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 (1.5 L) 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 (2 L), διασπείρονται 30 g πιεστής ζύμης αρτοποιίας, διαβιβάζεται αποστειρωμένος αέρας και το όλο σύστημα θερμοστατείται στους 28 – 30 °C. Εάν χρειαστεί, προστίθεται ποσότητα αντιαφριστικού. Μετά από 24 h το υγρό ζύμωσης φυγοκεντρείται και ζυγίζεται η βιομάζα που παράχθηκε ή προσδιορίζεται φασματομετρικά μέσω πρότυπης καμπύλης.



Σχήμα 2. Σύστημα βιοαντιδραστήρα για την παραγωγή ζύμης αρτοποιίας.

ΑΣΚΗΣΗ 2

Ακίνητοποίηση Κυττάρων Σακχαρομύκητα 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. Η ακίνητοποίηση μιμείται αυτό που συμβαίνει στη φύση, και ειδικότερα σχετίζεται με την παγίδευση και ανάπτυξη των κυττάρων στο εσωτερικό, ή σε όλη την επιφάνεια των δομών που χρησιμοποιούνται ως φορείς ακίνητοποίησης. Η τεχνική της ακίνητοποίησης έχει εφαρμοσθεί με επιτυχία σε διάφορους τομείς της βιομηχανίας, όπως στην παραγωγή, α) ζυμωμένων αλλαντικών, β) γαλακτοκομικών προϊόντων, και γ) κρασιού ή μηλίτη οίνου. Επιπλέον, πολλές μελέτες υποστηρίζουν ότι η χρήση ακινητοποιημένων κυττάρων σε φυσικούς φορείς οδηγεί σε βελτιωμένα ποιοτικά χαρακτηριστικά των τελικών προϊόντων, ιδίως όσον αφορά στο προφίλ των αρωματικών ενώσεων και την αύξηση της διάρκειας ζωής κατά την αποθήκευση των προϊόντων (Νέλιος, 2024).

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

1. Διατήρηση της ζωτικότητας των ακινητοποιημένων κυττάρων. Η βιολογική δράση των ακινητοποιημένων κυττάρων δεν πρέπει να μεταβάλλεται με την ακίνητοποίηση.
2. 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).
3. Ο βιοκαταλύτης πρέπει να είναι ή να παρασκευάζεται από φθηνά υλικά και να υπόκειται εύκολα σε διαδικασίες ανάπτυξης βιομηχανικής κλίμακας (scale-up).
4. Το πορώδες του βιοκαταλύτη πρέπει να είναι αμετάβλητο και ελεγχόμενο. Η ελεύθερη μετακίνηση των υποστρωμάτων, προϊόντων, και αερίων είναι βασική για αποδοτική λειτουργία των ακινητοποιημένων κυττάρων (Mitropoulou et al., 2013).

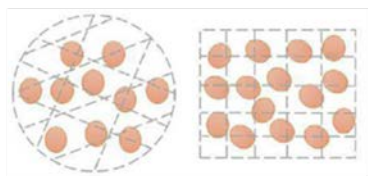
Ακίνητοποίηση κυττάρων

Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, οι τρεις μέθοδοι ακίνητοποίησης που αναφέρονται συχνότερα περιλαμβάνουν: α) την ακίνητοποίηση ή προσκόλληση σε

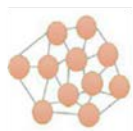
στερεή επιφάνεια, β) τον εγκλωβισμό σε πορώδες υλικό, και γ) τη δημιουργία συσσωματωμάτων (Σχήμα 3).



Ακίνητοποίηση σε επιφάνεια



Εγκλωβισμός σε πορώδες υλικό



Δημιουργία συσσωματωμάτων

Σχήμα 3. Σχηματική απεικόνιση των κύριων μεθόδων κυτταρικής ακίνητοποίησης.

Ακίνητοποίηση κυττάρων σε στερεή επιφάνεια

Η ακίνητοποίηση των κυττάρων σε στερεά υποστρώματα πραγματοποιείται με φυσική προσρόφηση λόγω των ηλεκτροστατικών δυνάμεων μεταξύ της κυτταρικής μεμβράνης και του φορέα ακίνητοποίησης. Τα κύτταρα μπορούν να προσκολληθούν σε διαφορετικές επιφάνειες για να αναπτυχθούν και να αναπτύξουν ένα βιοφίλμ, το οποίο τους προσφέρει προστασία από επικίνδυνες συνθήκες. Αυτή η εγγενής ιδιότητα επιτρέπει την ακίνητοποίηση σε φυσικά και συνθετικά πορώδη ή μη πορώδη στερεά υποστρώματα για πολλαπλούς σκοπούς, χωρίς να επηρεάζεται η βιωσιμότητα των κυττάρων. Πρόκειται για μια απλή και προσιτή μέθοδο που επιτρέπει την άμεση επαφή μεταξύ ακινητοποιημένων κυττάρων και θρεπτικών ουσιών, με αποτέλεσμα την υψηλή μεταφορά μάζας και την υψηλή μετατροπή υποστρώματος (Giese et al., 2020, Sekoai et al., 2018). Κύριο μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η χαμηλή αντοχή των δυνάμεων σταθεροποίησης, η οποία μπορεί να οδηγήσει στην αποκόλληση των κυττάρων (Larponi et al., 2022).

Εγκλωβισμός σε πορώδες υλικό

Ο εγκλωβισμός κυττάρων σε πορώδη υλικά αποτελεί μια ευέλικτη τεχνική που χρησιμοποιείται για τον περιορισμό μικροοργανισμών, είτε πρόκειται για μικρόβια, είτε ζωικά ή φυτικά κύτταρα (Larponi et al., 2022). Στην εν λόγω μεθοδολογία, τα κύτταρα παγιδεύονται εντός ενός πολυμερούς δικτύου, το οποίο αποτελείται από

φυσικά ή συνθετικά πολυμερή και η δομή του είναι πορώδης και άκαμπτη, επιτρέποντας τη διάχυση υποστρωμάτων και προϊόντων, ενώ παράλληλα προστατεύει τον επιλεγμένο μικροοργανισμό από τις αντιδράσεις του περιβάλλοντος. Χαρακτηριστικά παραδείγματα πορώδων υλικών, τα οποία χρησιμοποιούνται ως φορείς ακίνητοποίησης αποτελούν τα πολυμερή υλικά όπως το αλγινικό, η αγαρόζη, και το πολυακρυλαμίδιο, τα οποία έχουν ευρεία χρήση στην κατασκευή προϊόντων προστιθέμενης αξίας, όπως π.χ. φαρμακευτικά προϊόντα (Guisan, 2013).

Δημιουργία συσσωματωμάτων (κυτταρική κροκίδωση)

Η κυτταρική κροκίδωση αναφέρεται στη συγκέντρωση κυττάρων για το σχηματισμό μιας μεγαλύτερης μονάδας ή στην ικανότητά τους να σχηματίζουν θρόμβους σε εναιώρημα και να καθίζουν γρήγορα. Η προσθήκη παραγόντων κροκίδωσης σε υγρή καλλιέργεια ενισχύει την κυτταρική συσσωμάτωση. Φυτικά κύτταρα, ζύμες, και μύκητες φέρουν ως φυσική ικανότητα το σχηματισμό συσσωματωμάτων. Η εν λόγω τεχνική αποτελεί μια μέθοδος ακίνητοποίησης και εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η τιμή του pH, η σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος και η συγκέντρωση του διαλυμένου O₂ (Kourkoutas et al., 2004).

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 (Mitropoulou et al., 2013):

- Επιτυχημένη προστασία των κυττάρων από διάφορους παράγοντες, όπως η αλλαγή του pH, η θερμοκρασία, ο διαλύτης ή η παρουσία βαρέων μετάλλων,
- Ευκολία και γρήγορη απομάκρυνση του προϊόντος, καθώς ο βιοκαταλύτης και το προϊόν βρίσκονται σε διαφορετικές φάσεις, βελτιώνοντας την απόδοση της διαδικασίας,
- Απλός έλεγχος της αντίδρασης με προσθήκη ή αφαίρεση του ακίνητοποιημένου βιοκαταλύτη,
- Ευκολία στη διαχείριση και την επαναχρησιμοποίηση των ακίνητοποιημένων κυττάρων,
- Επιτάχυνση της διαδικασίας λόγω υψηλών συγκεντρώσεων βιοκαταλύτη και χρήσης κυττάρων που δεν βρίσκονται στη φάση ανάπτυξης,

- Υψηλή παραγωγικότητα λόγω της δυνατότητας χρήσης των βιοκαταλυτών σε συνεχείς διαδικασίες και απομάκρυνσης των προϊόντων και των ανεπιθύμητων παραπροϊόντων,
- Βελτιωμένος έλεγχος της παραγωγικής διαδικασίας σε συστήματα συνεχούς λειτουργίας,
- Προϊόντα απαλλαγμένα από ένζυμα / κύτταρα λόγω του φυσικού διαχωρισμού του βιοκαταλύτη από το προϊόν,
- Μειωμένος κίνδυνος μικροβιακών επιμολύνσεων λόγω της υψηλής συγκέντρωσης ακινητοποιημένων κυττάρων και της υψηλής ζυμωτικής τους δράσης,
- Δυνατότητα χρήσης αντιδραστήρων μικρότερου μεγέθους, με αποτέλεσμα μείωση του επενδυτικού κόστους, και
- Μείωση του διαστήματος ζύμωσης και ωρίμανσης προϊόντων, όπως η μπίρα και το κρασί.

Επίδραση της ακινητοποίησης στους μικροοργανισμούς.

Σε πολλές περιπτώσεις έχει αναφερθεί αλλαγή της μεταβολικής δραστηριότητας μικροοργανισμών κατά την ακινητοποίησή 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 ακινητοποιημένα 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 ακινητοποίησης
- Βιοαντιδραστήρας
- $^{\circ}\text{Be}$ μετρο
- Θερμόμετρο

Πειραματική διαδικασία

Για την ακινητοποίηση των κυττάρων ζύμης που παράχθηκαν από την Άσκηση 1 σε φυσικά υποστρώματα (φρούτα, απολιγνινοποιημένη κυτταρίνη, πελλέτες

γλουτένης, κλπ), η κατάλληλη ποσότητα τεμαχισμένου υλικού τοποθετείται στον γυάλινο βιοαντιδραστήρα (1 L), ο οποίος περιέχει την καλλιέργεια της ζύμης. Το μίγμα αφήνεται για τουλάχιστον 8 h στους 28 – 30 °C. Κατόπιν, ο ακίνητοποιημένος Ιβιοκαταλύτης ξεπλένεται αρκετές φορές με θρεπτικό υγρό ίδιας σύστασης με αυτό το οποίο πρόκειται να χρησιμοποιηθεί στην αλκοολική ζύμωση (Άσκηση 3).



Εικόνα 1. Ακίνητοποίηση μικροβιακής καλλιέργειας σε νιφάδες βρώμης (αριστερά) και φλούδες στέμφυλων (δεξιά).

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 θεικού οξέος. Επίσης, συνήθως προστίθεται 0.5g/L KH_2PO_4 .

Η εκχύλιση της σταφίδας γίνεται στους 72 °C για 4 h 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 θεικού 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 ανά 100 mL 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.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Πειραματική διαδικασία

Τοποθετούμε την κατάλληλη ποσότητα βιοκαταλύτη στον βιοαντιδραστήρα και προσθέτουμε την απαιτούμενη ποσότητα μελάσας ή κατάλληλου θρεπτικού υλικού Yeast Medium Broth (σύσταση: 4% w/v D-glucose, 0.4 % w/v yeast extract, 0.1% w/v $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.1% w/v KH_2PO_4 και 0.5% w/v $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

Προσδιορίζουμε τον αρχικό $^{\circ}\text{Be}$ και στη συνέχεια λαμβάνονται μετρήσεις του $^{\circ}\text{Be}$ καθημερινά έως το τέλος της ζύμωσης. Με βάση τις μετρήσεις και τα αποτελέσματα ανάλυσης με HPLC (Άσκηση 4) συμπληρώνεται ένας Πίνακας αντίστοιχος του Πίνακα 1 (Άσκηση 5) και οι τιμές παρουσιάζονται γραφικά.



Εικόνα 2. Πιλοτικής κλίμακας βιοαντιδραστήρας συνεχούς λειτουργίας, συνολικού όγκου 70 L.

ΑΣΚΗΣΗ 4

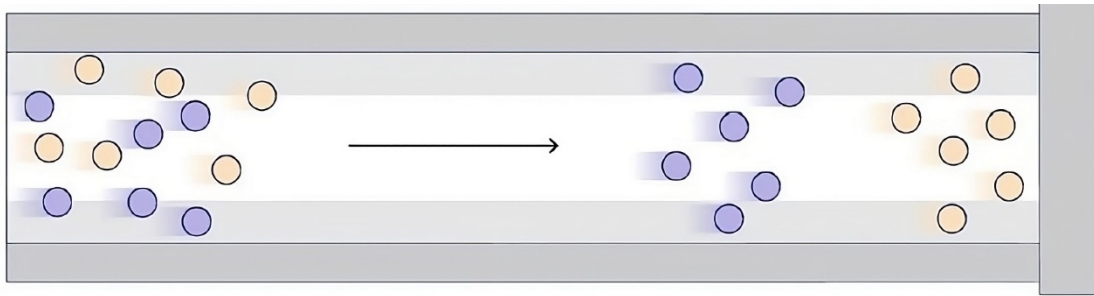
Ανάλυση Προϊόντων Ζύμωσης με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο όρος χρωματογραφία (chromatography) περιλαμβάνει πλήθος αναλυτικών τεχνικών που εφαρμόζονται κοινώς στον διαχωρισμό των συστατικών μιγμάτων ουσιών. Οι χρωματογραφικές τεχνικές διαχωρισμού εφαρμόζονται ευρύτατα για τη διαπίστωση της παρουσίας ή μη συστατικών σε μίγματα τα οποία περιέχουν ένα περιορισμένο αριθμό άλλων ουσιών/προσμίξεων, γνωστής, ως επί το πλείστον, ταυτότητας. Η επιβεβαίωση της ταυτότητας των συστατικών του μίγματος προαπαιτεί τον χρωματογραφικό διαχωρισμό αυτών, με σκοπό την απομόνωσή τους. Ακολουθεί ανάλυση των απομονούμενων συστατικών με χημικές ή φασματοσκοπικές τεχνικές.

Πέραν των εφαρμογών της στην κλινική ανάλυση, η χρωματογραφία χρησιμοποιείται ευρύτατα στην ανάλυση τροφίμων και περιβαλλοντικών δειγμάτων, στη βιοχημική έρευνα, όπως και στην καθημερινή πρακτική ενός αναλυτικού εργαστηρίου, κλπ. Σε συνδυασμό με επακόλουθη συζευγμένη τεχνική ανίχνευσης, όπως UV/Vis, Mass Spectrometry (MS), δείκτη διάθλασης (Refractive Index - RI), η χρωματογραφία αποτελεί το αναγκαίο στάδιο, όχι μόνο για τον ποιοτικό χαρακτηρισμό, αλλά και τον ποσοτικό προσδιορισμό των διαχωριζόμενων ουσιών, μεταβολιτών, φαρμάκων, κ.α. Ειδικότερα, για τον προσδιορισμό σακχάρων και οργανικών οξέων σε βιολογικά δείγματα και δείγματα τροφίμων κατάλληλος ανιχνευτής αποτελεί ο RI. Αναλυτικότερα, ανιχνευτής RI μετρά τις μεταβολές του δείκτη διάθλασης του κινούμενου υγρού, καθώς διέρχεται από το κελί ροής, κάνοντας σύγκριση με αντίστοιχο κελί αναφοράς. Οι διαφορές στον δείκτη διάθλασης προκαλούνται από την παρουσία διαλυμένων συστατικών, όπως σάκχαρα και οργανικά οξέα, επιτρέποντας τον ποσοτικό τους προσδιορισμό.

Κάθε χρωματογραφική τεχνική περιλαμβάνει μία κινητή φάση (mobile phase), η οποία ρέει μεταφέροντας τις διαχωριζόμενες ουσίες – συστατικά ενός μίγματος – μέσω μίας στατικής φάσης (static phase). Η κινητή φάση αποτελείται από ένα διαλύτη ή σύστημα διαλυτών, ενώ η στατική φάση από πορώδες στερεό υλικό ή από υγρό καθηλωμένο σε στερεό υπόστρωμα. Ο διαχωρισμός των συστατικών στη χρωματογραφία βασίζεται στο διαφορετικό βαθμό αλληλεπίδρασης του κάθε συστατικού με τις δύο φάσεις, ο οποίος καθορίζεται από την αγκιστεία (φυσικοχημική συγγένεια) του συστατικού με την κάθε φάση. Κάθε μόριο μίας ουσίας, κατά τη μετανάστευσή του διαμέσω της στήλης μετακινείται πάρα πολλές φορές μεταξύ της κινητής φάσης (όπου διαλύεται) και της στατικής φάσης (όπου προσροφάται ή κατανέμεται ή δεσμεύεται λόγω αγκιστείας κ.τ.λ.) και αντίστροφα (Σχήμα 4).



Σχήμα 4. Αρχή διαχωρισμού συστατικών μίγματος με την τεχνική της χρωματογραφίας. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται βάσει της διαφορετικής αγκιστείας των συστατικών με την κινητή και στατική φάση. Αναπαρίσταται η πορεία μορίων δύο διαφορετικών ουσιών διαμέσου μίας στήλης. Το κίτρινο μόριο κατανέμεται πιο σημαντικά στην κινητή φάση και συνεπώς παρασύρεται από αυτήν ταχύτερα, διότι δεν αλληλεπιδρά ισχυρά με τη στατική φάση. Αντίθετα, το μπλε μόριο αλληλεπιδρά ισχυρότερα με τη στατική φάση, με αποτέλεσμα να επιβραδύνεται. Κατά συνέπεια, το μπλε συστατικό θα κινείται βραδύτερα από το κίτρινο, με αποτέλεσμα το διαχωρισμό τους.

Υγρή Χρωματογραφία και Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης

Στην υγρή χρωματογραφία (Liquid Chromatography ή LC), η κινητή φάση είναι υγρή, ενώ η στατική φάση μπορεί να είναι στερεή ή υγρή. Η LC βρίσκει ευρύτατη εφαρμογή, καθώς οι περισσότερες μη πτητικές και θερμοευαίσθητες ενώσεις διαχωρίζονται αποκλειστικά με αυτή.

Η χρωματογραφία HPLC (High Pressure Liquid Chromatography ή High Performance Liquid Chromatography – Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης ή Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης) αποτελεί σημαντικά εξελιγμένη μορφή της υγρής χρωματογραφίας στήλης, όπου η κινητή φάση πλέον δεν ρέει υπό την επίδραση της βαρύτητας, αλλά με τη βοήθεια αντλίας (το σύστημα βρίσκεται υπό πίεση). Αυτό επιταχύνει την ανάλυση και επιτρέπει τη χρήση χρωματογραφικών στηλών με μικρό μέγεθος σωματιδίων υλικού πλήρωσης. Η χρήση μικρού μεγέθους σωματιδίων υλικού πλήρωσης αυξάνει το εμβαδόν της επιφάνειας της στατικής φάσης που είναι διαθέσιμο να αλληλεπιδράσει με τα μόρια που μεταφέρονται μέσω της κινητής φάσης. Κατά συνέπεια, βελτιώνεται ο διαχωρισμός των αναλυόμενων μορίων και μειώνεται σημαντικά το μέγεθος της στήλης που απαιτείται για έναν διαχωρισμό (Καρκαλούσος, 2015).

Οργανολογία HPLC

Μία βασική εργαστηριακή διάταξη υγρής χρωματογραφίας περιλαμβάνει τα παρακάτω επιμέρους μέρη και φαίνεται στην Εικόνα 1:

- Περιέκτες διαλυτών: Οι διαλύτες που θα αποτελέσουν την κινητή φάση βρίσκονται αποθηκευμένοι σε ειδικές φιάλες. Η κινητή φάση είναι απαραίτητη για τη μεταφορά των δειγμάτων μέσα από το σύστημα της υγρής χρωματογραφίας.

- Απαερωτής κενού: Ο απαερωτής εξασφαλίζει την απαέρωση της κινητής φάσης, ώστε να είναι εφικτός ο έλεγχος της πίεσης στη χρωματογραφική στήλη.
 - Αντλία (pump): Η αντλία εξασφαλίζει τη συνεχή άντληση και προώθηση της κινητής φάσης διαμέσου του συνόλου του συστήματος, από τους περιέκτες των διαλυτών μέχρι το δοχείο συλλογής των αποβλήτων του συστήματος, υπό ρυθμιζόμενη υψηλή πίεση και ροή.
 - Σύστημα εισαγωγής δείγματος (injection system/ injector valve): περιλαμβάνει βρόγχο σταθερού όγκου ή αυτόματο σύστημα εισαγωγής, μεταβλητού (προεπιλεγμένου) όγκου έγχυσης. Βρίσκεται πριν τη χρωματογραφική στήλη και επιτρέπει την εισαγωγή του δείγματος στη ροή της κινητής φάσης.
 - Χρωματογραφική στήλη (column): στη στήλη επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός του μίγματος στα συστατικά του. Εφόσον ο διαχωρισμός καθορίζεται και από τη θερμοκρασία, η στήλη εμπεριέχεται σε θερμοστατούμενο κλίβανο (column oven).
 - Ανιχνευτής (detector): Η ανίχνευση των ουσιών που εξέρχονται της στήλης γίνεται συνεχώς, κυρίως με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης ή φασματομετρία UV/Vis.



Εικόνα 3. Τυπική εργαστηριακή διάταξη χρωματογραφίας HPLC (Shimadzu Corp., Duisburg, Germany).

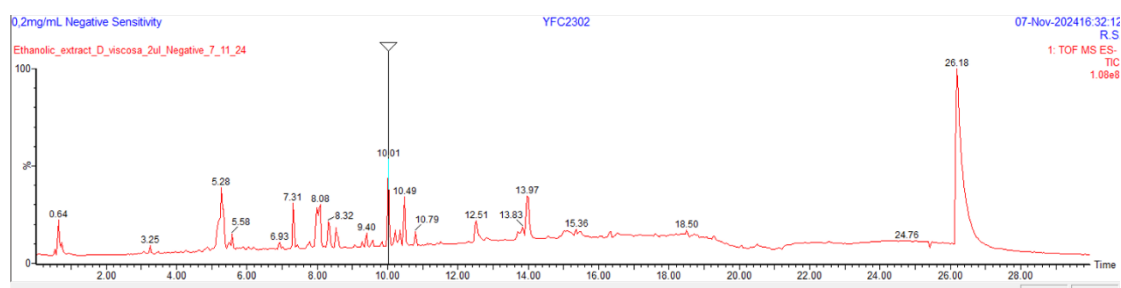
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Υλικά και συσκευές

- Διάταξη συστήματος HPLC με ανιχνευτή Refractive index (RI)
- Χρωματογραφική στήλη αποκλεισμού ιόντων (ion-exclusion)
- Διάλυμα H_2SO_4 0.049 g/L (κινητή φάση)
- Σύριγγες των 10 mL για τη συλλογή δείγματος
- Φίλτρα nylon διατομής 0.22 μm
- Υπερκείμενο διάλυμα ανεπτυγμένης καλλιέργειας
- HPLC grade dH_2O
- Eppendorf των 2 mL
- Λογισμικό ανάλυσης δεδομένων HPLC

Πειραματική διαδικασία

Μετά το τέλος της ζύμωσης του θρεπτικού μέσου της επιλογής μας από τα κύτταρα της ζύμης αφαιρούμε ποσότητα ~5 mL, την οποία την φιλτράρουμε με χρήση nylon φίλτρων διατομής 0.22 μm . Στη συνέχεια, 2 mL από το φιλτραρισμένο διάλυμα τοποθετείτε σε καθαρό eppendorf, το οποίο σημαίνεται και με τον κωδικό της κάθε εργαστηριακής ομάδας. Από το δείγμα αυτό πραγματοποιείται απευθείας ένεση δείγματος όγκου 20 μL στον δειγματολήπτη της HPLC. Η ανάλυση κάθε δείγματος διαρκεί 40 min και η ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιείται μέσω χρήσης του λογισμικού Lab Solutions (Shimadzu Corp.) και χρήση πρότυπων ενώσεων. Η ταυτοποίηση των ενώσεων επιτυγχάνεται από τον χρόνο έκλουσης πρότυπων ενέσεων, ενώ ο ποσοτικός προσδιορισμός μέσω πρότυπων καμπυλών.



Εικόνα 4. Παράδειγμα χρωματογραφήματος HPLC από την ανάλυση υδατικού φυτικού εκχυλίσματος.

ΑΣΚΗΣΗ 5

Υπολογισμός Κινητικών Παραμέτρων Ζύμωσης

Κινητικές παράμετροι

Στις βιομηχανικές ζυμώσεις είναι απαραίτητος ο υπολογισμός συγκεκριμένων 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:

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

Πίνακας 1. Παράδειγμα κινητικών παραμέτρων αλκοολικής ζύμωσης μελάσας με ακινητοποιημένα 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 (g·L ⁻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

Παράδειγμα Υπολογισμού κινητικών παραμέτρων

Πρόβλημα:

Έστω ένας βιομηχανικός βιοαντιδραστήρας στήλης ακινητοποιημένων κυττάρων συνεχούς λειτουργίας παραγωγής βιοκαυσίμων (βιοαιθανόλης), ο οποίος βρίσκεται σε σταθερή κατάσταση (steady state). Με δεδομένα ότι ο συνολικός όγκος του βιοαντιδραστήρα είναι 5.000 L, ο υγρός όγκος 4.200 L, η παροχή του εισερχόμενου ρεύματος 750 L/h, η συγκέντρωση σακχάρου του εισερχόμενου ρεύματος 220 g/L, η συγκέντρωση σακχάρου του εξερχόμενου ρεύματος 25 g/L και η συγκέντρωση του προϊόντος (αιθανόλης) 9.5% (v/v), να υπολογιστούν:

A) ο ρυθμός αραίωσης (dilution rate) βάσει του υγρού και συνολικού όγκου,

B) η παραγωγικότητα αιθανόλης (σε g/Lh) βάσει του υγρού όγκου,

Γ) η απόδοση σε αιθανόλη (ethanol yield factor), και

Δ) το % ποσοστό μετατροπής (% conversion).

Δίνεται η πυκνότητα της αιθανόλης (0.79g/mL).

Λύση:

Δεδομένα:

Συνολικός όγκος βιοαντιδραστήρα: $V_{\text{total}} = 5000 \text{ L}$

Υγρός όγκος: $V = 4200 \text{ L}$

Παροχή εισερχόμενου ρεύματος: $F = 750 \text{ L/h}$

Συγκέντρωση εισερχόμενου σακχάρου: $S_{\text{input}} = 220 \text{ g/L}$

Συγκέντρωση εξερχόμενου σακχάρου: $S_{\text{output}} = 25 \text{ g/L}$

Συγκέντρωση αιθανόλης: $C_{\text{EtOH}} = 9.5\% \text{ v/v}$

Πυκνότητα αιθανόλης: $\rho_{\text{EtOH}} = 0.79 \text{ g/mL}$ ή $\rho_{\text{EtOH}} = 790 \text{ g/L}$

A) ρυθμός αραίωσης (DF)

$$DF = F/V$$

Βάσει του υγρού όγκου $V=4200 \text{ L}$:

$$DF = \frac{750}{4200} = 0.1786 \text{ 1/h}$$

Βάσει του συνολικού όγκου $V_{\text{total}}=5000 \text{ L}$:

$$DF = \frac{750}{5000} = 0.15 \text{ 1/h}$$

Επομένως:

- $D = 0.1786 \text{ h}^{-1}$ (βάσει υγρού όγκου)
- $D_{\text{total}} = 0.15 \text{ h}^{-1}$ (βάσει συνολικού όγκου)

Β) παραγωγικότητα αιθανόλης (Pr) (σε g/Lh) βάσει του υγρού όγκου

$$Pr = C_{EtOH} \times \rho_{EtOH} \times D$$

Δεδομένου ότι η συγκέντρωση αιθανόλης (C_{EtOH}) είναι **9.5% v/v**, η πυκνότητα (ρ_{EtOH}) **790 g/L** και ο ρυθμός αραίωσης υγρού όγκου (D) **0.1786 h⁻¹** αυτό σημαίνει:

$$Pr = \frac{9.5}{100} \times 790 \times 0.1786 = 75.05 \times 0.1786 = 13.4 \text{ g/Lh}$$

Άρα η παραγωγικότητα είναι **13.4 g/Lh**.

Γ) απόδοση σε αιθανόλη (Y_{EtOH})

$$Y_{EtOH} = \frac{P_{EtOH}}{S_{input} - S_{output}}$$

Όπου P_{EtOH} είναι η συγκέντρωση αιθανόλης στο διάλυμα σε g/L και υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$P_{EtOH} = C_{EtOH} \times \rho_{EtOH} = \frac{9.5}{100} \times 790 = 75.05 \text{ g/L}$$

Δεδομένου, λοιπόν, ότι η συγκέντρωση αιθανόλης είναι **75.05 g/L**, η συγκέντρωση εισερχόμενου σακχάρου (Sinput) **220 g/L** και η συγκέντρωση εξερχόμενου σακχάρου (Soutput) **25 g/L** αυτό σημαίνει:

$$Y_{EtOH} = \frac{75.05}{220 - 25} = 0.385 \frac{g \text{ EtOH}}{g \text{ σακχάρου}}$$

Άρα η απόδοση σε αιθανόλη είναι **0.385 g EtOH/g σακχάρου**.

Δ) % ποσοστό μετατροπής (Con).

$$Con = \frac{Sinput - Soutput}{Sinput} \times 100$$

Όμοια, δεδομένου ότι, η συγκέντρωση εισερχόμενου σακχάρου (Sinput) είναι **220 g/L** και η συγκέντρωση εξερχόμενου σακχάρου (Soutput) **25 g/L** αυτό σημαίνει:

$$Con = \frac{220 - 25}{220} \times 100 = 88.64\%$$

Άρα η απόδοση είναι **88.64%**.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Giese, E.C.; Silva, D.D.V.; Costa, A.F.M.; Almeida, S.G.C.; Dussán, K.J. Immobilized microbial nanoparticles for biosorption. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2020**, *40*, 653–666. <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1751583>.

Guisan, J.M. New opportunities for immobilization of enzymes. *Methods Mol. Biol.* **2013**, *1051*, 1–13. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-550-7_1.

Kourkoutas, Y.; Bekatorou, A.; Banat, I.M.; Marchant, R.; Koutinas, A.A. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: A review. *Food Microbiol.* **2004**, *21*, 377–397. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2003.10.005>.

Kumar, R.; Raj, T.; Næss, G.; Sørensen, M.; Dhawan, V. Opportunities and challenges in single-cell protein production using lignocellulosic material. *Biofuels, Bioprod. Biorefin.* **2024**, *18*, 310–321.

Lapponi, M.J.; Méndez, M.B.; Trelles, J.A.; Rivero, C.W. Cell immobilization strategies for biotransformations. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* **2022**, *33*, 100565. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2021.100565>.

Mitropoulou, G.; Nedovic, V.; Goyal, A.; Kourkoutas, Y. Immobilization technologies in probiotic food production. *J. Nutr. Metab.* **2013**, *2013*, 716861. <https://doi.org/10.1155/2013/716861>.

Sekoai, P.T.; Awosusi, A.A.; Yoro, K.O.; Singo, M.; Oloye, O.; Ayeni, A.O.; Bodunrin, M.; Daramola, M.O. Microbial cell immobilization in biohydrogen production: a short overview. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2018**, *38*, 157–171. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1312274>.

Καρκαλούσος, Π., Γεωργίου, Ζ., Κρούπης, Χ., Παπαϊωάννου, Α., Πλαγεράς, Π., Σπυρόπουλος, Β., Τσότσου, Γ., & Φούντζουλα, Χ. (2015). Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (απόδοσης) στην κλινική χημεία. Βασικές αρχές και παραδείγματα. [Κεφάλαιο]. Στο Καρκαλούσος, Π., Γεωργίου, Ζ., Κρούπης, Χ., Παπαϊωάννου, Α., Πλαγεράς, Π., Σπυρόπουλος, Β., Τσότσου, Γ., & Φούντζουλα, Χ. 2015. Εργαστηριακές ασκήσεις κλινικής χημείας [Εργαστηριακός Οδηγός]. Κάλλιπος, Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις. <https://hdl.handle.net/11419/5388>

Νέλιος, Γ. Σχεδιασμός και ανάπτυξη καινοτόμων λειτουργικών τροφίμων με ακινητοποιημένες καλλιέργειες ευεργετικών μικροοργανισμών. Διδακτορική Διατριβή, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Τμήμα Μοριακής Βιολογίας & Γενετικής, Αλεξανδρούπολη, Ελλάδα, 2024.