

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ

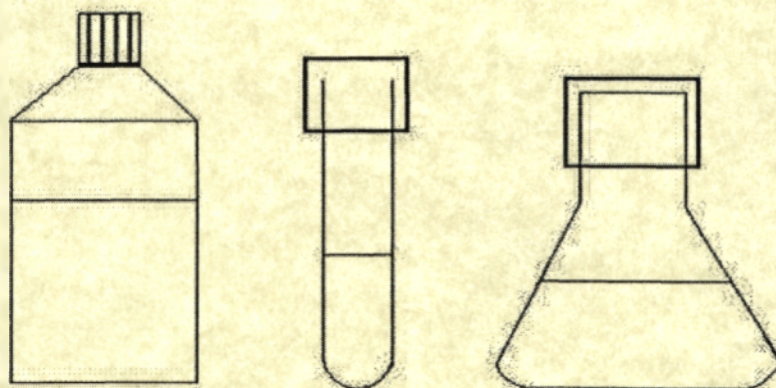
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΩΝ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΣΙΤΑΡΙΟΥ



ΤΑΛΙΟΥΡΑΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

ΚΑΛΑΜΑΤΑ 2011

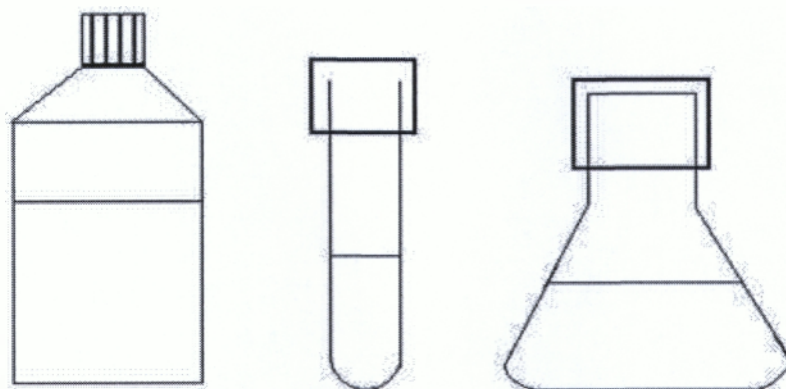
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΩΝ
ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΣΙΤΑΡΙΟΥ**



ΤΑΛΙΟΥΡΑΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

ΚΑΛΑΜΑΤΑ 2011

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Εισαγωγή.....	4
2. Ιστορική αναδρομή.....	5
3. Η θέση της βιοτεχνολογίας στον 21 ^ο αιώνα	7
4. Μικροβιακές καλλιέργειες.....	7
5. Τρόποι ανάπτυξης των μικροοργανισμών.....	9
6. Βιομάζα και βιοκαύσιμα – Οι δυνατότητες των σιτηρών.....	13
7. Τα δημητριακά.....	15
8. Το σιτάρι.....	16
8.1. Προέλευση και εξέλιξη.....	16
8.2. Επιστημονική ονομασία και χρήσεις σιταριού.....	18
8.3. Αλεύρι το σπουδαιότερο προϊόν του σιταριού.....	19
8.4. Ψωμί.....	20
8.5. Τα ζυμαρικά.....	21
9. Βιοαντιδραστήρες.....	25
9.1. Βιοαντιδραστήρας καθορισμένης δομής.....	26
9.2. Βιοαντιδραστήρες ασυνεχούς λειτουργίας (Batch reactors)	26
9.3. Βιοαντιδραστήρες συνεχούς λειτουργίας.....	28
9.4. Αντιδραστήρες αναδευόμενου δοχείου (Stirred-tank reactors).....	28
9.5. Αντιδραστήρες ρευστής κλίνης ή διογκωμένοι (Fluidized or expanded bed reactors).....	28
9.6. Αντιδραστήρες σταθερής κλίνης (Fixed or packed bed reactors).....	29
9.7. Βιοαντιδραστήρας ΖΣΚ.....	30
9.8. Βιοαντιδραστήρας με δίσκους.....	30
9.9. Βιοαντιδραστήρας στερεάς κλίνης.....	31
9.10. Βιοαντιδραστήρας περιστρεφόμενου τυμπάνου.....	32
9.11. Βιοαντιδραστήρας με ανάδευση.....	33
9.12. Βιοαντιδραστήρας ρευστοποιημένης κλίνης.....	33

10.	Βιομετασχηματισμός σωματιδίων.....	34
10.1.	Εισαγωγή.....	34
10.1.1.	Βιομετασχηματισμός σωματιδίων.....	37
10.2	Υλικό και μέθοδοι.....	42
10.2.1.	Μικροοργανισμοί.....	42
10.2.2.	Προετοιμασία των μέσων ζύμωσης.....	43
10.2.3.	Πειραματική προεργασία.....	43
10.2.4.	Αναλυτικές μέθοδοι.....	46
10.3.	Αποτελέσματα και συζήτηση.....	48
10.3.1.	Παραγωγή πρώτης ύλης από βιομετασχηματισμό σωματιδίων.....	48
10.3.2.	Βελτιώνοντας την εξόρυξη των πρώτων υλών.....	57
10.3.3.	Αξιολόγηση των πρώτων υλών που ελήφθησαν από βιομετασχηματισμό σωματιδίων.....	60
10.4.	Συμπεράσματα.....	63
11.	Παραγωγή πολυ-υδροξυβουτυρικών από μια νέα πρώτη ύλη που προέρχεται από έναν βιοαντιδραστήρα με βάση το σιτάρι.....	65
11.1.	Αναλυτικές μέθοδοι.....	65
11.2.	Αποτελέσματα.....	66

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι να αναδείξει τις δυνατότητες χρήσης και εφαρμογής των τεχνικών βιοτεχνολογίας κάνοντας ιδιαίτερη μνεία στη χρήση του σιταριού ως πρώτης ύλης.

Ο υπερπληθυσμός, η φτώχεια και οι πανδημίες του τρίτου κόσμου (επηρεάζουν πάνω από 2 δισ. ανθρώπους), τα περιβαλλοντικά προβλήματα, νέες ασθένειες – ιώσεις, η ενεργειακή κρίση, η οικονομική και πολιτική αστάθεια θα σημαδέψουν τον 21^ο αιώνα. Αναμφίβολα ένα από τα σημαντικότερα διεθνή προβλήματα είναι η πείνα στις χώρες κυρίως του τρίτου κόσμου.

Ο αιώνας αυτός θα είναι όμως και μια περίοδος μεγάλων τεχνολογικών και επιστημονικών επιτευγμάτων με τα οποία θα επιδιωχθεί να δοθεί λύση στις νέες προκλήσεις.

Η βιοτεχνολογία, το άσπρο πρόβατο της παγκοσμιοποίησης με τις καινοτόμες εφαρμογές της στην ιατρική, τη βιομηχανική παραγωγή και την ενέργεια, δεν θα είναι πανάκεια αλλά σίγουρα θα βελτιώσει τη ζωή και πολλούς ποιοτικούς της δείκτες σε όλο τον κόσμο.¹

Σύμφωνα με τον επικρατέστερο ορισμό ως βιοτεχνολογία μπορεί να οριστεί η τεχνολογία των βιολογικών διεργασιών με χρήση οργανισμών, των μερών ή των επεξεργασιών τους, για την κατασκευή ή παραγωγή χρήσιμων ή εμπορικά αξιοποιήσιμων ουσιών, καθώς και για την παροχή υπηρεσιών προς όφελος του ανθρώπου.²

Ο όρος υποδηλώνει ένα ευρύ φάσμα διαδικασιών, από τη χρήση γαιοσκωλήκων για παραγωγή πρωτεΐνης μέχρι την παραγωγή ανθρώπινων γονιδίων, όπως η ορμόνη ανάπτυξης. Στα βιοτεχνολογικά προϊόντα περιλαμβάνονται φαρμακευτικές πρωτεΐνες, τροφές, απορρυπαντικά κ.α., ενώ στις υπηρεσίες περιλαμβάνεται ένα πλήθος εφαρμογών, από την επεξεργασία λυμάτων και αποβλήτων ως την ιατρική διάγνωση, ή τα επιτεύγματα της γονιδιακής θεραπείας.³

Αν και ως όρος η βιοτεχνολογία είναι πρόσφατος, ως δραστηριότητα είναι τόσο παλιά όσο και η παραγωγή μπύρας από τη ζύμωση κριθαριού και η παραγωγή ψωμιού πριν

¹ FAOSTAT2011 <http://faostat.fao.org>

² Βουρδούμπας Ιωάννης 2002 «Εισαγωγή στις Τεχνολογίες της Ενεργειακής Αξιοποίησης της Βιομάζας»

³ ΚΑΠΕ (Κέντρο Ανανεώσιμων Πηγών Ενέργειας) 2006 «Ενεργειακές καλλιέργειες για την παραγωγή υγρών και στερεών καυσίμων στην Ελλάδα»

9.000 χρόνια στη Βαβυλώνα. Η σημερινή βιοτεχνολογία αξιοποιεί τα σύγχρονα επιτεύγματα της μοριακής βιολογίας και χρησιμοποιεί ένα πλήθος τεχνικών, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται η γενετική μηχανική (ανασυνδυασμένο DNA), μέθοδοι ιστομηχανικής και καλλιέργειών κυττάρων σε μεγάλη κλίμακα, η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης κλπ.

Έχει πλήθος εφαρμογών στις επιστήμες υγείας, στην προστασία του περιβάλλοντος (λ.χ. χρήση της στη διαχείριση αποβλήτων), στη γεωργία, στην κτηνοτροφία και στη βιομηχανία. Από κοινού με τη βιοϊατρική τεχνολογία, η οποία αφορά στην ανάπτυξη τεχνολογιών με εφαρμογές στην ιατρική, η βιοτεχνολογία αποκαλείται ορισμένες φορές βιολογική μηχανική.³

2. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Είναι συχνό το φαινόμενο το ευρύ κοινό να έχει τη λανθασμένη αντίληψη ότι η βιοτεχνολογία είναι μια σύγχρονη επιστήμη. Η αντίληψη αυτή απέχει κατά πολύ από την πραγματικότητα, καθώς οι ζωντανοί οργανισμοί δεν είναι σε χρήση μόνο στις μέρες μας. Ανέκαθεν οι άνθρωποι ήταν εξοικειωμένοι με τη χρήση τους σε διάφορες εκφάνσεις της ζωής τους. Οι διαδικασίες αυτές γίνονταν κυρίως ύστερα από τυχαίες ανακαλύψεις ή βάση της εμπειρικής παρατήρησης των φαινομένων. Έτσι, οι ζωντανοί οργανισμοί χρησιμοποιούνταν ευρέως για την παρασκευή διαφόρων προϊόντων όπως το ψωμί, η μύρα και το κρασί. Είναι γνωστό ότι εδώ και δέκα χιλιάδες περίπου χρόνια η βιοτεχνολογία χρησιμοποιείται είτε εκούσια είτε ακούσια από τον άνθρωπο. Τέτοια παραδείγματα έχουν να προσφέρουν διάφοροι αρχαίοι πολιτισμοί όπως οι Βαβυλώνιοι, οι Αιγύπτιοι και οι Ρωμαίοι, που χρησιμοποίησαν κάποιες τεχνικές για την παραγωγή προϊόντων διατροφής, αλλά και για τη βελτίωση των σοδειών τους.

Περί τα έξι χιλιάδες χρόνια πριν, οι πρώτοι κάτοικοι της λεκάνης της Μεσογείου ήταν σε θέση να παράγουν κρασί, μύρα και ψωμί κάνοντας χρήση της διαδικασίας της ζύμωσης.

Δύο χιλιάδες χρόνια αργότερα, οι Κινέζοι, είχαν τη δυνατότητα να παρασκευάσουν γιαούρτι χρησιμοποιώντας γαλακτικό οξύ και να παρασκευάσουν ακόμα και τυρί χρησιμοποιώντας κάτι που έμοιαζε με μούχλα.⁴

⁴ Εγκυκλοπαίδεια «Πάπυρος Λαρούς Μπριτάννικα», том. 11, σελ. 448-463.

Παγκοσμίως, σε ότι αφορά στη γεωργική καλλιέργεια, οι πλείστοι λαοί είχαν εξοικειωθεί με εξελιγμένες για τα δεδομένα τους τεχνικές, αφού, όπως έχει διαπιστωθεί, χρησιμοποιούσαν συγκεκριμένους σπόρους, οι οποίοι έφεραν κάποια από τα επιθυμητά χαρακτηριστικά που ήθελαν να προσδώσουν στις καλλιέργειές τους.

Στα τέλη του 19ου αιώνα η βιολογία σημείωσε τεράστια πρόοδο. Ανακαλύφθηκαν μικροοργανισμοί και επίσης ανακαλύφθηκε η μέθοδος της παστερίωσης. Πειράματα βιολογίας με γενετικό χαρακτήρα άρχισαν να διενεργούνται από τον Gregor Mendel, ο οποίος χρησιμοποίησε σπόρους σε πειράματα με φυτά. Ο όρος Βιοτεχνολογία χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1919 από τον Ούγγρο Καρκ Ερέγκυ, μηχανικό στο επάγγελμα, ο οποίος ήθελε να περιγράψει «τη διαδικασία παραγωγής προϊόντων από ακατέργαστα υλικά με χρήση ζωντανών οργανισμών». ⁵

Η βιοτεχνολογία συνδύασε κατ' αυτό τον τρόπο την αγροκαλλιέργεια με τη βιομηχανία στις αρχές του εικοστού αιώνα. Διάφορες τεχνικές ζύμωσης εξελίχθηκαν και αναπτύχθηκαν για να παραχθούν προϊόντα ευρείας χρήσης από άμυλο, όπως είναι το «ασετόν» (ακετόνη) και διαλύτες χρωμάτων που χρησιμοποιούνταν για τα αυτοκίνητα ή για άλλου είδους μηχανές. ⁶

Ανάμεσα στα έτη 1930 και 1952 οι ερευνητές επικεντρώθηκαν στη σχέση μεταξύ γονιδίων και πρωτεϊνών. Διαπιστώθηκε άμεση σχέση μεταξύ των μεταλλάξεων ενός γονιδίου και της σειράς των αμινοξέων σε πρωτεΐνες. Η ανακάλυψη της πενικιλίνης κατά το δεύτερο παγκόσμιο πόλεμο οδήγησε στην εστίαση της προσοχής πάνω στη χρήση των φαρμακευτικών προϊόντων. Η εποχή του "Ψυχρού Πολέμου" ήταν η κατεξοχήν περίοδος όπου αναπτύχθηκαν εργασίες με μικροοργανισμούς στην προετοιμασία για το ενδεχόμενο ενός βιολογικού πολέμου και την παραγωγή περισσότερων αντιβιοτικών. ⁷ Η συσσωρευμένη γνώση για την κυτταρική δομή, την Βιοχημεία και την κληρονομικότητα του είδους ανοίγει την πόρτα στη σύγχρονη μοριακή βιολογία και βιοτεχνολογία. Στα 1985 σχεδιάστηκε μια χάρτα για την παρακολούθηση και την αλληλουχία του ανθρώπινου γονιδιώματος. Ονομάστηκε «Human Genome Initiative» με αντικειμενικό στόχο την αποκάλυψη των 80.000 με 100.000 ανθρωπίνων γονιδίων. ⁸

⁵ Εγκυκλοπαίδεια «Υδρία», том 3, σελ. 256.

⁶ <http://www.beg.gr>

⁷ <http://www.ecoreg.gr>

⁸ Merloyd Lawrence, « Drawing the Map of Life: Inside the Human Genome Project» εκδ. Περασάς 2010.

3. Η ΘΕΣΗ ΤΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΟΝ 21^ο ΑΙΩΝΑ

Σήμερα η βιοτεχνολογία αποτελεί συνδυασμό επιστήμης και τεχνολογίας με στόχο την εφαρμογή των γνώσεων που έχουν αποκτηθεί από τη μελέτη των ζωντανών οργανισμών για την παραγωγή σε ευρεία κλίμακα χρήσιμων προϊόντων. Τέτοια προϊόντα είναι για παράδειγμα η αλκοόλη, που παράγεται με ζύμωση, και η ανθρώπινη ινσουλίνη, που παράγεται από γενετικά τροποποιημένα βακτήρια. Η βιοτεχνολογία συνεισφέρει σε διάφορους τομείς, όπως είναι η ιατρική, η γεωργία, η κτηνοτροφία, η βιομηχανία και η προστασία του περιβάλλοντος.⁹

Στηρίζεται κυρίως σε τεχνικές καλλιέργειας και ανάπτυξης των μικροοργανισμών και σε τεχνικές συνδυασμένου DNA.¹⁰ Ο λόγος για τον οποίο στη βιοτεχνολογία χρησιμοποιούνται τεχνικές συνδυασμένου DNA είναι το ότι παρέχεται έτσι η δυνατότητα εισαγωγής νέων επιθυμητών ιδιοτήτων στους ζωντανούς οργανισμούς σε μικρότερο χρόνο και με μεγαλύτερη ακρίβεια απ' ό,τι στο παρελθόν. Τα τελευταία χρόνια έχουν επιτευχθεί σημαντικές εξελίξεις στον τομέα αυτό, οι οποίες δημιουργούν ελπίδες για την πραγματοποίηση τεχνικών τροποποίησης ιδιοτήτων των οργανισμών, κάτι που μέχρι τώρα υπήρχε μόνο σαν ιδέα.¹¹

4. ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Ένα από τα σημαντικότερα εργαλεία για την Βιοτεχνολογία αποτελούν οι μικροβιακές καλλιέργειες. Όταν οι συνθήκες είναι κατάλληλες, ορισμένοι μικροοργανισμοί αυξάνονται σε μέγεθος και διαιρούνται, αυτό έχει σαν αποτέλεσμα ασφαλώς ο αριθμός τους να αυξάνεται. Τα κύτταρα που προκύπτουν μετά από κάθε διαίρεση έχουν, όπως είναι αναμενόμενο, το ίδιο μέγεθος με τα κύτταρα που προϋπήρχαν.¹²

Ο ρυθμός ανάπτυξης ενός πληθυσμού μικροοργανισμών, δηλαδή ο ρυθμός με τον οποίο διαιρούνται τα κύτταρά του, καθορίζεται από το χρόνο διπλασιασμού. Κάθε είδος μικροοργανισμού έχει χαρακτηριστικό χρόνο διπλασιασμού. Οι παράγοντες που επηρεάζουν το χρόνο διπλασιασμού, και κατά συνέπεια και το ρυθμό ανάπτυξης των μικροοργανισμών, είναι η διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών, το οξυγόνο, η θερμοκρασία και το pH.¹³

⁹ Βιοτεχνολογικές εφαρμογές Ernest N. Savage, Albert G. Rossner, Gary D. Finke Εκδόσεις Ίων.

¹⁰ <http://www.el.wikipedia.org/wiki>

¹¹ Αθανάσιος Τσαυτάρης, «Η άλλη πλευρά της βιοτεχνολογίας», Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών,

¹² Νεραντζής Ηλίας «Βιοτεχνολογία και βιομηχανικές ζυμώσεις», Εκδ.Εμβryo, 2010.

¹³ <http://www.el.wikipedia.org/wiki>

Όπως άλλωστε όλοι οι ζωντανοί μικροοργανισμοί, προκειμένου ένας μικροοργανισμός να αναπτυχθεί χρειάζεται ορισμένα θρεπτικά συστατικά. Έτσι είναι απαραίτητο να προμηθεύεται από το περιβάλλον στο οποίο αναπτύσσεται, μια ομάδα από διάφορα θρεπτικά συστατικά. Σ αυτά συγκαταλέγονται και ο άνθρακας, το άζωτο, διάφορα μεταλλικά ιόντα και το νερό.¹⁴

Οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν ως πηγή C το CO₂ της ατμόσφαιρας ενώ για τους ετερότροφους χρησιμοποιούνται διάφορες οργανικές ενώσεις, όπως υδατάνθρακες. Για τους περισσότερους μικροοργανισμούς τα αμμωνιακά ή τα νιτρικά ιόντα αποτελούν και την πηγή απορρόφησης αζώτου.

Ο λόγος για τον οποίο τα μεταλλικά ιόντα είναι απαραίτητα στους μικροοργανισμούς είναι για να μπορούν να πραγματοποιούνται οι χημικές αντιδράσεις στο κύτταρο, αλλά είναι και εξίσου χρήσιμα ως συστατικά διαφόρων μορίων.¹³

Η ανάπτυξη αυτών των μικροοργανισμών επηρεάζεται σημαντικά από το pH, αφού οι περισσότεροι από αυτούς αναπτύσσονται σε pH 6-9. Υπάρχουν όμως μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται σε διαφορετικό pH, όπως είναι τα βακτήρια του γένους *lactobacillus* που αναπτύσσονται σε pH 4-5.

Άλλος ένας παράγοντας ο οποίος συμβάλλει στη ανάπτυξη των μικροοργανισμών είναι το οξυγόνο. Η παρουσία ή απουσία του μπορεί να βοηθήσει ή να αναστείλει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών.¹⁴

Εξαιτίας της σημασίας του οξυγόνου στην ανάπτυξή τους οι μικροοργανισμοί έχουν ταξινομηθεί ανάλογα με το βαθμό της παρουσίας του σε αυτή. Υπάρχουν οργανισμοί που απαιτούν υψηλή συγκέντρωση οξυγόνου. Αυτοί ονομάζονται υποχρεωτικά αερόβιοι, όπως τα βακτήρια του γένους *Mykobacterium*. Άλλοι μικροοργανισμοί, όπως οι μύκητες που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή άρτου, ανήκουν στην κατηγορία των μικροοργανισμών που αναπτύσσονται παρουσία οξυγόνου με ταχύτερο ρυθμό απ ότι στην απουσία του. Οι μικροοργανισμοί αυτοί ονομάζονται προαιρετικά αερόβιοι. Τέλος, υπάρχουν μικροοργανισμοί, όπως βακτήρια του γένους *Clostridium*, για τους οποίους το οξυγόνο είναι τοξικό. Αυτοί οι οργανισμοί ονομάζονται υποχρεωτικά αναερόβιοι.¹²

Άλλος ένας σημαντικότερος παράγοντας για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών είναι η θερμοκρασία. Καθορίζει δε σε μεγάλο βαθμό το ρυθμό της ανάπτυξης αυτής. Οι περισσότεροι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται άριστα σε θερμοκρασία 20-45 °C.

¹⁴ Κλώνης Ιωάννης, «Ενζυμική βιοτεχνολογία» 2010.

Το ίδιο ισχύει για μικροοργανισμούς που χρησιμοποιούνται σε πειράματα μοριακής βιολογίας.

Ωστόσο, ορισμένοι μικροοργανισμοί απαιτούν για την ανάπτυξή τους θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 45 °C, όπως αυτοί που αναπτύσσονται κοντά σε θερμοπηγές και άλλοι οι οποίοι αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες μικρότερες των 20°C.¹⁵

5. ΤΡΟΠΟΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Οι μικροοργανισμοί μπορούν να αναπτυχθούν τόσο σε ένα εργαστήριο, όσο και σε μεγαλύτερη κλίμακα, δηλαδή σε βιομηχανική κλίμακα.¹⁵ Οι μικροοργανισμοί, όπως έχει προαναφερθεί, χρησιμοποιούνται από τους επιστήμονες ήδη από τον 19ο αιώνα για την καλλιέργεια βακτηρίων και μυκήτων. Ο Louis Pasteur στο Παρίσι υπήρξε από τους πρωτοπόρους σ' αυτήν την προσπάθεια.

Για την καλλιέργεια των μικροοργανισμών είναι απαραίτητο αρχικά να απομονώσουμε τα διάφορα είδη βακτηριδίων και μυκήτων, να παρασκευαστούν κατάλληλα θρεπτικά συστατικά και να διαμορφωθούν οι κατάλληλες συνθήκες ανάπτυξης.¹⁶

Στις μέρες μας οι διάφοροι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή χρήσιμων προϊόντων όπως αντιβιοτικά ή ένζυμα αναπτύσσονται ως επί το πλείστον σε εργαστήρια και σε μεγάλη κλίμακα στις βιομηχανικές μονάδες κάτω από αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες καλλιέργειας.

Για την καλύτερη ανάπτυξη αυτών των μικροοργανισμών απαιτούνται κάποια υλικά, όπως τα τεχνητά θρεπτικά υλικά. Αυτά πρέπει να περιέχουν πηγή άνθρακα, πηγή αζώτου και ιόντα. Στην περίπτωση αερόβιων μικροοργανισμών είναι απαραίτητη η παρουσία οξυγόνου.

Τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών στο εργαστήριο μπορεί να είναι υγρά ή στερεά. Τα υγρά θρεπτικά συστατικά περιέχουν όλα τα απαραίτητα στοιχεία που προαναφέρθηκαν διαλυμένα σε νερό. Τα στερεά θρεπτικά υλικά παρασκευάζονται με ανάμιξη των υλικών με ένα πολυσακχαρίτη που προέρχεται από φύκη, το άγαρ. Το άγαρ είναι ρευστό σε

¹⁵ Ζουμπούλης Αναστάσιος και Μάτης Κ. Α., «Διεργασίες στη βιοτεχνολογία - Θεωρία και προβλήματα» Εκδόσεις Τζιόλα

¹⁶ Κυριακίδης Α. Δ., «Βιοτεχνολογία», εκδ. ΖΗΤΗ ΠΕΛΑΓΙΑ & ΣΙΑ Ο.Ε., 2000,

θερμοκρασίες πάνω από 45°C αλλά σε μικρότερες θερμοκρασίες παρουσιάζει την ιδιότητα να στερεοποιείται.¹⁷

Για την παραγωγή μικροοργανισμών είναι απαραίτητο να τηρηθεί μια συγκεκριμένη πορεία: αρχικά μια καλλιέργεια ξεκινάει με την προσθήκη μικρής ποσότητας κυττάρων στο θρεπτικό υλικό. Η διαδικασία αυτή είναι ευρέως γνωστή και διαδεδομένη με την ονομασία «εμβολιασμός».

Έπειτα, μετά τον εμβολιασμό, οι μικροοργανισμοί παραμένουν σε ένα κλίβανο που εξασφαλίζει σταθερή θερμοκρασία κατάλληλη για την ανάπτυξή τους. Με αυτό τον τρόπο εντός 12-76 ωρών παράγεται μεγάλος αριθμός βακτηρίων.

Η διατήρηση των καλλιεργειών αυτών απαιτεί διαδικασία ψύξης σε χαμηλές θερμοκρασίες στους -80 °C για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα. Για την αποφυγή ανάπτυξης άλλων μικροοργανισμών, εκτός εκείνων που πρόκειται να καλλιεργηθούν, τα θρεπτικά υλικά και οι συσκευές αποστειρώνονται πριν από την έναρξη της καλλιέργειας.¹⁸

Προκειμένου οι μικροοργανισμοί να καλλιεργηθούν σε μεγάλη κλίμακα (βιομηχανική καλλιέργεια) χρησιμοποιούνται κατάλληλες συσκευές που ονομάζονται βιοαντιδραστήρες ή ζυμωτές. Οι βιοαντιδραστήρες επιτρέπουν τον έλεγχο και τη ρύθμιση των συνθηκών (θερμοκρασία, pH, συγκέντρωση οξυγόνου) που αφορούν στην καλλιέργεια.

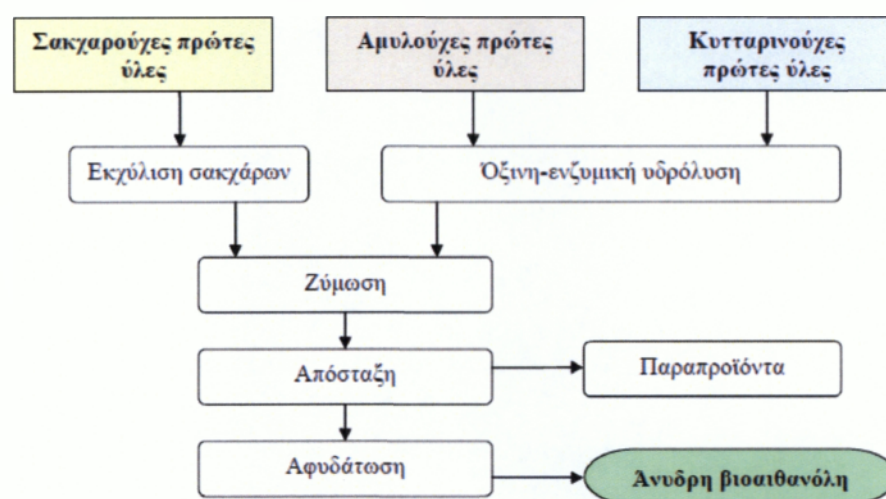
Στο θρεπτικό υλικό που προστίθεται στους βιοαντιδραστήρες, χρησιμοποιούνται φθηνές και οικονομικές πηγές άνθρακα, όπως η μελάσα, που αποτελεί παραπροϊόν της επεξεργασίας ζαχαροκάλαμου ή ζαχαρότευτλων.

Η καλλιέργεια στο βιοαντιδραστήρα ξεκινάει με τον εμβολιασμό από μια αρχική καλλιέργεια μικροοργανισμών που έχει γίνει στο εργαστήριο. Μέσα στο βιοαντιδραστήρα οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται χρησιμοποιώντας τα συστατικά του θρεπτικού υλικού. Είναι απαραίτητο όλες οι διεργασίες να πραγματοποιούνται κάτω από στείρες συνθήκες για να μη μολυνθεί με κάποιο τρόπο η καλλιέργεια. Ο ίδιος ο βιοαντιδραστήρας και το θρεπτικό υλικό αποστειρώνονται πριν από τη χρήση.

¹⁷ www.aenaon.net/gr/content/view/369/82/

¹⁸ [www.proz.com/Biology/\(-tech,-chem,micro-\)](http://www.proz.com/Biology/(-tech,-chem,micro-))

Η διαδικασία ανάπτυξης μικροοργανισμών σε υγρό θρεπτικό υλικό κάτω από οποιεσδήποτε συνθήκες ονομάζεται ζύμωση. Ο όρος ζύμωση στο παρελθόν χρησιμοποιείτο μόνο για την περιγραφή αναερόβιων διεργασιών, αλλά σήμερα χρησιμοποιείται με την ευρεία έννοια και περιλαμβάνει όλες τις διεργασίες αερόβιες και αναερόβιες.¹⁹



Τα προϊόντα της ζύμωσης είναι είτε τα ίδια τα κύτταρα, που ονομάζονται βιομάζα, είτε προϊόντα των κυττάρων, όπως πρωτεΐνες και αντιβιοτικά. Υπάρχουν διάφοροι τύποι ζυμώσεων οι οποίοι μπορούν να εφαρμοστούν ανάλογα με το επιθυμητό προϊόν. Δύο ευρέως χρησιμοποιούμενοι τύποι είναι η κλειστή και η συνεχής καλλιέργεια.²⁰

Η κλειστή καλλιέργεια πραγματοποιείται με τον εξής τρόπο: στο βιοαντιδραστήρα τοποθετείται αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό το οποίο εμβολιάζεται με αρχική καλλιέργεια μικροοργανισμών. Η διαδικασία συνεχίζεται μέχρις ότου επέλθει το επιθυμητό αποτέλεσμα για το τελικό προϊόν.¹⁹

Οι μικροοργανισμοί σε αυτό τον τύπο καλλιέργειας περνούν από την λανθάνουσα αρχικά φάση και έπειτα στην εκθετική φάση, για να ολοκληρώσουν τον κύκλο τους με τις δύο τελευταίες φάσεις που είναι η στατική και η φάση θανάτου. Κατά τη λανθάνουσα φάση ο αριθμός των μικροοργανισμών που προέρχεται από την αρχικά καλλιέργεια παραμένει σχεδόν σταθερός. Αυτό οφείλεται στο ότι οι μικροοργανισμοί

¹⁹ www.poukamisas.gr/ethnos/BIOLOGIA_KAT_-24.03_10

²⁰ gbt.aua.gr/el.

χρειάζονται κάποιο χρονικό διάστημα για να προσαρμοστούν στις καινούριες συνθήκες και να αρχίσουν να αναπτύσσονται.

Στη συνέχεια οι μικροοργανισμοί διαιρούνται με ταχύ ρυθμό, επειδή η καλλιέργεια πραγματοποιείται σε αυτό το στάδιο κάτω από τις καλύτερες δυνατές συνθήκες σε ό,τι αφορά στο επίπεδο του οξυγόνου, της θερμοκρασίας και του pH. Εξάλλου, και στο υλικό καλλιέργειας υπάρχουν κατά τη φάση αυτή άφθονα θρεπτικά συστατικά. Αυτή η φάση ανάπτυξης ονομάζεται εκθετική, επειδή ο αριθμός των μικροοργανισμών αυξάνεται με εκθετικό τρόπο.²¹

Κατά τη στατική φάση, η οποία ακολουθεί, ο πληθυσμός των μικροοργανισμών δεν αυξάνεται, λόγω εξάντλησης κάποιου θρεπτικού συστατικού ή λόγω συσσώρευσης τοξικών προϊόντων από το μεταβολισμό των μικροοργανισμών. Τέλος, κατά τη φάση θανάτου, ο αριθμός των μικροοργανισμών μειώνεται, παρ' ό,τι η διαδοχή των φάσεων ανάπτυξης σε κάθε κλειστή καλλιέργεια είναι συγκεκριμένη και η διάρκεια κάθε φάσης διαφέρει ανάλογα με το είδος των μικροοργανισμών. Οι μικροοργανισμοί παράγουν χρήσιμα προϊόντα συνήθως κατά τη διάρκεια της εκθετικής και της στατικής φάσης ανάπτυξής τους. Στον τύπο της συνεχούς καλλιέργειας οι μικροοργανισμοί τροφοδοτούνται συνεχώς με θρεπτικά συστατικά. Ταυτόχρονα, απομακρύνονται από την καλλιέργεια κύτταρα και άχρηστα προϊόντα.²²

Η τελική φάση κατεργασίας μιας καλλιέργειας απαιτεί τη χρήση τεχνικών καθαρισμού. Το προϊόν που παραλαμβάνεται από το βιοαντιδραστήρα περνά τη φάση της τελικής κατεργασίας καθαρισμού του προϊόντος. Σε πρώτη φάση γίνεται διαχωρισμός των υγρών από τα στερεά συστατικά, στα οποία συμπεριλαμβάνονται και τα κύτταρα. Αυτό γίνεται συνήθως με την τεχνική της διήθησης ή της φυγοκέντρωσης. Το επιθυμητό προϊόν μπορεί να περιλαμβάνεται στα στερεά ή τα υγρά συστατικά απ όπου παραλαμβάνεται με τη χρήση κατάλληλων μεθόδων. Τα προϊόντα ζύμωσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνο όταν είναι απόλυτα καθαρά και ακραιφνή, δηλαδή όταν δεν έχουν προσμείξεις. Γι αυτό και είναι απαραίτητη η διεργασία καθαρισμού του προϊόντος.²³

²¹ www.enveng.tuc.gr

²² www.bio.uth.gr

²³ www.pythia-biotechnology.com

6. ΒΙΟΜΑΖΑ ΚΑΙ ΒΙΟΚΑΥΣΙΜΑ - ΟΙ ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΣΙΤΗΡΩΝ.

Τα φυτά είναι ένας αένας μετατροπέας της ηλιακής ενέργειας, η οποία αποθηκεύεται σε χημική ενέργεια σε αυτά μέσω της φωτοσύνθεσης. Η βιομάζα τους έχει ουδέτερη (σχεδόν μηδενική) επίπτωση στο φαινόμενο του θερμοκηπίου, διότι η έκλυση CO₂ από την καύση της αντισταθμίζεται από την απορρόφησή του κατά τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης για τη δημιουργία ισόποσης βιομάζας.²⁴

Μετά την πετρελαϊκή κρίση του 1973, η βιομάζα έδειξε ότι αποτελεί μια σπουδαία πηγή ενέργειας, η οποία είναι δυνατόν να συμβάλλει στην ενεργειακή επάρκεια μετά την εξάντληση των αποθεμάτων του αργού πετρελαίου, του ορυκτού άνθρακα και του φυσικού αερίου και στη μείωση των εκπομπών των αερίων του θερμοκηπίου που συμμετέχουν στη θέρμανση της υδρογείου και τις κλιματικές αλλαγές.²⁵

Έχει υπολογιστεί ότι κατ' έτος, παράγονται παγκοσμίως μέσω της φωτοσύνθεσης περίπου 220 δισεκατομμύρια τόνοι ξηρής βιομάζας με ενεργειακό ισοδύναμο που αντιστοιχεί στο δεκαπλάσιο της παγκόσμιας κατανάλωσης ενέργειας.

Το δυναμικό της βιομάζας στην Ελλάδα από αγροτικά και δασικά υπολείμματα είναι εξαιρετικά μεγάλο. Εκτιμάται συνολικά σε 50.000 TJ ή 12.000 Kton, το οποίο ισοδυναμεί με το 50% της σημερινής ακαθάριστης εγχώριας κατανάλωσης ενέργειας. Αν σε αυτά προστεθεί και το δυναμικό που προκύπτει από τη δυνατότητα αξιοποίησης ενεργειακών καλλιεργειών, αντιλαμβάνεται κανείς ότι οι δυνατότητες εκμετάλλευσης της βιομάζας για ενεργειακούς σκοπούς είναι τεράστιες.²⁶

Η βιομάζα για ενεργειακούς σκοπούς, περιλαμβάνει κάθε τύπο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή στερεών, υγρών και αερίων καυσίμων. Τα υγρά βιοκαύσιμα χρησιμοποιούνται κυρίως στις μεταφορές, τα στερεά για παραγωγή θερμικής και ηλεκτρικής ενέργειας, ενώ τα αέρια βιοκαύσιμα έχουν πολλαπλές χρήσεις. Τα διάφορα είδη βιοκαυσίμων μπορούν να αντικαταστήσουν όλες οι μορφές ορυκτών καυσίμων, δηλαδή αντικατάσταση της βενζίνης από βιοαιθανόλη, του πετρελαίου κίνησης από βιοντήζελ, του πετρελαίου θέρμανσης από στερεά

²⁴ el.wikipedia.org/wiki/Βιοκαύσιμα

²⁵ www.physics4u.gr/energy/biofuels

²⁶ www.gasclimattica.gr/Βιοκαυσιμα

μορφοποιημένα βιοκαύσιμα (πελλέτες και μπριγκέτες), της ηλεκτροπαραγωγής από λιγνίτη και λιθάνθρακα με ηλεκτροπαραγωγή από βιομάζα ή πελλέτες.²⁷

Σημειώνεται ότι η βιομάζα είναι ο μοναδικός ανανεώσιμος πόρος ενέργειας από τον οποίο μπορούν να παραχθούν υγρά καύσιμα για τις μεταφορές, γεγονός σημαντικό, αν συνεκτιμηθεί ότι το 21% του συνόλου των εκπομπών αερίων θερμοκηπίου που συμβάλλουν στη θέρμανση της υδρογείου οφείλεται στις μεταφορές, ενώ συγχρόνως οι απαιτούμενες ποσότητες καυσίμων για μεταφορές αναμένεται να αυξηθούν σημαντικά παγκοσμίως, λόγω της αύξησης των αυτοκινήτων από 600 εκατομμύρια σήμερα σε περίπου 1,2 δισεκατομμύρια τα επόμενα 20 χρόνια.²⁸

Κύρια πλεονεκτήματα των βιοκαυσίμων είναι ότι είναι CO₂-ουδέτερα, κατά την καύση τους εκπέμπονται μικρότερες ποσότητες ρύπων, είναι βιοαποδομήσιμα και συμβάλλουν στην αειφορία, ενώ πρακτικά δεν παράγουν οξείδια του θείου. Ωστόσο, κύρια μειονεκτήματα των βιοκαυσίμων είναι αφενός ότι, με την παρούσα τεχνολογία το κόστος παραγωγής τους είναι πολύ υψηλό, καθιστώντας τα μη ανταγωνιστικά προς τα ορυκτά καύσιμα και αφετέρου ότι απαιτούνται πολύ μεγάλες εκτάσεις καλλιεργήσιμης γης για την παραγωγή πρώτων υλών.²⁹

Για την ΕΕ τα παραγόμενα βιοντήζελ και βιοαιθανόλη γίνονται ανταγωνιστικά με τιμές πετρελαίου περίπου €60 και €90 ανά βαρέλι αντίστοιχα, ενώ υπολογίζεται ότι η έρευνα και η τεχνολογική ανάπτυξη στον τομέα των βιοκαυσίμων θα επιφέρει μείωση κόστους κατά 30%. Μοναδική εξαίρεση αποτελεί η Βραζιλία, όπου πλέον η βιοαιθανόλη που παράγεται από ζαχαροκάλαμο είναι ήδη ανταγωνιστική έναντι της βενζίνης.³⁰

Ανάλογα με την χρησιμοποιούμενη τεχνολογία, τα βιοκαύσιμα διακρίνονται σε πρώτης και δεύτερης γενιάς. Βιοκαύσιμα πρώτης γενιάς είναι η αιθανόλη και το βιοντήζελ ενώ δεύτερης γενιάς το βιοντήζελ Fisher-Tropsch, η κυτταρινική αιθανόλη από λιγνοκυτταρινούχες πρώτες ύλες (πχ άχυρο, ξύλο), το βιο-DME (διμεθυλαιθέρας) και το συνθετικό φυσικό αέριο (SNG).³¹

²⁷ www.tovima.gr/finance/article

²⁸ www.epirusbiosis.gr

²⁹ www.biofuels.gr

³⁰ papadopoulosg.blogspot.com

³¹ www.ecofinder.gr

Η βιοαιθανόλη παράγεται από σακχαρούχα, κυτταρινούχα και αμυλούχα φυτά (σιτάρι, καλαμπόκι, σόργο, ζαχαρότευτλα κ.α). Κύριος τρόπος παραγωγής της είναι η ζύμωση των αμυλούχων-σακχαρούχων συστατικών και ο διαχωρισμός της αιθανόλης με απόσταξη. Χρησιμοποιείται για την αύξηση του αριθμού οκτανίων της βενζίνης και για βελτίωση της ποιότητάς της, συνήθως σε μείγμα E10 (10% αιθανόλη + 90% βενζίνης). Η αυτοκινητοβιομηχανία πλέον διαθέτει στο εμπόριο μοντέλα (FFV, Flexible Fuel Vehicle) που χρησιμοποιούν μίγμα E85 (85% αιθανόλη + 15% βενζίνης) ή οποιοδήποτε άλλο μίγμα αιθανόλης-βενζίνης. Για την παραγωγή της βιοαιθανόλης χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη το ζαχαροκάλαμο στη Βραζιλία, κυρίως αραβόσιτος στις ΗΠΑ, δημητριακά και ζαχαρότευτλα στην ΕΕ. Στη Βραζιλία, η οποία διαθέτει την πιο ανεπτυγμένη βιομηχανία βιοκαυσίμων παγκοσμίως, περισσότερα από τα μισά αυτοκίνητα που κυκλοφορούν είναι αλκοολοκίνητα, ενώ τα υπόλοιπα καταναλίσκουν μίγμα βενζίνης-αλκοόλης σε αναλογία 80%-20% αντίστοιχα.³²

Άλλα βιοκαύσιμα είναι τα βιο-ETBE (αιθυλο-τριτοταγής βουτυλ-εστέρας) και βιο-METBE (μέθυλο-τριτοταγής βουτυλ-εστέρας) που παράγονται με μίξη 48% και 36% αιθανόλης με ισοβουτυλένιο, η βιομεθανόλη (CH_3OH) η οποία παράγεται με αεριοποίηση, το βιοαέριο που παράγεται με αναερόβια ζύμωση υγρής βιομάζας, το βιο-υδρογόνο, το βιο-DME (διμεθυλαιθέρας) το οποίο παράγεται από μεθανόλη και το βιοντήζελ Fisher-Tropsch το οποίο παράγεται με αεριοποίηση της βιομάζας.

7. ΤΑ ΔΗΜΗΤΡΙΑΚΑ

Τα δημητριακά είναι η σπουδαιότερη κατηγορία φυτών που καλλιεργούνται για τη διατροφή του ανθρώπου. Από τα δημητριακά παράγεται ένα από τα βασικά είδη της ανθρώπινης διατροφής, το ψωμί, ζωοτροφές, πρώτες ύλες για τη βιομηχανία τροφίμων, για τη βιομηχανία χαρτιού, καθώς και για άλλους βιομηχανικούς κλάδους.³³

Τα δημητριακά στη μεγάλη τους πλειοψηφία ανήκουν στην οικογένεια των αγραωσιδών και τα περισσότερα κατάγονται από την περιοχή της Δυτικής Ασίας. Τα δημητριακά αποτελούν τη βάση της φυτικής παραγωγής κάθε χώρας και στις πιο πολλές χώρες η καλλιέργειά τους κατέχει την πρώτη θέση της γεωργικής παραγωγής.

³² www.autocrete.com/oikologia/viokausimo-algi.html

³³ www.biotechwatch.gr

Χωρίζονται σε τρεις βασικές κατηγορίες:

- Στα σιτηρά, που περιλαμβάνουν το σιτάρι, το καλαμπόκι, το ρύζι, το κεχρί και πολλά άλλα παρόμοια είδη.
- Στα οσπριοειδή, στα οποία ανήκουν τα διάφορα είδη των φασολιών, η σόγια (που θεωρείται σαν ένα από τα πιο βασικά οσπριοειδή), οι φακές, τα ρεβίθια κλπ., και τέλος
- Στα ελαιώδη δημητριακά, όπως είναι η σόγια, ο ηλιόσπορος και πολλά άλλα.

Στις χώρες με θερμότερα κλίματα καλλιεργούνται κυρίως το σόργο, το ρύζι (που αποτελεί και τη βασική τροφή εκατομμυρίων ανθρώπων σε ολόκληρο τον κόσμο, ιδιαίτερα στις ασιατικές χώρες) και το καλαμπόκι (που αποτελεί αντίστοιχα βασικό στοιχείο διατροφής για πολλούς κατοίκους της Αμερικανικής Ηπείρου). Στις χώρες με ψυχρότερα κλίματα καλλιεργούνται κυρίως το σιτάρι, το καλαμπόκι, το κριθάρι, η βρώμη, καθώς και η σίκαλη.³⁴

Γενικά τα δημητριακά είναι μονοετή φυτά που σπέρνονται και θερίζονται μέσα σε ένα χρόνο. Σύμφωνα με πρόσφατες ανακαλύψεις, η χρήση των δημητριακών ως τροφής από τους ανθρώπους ανάγεται στην προϊστορική εποχή.

8. ΤΟ ΣΙΤΑΡΙ

8.1. Προέλευση και εξέλιξη

Οι αλλαγές του κλίματος στην Εύφορη Ημισέληνο περίπου 10.000 χρόνια πριν οδήγησαν στη διάδοση των άγριων δημητριακών, ένα από τα οποία ήταν ο πρόγονος του σύγχρονου σιταριού. Από εκείνα τα χρόνια, πολλές γενετικές αλλαγές, που επήλθαν είτε τυχαία είτε ηθελημένα, έχουν οδηγήσει σε ένα πολύ διαφορετικό φυτό.

Το σιτάρι ήταν αρχικά ένα άγριο χόρτο, αποκαλούμενο σίτος ο μονόκοκκος. Περίπου 10.000 χρόνια πριν αποτελούσε το βασικό συστατικό της διαίτας για τους κυνηγούς-συλλέκτες στη Μεσοποταμία και στις κοιλάδες των ποταμών Τίγρη και Ευφράτη στη Μέση Ανατολή, μια περιοχή αποκαλούμενη Εύφορη Ημισέληνος. Η ποσότητα σιτηρών που οι άνθρωποι μπορούσαν να μαζέψουν από αυτό το σιτηρό, τους επέτρεψε να δημιουργήσουν μόνιμα χωριά και σηματοδότησε την αρχή της σύγχρονης γεωργίας. Σήμερα, γίνονται περισσότερα τρόφιμα με σύγχρονες ποικιλίες σιταριού, που τροποποιήθηκαν βαθμιαία κατά τη διάρκεια πολλών αιώνων, από οποιοδήποτε άλλο δημητριακό.

³⁴ www.ceja.educagri.fr

Όταν το άγριο σιτάρι ωριμάζει, οι σπόροι πέφτουν από το μίσχο στο έδαφος, μειώνοντας τη συγκομιδή εσωκλείονται επίσης σε έναν φλοιό. Η μετάβαση στο σύγχρονο σιτάρι, του οποίου οι γυμνοί σπόροι παραμένουν συνδεδεμένοι με τον μίσχο, πραγματοποιήθηκε μέσω τυχαίων υβριδοποιήσεων. Αυτές πραγματοποιήθηκαν μεταξύ του σίτου του μονόκοκκου και άλλων άγριων χόρτων στην Εύφορη Ημισέληνο. Κάθε υβριδοποίηση οδήγησε σε διαφορετικό συνδυασμό χρωμοσωμάτων (γενετικές πληροφορίες) και διαφορετικά χαρακτηριστικά στους απογόνους. Σε δύο τέτοιες υβριδοποιήσεις, ο σίτος ο μονόκοκκος (χρωμοσώματα AA) συνδυάστηκε με δύο άλλα άγρια χόρτα (BB και DD), με αποτέλεσμα το σιτάρι του ψωμιού (AABBDD).

Καθώς οι άνθρωποι στην Εύφορη Ημισέληνο μάζευαν σιτάρι, έτειναν να συλλέγουν περισσότερο τα σιτηρά που ήταν σταθερά συνδεδεμένα με τον μίσχο παρά τα πιο χαλαρά σιτηρά. Επειδή αυτό το χαρακτηριστικό μεταφέρεται στις μελλοντικές γενεές, μόλις άρχισαν να φυτεύουν τους δικούς τους σπόρους, καλλιέργησαν πολύ περισσότερα από την ποικιλία με τα σταθερά συνδεδεμένα και γυμνά σιτηρά παρά από αυτήν με τα χαλαρά σιτηρά που εσωκλείονταν σε έναν φλοιό. Κατ' αυτό τον τρόπο, το σιτάρι άρχισε να αλλάζει, έτσι ώστε σήμερα, στον «εξημερωμένο» σίτο, τα σιτηρά παραμένουν συνδεδεμένα με τον μίσχο σε όλα τα φυτά. Οι γενετικοί πρόγονοι του σημερινού σιταριού μπορούν ακόμα να βρεθούν στην Εύφορη Ημισέληνο και χρησιμοποιούνται ακόμα για πειράματα αναπαραγωγής. Γι' αυτόν τον λόγο, μερικές φορές αποκαλείται Κέντρο Γονιδίων Σίτου.

Μετά από αυτή την ευτυχή και απρόσμενη αρχή, έχουν επιτευχθεί περαιτέρω επιτυχίες στην αναπαραγωγή του σιταριού μέσω σκόπιμης υβριδοποίησης ή «διασταύρωσης» και επακόλουθης επιλογής των επιτυχών αποτελεσμάτων. Η χρήση της διασταύρωσης και της επιλογής οδήγησε στην αποκαλούμενη «πράσινη επανάσταση» των δεκαετιών του '60 και του '70, κατά την οποία παρατηρήθηκαν αυξήσεις στην παραγωγή του σιταριού κατά τουλάχιστον 35%.

Οι διασταυρώσεις δεν είναι μόνο δυνατές μεταξύ αυτών του ίδιου είδους αλλά, σε περιορισμένη έκταση, και μεταξύ διαφορετικών ειδών. Παραδείγματος χάριν, η διασταύρωση σκληρού σιταριού και σίκαλης οδήγησε στο Τριτικάλ, το οποίο συνδυάζει τη δυνατότητα απόδοσης και την ποιότητα του σιταριού με τα αγρονομικά χαρακτηριστικά γνωρίσματα της σίκαλης, η οποία μπορεί να αναπτυχθεί σε χειρότερες εδαφολογικές συνθήκες.

Τα συμβατικά προγράμματα αναπαραγωγής έχουν σαφώς αποδειχθεί ισχυρά μέσα αξιοποίησης της γενετικής ποικιλομορφίας των καλλιεργούμενων φυτών, ώστε να θρέψουν τον παγκόσμιο πληθυσμό. Υπάρχει, ωστόσο, ένα ερωτηματικό στο εάν αυτές οι μέθοδοι θα είναι επαρκείς για να ταΐσουν τον ταχύτατα αυξανόμενο πληθυσμό της νέας χιλιετίας.

8.2 ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ ΚΑΙ ΧΡΗΣΕΙΣ ΣΙΤΑΡΙΟΥ

Το σιτάρι ανήκει στο φυτικό βασίλειο και στη συνομοταξία των «Αγγειόσπερμων» (Magnoliophyta). Σε ό,τι αφορά στα επιμέρους χαρακτηριστικά, ανήκει στην ομοταξία των Μονοκοτυλήδων (Liliopsida) και στην τάξη των Κυπειρωδών (Cyperales). Κατατάσσεται στην οικογένεια των Ποοειδών (Poaceae) ή Αγρωστωδών (Gramineae) ενώ η υποοικογένεια στην οποία ανήκει είναι αυτή των Ποοειδών (Pooideae) το γένος *Triticum*.

Το σιτάρι είναι ετήσιο φυτό, το οποίο ανήκει στην οικογένεια των δημητριακών και θεωρείται παγκοσμίως ως το σημαντικότερο φυτό μεταξύ των άλλων δημητριακών, με συνολική παραγωγή 573,5 εκατομμυρίων τόνων το 2002.³⁵

Στην Ελλάδα, το σιτάρι (σκληρό και μαλακό) είναι το πιο διαδεδομένο ετήσιο φυτό και η καλλιέργειά του είναι εκτεταμένη σε όλη τη χώρα. Η συνολική καλλιεργούμενη έκταση (σκληρό και μαλακό) ήταν 6,6 εκατομμύρια στρέμματα το σκληρό και 1,9 εκατομμύρια στρέμματα το μαλακό (2000), με παραγωγή 1,8 και 0,5 εκατομμυρίων τόνων, αντίστοιχα. Η συνολική παραγωγή του σιταριού στην Ελλάδα ξεπέρασε τα 2 εκατομμύρια τόνους το 2002. Το μεγαλύτερο μέρος της παραγωγής αυτής χρησιμοποιείται για ανθρώπινη κατανάλωση, καθώς και για ζωοτροφή.³⁶

Σύμφωνα με το Ινστιτούτο Σιτηρών Θεσσαλονίκης, οι ελληνικές μέσες αποδόσεις σκληρού σιταριού κυμαίνονται από 150-800 κιλά/στρέμμα και οι αντίστοιχες του μαλακού σιταριού κυμαίνονται από 200-900 κιλά/στρέμμα. Οι αποδόσεις σε σπόρο % του συνολικού βάρους του υπέργειου τμήματος του φυτού (Δείκτης Συγκομιδής) και των δύο τύπων κυμαίνονται από 30-56%.

Εκτός από βασικό είδος διατροφής, το σιτάρι χρησιμοποιείται και σε άλλους τομείς, όπως η ιατρική και η κοσμετολογία. Πιστεύεται από πολλούς ότι, το σιτάρι καταπολεμά τη δυσκοιλιότητα χάρη στις ωφέλιμες εδώδιμες φυτικές ίνες που διαθέτει

³⁵ el.wikipedia.org

³⁶ www.geoperi.gr

σε αφθονία, ενώ βελτιώνει παράλληλα τη λειτουργία του εντέρου. Η κατανάλωση προϊόντων ολικής άλεσης που περιέχουν σημαντικό ποσοστό φλοιού του σιταριού συνδέεται με τα μικρά ποσοστά καρκίνου του εντέρου και επίσης προλαμβάνει φλεβίτιδες και αιμορροΐδες, εξαιτίας ενός μεγάλου ποσοστού βιταμινών που απορροφούνται από τον οργανισμό.

8.3 ΑΛΕΥΡΙ, ΤΟ ΣΠΟΥΔΑΙΟΤΕΡΟ ΠΡΟΙΟΝ ΤΟΥ ΣΙΤΑΡΙΟΥ

Είναι ένα προϊόν γνωστό από την αρχαιότητα, χωρίς να είναι ακριβής η προέλευσή του, αλλά τόσο σημαντικό στην καθημερινή μας διατροφή, αφού χρησιμοποιείται ευρέως για την παραγωγή αρκετών προϊόντων όπως ψωμί, αρτοσκευάσματα, γλυκά, ζυμαρικά, κλπ. Μέχρι και ο Όμηρος έκανε αναφορές για τους μύλους και το άλεσμα, πράγματα κοινά στους λαούς της εποχής του.

Πρόκειται για ένα προϊόν με ιδιαίτερο τεχνολογικό ενδιαφέρον, όσον αφορά την παρασκευή του, αλλά και την περαιτέρω χρήση του, αφού πλέον αριθμεί μεγάλο αριθμό ποικιλιών, καθεμία με δικό της προορισμό, ανάλογα την παρασκευή για την οποία προορίζεται. Πολλοί πιστεύουν ότι το αλεύρι απλά χωρίζεται σε σκληρό και μαλακό, καθώς επίσης ότι διαφοροποιείται ανάλογα με την προέλευση του δημητριακού.

Σύμφωνα με τον κώδικα Τροφίμων και Ποτών, αλεύρι ονομάζουμε το προϊόν άλεσης των δημητριακών. Ως, απλώς, αλεύρι ονομάζουμε το άλευρο του σίτου, και ορίζουμε αποκλειστικά και μόνο το προϊόν της άλεσης υγιούς σίτου, βιομηχανικά καθαρισμένου από κάθε οργανική ή ανόργανη ουσία. Αποτελεί το κυριότερο συστατικό των προϊόντων της αρτοποιίας, γι' αυτό και η άλεση του σιταριού πρέπει να έχει σαν στόχο την παραγωγή αλεύρου με τις υψηλότερες δυνατές αρτοποιητικές ιδιότητες. Ο σκοπός της άλεσης είναι η παραγωγή αλεύρου, όσο το δυνατόν καλύτερα διαχωρισμένου από το πίτυρο και το φύτρο.

Ανάλογα με το βαθμό άλεσης, έχουμε και τον τύπο του αλεύρου, ενώ το ποσοστό των περιεχομένων πρωτεϊνών διαχωρίζει τα άλευρα σε σκληρά και μαλακά (δυνατά και αδύνατα). Ως βαθμό άλεσης ορίζουμε το παραγόμενο βάρος αλεύρου, όταν αλέσουμε 100 μέρη βάρους καθαρισμένου σιταριού. Έτσι, έχουμε το αλεύρι τύπου 55% για ψωμάκια πολυτελείας, ψωμί τοστ, φρυγανιές κλπ, προϊόντα με υψηλό πρωτεϊνικό περιεχόμενο. Το αλεύρι τύπου 70%, το οποίο έχει πολύ μικρή ποσότητα πιτύρων, για το σύνθηες λευκό ψωμί. Υπάρχουν διάφορες κατηγορίες αλεύρου αυτού του τύπου: το δυνατό, το μαλακό ή ντεμί το οποίο δεν είναι άλλο από κάτι ενδιάμεσο. Οι βασικές

διαφορές των παραπάνω αλεύρων είναι ότι προέρχονται από διαφορετικές ποικιλίες σιταριών, οι οποίες διαφοροποιούνται τόσο ως προς το ποσοστό της γλουτένης, όσο και ως προς τη δύναμη της γλουτένης. Το αλεύρι τύπου 90% είναι πλούσιο σε πίτυρο και θρεπτικά στοιχεία κάνοντάς το ιδανικό για ψωμί ολικής άλεσης. Για μαύρο ψωμί χρησιμοποιείται άλευρο ολικής άλεσης από μαλακό σιτάρι, μεγάλης θρεπτικής αξίας. Αλεύρι τύπου Μ προέρχεται κυρίως από σκληρά σιτάρια και έχει χαρακτηριστικό κίτρινο χρώμα. Από αυτό φτιάχνεται το γνωστό χωριάτικο ψωμί με τη χαρακτηριστική συμπαγή δομή και κόρα. Αλεύρι κατηγορίας Π, το λεγόμενο πολυτελείας, είναι το άλευρο εκείνο το οποίο προέρχεται από σιτάρια υψηλής ποιότητας, ενισχυμένα με γλουτένη ώστε να είναι πολύ δυνατό.³⁷

8.4 ΨΩΜΙ

Ανακατεύοντας δύο από τα στοιχειώδη γήινα υλικά, αλεύρι και νερό, παράγεται η βασική τροφή του ανθρώπου, ο άρτος. Το ψωμί ως πρώτη τροφή αποτέλεσε κοινή συνήθεια των ανθρώπων μέσα στους αιώνες όπου και να τους συναντούσες. Ανάλογα με τα προϊόντα του κάθε τόπου, την ιστορία, τις κοινωνικές και τις θρησκευτικές τους θέσεις, αλλά και τις ανάγκες τους, εξελίχθηκε και η ιστορία του ψωμιού. Το ψωμί θεωρείται προϊόν που χορταίνει, που θρέφει και που «συντροφεύει» όλα τα γεύματα της ημέρας. Διάφορα εργαλεία καλλιέργειας αλλά και επεξεργασίας των δημητριακών καρπών, μας οδηγούν στην Μεσοποταμία, όπου φαίνεται να ξεκινάνε όλα. Στην αρχή, οι δημητριακοί καρποί καταναλώνονταν ωμοί. Αργότερα καβουρδίζονται και σιγά - σιγά παρασκευάζεται το πρώτο αλεύρι, προϊόν αλεσμένων ή κοπανισμένων σπόρων ανάμεσα σε δύο λείες πέτρες. Ανακατεύοντας το πρωτόγονο αυτό αλεύρι με νερό, φτιάχνεται ο πρώτος χυλός, ο πραγματικός πρόγονος του σημερινού ψωμιού.

Σταδιακά βελτιώνεται από τη μία η ποιότητα του χυλού, φτάνοντας τη μορφή μιας πηχτής ζύμης και από την άλλη η παρασκευή του, αφού πλέον ψήνεται απευθείας στη φωτιά ή πάνω σε καυτές πέτρες. Άγνωστο το ποιος και το πώς ανακάλυψε τη φυσική αλκοολική ζύμωση από την επαφή του αλευριού και του νερού (προζύμι). Φημολογείται ότι ήταν τυχαίο, όμως στάθηκε σημείο αναφοράς για την πορεία της ποιότητας και των ποικιλιών του άρτου στην πάροδο των χρόνων.

³⁷ el.wikipedia.org

Αρχικά η παρασκευή του ψωμιού ήταν οικιακή υπόθεση, δουλειά της νοικοκυράς για να καλύψει της ανάγκες της οικογένειας. Με τα χρόνια, η αύξηση της κατανάλωσης και της ζήτησης φέρνουν τη μεγάλη ανατροπή και η μαζική παραγωγή κάνει την εμφάνιση της με τη μορφή των αρτοποιείων. Για πρώτη φορά τα συναντάμε στη Ρώμη επί αυτοκράτορα Τραϊανού το 97 - 117 μ.Χ. Έτσι, σταδιακά οι νοικοκυρές «ξεκουράζονται» και οι αρτοποιοί μεγαλουργούν στην τέχνη του ψωμιού με την ποικιλία στη γεύση, στη μορφή, στα συστατικά, με τη φαντασία και τη μαστοριά τους.³⁸

8.5 ΤΑ ΖΥΜΑΡΙΚΑ

Η χρήση των ζυμαρικών φαίνεται ότι ξεκίνησε από συγκεκριμένους πληθυσμούς σε ορισμένες περιοχές και αργότερα εξαπλώθηκε σε ολόκληρο τον κόσμο. Η παλαιότερη χρήση των ζυμαρικών πιθανώς χρονολογείται στην Κίνα, όπου εξακολουθούν να καταναλώνονται ευρύτατα ως και σήμερα. Τα Κινέζικα και Ασιατικά ζυμαρικά ωστόσο αναφέρονται γενικότερα ως noodles.

Έλληνες και Ρωμαίοι

Πολλές πηγές αναφέρουν ότι ο Μάρκο Πόλο εισήγαγε τα ζυμαρικά στην Ιταλία από τα ταξίδια του στην Ασία το 1292 μ.Χ., αλλά η καταγωγή των μακαρονιών στην Ιταλία ανατρέχεται πίσω στους αρχαίους Ρωμαίους, οι οποίοι απέδιδαν την προέλευση τους στους «Θεούς». Σύμφωνα με ένα διαδεδομένο μύθο, τα ζυμαρικά ήταν εφεύρεση του Ηφαίστου, του Ελληνικού θεού της φωτιάς (Βούλκαν για τους Ρωμαίους), αλλά αυτό δεν αναφέρεται πουθενά στην κλασσική λογοτεχνία.

Τα ζυμαρικά ήταν σίγουρα γνωστά στους αρχαίους Έλληνες και Ρωμαίους. Ένα συγκεκριμένο είδος που καταναλώνονταν ήταν μία φαρδιά χυλοπίτα που καλούνταν στα ελληνικά «λάγανον» και πιθανότατα ήταν παρόμοιο με τα σημερινά λαζάνια. Ωστόσο, αξίζει να αναφερθεί ότι το λάγανον δεν καταναλωνόταν βρασμένο όπως τα λαζάνια αλλά ψημένο πάνω σε θερμαινόμενες πέτρες ή σε φούρνο και για αυτό το λόγο είναι περισσότερο συνδεδεμένο με τη σημερινή πίτσα.

Ο Απίκιος, ένας Ρωμαίος συγγραφέας του πρώτου μ.Χ αιώνα περιγράφει ένα ζυμαρικό φτιαγμένο για να «περικλείει φαγητό σε σχήμα τυμπάνου και πίτες». Τα ζυμαρικά αυτά ονομάζονταν λάγανα. Η συνταγή για το ζυμάρι τους δεν αναφέρεται

³⁸ el.wikipedia.org

αλλά δίνονται προτάσεις για την επικάλυψη και καρύκευση τους με κρέας και ψαρικά. Πιθανώς να ήταν παρόμοια με τα σημερινά ραβιόλια ή τორτελίνια.

Σύμφωνα επίσης με ορισμένες εικασίες τα ζυμαρικά ήταν υπό μία τους μορφή γνωστά ήδη στους Ετρούσκους, αν και δεν υπάρχουν ιστορικά στοιχεία που να το επιβεβαιώνουν.

Οι Άραβες και τα ζυμαρικά

Η πρώτη συγκεκριμένη γραπτή αναφορά σε χυλοπίτες μαγειρεμένες με βράσιμο βρίσκεται στο Ταλμούδ της Ιερουσαλήμ, είναι γραμμένη στα Αραμαϊκά και χρονολογείται στο 5 αιώνα μ.Χ. Οι χυλοπίτες αυτές αναφέρονται ως *itriyah*. Σύμφωνα με αραβικές πηγές, η λέξη αυτή χρησιμοποιείται περισσότερο για τις αποξηραμένες χυλοπίτες που μπορούν να αγοραστούν, παρά για τις σπιτικές χυλοπίτες που είναι απαραίτητα φρέσκα ζυμαρικά. Οι αποξηραμένες χυλοπίτες είναι δυνατό να αποθηκευτούν, ενώ οι φρέσκοι πρέπει να καταναλώνονται αμέσως μετά την ετοιμασία τους. Είναι πολύ πιθανό τα ζυμαρικά να έγιναν γνωστά κατά τη διάρκεια των αραβικών κατακτήσεων της Σικελίας καθώς πρόκειται για βασικά τρόφιμα. Ο Άραβας γεωγράφος Al - Idrisi γράφει ότι ένα προϊόν βασιζόμενο στο αλεύρι παράγεται με τη μορφή κορδονιών στο Παλέρμο που την εποχή του ήταν αραβική αποικία.

Εικάζεται ότι η λέξη «μακαρόνι» κατάγεται από τη σικελική λέξη «μακαρούνι» (*maccaruni*) που μεταφράζεται ως «μορφοποίηση της ζύμης με την εφαρμογή δύναμης». Κατά τις αρχαίες μεθόδους παρασκευής των ζυμαρικών, η εφαρμογή δύναμης ήταν απαραίτητη για το αναπιάσιμο της ζύμης με τα πόδια, διαδικασία που έπαιρνε όλη την ημέρα. Αρχαία σικελικά πιάτα ζυμαρικών, μερικά εκ των οποίων καταναλώνονται ως και σήμερα, περιλάμβαναν σταφίδες και καρυκεύματα, υλικά τα οποία έφεραν οι άραβες. Τούτο αποτελεί μία ακόμη ένδειξη ότι τα ζυμαρικά εισήχθησαν στην Ιταλία κατά τη διάρκεια των αραβικών κατακτήσεων.

Μεσαιωνική Ιταλία

Γύρω στο έτος 1000 μ.Χ. έχουμε την πρώτη καταγεγραμμένη συνταγή για ζυμαρικά στο βιβλίο " *De arte Coquinaria per vermicelli e macaroni siciliani* " (Η τέχνη του Μαγειρέματος Σικελικών Μακαρονιών και Σπαγκέτι) του Martino Corno, σεφ του ισχυρού πατριάρχη της Ακουιλίας.

Οι πρώτες ιστορικές πηγές που αναφέρουν την παραγωγή αποξηραμένων ζυμαρικών σε μία κατά τα φαινόμενα μικρής κλίμακας βιομηχανική επιχείρηση χρονολογούνται στο 1150, όταν ο Άραβας γεωγράφος Al - Idrisi αναφέρει ότι στην Τράβια, περίπου 30 χλμ. από το Παλέρμο, «παράγουν αφθονία ζυμαρικών με τη μορφή κορδονιών (tría στα αραβικά) τα οποία εξάγουν παντού, στην Καλαβρία και σε πολλές μουσουλμανικές και χριστιανικές χώρες».

Το 1279 ένας στρατιώτης από τη Γένοβα αναγράφει στο λεπτομερή κατάλογο με τα περιουσιακά του υπάρχοντα ένα κουβά με αποξηραμένα ζυμαρικά (una bariscella plena de macaronis). Ένα έγγραφο από το 1244 και ένα άλλο από το 1316 μαρτυρούν την παραγωγή αποξηραμένων ζυμαρικών στη Λιγουρία, που σημαίνει ότι τα ζυμαρικά ήταν πλέον διαδεδομένα σε όλη την Ιταλική χερσόνησο.

Μεταξύ του 1400 και 1500, η παραγωγή των «fidei» (ζυμαρικά στην τοπική διάλεκτο) ήταν αρκετά ευρέως διαδεδομένη στη Λιγουρία, όπως καταδεικνύει η ίδρυση της Εταιρίας Παρασκευαστών Ζυμαρικών το 1546 (το παλαιότερο σωζόμενο έγγραφο της συντεχνίας αυτής ωστόσο χρονολογείται το 1571) στη Νάπολη. Το 1574 μία παρόμοια συντεχνία ιδρύθηκε στη Γένοβα και τρία χρόνια αργότερα οι «Κανόνες για τους Παρασκευαστές Ζυμαρικών της Συντεχνίας» (Regolazione dell ' Arte dei Maestri Fidelari) συντάχθηκαν στη Σαβόνα.

Το 1584, ο συγγραφέας Giordano Bruno παραθέτει ένα ναπολιτάνικο ρητό "*e cascato il maccarone dentro il formaggio*" (έπεσε το μακαρόνι στο τυρί).

Διάφορα είδη ζυμαρικών, συμπεριλαμβανομένων των μακριών κούφιων σωλήνων, αναφέρονται στα αρχεία ιταλικών και δομινικανών μοναστηριών του 15 ου αιώνα. Το 17 ο αιώνα πια τα ζυμαρικά είχαν γίνει μέρος της καθημερινής διατροφής σε όλη την Ιταλία καθώς ήταν οικονομικά, άμεσα διαθέσιμα και πρακτικά.

17 ος και 18 ος αιώνες

Το 17^ο αιώνα, ειδικότερα στη Νάπολη, η πληθυσμιακή ανάπτυξη επιδείνωσε τα προβλήματα διαθεσιμότητας τροφής, έως ότου μία μικρή τεχνολογική επανάσταση κατέστησε δυνατή την παραγωγή ζυμαρικών σε πολύ χαμηλότερη τιμή. Το γεγονός αυτό είχε ως συνέπεια να γίνουν τα ζυμαρικά το φαγητό του λαού. Η εγγύτητα της Νάπολης με τη θάλασσα (όπως ήταν η περίπτωση με τη Λιγουρία και τη Σικελία) διευκόλυνε τη ξήρανση τους, διαδικασία που επιτρέπει τη διατήρησή τους για παρατεταμένη χρονική περίοδο. Το λιμάνι επίσης που κατέστησε δυνατή τη μέσω

θαλάσσης μεταφορά των αποξηραμένων ζυμαρικών επέτρεψε την εξαγωγή τους σε ολόκληρη την Ιταλία.

Αρχικά η παρασκευή των ζυμαρικών στηρίζονταν στο αναπιάσιμο του ζυμαριού με το πάτημα των ποδιών. Ο παρασκευαστής τους για το λόγο αυτό έπρεπε να είναι καθισμένος ώστε να μπορεί να χρησιμοποιεί τα πόδια του για την ανάμειξη και το ζύμωμα του ζυμαριού. Ο βασιλιάς της Νάπολης Φερδινάνδος II, προσέλαβε ένα διάσημο μηχανικό (Cesare Spadaccini) για να βελτιώσει την όλη διαδικασία. Το νέο αυτό σύστημα περιλάμβανε την προσθήκη βραστού νερού σε φρεσκοαλεσμένο σιμιγδάλι και η ανάμειξη με τα πόδια είχε αντικατασταθεί από μία χάλκινη μηχανή που μιμούταν στην εντέλεια το έργο των ανθρώπινων ποδιών.

Το 1740, η πόλη της Βενετίας εξέδωσε στον Paolo Adami την άδεια ανοίγματος του πρώτου εργοστασίου παραγωγής ζυμαρικών. Ο εξοπλισμός ήταν αρκετά απλός, καθώς αποτελούνταν από μία μεταλλική πρέσα που θέτονταν σε λειτουργία με τη βοήθεια αρκετών νέων αγοριών. Το 1763 ο Δούκας της Πάρμας, Δον Φερντινάντο της Βουρβόνης, έδωσε στον Stefano Lucciardi της Σαρτσάνα το δικαίωμα 10ετούς μονοπωλείου για την παραγωγή αποξηραμένων ζυμαρικών - γενοβέζικου τύπου - στην πόλη της Πάρμας.

Το 1766 το πτώμα του Saint Stephen βρίσκεται σε μία σκάφη ζυμώματος όπου είχε ενταφιαστεί και για το λόγο αυτό γίνεται ο Προστάτης 'Άγιος των παρασκευαστών ζυμαρικών.

Ο Goethe στο ημερολόγιο του, *Ταξίδια στην Ιταλία* (από το 1787) ορίζει το μακαρόνι ως «περίτεχνο ζυμαρί, φτιαγμένο με ψιλό σιμιγδάλι, λεπτοδουλεμένο, βρασμένο και κομμένο σε διάφορα σχέδια»

Επίσης περιγράφει απολαυστικά επεισόδια από τη ζωή στη Νάπολη, δίνοντας μία περιγραφή του έργου των μακαρονοποιών που στη γωνιά σχεδόν κάθε δρόμου «δραστήριοι φτιάχνουν μακαρόνια και τα λαδώνουν χρησιμοποιώντας καυτό λάδι σε τηγάνια, ειδικά τις μέρες εκείνες όπου πρέπει να απαρνεύσει το κρέας. Πουλούν τα προϊόντα τους τόσο πετυχημένα που χιλιάδες άνθρωποι κουβαλούν το γεύμα τους σε κομμάτια χαρτιού».³⁹

³⁹ el.wikipedia.org

9. ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΕΣ

ΓΕΝΙΚΑ

Βιοαντιδραστήρας μπορεί να θεωρηθεί κάθε διάταξη ή σύστημα που υποστηρίζει ένα βιολογικά ενεργό περιβάλλον. Σε αυτό το περιβάλλον μικροοργανισμοί μπορούν να δρουν και να αναπτύσσονται ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν. Οι κυριότεροι μικροοργανισμοί που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ένα βιοαντιδραστήρα είναι βακτήρια, μύκητες, ζυμομύκητες, φυτικά και ζωικά κύτταρα⁴⁰. Οι διαστάσεις των βιοαντιδραστήρων ποικίλουν και ο όγκος τους μπορεί να είναι από μερικά ml ενός δοκιμαστικού σωλήνα μέχρι και μερικές εκατοντάδες ml³. Ανάλογα με τις διαστάσεις και την πολυπλοκότητά τους το κόστος αυτό ποικίλει. Το είδος του βιοαντιδραστήρα που θα επιλεγεί για μια διαδικασία, θα πρέπει να είναι συμβατό με τα χαρακτηριστικά του υποστρώματος και του μικροοργανισμού που θα χρησιμοποιηθούν και να επιτρέπει τον όσο δυνατό καλύτερο έλεγχο της διαδικασίας αυτής^{40 41 42}.

Κατά το σχεδιασμό ενός βιοαντιδραστήρα υπάρχουν κάποιες παράμετροι που θα πρέπει να ληφθούν υπόψη, όπως⁴⁰:

- ο έλεγχος της θερμοκρασίας μέσα στον αντιδραστήρα
- ο έλεγχος του pH μέσα στον αντιδραστήρα
- η διαθεσιμότητα του νερού
- η επάρκεια του οξυγόνου (για αερόβιες διαδικασίες)
- η απομάκρυνση προϊόντων και παρά-προϊόντων από τον αντιδραστήρα.

Τα προϊόντα σε ένα βιοαντιδραστήρα μπορούν να παραχθούν με τρεις κυρίως διαδικασίες⁴⁰:

α) Διαδικασίες όπου τα προϊόντα που παράγονται από τα κύτταρα είναι εξωκυτταρικά (π.χ. αλκοόλες, κιτρικό οξύ κ.ά.) ή ενδοκυτταρικά (π.χ. μεταβολίτες, ένζυμα κ.ά.)

β) Διαδικασίες με σκοπό τη βιομάζα.

γ) Διαδικασίες που μετατρέπουν ένα συστατικό. Αυτές ονομάζονται βιομετατροπές.

Παρακάτω θα περιγραφούν μερικοί από τους πιο διαδεδομένους τύπους βιοαντιδραστήρων, τόσο σε εργαστηριακή, όσο και σε βιομηχανική κλίμακα.

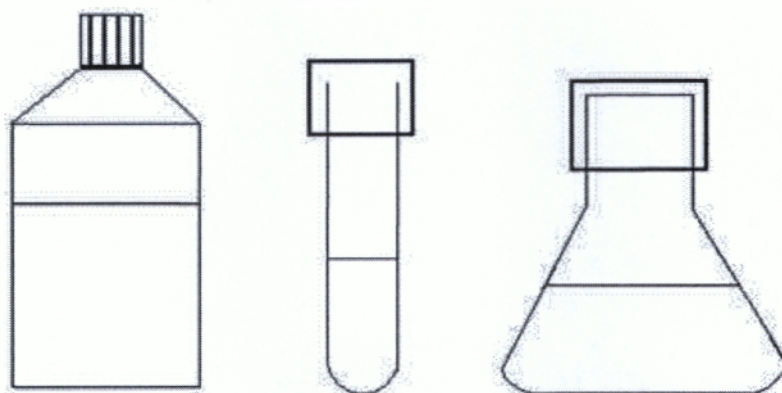
⁴⁰ www.cepmegazine.org. pp. 34-41

⁴¹ www.np.edu.sg/lscet/biochemical_engineering/lectures

⁴² A.L. Laskin, Enzymes and immobilized cells in biotechnology, The Benjamin/cummings Publishing Company Inc. (1985).

9.1 ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΕΣ ΚΑΘΟΡΙΣΜΕΝΗΣ ΔΟΜΗΣ

Οι αντιδραστήρες αυτοί βρίσκουν εφαρμογές κυρίως σε εργαστηριακό επίπεδο και οι όγκοι τους μπορούν να φτάσουν μέχρι και τα 5L. Μερικές χαρακτηριστικές δομές φαίνονται στο παρακάτω διάγραμμα. Το χαρακτηριστικό αυτών των αντιδραστήρων είναι ότι ο αερισμός εξαρτάται από την ταχύτητα μεταφοράς του οξυγόνου από την επιφάνεια της καλλιέργειας και επειδή η επιφάνεια αυτή είναι μικρή, οι αντιδραστήρες αυτοί χρησιμοποιούνται κυρίως για περιπτώσεις όπου οι απαιτήσεις της καλλιέργειας για οξυγόνο είναι μικρές. Μια τεχνική η οποία αυξάνει την ταχύτητα μεταφοράς του οξυγόνου είναι η συνεχής ανάδευση αυτών των αντιδραστήρων, η οποία και αυξάνει την έκταση της επιφάνειας της καλλιέργειας⁴¹.



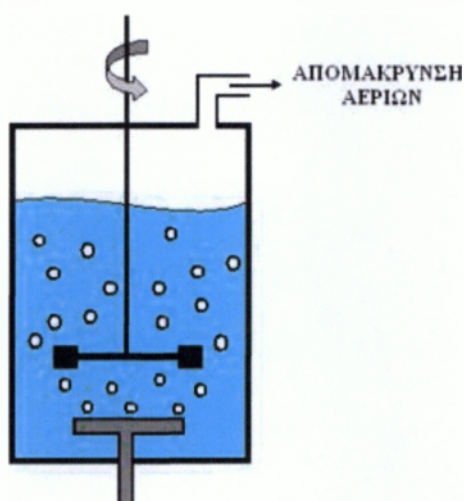
Σχήμα 1: Δομές αντιδραστήρων καθορισμένης δομής.

9.2 ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΕΣ ΑΣΥΝΕΧΟΥΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ (BATCH REACTORS)

Οι αντιδραστήρες αυτοί μπορούν να βρουν εφαρμογή τόσο σε εργαστηριακή όσο και σε βιομηχανική κλίμακα. Το μέγεθος αυτών των αντιδραστήρων είναι ανάλογα με τις απαιτήσεις και τις προδιαγραφές για τις οποίες κατασκευάζονται. Σε εργαστηριακό επίπεδο, όπου η χωρητικότητα τους είναι περιορισμένη, συνήθως κατασκευάζονται από γυαλί, ενώ στην βιομηχανία όπου έχουν πολύ μεγαλύτερη χωρητικότητα, συνήθως κατασκευάζονται από ανοξείδωτο χάλυβα⁴⁰. Για τον καλύτερο αερισμό των καλλιεργειών σε αυτούς τους αντιδραστήρες, μπορούν να προστεθούν συστήματα μηχανικής ανάδευσης ή αερισμού ή και τα δυο μαζί. Στην περίπτωση που εφαρμόζεται μόνο μηχανική ανάδευση, τότε η ταχύτητα ανάδευσης θα πρέπει να είναι σχετικά υψηλή για τον επαρκή αερισμό της καλλιέργειας. Στην περίπτωση της

ταυτόχρονης εφαρμογής και των δυο συστημάτων, τότε η ταχύτητα ανάδευσης μπορεί να είναι χαμηλότερη, γεγονός αρκετά σημαντικό στην περίπτωση της χρήσης ακινητοποιημένων μικροοργανισμών, αφού η έντονη ανάδευση μπορεί να αυξήσει σημαντικά το φαινόμενο της διαφυγής των μικροοργανισμών από το μέσο ακινητοποίησης προς το διάλυμα⁴³. Τόσο η μηχανική ανάδευση, όσο και ο αερισμός συμβάλλουν στην ομογενοποίηση της καλλιέργειας.

Στις περιπτώσεις που οι συνθήκες στον αντιδραστήρα πρέπει να είναι αναερόβιες, όπως στην παραγωγή αλκοόλης, στην παραγωγή οίνων, μύρας και αλκοολούχων ποτών, αλλά και στην επεξεργασία αποβλήτων, τότε τόσο η ανάδευση όσο και τα συστήματα αερισμού αποφεύγονται⁴⁰.

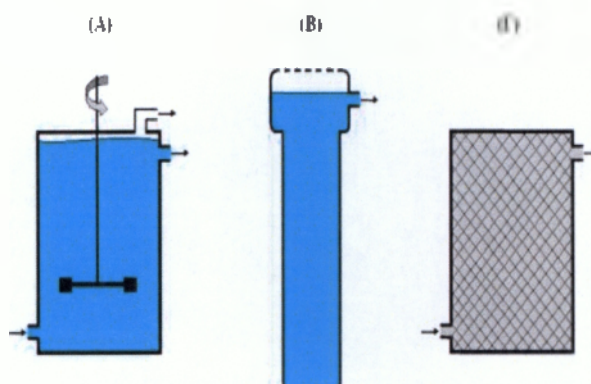


Σχήμα 2: Βιοαντιδραστήρας ασυνεχούς λειτουργίας με σύστημα μηχανικής ανάδευσης και αερισμού.

⁴³ D. Serp, E. Cantana, C. Heinzen, U. Von Stockar, I. W. Marison, Characterization of an Encapsulation Device for the Production of Monodisperse Alginate Beads for Cell Immobilization, *Biotechnol, Bioeng.*

9.3 ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΕΣ ΣΥΝΕΧΟΥΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ

Οι βιοαντιδραστήρες συνεχούς λειτουργίας μπορούν να διακριθούν σε τρία βασικά είδη τα οποία είναι⁴²:



Σχήμα 3: Βιοαντιδραστήρες συνεχούς λειτουργίας αναδεδόμενου δοχείου (Α), ρευστής κλίνης (Β) και σταθερής κλίνης (Γ).

9.4 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΕΣ ΑΝΑΔΕΥΟΜΕΝΟΥ ΔΟΧΕΙΟΥ (STIRRED-TANK REACTORS)

Οι αντιδραστήρες αυτοί είναι οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι. Ως προς τη δομή τους είναι όμοιοι με τους αντίστοιχους ασυνεχείς αντιδραστήρες, με τη μόνη διαφορά ότι υπάρχει η είσοδος και έξοδος θρεπτικού υποστρώματος και προϊόντος. Μια παραλλαγή των αντιδραστήρων αυτών είναι οι αντιδραστήρες με σύστημα ανακύκλωσης των μικροοργανισμών. Σε αυτή την περίπτωση το προϊόν της εξόδου μεταβιβάζεται σε δοχείο, όπου διαχωρίζονται οι μικροοργανισμοί από το κύριο προϊόν (συνήθως με φυγοκέντρωση).

Οι μικροοργανισμοί στη συνέχεια οδηγούνται πίσω στον αντιδραστήρα για να συνεχίσουν τη δράση τους, περιορίζοντας με αυτό τον τρόπο την απώλεια της βιομάζας⁴¹.

9.5 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΕΣ ΡΕΥΣΤΗΣ ΚΛΙΝΗΣ Η ΔΙΟΓΚΩΜΕΝΟΙ (FLUIDIZED OR EXPANDED BED REACTORS)

Στους αντιδραστήρες αυτούς το θρεπτικό υπόστρωμα και η καλλιέργεια βρίσκονται σε υγρή φάση και συνήθως στο επάνω μέρος του αντιδραστήρα υπάρχει μια διόγκωση, ώστε να μην υπάρχει κίνδυνος συσσώρευσης αερίων που παράγονται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης μέσα στον αντιδραστήρα. Ως προς το σχήμα τους οι

αντιδραστήρες αυτοί μπορεί να είναι υπό τη μορφή στήλης⁴² ή υπό τη μορφή κασετίνας⁴⁴. Σημαντικό πλεονέκτημα αυτών των αντιδραστήρων είναι οι υψηλές ταχύτητες μεταφοράς μάζας με την ταυτόχρονη υψηλή συγκέντρωση βιομάζας, ειδικά στην περίπτωση της χρήσης ακινητοποιημένων μικροοργανισμών σε στερά σωματίδια. Όσο πιο μικρά είναι αυτά τα σωματίδια, τόσο πιο εύκολα μπορούν να μετακινούνται μέσα στον αντιδραστήρα, άρα και τόσο πιο μεγάλη μεταφορά μάζας επιτυγχάνεται. Οι αντιδραστήρες αυτοί συνήθως διακρίνονται σε⁴¹:

- διαφασικά συστήματα, όπου δεν υπάρχει αερισμός
- τριφασικά συστήματα, όπου υπάρχει αερισμός (συνήθως με τη βοήθεια αντλίας)

9.6 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΕΣ ΣΤΑΘΕΡΗΣ ΚΑΙΝΗΣ (FIXED OR PACKED BED REACTORS)

Οι αντιδραστήρες αυτοί αποτελούνται από μια πακεταρισμένη στήλη η οποία περιέχει κάποιο στερεό ή ακίνητες στερεές επιφάνειες, που συγκρατούν ή παγιδεύουν τους μικροοργανισμούς. Επίσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν και στερεά πηκτώματα (π.χ. Αλγινικό, καρραγενάνη) υπό τη μορφή σφαιριδίων ή καψυλίων, όπου οι μικροοργανισμοί είναι ακινητοποιημένοι μέσα σε αυτά. Το πλεονέκτημα σε μια τέτοια περίπτωση είναι η αποτελεσματικότερη κατακράτηση της βιομάζας. Το θρεπτικό υπόστρωμα μπορεί να εισαχθεί ή από το πάνω ή από το κάτω μέρος του αντιδραστήρα. Επειδή σε αυτού του είδους τους αντιδραστήρες επιτυγχάνεται η μεγαλύτερη ενεργότητα ανά μονάδα όγκου, το μέγεθος τους μπορεί να είναι μικρότερο από τα άλλα δυο είδη αντιδραστήρων. Οι αντιδραστήρες αυτοί συνήθως χρησιμοποιούνται για βιομετατροπές μικρών μορίων, για κατεργασία υδατικών αποβλήτων, για την παραγωγή ενζύμων και αμινοξέων⁴⁵. Ένα σημαντικό πρόβλημα που παρουσιάζεται κατά τη λειτουργία αυτών των αυτών των αντιδραστήρων είναι η χαμηλή ταχύτητα μεταφοράς μάζας και η δημιουργία συσσωματωμάτων που έχει σαν αποτέλεσμα το φράξιμο της στήλης.

⁴⁴ E. T. Nerantzis, The Microfermentation Cassette (MFC) Application: The continuous production of honey vinegar, e-Journal of science & Technology

⁴⁵ A. N. Glazer, H. Nikaido, Microbial biotechnology: fundamentals of applied microbiology, W. H. Freeman and Company, pp. 250 (1995).

Συγκριτικά μεταξύ των βιοαντιδραστήρων ασυνεχούς και συνεχούς λειτουργίας, οι ασυνεχείς παρουσιάζουν τα πλεονεκτήματα ότι απαιτείται χαμηλότερο κόστος για την κατασκευή τους (σύγκριση αντιδραστήρων ίδιας χωρητικότητας), υπάρχει μικρότερος κίνδυνος επιμόλυνσης και μετάλλαξης των χρησιμοποιούμενων μικροοργανισμών, εμφανίζεται μεγαλύτερη ευελιξία με ευρύτερη ποικιλία προϊόντων και βιολογικών συστημάτων. Σε αντίθεση οι αντιδραστήρες συνεχούς λειτουργίας χαρακτηρίζονται από υψηλότερα ποσοστά παραγωγικότητας, μεγαλύτερη δυνατότητα για αυτοματισμό της διαδικασίας που ακολουθείται, μεγαλύτερους παραγωγικούς χρόνους και σταθερότερη ποιότητα των προϊόντων εξαιτίας των αμετάβλητων συνθηκών λειτουργίας τους⁴⁰.

9.7 ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑΣ ΖΣΚ

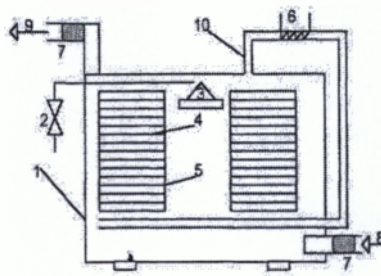
Στις διεργασίες ζύμωσης, ο βιοαντιδραστήρας παρέχει το κατάλληλο περιβάλλον για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού που προκαλεί τις βιολογικές αντιδράσεις. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης πρέπει να εμποδίζει την απελευθέρωση βιομάζας ή μέσου ανάπτυξης στο περιβάλλον καθώς και την είσοδο ξένων ουσιών ή μικροοργανισμών στο χώρο της αντίδρασης. Μεγάλος αριθμός βιοαντιδραστήρων υγρής καλλιέργειας έχει σχεδιαστεί, ενώ οριακή πρόοδος έχει σημειωθεί στους βιοαντιδραστήρες ΖΣΚ. Οι πρόσφατες εξελίξεις στον έλεγχο των διεργασιών υγρής καλλιέργειας μέσω ηλεκτρονικών υπολογιστών έχει δώσει ώθηση στο σχεδιασμό νέων συστημάτων, ενώ οι διεργασίες ΖΣΚ σχεδιάζονται με εμπειρικά κριτήρια (Pandey, 1991)⁴⁶. Στη συνέχεια, εξετάζονται συνοπτικά οι κυριότεροι τύποι βιοαντιδραστήρων ΖΣΚ.

9.8 ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑΣ ΜΕ ΔΙΣΚΟΥΣ

Αποτελεί τον παλαιότερο και απλούστερο βιοαντιδραστήρα ΖΣΚ. Ένα σχετικά λεπτό στρώμα υποστρώματος (πάχους από 5 ως 15 cm) απλώνεται στη μεγάλη επιφάνεια που παρέχουν ειδικά κατασκευασμένοι δίσκοι, τοποθετημένοι ο ένας πάνω στον άλλο. Η ύγρανση του περιβάλλοντος χώρου γίνεται με υγραντήρες ή με την κυκλοφορία υγρού αέρα. Ο αερισμός έχει μικρή ένταση και διευκολύνεται από τους διάτρητους πυθμένες των δίσκων. Η ανάδευση, όταν εφαρμόζεται, γίνεται χειροκίνητα και σε τακτά χρονικά διαστήματα. Τέλος η θερμοκρασία είτε ακολουθεί τις διακυμάνσεις της θερμοκρασίας του περιβάλλοντος, είτε ελέγχεται με την

⁴⁶ Pandey, A. (1991). Aspects of fermenter design for solid-state fermentations. *Process Biochem.* 26, 355-361.

τοποθέτηση των δίσκων σε ειδικά διαμορφωμένα δωμάτια ή συσκευές. Οι βιοαντιδραστήρες με δίσκους απαιτούν μεγάλη επιφάνεια εγκατάστασης και οδηγούν σε διεργασίες εντάσεως εργασίας. Επίσης, το υπόστρωμα χρειάζεται ξεχωριστή αποστείρωση, γεγονός που αυξάνει πολύ το λειτουργικό κόστος (Pandey, 1991)⁴⁶.

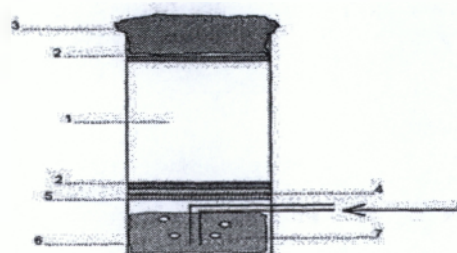


Σχήμα 4: Διάγραμμα ροής τυπικού βιοαντιδραστήρα με δίσκους. 1. Δωμάτιο βιοαντιδραστήρα 2. Βαλβίδα νερού 3. Υγραντήρας 4. Δίσκοι 5. Βάσεις δίσκων 6. Θερμαντήρας αέρα 7. Φίλτρα αέρα 8. Είσοδος αέρα 9. Έξοδος αέρα 10. Ανακύκλωση αέρα (Mitchell et al, 1992)

9.9 ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑΣ ΣΤΕΡΕΑΣ ΚΛΙΝΗΣ

Οι βιοαντιδραστήρες στερεάς κλίνης χαρακτηρίζονται από στατικό υπόστρωμα που σταθεροποιείτε πάνω σε διάτρητη βάση. Το κύριο μέρος του βιοαντιδραστήρα αποτελείται από μια ψηλή, λεπτή, κυλινδρική κολώνα. Ο αερισμός εφαρμόζεται συνήθως από τη βάση. Η διατήρηση της θερμοκρασίας στην επιθυμητή τιμή επιτυγχάνεται με μανδύα που περιβάλλει την κυλινδρική κολώνα. Το πλεονέκτημα των βιοαντιδραστήρων αυτού του είδους είναι η σχετική απλότητά τους, ενώ επιτρέπουν καλύτερο έλεγχο θερμοκρασίας και υγρασίας από τους βιοαντιδραστήρες με δίσκους. Στα μειονεκτήματά τους συγκαταλέγονται το δύσκολο άδειασμα του τελικού προϊόντος, η μη ομοιόμορφη ανάπτυξη του μικροοργανισμού και τα προβλήματα κατά την εφαρμογή σε μεγαλύτερη κλίμακα⁴⁷.

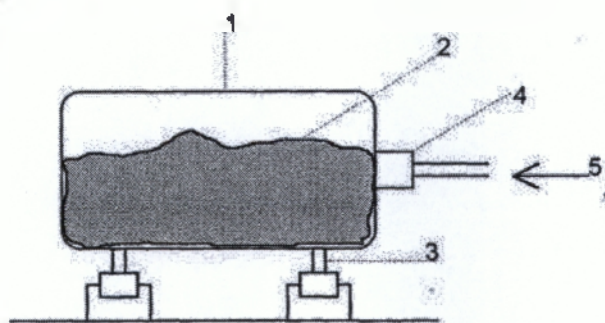
⁴⁷ Lonsate et al, 1992. Scale-up strategies for solid state fermentation systems. *Process Biochem.* 27, 259-273.



Σχήμα 5: Τυπικός βιοαντιδραστήρας στερεάς κλίνης. 1. Χώρος πληρώσεως με στερεό υπόστρωμα 2. Δίσκος διηθητικού χαρτιού 3. Βαμβάκι 4. Υαλοβάμβακας 5. Κόσκινο από ανοξείδωτο χάλυβα 6. Υγραντήρας 7. Νερό 8. Είσοδος αέρα⁴⁸.

9.10 ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑΣ ΠΕΡΙΣΤΡΕΦΟΜΕΝΟΥ ΤΥΜΠΑΝΟΥ

Αποτελείται από έναν οριζόντιο ή κεκλιμένο κύλινδρο, ο οποίος περιστρέφεται γύρω από τον άξονά του, προκαλώντας ανάδευση του στερεού υποστρώματος. Με αυτό τον τρόπο, η ανάμιξη των στερεών είναι πιο ήπια από όλες τις μεθόδους αυτοματοποιημένης ανάδευσης και προκαλεί τη μικρότερη καταστροφή στο μικροοργανισμό και στη δομή του υποστρώματος. Ο αερισμός είναι χαμηλός και γίνεται συνήθως από την κεφαλή του βιοαντιδραστήρα. Μειονεκτήματα των αντιδραστήρων περιστρεφόμενου τυμπάνου αποτελούν η πιθανή συσσωμάτωση των στερεών σωματιδίων και ο δύσκολος έλεγχος της θερμοκρασίας (Mitchell et al, 1992)⁴⁸.



Σχήμα 6: Τυπικός βιοαντιδραστήρας περιστρεφόμενου τυμπάνου. 1. Περιστρεφόμενο τύμπανο 2. στερεό υπόστρωμα 3. Ρουλεμάν 4. Περιστρεφόμενος αρμός 5. Είσοδος αέρα.

⁴⁸ Mitchell et al, 1992. General principles of reactor design and operation for SSC. In: Solid substrate Cultivation, Doelle, H. W., Mitchell, D. A. & Rolz, C. E. (eds), Elsevier Applied Science, London & New York, pp. 29-53.

9.11 ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑΣ ΜΕ ΑΝΑΔΕΥΣΗ

Οι βιοαντιδραστήρες με ανάδευση διακρίνονται σε οριζόντιους και κατακόρυφους, ανάλογα με τη διεύθυνση του άξονα μετάδοσης της κίνησης. Οι οριζόντιοι βιοαντιδραστήρες με ανάδευση μοιάζουν πολύ με τους βιοαντιδραστήρες περιστρεφόμενου τυμπάνου, με μόνη διαφορά ότι η ανάδευση παρέχεται από ένα εσωτερικό σύστημα περυγίων. Οι κατακόρυφοι βιοαντιδραστήρες με ανάδευση συνήθως είναι εφοδιασμένοι με σύστημα ισχυρού αερισμού. Και στα δύο είδη βιοαντιδραστήρων η ανάδευση μπορεί να είναι συνεχής ή περιοδική ⁴⁸.

9.12 ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑΣ ΡΕΥΣΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΚΛΙΝΗΣ

Το βασικό χαρακτηριστικό των βιοαντιδραστήρων ρευστοποιημένης κλίνης είναι μια σχετικά ψηλή κολώνα από τι διάτρητη βάση της οποίας διέρχεται αέρας με μεγάλη ροή. Όταν ένα αέριο περάσει με πολύ μεγάλη ροή μέσα από μια κλίνη στερεών σωματιδίων, τα στερεά αιωρούνται στο αέριο ρεύμα και τότε η κλίνη χαρακτηρίζεται ως ρευστοποιημένη. Για ροές αερίου πολύ μεγαλύτερες από την ελάχιστη ροή ρευστοποίησης, η κλίνη παίρνει την όψη υγρού που βράζει. Τα κυριότερα πλεονεκτήματα αυτού του είδους βιοαντιδραστήρων είναι ο καλός αερισμός, η απομάκρυνση πτητικών παρεμποδιστικών ουσιών, η καλή ανάδευση και η ξήρανση του προϊόντος μέσα στο βιοαντιδραστήρα. Μέχρι τώρα οι ερευνητικές εργασίες σε αυτό το πεδίο έχουν περιοριστεί στην ανάπτυξη ζυμών με σκοπό την παραγωγή αιθανόλης ή μικροβιακής πρωτεΐνης ⁴⁸. Η αιτία είναι το υψηλό κόστος της διεργασίας (ανακύκλωση μεγάλων ποσοτήτων αέρα) και η εμφάνιση ισχυρών διατμητικών τάσεων που συχνά παρεμποδίζουν την κυτταρική ανάπτυξη.

10. ΒΙΟΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ:

Μια νέα στρατηγική μέθοδος για βιοδιυλιστήρια

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μια στρατηγική νέας μεθόδου που βασίζεται στη συγκέντρωση σωματιδίων βιομετασχηματισμού έχει αναπτυχθεί για την παραγωγή χημικών προϊόντων και βιοκαυσίμων προστιθέμενης αξίας. Η διαδικασία, η οποία περιλαμβάνει δύο βασικά στάδια, ζυμώσεις μυκήτων και ασυνεχή εξόρυξη, οδηγεί στην παραγωγή γενόσημων πρώτων υλών ζύμωσης με βάση τα σιτηρά.

Εν μέρει ολόκληροι λείοι κόκκοι σιταριού χρησιμοποιήθηκαν ως υπόστρωμα για την ανάπτυξη των *Aspergillus awamori* σε ένα γεμάτο βιοαντιδραστήρα. Το νερό έρρεε μέσω του στρώματος των σωματιδίων κατά διαστήματα κάθε 6 ώρες για να εξαγάγει γλυκόζη και άλλα θρεπτικά συστατικά και να διατηρήσει τα επίπεδα υγρασίας - θερμοκρασίας. Οι πρώτες ύλες που ελήφθησαν μέσω του συστήματος αυτού έχουν χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω ζυμώσεις από *Wautersia eutropha* για την παραγωγή βιοδιασπώμενων πλαστικών PHB (πολύ-υδροξυβουτιράτη) και από *Saccharomyces cerevisiae* για την παραγωγή αιθανόλης.

Αυτά τα προκαταρκτικά αποτελέσματα καταδεικνύουν τη δυνατή καταλληλότητα της νέας έννοιας του βιομετασχηματισμού σωματιδίων στην ανάπτυξη των βιοδιυλιστηρίων.

10.1 Εισαγωγή

Υπάρχει μια αυξανόμενη κοινωνική και πολιτική απαίτηση για τη δημιουργία ανανεώσιμων πρώτων υλών για την παραγωγή χημικών και καυσίμων που μπορούν να μειώσουν την εξάρτησή μας από τα φθίνοντα αποθέματα πετρελαίου, και να οδηγήσουν στη μείωση των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου. Βασιζόμαστε στο πετρέλαιο για το 90% των μεταφορών μας, για τα τρόφιμα και για τα φαρμακευτικά προϊόντα⁴⁹, αλλά αυτή η ευρεία χρήση πρώτων υλών δεν είναι ούτε βιώσιμη ούτε φιλική για το περιβάλλον.

Τα παγκόσμια αποθέματα πετρελαίου, εκτιμήθηκαν στο τέλος του 2001 να είναι επαρκή για 40,3 χρόνια⁵⁰. Την ίδια στιγμή, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Kyoto,

⁴⁹ Kirby A. Energy: meeting soaring demand, BBC News. Special Reports: Planet Under Pressure: 2004.

⁵⁰ Energy_Information_Administration. International energy outlook. Energy Information Administration: 2003.

οι βιομηχανικές χώρες πρέπει να μειώσουν τις συνολικές εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου κατά μέσο όρο 5,2% (από το 2008) σε σύγκριση με τα επίπεδα του 1990⁵¹. Η Επιτροπή της ΕΕ έχει καλέσει τα μέλη της να προχωρήσουν με μια μείωση κατά 20% έως το 2020, υποδηλώνοντας 20% υποκατάσταση των παραδοσιακών καυσίμων στις οδικές μεταφορές από άλλες εναλλακτικές ουσίες⁵².

Έτσι, με τις τιμές του αργού πετρελαίου να φθάνουν σε ιστορικά υψηλά επίπεδα και την ανάγκη διαφοροποίησης των ενεργειακών πηγών, οι κυβερνήσεις και οι βιομηχανίες αναπόφευκτα στρέφονται στις ανανεώσιμες πηγές ενέργειας, σε αντικατάσταση πρώτων υλών. Ενώ η ανανεώσιμη ενέργεια μπορεί να προέλθει από διάφορες πηγές, όπως ο άνεμος, ο ήλιος, το νερό και η βιομάζα, η παραγωγή υλικών ουσιών εξαρτάται ουσιαστικά από την βιομάζα, και ιδιαίτερα στη βιομάζα των φυτών.

Η φύση παράγει 200 δισεκατομμύρια τόνους βιομάζας ετησίως, μέσω της φωτοσύνθεσης και μόνο το 3-4% χρησιμοποιείται επί του παρόντος από τον άνθρωπο για τροφή ή μη διατροφικούς σκοπούς⁵³. Τα πιο εντατικά καλλιεργούμενα φυτά είναι αυτά που βασίζονται σε άμυλο και, από αυτά, τα δημητριακά είναι τα πιο σημαντικά. Η παγκόσμια παραγωγή σιταριού είναι 617 εκατομμύρια τόνους ετησίως⁵⁴, καθώς και ένα μεγάλο μέρος που σπαταλιέται μέσω, για παράδειγμα, φτωχών τεχνικών μετά τη συγκομιδή και την αποθήκευση. Επιπλέον, η επεξεργασία σιτηρών για ανθρώπινη κατανάλωση αφήνει περίπου το 15% των σιτηρών ως απόβλητο. Έτσι, η χρήση των δημητριακών αποβλήτων και δημητριακών παραπροϊόντων μπορούν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στην παροχή βιώσιμων πρώτων υλών για την παραγωγή χημικών προϊόντων και υλικών. Η γκάμα των προϊόντων με βάση τα σιτηρά σαν ανανεώσιμες πρώτες ύλες θα μπορούσε να είναι τόσο ευρεία όσο αυτή από το πετρέλαιο, δηλαδή διαλύτες, πλαστικά, καύσιμα, χημικές ουσίες, ίνες, ευγενής χημικές ουσίες και ελαία, και ως εκ τούτου η έννοια του βιοδιυληστηρίου είναι ουσιαστική⁵⁵.

⁵¹ UN. Kyoto protocol to the United Nations framework convention on climate change. United Nations: 1998.

⁵² EurActiv. Alternative fuels for transport Environmental Policy Section: 2005.

⁵³ Klass DL. Biomass for renewable energy, fuels and chemicals. Academic Press: 1998.

⁵⁴ FAO. Food outlook: global market analysis. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO): 2006.

⁵⁵ Kamm B, Kamm M, Gruber PR, Kromus S. Biorefinery systems an overview. In: Kamm B, Gruber pr, Kamm M, editors. Biorefineries- industrial processes and products. Wiley-VCH: 2005. p. 3-41.

Με την κίνηση προς ανανεώσιμες πηγές ενέργειας, οι οποίες αναγκαστικά θα είναι βιολογικό υλικό, θα επέλθει μια κίνηση προς εναλλακτικές διαδρομές επεξεργασίας, πολλές από τις οποίες θα είναι επίσης βιολογικά βασισμένες.

Σε αυτές τις περιπτώσεις ο όρος βιοδιυληστήριο είναι διπλά σχετικός, αφενός λόγω της βιολογικής φύσης της πρώτης ύλης και από την άλλη πλευρά, λόγω του αυξανόμενου βιολογικού χαρακτήρα της επιλεγμένης επεξεργασίας και μεθόδων μεταποίησης⁵⁶.

Νέες βιοδιεργασίες που βασίζονται σε ανανεώσιμες πρώτες ύλες που χρησιμοποιούν πιο αποτελεσματικά τους πόρους, και ταυτόχρονα παράγουν λιγότερα απόβλητα, μπορεί να συμβάλουν σημαντικά στην αειφόρο ανάπτυξη. Ωστόσο, δεν αρκεί απλώς να αναπτύξουμε διαδικασίες πιο φιλικές προς το περιβάλλον. Η βιωσιμότητα απαιτεί επίσης οικονομικές και κοινωνικές αποδείξεις⁵⁷. Οι τρέχουσες συμβατικές βιοτεχνολογικές μέθοδοι, που είναι πιο πιθανό να χρησιμοποιηθούν σε συστήματα βιοδιυληστηρίου, απαιτούν γενικά τη χρήση σχετικά ακριβών πρώτων υλών και μεγάλες ποσότητες νερού και συνεπώς, συχνά είναι μη ανταγωνιστικές.

Βιομηχανικές πρακτικές που χρησιμοποιούν σιτηρά ως πρώτη ύλη, χρησιμοποιούν εμπορικά ένζυμα (γλυκοαμυλάση και α-αμυλάση) και ξεχωριστά στάδια υδροποίησης και σακχαροποίησης, αυξάνοντας το κόστος παραγωγής^{58 59}. Στο Κέντρο SATAKE για Μηχανική Επεξεργασία Δημητριακών (SCGPE) έχουμε εργαστεί για την ανάπτυξη μιας νέας διαδικασίας βιοδιυληστηρίου που οδηγεί στην παραγωγή γενόσημων πρώτων υλών ζύμωσης με βάση τα σιτηρά, καθιστώντας τις διαδικασίες και τα προϊόντα πιο ανταγωνιστικά με τα πετροχημικά προϊόντα.

Η πρώτη μέθοδος για την παραγωγή μιας γενικής πρώτης ύλης από σίτο υποβλήθηκε το 1996⁶⁰. Οι πιο σημαντικές λειτουργίες μονάδων που συμμετέχουν στην παραγωγή είναι: η άλεση, η ζύμωση, ενίσχυση της γλυκόζης, και τη βελτίωση του αζώτου. Η διαδικασία προϋποθέτει τη συνεχή ζύμωση με εμβάπτιση (SmF) από αλεύρι σιταριού με *Aspergillus awamori* για επιτόπια παραγωγή ενζύμων και την παραγωγή δύο

⁵⁶ Kamm B, Kamm M. Principles of biorefineries. Appl Microbiol Biotechnol 2004; 64: 137-45.

⁵⁷ Clark J, Maccurrie D. Handbook on green chemistry & technology. Blackwell Publishing: 2002.

⁵⁸ Mulvihill P. Crystalline and liquid dextrose products: production, properties and applications. In: Schenck F, Hebera R, editors. Starch hydrolysis products-worldwide technology production and applications. New York: VCH: 1992.

⁵⁹ Crabb W, Shetty J. Commodity scale production of sugars from starch. Curr Opin Microbiol 1999;2:252-6.

⁶⁰ Webb C, Wang R. Development of a generic fermentation feedstock from whole wheat flour. In: Campbell GM, Webb C, McKee SL, editors. Cereals: novel uses and processes. New York and London: Plenum Press: 1997.

υγρών ρευμάτων, ένα από τα οποία είναι πλούσιο σε γλυκόζη ενώ το άλλο είναι πλούσιο σε άζωτο. Οι γενικές πρώτες ύλες που παράγονται από το συνδυασμό των δύο υγρών ρευμάτων έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την παραγωγή αιθανόλης, γαλακτικού οξέως, χρωστικών ουσιών, ενζύμων, γλυκερόλης, πολύ-υδροξυβουτιράτη (PHB) κ.α.^{61 62 63}.

Θεωρητικές εργασίες που έγιναν⁶⁴ έδειξαν ότι, αν μπορούσε να διπλασιαστεί η αύξηση στην παραγωγή σιταριού παγκοσμίως, αυτό θα ήταν αρκετό για την παραγωγή της πλειοψηφίας των σημερινών πετροχημικών προϊόντων ή ισοδύναμά τους, μέσω του βιομετασχηματισμού, χωρίς καμία μείωση της λιανικής πώλησης τροφίμων του σίτου.

Επίσης πραγματοποιήθηκε εκτίμηση του κόστους, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι το λειτουργικό κόστος για ένα βιομηχανικό συγκρότημα που παράγει περίπου 200 m³ ημερησίως συγκρίνεται ευνοϊκά με τις συμβατικές πρώτες ύλες και δεν υπάρχει ανάγκη για επιπλέον θρεπτικά υλικά, όπως θα μπορούσε να συμβεί με τα σιρόπια γλυκόζης, μελάσα κλπ.

Αυτά τα χαρακτηριστικά καθιστούν το σιτάρι και τη διαδικασία που προτείνεται μια εφικτή λύση προς την εμπορευματοποίηση αποτελεσματικών και ανταγωνιστικών ως προς το κόστος ανανεώσιμων πρώτων υλών για την παραγωγή χημικών.

10.1.1 Βιομετασχηματισμός σωματιδίων

Προκειμένου να ξεπεραστούν ορισμένες από τις προκλήσεις της παραγωγής των γενόσημων πρώτων υλών ζύμωσης, αναπτύχθηκε μια στρατηγική διαδικασία για βιοδιωλιστήρια (βιομετασχηματισμού σωματιδίων), βασισμένη σε ζύμωση στερεάς κατάστασης (SSF). Αυτή η νέα διαδικασία, αντιμετωπίζει δύο από τα τρέχοντα προβλήματα του συμβατικού βιομετασχηματισμού.

Πρώτον, στη συμβατική επεξεργασία η άλεση των σπόρων των σιτηρών είναι απαραίτητη και αυτή είναι μια έντονη ενέργεια προ-επεξεργασίας, που απαιτεί

⁶¹ Koutinas AA, Wang R, Campbell GM, Webb C. A whole crop biorefinery system: a close system for the manufacture of non-food products from cereals. In: Kamm B, Gruber PR, Kamm M, editors. Biorefineries- industrial processes and products. Wiley-VCH: 2005. p. 165-93.

⁶² Koutinas AA, Xu Y, Wang R, Webb C. Polyhydroxybutyrate production from a novel feedstock derived from a wheat-based biorefinery. *Enzyme Microb Technol* 2006;40: 1035-44.

⁶³ Wang R, Dominguez-Espinosa RM, Leonard K, Koutinas A, Webb C. The application of a generic feedstock from wheat for microbial fermentations. *Biotechnol Prog* 2002; 18(5): 1033-8.

⁶⁴ Koutinas AA, Wang R, Webb C. Evaluation of wheat as generic feedstock for chemical production. *Ind Cros Prod* 2004;20(1): 75-88.

περίπου 36 kJ kg^{-1} σίτου⁶⁵. Η χρήση λείανσης αντί αλέσεως θα μπορούσε καταρχήν να μειώσει αυτή την ενέργεια έως και κατά 60%. Η λείανση είναι μια διαδικασία κατά την οποία τα στρώματα του φλοιού του σιταριού απομακρύνονται διαδοχικά με τριβή και γίνεται σε έναν αποφλοιωτή⁶⁶.

Δεύτερον, ο βιομετασχηματισμός συνήθως περιλαμβάνει ζύμωση με εμβάπτιση, η οποία απαιτεί μεγάλες ποσότητες νερού, σε αυτή την περίπτωση $12,5 \text{ kg}$ νερού ανά kg σίτου (για 8% w/v). Η στρατηγική διαδικασία που προτείνεται σε αυτή την εργασία για την παραγωγή πρώτων υλών που βασίζονται σε SSF θα μπορούσε να μειώσει την απαίτηση νερού κατά περισσότερο από 90% (χρησιμοποιώντας ολόκληρους κόκκους σίτου σε $0,8 \text{ kg}$ νερού ανά kg στερεών κόκκων). Η χρήση ολόκληρων σπόρων μειώνει προβλήματα παχυρευστότητας που συνδέονται με τη χρήση αναστολών αλεύρου που είναι ένας από τους περιορισμούς του SmF.

Ζύμωση στερεάς κατάστασης ορίζεται ως η καλλιέργεια μικροοργανισμών στα υγρά στερεά υλικά, είτε με αδρανής αερομεταφορείς ή σε αδιάλυτο υπόστρωμα που μπορεί, επιπλέον, να χρησιμοποιούνται ως άνθρακας και ως πηγή ενέργειας⁶⁷.

Σύμφωνα με Moo-Young και άλλους⁶⁸, ο όρος ζύμωση στερεάς κατάστασης θα πρέπει να χρησιμοποιείται ειδικά για εκείνες τις καταστάσεις στις οποίες ο χώρος μεταξύ των στερεών υλικών καταλαμβάνεται από μια συνεχή φάση αερίου. Το υγρό στερεό υλικό που χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα μπορεί να είναι είτε μια συνεχή ή μια διακριτή φάση, διαιρώντας τα συστήματα SSF σε δύο υποσύνολα (Σχ.7). Όταν το στερεό είναι μια συνεχής φάση, ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται σε μεγάλη έκταση όπως πλάκες άγαρ ή στερεό κέικ και σε αυτή την περίπτωση μπορεί να χαρακτηριστεί ως καλλιέργεια Στερεής Επιφάνειας. Το δεύτερο υποσύνολο των SSF περιλαμβάνει μια διακριτή στερεά φάση στην οποία οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται στην επιφάνεια των υγρών διακριτών σωματιδίων, στο εσωτερικό τους και μεταξύ των σωματιδίων. Ο επιλεγμένος όρος για να περιγράψει αυτό το είδος συστήματος SSF, το οποίο συνεπάγεται τη χρήση σωματιδίων είναι

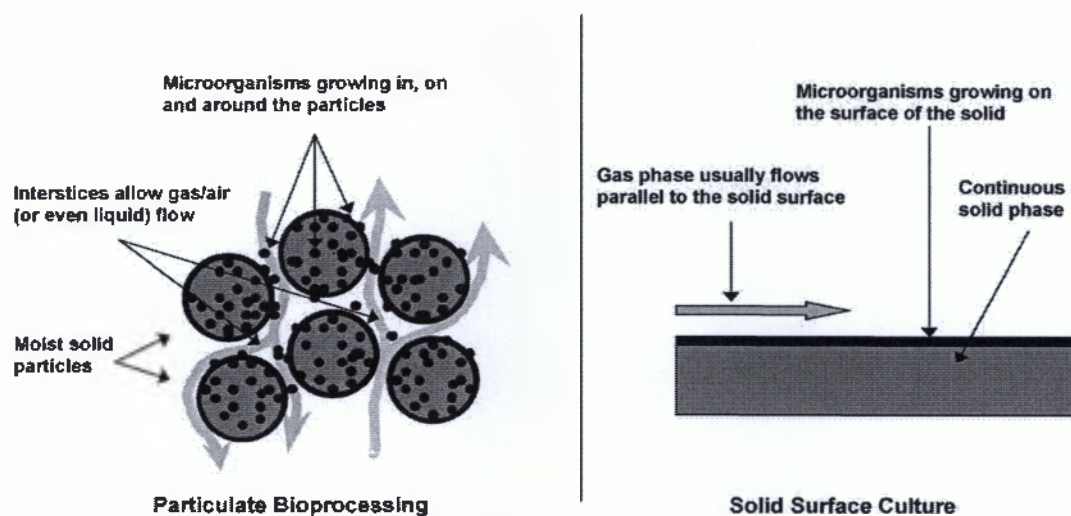
⁶⁵ Koutinas AA, Wang R, Webb C. Restructuring upstream bioprocessing: technological and economical aspects for production of a generic microbial feedstock from wheat. *Biotechnol Bioeng* 2004;85(5): 524-38.

⁶⁶ Mousia Z, Edherly S, Pandiella SS, Webb C. Effect of wheat pearling on flour quality. *Food Res Int* 2004;37(5): 449-59.

⁶⁷ Mitchell DA, Kreiger N, Berovic M. Solid-state fermentation bioreactors. In: *Fundamentals of design and operation*. Springer: 2006.

⁶⁸ Moo-young KM, Moreira AR, Tengerdy RP. Principles of solid-substrate fermentation. In: Smith JE, Berry DR, Kristiansen B, editors. *The filamentous fungi*. London: Edward Arnold: 1983. p. 117-44.

βιομετασχηματισμός σωματιδίων, ένας νέος και πιο συγκεκριμένος όρος που έχει καθοριστεί και εισήχθη για να τονίσει τη σωματιδιακή φύση του υποστρώματος.



Σχήμα 7: Απεικόνιση των δύο υποσυνόλων των συστημάτων ζύμωσης στερεάς κατάστασης, σύμφωνα με το νέο ορισμό που ορίστηκε στο κείμενο

Σήμερα, οι περισσότερες από τις εμπορικά σημαντικές ζυμώσεις στερεάς κατάστασης εμπεριέχουν υποστρώματα σε στερεά κατάσταση σωματιδίων.

Έτσι, σε αυτή την περίπτωση μπορούμε να αναφερθούμε σε αυτές ως συστήματα βιομετασχηματισμού σωματιδίων. Η φύση των σωματιδίων, που συνεπάγεται μεγάλη επιφάνεια σε αναλογία όγκου και την απουσία ελεύθερου ύδατος, καθιστά τα συστήματα αυτά αρκετά διαφορετικά από τις παραδοσιακές ζυμώσεις με εμβάπτιση και προσδίδει στο βιομετασχηματισμό σωματιδίων πολλά πιθανά οφέλη, όπως ελαχιστοποίηση αποβλήτων και εντατικοποίηση της διαδικασίας.

Ο βιομετασχηματισμός σωματιδίων είναι κοντά στο φυσικό περιβάλλον στο οποίο πολλοί μικροοργανισμοί είναι προσαρμοσμένοι, επιτρέποντας αύξηση της ανάπτυξης, μορφολογική πολυμορφία και διαφοροποίηση⁶⁹.

Σε συστήματα βιομετασχηματισμού σωματιδίων η υψηλή συγκέντρωση υποστρώματος λόγω της απουσίας ελεύθερου νερού μπορεί να επιτρέψει υψηλή συγκέντρωση βιομάζας και προϊόντος. Αυτό επιτρέπει τη χρήση μικρότερων αντιδραστήρων και απλούστερη λήψη του προϊόντος.

⁶⁹ Mitchell DA, Berovic M, Krieger N. Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing. In: Scheper T, editor. Advances in biochemical engineering biotechnology. Springer: 1999. p. 61-138.

Ο βιομετασχηματισμός σωματιδίων αναγνωρίζεται να είναι ένα καλό σύστημα για την παραγωγής του ενζύμου με τη χρήση διαφόρων πρώτων υλών^{70 71 72 73}.

Έχει αποδειχθεί από τον Viniegra-Gonzalez και άλλους⁷⁴ ότι τα πλεονεκτήματα του βιομετασχηματισμού σωματιδίων στην παραγωγή του ενζύμου οφείλονται σε: υψηλή παραγωγικότητα (λόγω της αυξημένης βιομάζας), τη χαμηλή πρωτεόλυση και μεγάλη επιφάνεια για την ανταλλαγή αερίων.

Ένα άλλο πλεονέκτημα που συνδέεται με την έλλειψη ελεύθερου ύδατος είναι ότι το οξυγόνο λαμβάνεται από τους μικροοργανισμούς πιο άμεσα από τον αέρα με διάχυση και έτσι ο αερισμός απαιτεί λιγότερη δύναμη επειδή οι πιέσεις είναι χαμηλότερες⁷⁵. Συνεπώς, υπάρχει λιγότερη απαίτηση ενέργειας, έλλειψη συσσώρευσης αφρού και ο κίνδυνος μόλυνσης είναι μικρότερος δεδομένου ότι οι περισσότεροι μικροοργανισμοί χρειάζονται υψηλή δραστηριότητα νερού να αναπτυχθούν. Τέτοια πλεονεκτήματα θα σήμαιναν ότι υπάρχουν σημαντικές δυνατότητες για βιομετασχηματισμό σωματιδίων στην ανάπτυξη των διαδικασιών βιοδιυλιστηρίου. Υπάρχουν, επίσης, βεβαίως, μειονεκτήματα που συνδέονται με ζύμωση στερεάς κατάστασης. Αυτά περιλαμβάνουν κακή ανάμειξη, ετερογένεια, αποξήρανση, χαρακτηριστικά κακής μετακίνησης θερμότητας και ρυθμούς ανάπτυξης που περιορίζονται από διάχυση θρεπτικών ουσιών^{76 77}. Έχοντας τα στερεά με τη μορφή διακριτών σωματιδίων (σωματιδίων βιομετασχηματισμού) μπορεί να βοηθήσει στην ανακούφιση ορισμένων από αυτά τα προβλήματα, ιδίως εάν μια διακοπτόμενη πρόσθεση νερού έχει ενσωματωθεί στην λειτουργία της ζύμωσης.

Η εργασία αυτή περιγράφει τα επιτευχθέντα αποτελέσματα όσον αφορά την ανάπτυξη μιας διαδικασίας που βασίζεται στον βιομετασχηματισμό σωματιδίων,

⁷⁰ Ustok FI, tarin C, Gogus N. Solid-state production of polygalacturonasa by *Aspergillus sojae* ATCC 20235. *J Biotechnol* 2007;127(2):322-34.

⁷¹ Botella C, de Ory I, Cantero D, Blandino A. Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace. *Biochem Eng J* 2005;26(2-3):100-6.

⁷² Pandey A, Selvakumar P, Soccol CR, Nigam P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Curr Sci* 1999;77(1):149-62.

⁷³ Botella C, Diaz A, De Ory I, Webb C, Blandino A. Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. *Process Biochem* 2007;42: 98-101.

⁷⁴ Viniegra-Gonzalez G, Favela-Torres E, Aguilar CN, Romero-Gomez SJ, Diaz-Godinez G, Augur C. Advantages of fungal enzymes production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochem Eng J* 2003;13(2-3): 157-67.

⁷⁵ Pandey A, Soccol CR, Rodriguez-Leon JA, Nigam P. Solid-state fermentation in biotechnology: fundamentals and applications. *Asiatech Publisher Inc.*: 2001.

⁷⁶ Holker U, Lenz J. Solid-state fermentation – are there any biotechnological advantages? *Curr Opin Microbiol* 2005;8: 301-6.

⁷⁷ Hardin MT, hows T, Mitchell DA. Mass transfer correlations for rotating drum bioreactors. *J Biotechnol* 2002;97(1): 89-101.

παρουσιάζοντας ορισμένα πειραματικά αποτελέσματα από την πραγματοποίηση σημαντικών εργασιών μονάδας εντός της διαδικασίας.

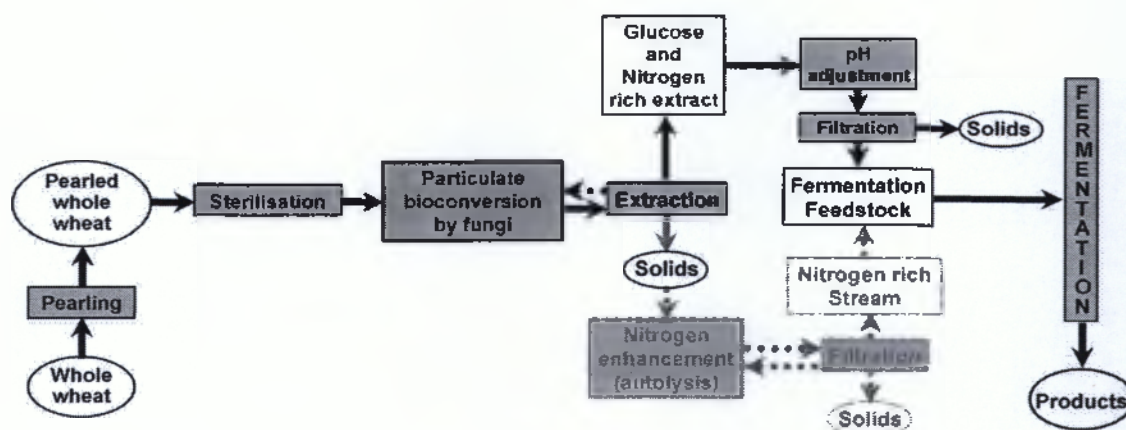
Αυτή η στρατηγική νέας μεθόδου για βιοδιωλιστήρια μπορεί να συνοψιστεί χρησιμοποιώντας το σχεδιάγραμμα στο Σχ. 8. Η αρχική διαδικασία για να παραχθεί το γενικό μέσο ζύμωσης με βάση τα σιτηρά⁶⁰ εμπεριείχε πολλά στάδια της διαδικασίας. Ο βιομετασχηματισμός σωματιδίων προσφέρει την δυνατότητα να μειωθεί η πολυπλοκότητα της όλης διαδικασίας συνδυάζοντας μερικά από τα βήματα. Η προτεινόμενη διαδικασία περιλαμβάνει δύο κύρια στάδια της ζύμωσης.

Στο πρώτο, ένα γεμάτο κρεβάτι από μερικώς στρογγυλεμένους ολόκληρους κόκκους σιταριού χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα για το μύκητα *A. awamori* που παράγει αμυλολυτικά ένζυμα για να υποβαθμίσει το άμυλο σε γλυκόζη. Οι μύκητες παράγουν επίσης πρωτεάσες που μετατρέπουν πρωτεΐνες σιταριού σε ελεύθερο αμινο αζώτου (FAN). Διακοπτόμενη ροή νερού μέσω του αντιδραστήρα κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας βοηθά στην διατήρηση της υγρασίας και τα επίπεδα θερμοκρασίας, και χρησιμοποιείται επίσης για να εκχύλισμα διαλυτών συστατικών.

Το δεύτερο βήμα ζύμωσης γίνεται με τη χρήση των εκχυλισμάτων που λαμβάνονται από το πρώτο βήμα. Αυτά έχουν υψηλή γλυκόζη και ελεύθερες συγκεντρώσεις αμινο αζώτου και μπορούν να χρησιμοποιηθούν, για παράδειγμα, με *Wautersia eutropha* για την παραγωγή των βιοδιασπώμενων πλαστικών PHB ή από *Sacharomyces cerevisiae* για την παραγωγή αιθανόλης. Αυτά τα δύο προϊόντα έχουν επιλεγεί για τη δοκιμή των πρώτων υλών ζύμωσης, εξαιτίας των περιβαλλοντικών οφελών τους σε σχέση με πλαστικά με βάση το πετρέλαιο και τα ορυκτά καύσιμα μεταφορών ,αντίστοιχα^{78 79}.

⁷⁸ Harding KG, Dennis JS, von Blottnitz H, Harrison STL. Environmental analysis of plastic production processes: comparing petroleum based polypropylene and polyethylene with biologically-based poly-β-hydroxybutyric acid using life cycle analysis. *J Biotechnol* 2007;130(1): 57-56.

⁷⁹ Lee J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *J Biotechnol* 1997;56(1): 1-24.



Σχήμα 8: Προτεινόμενη διαδικασία για την παραγωγή γενικών πρώτων υλών ζύμωσης με βιομετασχηματισμό σωματιδίων. Οι διακεκομμένες γραμμές δείχνουν προαιρετικά στάδια της διαδικασίας

10.2 Υλικά και μέθοδοι

10.2.1 Μικροοργανισμοί

Μυκητιασικές ζυμώσεις διεξήχθησαν χρησιμοποιώντας ένα στέλεχος της *A. awamori* 2B.361 U2 / 1.

Πριν από την πειραματική εργασία, σπόρια *A. awamori* καθαρίστηκαν και επωάστηκαν σε φιάλες που περιείχαν στερεό θρεπτικό υπόστρωμα του 5% (w / w) αλεύρι ολικής αλέσεως σίτου και 2% (w/w) άγαρ σε ξηρή βάση(db). Τα προκύπτοντα σπόρια ανεστάλησαν σε 10% (v/v) διάλυμα γλυκερίνης και αποθηκεύτηκαν σε κρυοφιαλίδια των 2 ml στους -30 βαθμούς Κελσίου. Βακτηριακές ζυμώσεις διεξήχθησαν χρησιμοποιώντας το στέλεχος *W. eutropha* NCIMB 11599. Μια λυοφιλοποιημένη καλλιέργεια επαναδραστηριοποιήθηκε και επωάστηκε στους 30 βαθμούς Κελσίου για 24 ώρες σε ένα μέσο ανάπτυξης που περιείχε MRS ζωμό (Oxoid) και γλυκόζη (0,5%). Οι βακτηριακές καλλιέργειες αποθηκεύτηκαν στους 4 βαθμούς Κελσίου σε πλαγιές που περιείχαν 5 g L⁻¹ γλυκόζης, 10 g L⁻¹ εκχύλισμα μαγιάς και 20 g L⁻¹ άγαρ. Ζυμώσεις εμβολίων παρασκευάστηκαν με τη μεταφορά των κυττάρων χρησιμοποιώντας αποστειρωμένο βρόγχο σύρμα σε υγρό μέσο που περιείχε 5 g L⁻¹ γλυκόζη και 10 g L⁻¹ εκχύλισμα μαγιάς. Ζυμώσεις μαγιάς διεξήχθησαν χρησιμοποιώντας *S. cerevisiae* ATCC 22602 για την παραγωγή βιοαιθανόλης. Κύτταρα μαγιάς καλλιεργήθηκαν στο πρότυπο μέσο MYGP (3 g L⁻¹ εκχύλισμα μαλτόζης, 3 g L⁻¹ εκχύλισμα μαγιάς, 50 g L⁻¹ γλυκόζη, και 5 g L⁻¹ πεπτόνης) για την προετοιμασία εμβολίου.

10.2.2 Προετοιμασία των μέσων ζύμωσης

Μια ποικιλία μαλακού σίτου, Consort (που συλλέχθηκε το 2003 και διατέθηκε από την Εταιρία Σπόρων και Κόκκων Fisher Limited, Cranswick, UK) ήταν η κύρια πρώτη ύλη που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη αυτή.

Οι σπόροι του σίτου λειάνθηκαν για 5 δευτερόλεπτα με τη χρήση Λειαντικού μύλου Test SATAKE (μοντέλο TM05). Για να ρυθμίσουμε το ποσοστό υγρασίας στο επιθυμητό επίπεδο ($0,8 - 0,9 \text{ g νερού g}^{-1}$ στερεών κόκκων), λείοι κόκκοι εμποτίστηκαν σε πολύ νερό για 20 h. Μετά από διήθηση για την εξάλειψη του ελεύθερου νερού, οι κλιματιζόμενοι κόκκοι αποστειρώθηκαν για 3 ώρες στους 120 βαθμούς Κελσίου στο αυτόκλειστο.

Η πρώτη ύλη που χρησιμοποιήθηκε για τις ζυμώσεις βακτηρίων και ζύμης ελήφθη με διαλείπουσα εκχύλιση με νερό κατά τη διάρκεια της ζύμωσης μυκήτων.

Ένας συνδυασμός εκχυλισμάτων με συγκέντρωση της γλυκόζης του $19,3 \text{ g L}^{-1}$ και FAN των $0,036 \text{ g L}^{-1}$ χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια *W. eutropha*. Τρία διαφορετικά μέσα προετοιμάστηκαν να μελετήσουμε τις διαφορετικές συνθήκες, το pH των εκχυλισμάτων (C, D και E) ρυθμίστηκε από το pH 2,9 έως το βέλτιστο (6,8) για την ανάπτυξη *W. eutropha* με 10 M NaOH. Εκχύλισμα μαγιάς (7 mg) προστέθηκε στο μέσο E προκειμένου να αυξηθεί το περιεχόμενο FAN έως $0,061 \text{ g L}^{-1}$. Τα μέσα C και E αυτοκαύθηκαν στους 120 βαθμούς Κελσίου για 20 λεπτά, ενώ το μέσο D αποστειρώθηκε με διήθηση με τη χρήση μονάδας φίλτρου 0,2 χιλιοστών (Polycap 36 AS, Fisher).

Για την παραγωγή αιθανόλης η πρώτη ύλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν διαφορετική από εκείνη που χρησιμοποιείται για τον *W. eutropha*.

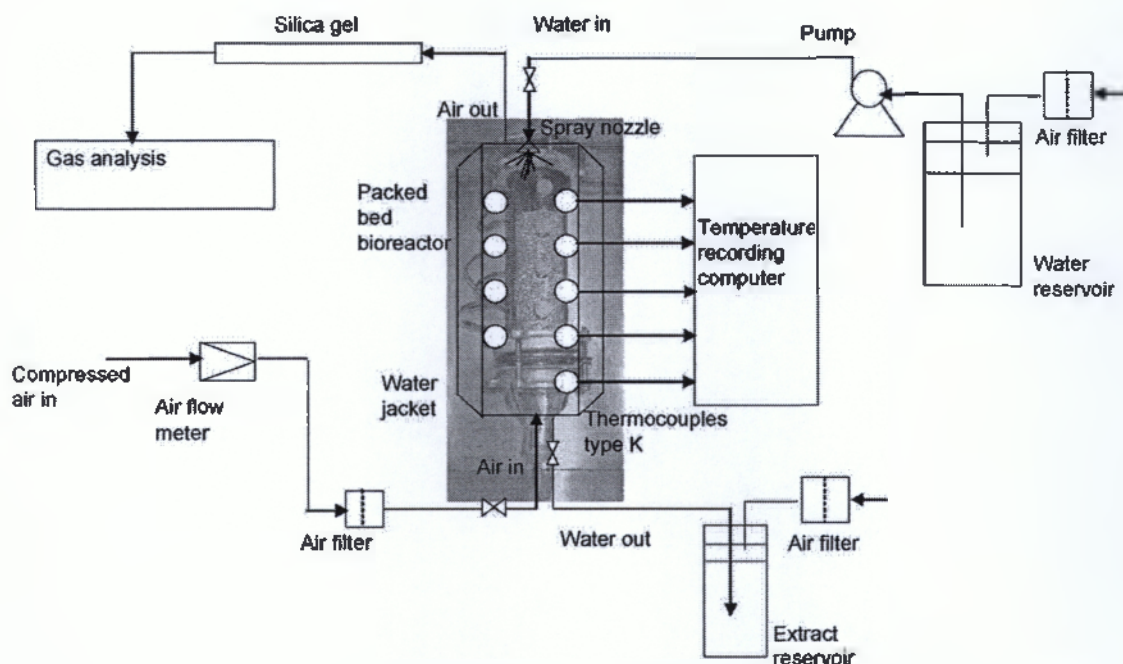
Αυτή η πρώτη ύλη περιείχε σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις γλυκόζης και FAN ($142,1 \text{ g γλυκόζης L}^{-1}$, $0,33 \text{ g FAN L}^{-1}$) λόγω της συμπερίληψης διέγερσης κατά την εξόρυξη. Τα εκχυλίσματα φιλτραρίστηκαν πριν εμβολιαστούν με *S. cerevisiae*.

10.2.3 Πειραματική προεργασία

Η παραγωγή των γενικών πρώτων υλών πραγματοποιήθηκε σε ένα γεμάτο αεριούχο αντιδραστήρα κρεβάτι $1,5 \text{ L}$ με ένα όγκο εργασίας του 1 L .

Η καινοτομία του συστήματος είναι η ενσωμάτωση ενός ακροφύσιου ψεκασμού για απαλή ροή νερού κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Μετά την αποστείρωση, 800 g σπόροι σιταριού με περιεκτικότητα σε υγρασία $0,87 \text{ g νερού g}^{-1}$ στερεού σιτηρού

εμβολιάστηκαν με 6 ml αιωρήματος σπορίων για να καταλήξει σε συγκέντρωση $1 \times 10^6 \text{g}^{-1}$ σπόρια των στερεών κόκκων. Μετά τον εμβολιασμό, οι σπόροι μεταφέρθηκαν σε ένα προηγουμένως αποστειρωμένο αντιδραστήρα (3 ώρες σε 120 K) και το σύστημα συναρμολογήθηκε όπως φαίνεται στο Σχ. 9.



Σχήμα 9: Σύστημα βιομετασχηματισμού σωματιδίων με διαλείπουσα προσθήκη νερού.

Συμπεσμένος αέρας εισέρχονταν στο σύστημα σε 1 L min^{-1} και αποστειρώθηκε χρησιμοποιώντας ένα φίλτρο αέρος. Ο αέρας τροφοδοτούνταν στον βιοαντιδραστήρα μέσω ενός διανομέα αέρος. Ο βιοαντιδραστήρας αποτελούνταν από ένα αποστειρωμένο γυάλινο κύλινδρο διαμέτρου των 8 εκ και 30 εκ ύψος, κλειστό στα δύο άκρα με ανοξείδωτες ατσάλινες πλάκες. Η κάτω πλάκα είχε δύο εισόδους για αέρα και την είσπραξη των εκχυλισμάτων και πάνω πλάκα είχε ανοίγματα για την έξοδο των καυσαερίων και την είσοδο του νερού. Πέντε αισθητήρες θερμοκρασίας (θερμοζεύγη τύπου K) και τέσσερα σημεία δειγματοληψίας βρίσκονται μέσα στο γυάλινο κύλινδρο. Ο αντιδραστήρας ήταν καλυμμένος από ένα σωλήνα σιλικόνης τυλιγμένο γύρω από το γυάλινο κύλινδρο για να ενεργεί ως επένδυση νερού.

Το νερό κυκλοφορούσε μέσα στην επένδυση από ένα υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους περίπου 30 K και η θερμοκρασία στα θερμοζεύγη καταγράφονταν από έναν υπολογιστή Microlab II (Aglicon, UK).

Για να μειώσουμε την υγρασία και ακαθαρσίες των καυσαερίων που εξέρχονται από το αντιδραστήρα, η ροή εξόδου περνούσε μέσα από ένα φίλτρο και ένα σωλήνα που περιείχε silica gel (διοξείδιο σιλικόνης). Ένα ρεζερβουάρ αποστειρωμένου νερού ήταν συνδεδεμένο στο στόμιο ψεκασμού μέσα από μια αντλία για να διανέμει νερό σε 180 ml min^{-1} . Αυτή η ταχύτητα ροής ήταν η ελάχιστη που απαιτούνταν για καλή διανομή νερού χρησιμοποιώντας το ακροφύσιο. Η αντλία ενεργοποιούνταν κάθε 6 ώρες για 30 δευτερόλεπτα, προσφέροντας 90-100ml νερό για κάθε εξαγωγή.

Για να βελτιωθούν και να μελετηθούν κάποιες από τις συνθήκες της εκχύλισης, αρκετές παρτίδες πειραμάτων εκχύλισης διεξήχθησαν χρησιμοποιώντας τα στερεά που έμειναν στο τέλος της ζύμωσης μυκήτων. Έτσι 10 g στερεών που είχαν υποστεί ζύμωση αναμίχθηκαν με 10 ml νερού σε φιάλες Erlenmeyer και στη συνέχεια ανακινήθηκαν σε περιστροφικό αναδευτήρα.

Διαφορετικές μεταβλητές μελετήθηκαν σχετικά με την εξόρυξη: θερμοκρασία εξόρυξης, διάρκεια της εξόρυξης, ρυθμός ανάδευσης, επανακυκλοφορία και ο αριθμός των βημάτων εξαγωγής.

Κάθε μεταβλητή μελετήθηκε χωριστά, διατηρώντας τις υπόλοιπες σε σταθερές τιμές: 10 ml αποσταγμένου νερού, 15 λεπτά ανακίνησης, 30 K και 200 περιστροφές ανά λεπτό. Το αιώρημα που προέκυψε μετά από κάθε εκχύλιση υποβλήθηκε σε φυγοκέντρωση (4000 στροφές ανά λεπτό, 15 λεπτά) και το υπερκείμενο αποθηκεύτηκε σε -20 K μέχρι να ζητηθεί για την ανάλυση. Κάθε ένα από τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν παρήχθησαν από διπλότυπα.

Οι θερμοκρασίες που μελετήθηκαν ήταν γύρω από την βέλτιστη θερμοκρασία ζύμωσης 20, 25, 30 και 35 K. Τα ποσοστά ανάδευσης που αξιολογήθηκαν ήταν 0, 150, 200 και 250 στροφές ανά λεπτό.

Η κινητική της εξόρυξης μελετήθηκε επίσης, ελέγχοντας τη συγκέντρωση των προϊόντων απόσταξης μετά από 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 και 20 λεπτά από την εκχύλιση.

Για να αυξηθεί η συγκέντρωση της γλυκόζης και να μειωθεί η ποσότητα του νερού που χρησιμοποιείται, ένα πείραμα πραγματοποιήθηκε, όπου το νερό που λαμβάνεται μετά την πρώτη εξαγωγή ανακυκλώνονταν πολλές φορές χρησιμοποιώντας νέα στερεά. Το εκχύλισμα ανακυκλώνονταν μόνο τέσσερις φορές, επειδή ο όγκος του υγρού μειώνονταν σε κάθε εκχύλιση και σχεδόν εξαντλούνταν μετά τον 4ο κύκλο.

Τέλος, για να ελεγχθεί αν υπήρχαν ακόμα θρεπτικά συστατικά μέσα στα στερεά μετά από μία και μόνο εξαγωγή και για να υπολογισθεί το συνολικό ποσό των θρεπτικών

ουσιών και ενζύμων που υπάρχουν στο στερεό, διαδοχικές εκχυλίσσεις έγιναν χρησιμοποιώντας το αρχικό στερεό ζύμωσης και ανανεώνοντας τον διαλύτη. Μετά από κάθε στάδιο εκχύλισης, το περιεχόμενο της φιάλης υποβάλλονταν σε φυγοκέντρηση για να διαχωριστεί το στερεό από το υγρό. Τότε, άλλα 10 ml αποσταγμένου νερού προστέθηκαν στα στερεά για την επόμενη εξόρυξη. Αυτή η διαδικασία επαναλήφθηκε έντεκα φορές, αποκτώντας έντεκα εκχυλίσματα. Η αξιολόγηση της πρώτης ύλης για την παραγωγή PHB έγινε χρησιμοποιώντας τα τρία διαφορετικά μέσα που περιγράφονται παραπάνω.

Βακτηριακές ζυμώσεις σε φιάλες Erlenmeyer 500 ml πραγματοποιήθηκαν σε ένα περιστροφικό αναδευτήρα των 250 στροφών ανά λεπτό (Infors AG, CH-4103 Bottmingen) στις 30 K. Ο ίδιος όγκος (50 ml) των μέσων ζύμωσης και το ίδιο αρχικό εμβόλιο (1 ml) χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε φιάλη.

Για την παραγωγή αιθανόλης 100 ml από ένα μείγμα των εκχυλισμάτων είχε εμβολιαστεί με 2 ml εναιωρήματος του *S. cerevisiae* δίνοντας μια συγκέντρωση της τάξης του $4,5 \times 10^6 \text{ cell ml}^{-1}$.

Οι ζυμώσεις ζύμης έγιναν υπό στατικές και αναερόβιες συνθήκες στους 30 K σε φιάλες Duran 250 ml εφοδιασμένες με καπάκια "κύκνειου λαιμού".

10.2.4 Αναλυτικές μέθοδοι

Τα διάφορα εκχυλίσματα που ελήφθησαν κατά τη διάρκεια του βιομετασχηματισμού σωματιδίων, αφού υποβλήθηκαν σε φυγοκέντρηση στις 4000 στροφές ανά λεπτό για 15 λεπτά, αναλύθηκαν από άποψη γλυκόζης, FAN και δραστηριότητα γλυκοαμυλάσης.

Η συγκέντρωση γλυκόζης αναλύθηκε χρησιμοποιώντας έναν αναλυτή γλυκόζης Analox GL6. Η συγκέντρωση FAN αναλύθηκε με τη μέθοδο χρωματομετρικής νινυδρίνης⁸⁰.

Η δραστηριότητα γλυκοαμυλάσης προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας το πρώην ζελατινοποιημένο (> 75 K, 15 λεπτά) εναιώρημα αλεύρου ολικής αλέσεως σίτου 6% (w/v, db) ως υπόστρωμα.

Σε 2 ml εναιωρήματος αλεύρου σίτου, προστέθηκαν 2 ml κατάλληλα αραιωμένου ενζύμου. Το διάλυμα που προέκυψε, επώαστηκε σε 60 K για 10 λεπτά. Στο χρόνο 0,5 και 10 λεπτά, 0,5 ml του διαλύματος μεταφέρθηκαν σε ένα πολύ μικρό σωλήνα

⁸⁰ Lie S. The EBC-ninhydrin method for determination of free alpha amino nitrogen. J Inst Brew 1973;79: 37-41.

φυγοκέντρωσης που περιείχε 0,5 ml κρύου Τριχλωροξικού οξέος (TCA) (5%, v/v) για να σταματήσει η αντίδραση. Η συγκέντρωση γλυκόζης εν συνεχεία καθορίστηκε από τον αναλυτή γλυκόζης Analox GL6.

Μια μονάδα δραστηριότητας ένζυμου ορίστηκε ως η ποσότητα ενζύμου που απελευθερώνει 1 μmol γλυκόζης ανά λεπτό υπό τις συνθήκες δοκιμασίας. Μεμονωμένοι πυρήνες σίτου ελήφθησαν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης μυκήτων και παρατηρήθηκαν κάτω από ένα Περιβαλλοντολογικό Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (ESEM Quanta 200 Scanning Electron microscope). Μικροφωτογραφίες με μεγεθύνσεις από 50 έως 12.000 ελήφθησαν.

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων παραγωγής PHB, δείγματα του 1 ml ελήφθησαν από τις βακτηριακές ζυμώσεις σε ποικίλα χρονικά διαστήματα αντίδρασης για τη μέτρηση του συνολικού ξηρού βάρους, γλυκόζης, συγκεντρώσεις FAN και PHB.

Κάθε δείγμα υποβλήθηκε σε φυγοκέντρωση σε 13.000 σ.α.λ. για 10 λεπτά και τα στερεά πλύθηκαν με αποσταγμένο νερό και υποβλήθηκαν σε φυγοκέντρωση δυο φορές διαδοχικά. Τα στερεά επαναιώρηθηκαν σε ακετόνη και μεταφέρθηκαν σε καθολικά μπουκάλια.

Μετρήσεις ξηρού βάρους πραγματοποιήθηκαν με αποξήρανση των στερεών σε 50 βαθμούς Κελσίου και ψύξη σε ξηραντήρα για τη σταθεροποίηση του βάρους. Το PHB μετρήθηκε με αέρια χρωματογραφία χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο που πρότειναν οι Riis και Mai⁸¹. Ένας αναλυτής GC (Hewlett Packard 5890, σειρά II) με αυτόματο δειγματολήπτη 7673 χρησιμοποιήθηκε. Το λογισμικό ήταν Chemistation Έκδοση 6,03. Η στήλη ήταν poraplot Q-HT 10 m x 0,32 mm και το αέριο μεταφοράς ήταν το ήλιο.

Η θερμοκρασία εισαγωγής ήταν 230 K, η θερμοκρασία ανίχνευσης ήταν 200 K και αρχική θερμοκρασία ήταν 120 K. Ένας ανιχνευτής ιονισμού φλόγας (FID) χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης μαγιάς, ελήφθησαν δείγματα 1 ml σε διαφορετικές χρονικές στιγμές και η συγκέντρωση αιθανόλης μετρήθηκε χρησιμοποιώντας το ίδιο GC, στήλη και αέριο μεταφοράς όπως και για το PHB. Τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν επίσης για την ανάλυση της γλυκόζης και καταμέτρηση κυττάρων με τη χρήση ενός Βελτιωμένου Neubauer Counting Chamber(Assistant-Germany.BDH).

⁸¹ Riis V, Mai W. Gas chromatographic determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis. J Chromatogr 1988;445: 285-9.

10.3 Αποτελέσματα και συζήτηση

10.3.1 Παραγωγή πρώτης ύλης από βιομετασχηματισμό σωματιδίων

Τα προκαταρκτικά πειράματα για να μελετήσουμε την επίδραση του κλιματισμού των πρώτων υλών αποκάλυψαν ότι τα 5 δευτερόλεπτα λείανσης χρησιμοποιώντας αποφλειωτή SATAKE και η αρχική υγρασία της τάξεως των $0,8 - 0,9 \text{ g νερού g}^{-1}$ στερεών σιτηρών ήταν οι πιο κατάλληλες συνθήκες για την ανάπτυξη των μυκήτων και την παραγωγή της πρώτης ύλης.

Οι ζυμώσεις στο εσωτερικό του αντιδραστήρα 1L με διαλείπουσα εισροή νερού διεξήχθησαν για να επιβεβαιώσουμε την καταλληλότητα ολόκληρων κόκκων σίτου για την ανάπτυξη *A. awamori*, να μελετήσουμε την επίδραση της διαλείπουσας ενστάλαξης νερού και την εξαγωγή κατά τη διάρκεια της ζύμωσης στην ανάπτυξη και στην παραγωγή ενζύμου, γλυκόζης και FAN και για να εξακριβώσουμε αν είναι δυνατή η απόκτηση μιας γενικής ζύμωσης πρώτης ύλης με το σύστημα που προτείνεται.

Η διαλείπουσα εισροή νερού άρχισε 10 ώρες μετά τον εμβολιασμό να επιτραπεί η ανάπτυξη (βλάστηση) και να αποφευχθεί το ξέπλυμα των σπόρων.

Η παρατήρηση συγκεκριμένων πυρήνων κάτω από το μικροσκόπιο επιβεβαίωσε ότι οι εν μέρει λείοι κόκκοι σιταριού ήταν κατάλληλοι για την ανάπτυξη μυκήτων και η υπερβολική χρήση νερού δεν είχε αρνητικές επιπτώσεις.

Η ενστάλαξη νερού είχε άμεσες συνέπειες για τις συνθήκες της ζύμωσης, εμποδίζοντας την ξήρανση του υποστρώματος και διατηρώντας τα επίπεδα θερμοκρασίας στο φάσμα 30-34 K κατά τη διάρκεια όλης της διαδικασίας.

Τροποποιήσεις των παραδοσιακών αντιδραστήρων SSF με διαλείπουσα προσθήκη νερού (προκειμένου να διατηρηθεί η υγρασία και επίπεδα θερμοκρασίας) έχουν αναφερθεί στο παρελθόν^{82 83 84}.

Το θετικό αποτέλεσμα του ελέγχου της υγρασίας κατά της ανάπτυξης επίσης μελετήθηκε από Von Mein και Mitchell⁸⁵, οι οποίοι έδειξαν ότι η μη προσθήκη νερού είχε ως αποτέλεσμα την ξήρανση του υποστρώματος και επιβράδυνση της ανάπτυξης.

⁸² Lonsane BK, Sucedo-Castaneda G, Raimbault M, Roussos S, Viniegra-Gonzalez G, Ghildyal NP, et al. Scale-up strategies for solid-state fermentation. *Process Biochem* 1992;27: 259-73.

⁸³ Ryoo D, Murphy VG, Karim MN, Tengerdy RP. Evaporative temperature and moisture control in a rocking reactor for solid substrate fermentation. *Biotechnol Tech* 1991;5:19-24.

⁸⁴ Nagel FJ, Tramper J, Bakker MSN, Rinzema A. Temperature control in a continuously mixed bioreactor for solid-state fermentation. *Biotechnol Bioeng* 2000;72(2):219-30.

⁸⁵ Von Mein OF, Mitchell D. A two-phase model for water and heat transfer within an intermittently-mixed solid-state fermentation bioreactor with forced aeration. *Biotechnol Bioeng* 2002;79(4):416-28.

ΙΑυξημένη φάση υστέρησης σε χαμηλή περιεκτικότητα νερού και συνακόλουθη μείωση των ιδιαίτερων ρυθμών ανάπτυξης έχουν επίσης αναφερθεί⁸⁶.

Στη μελέτη μας, το συγκεκριμένο ποσοστό αύξησης δεν υπολογίστηκε διότι δεν ήταν δυνατή η ανάκτηση της βιομάζας από τα στερεά ζύμωσης, αλλά διαπιστώθηκε ότι η διακοπτόμενη εισροή νερού είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της παραγωγής σπόρων και την αύξηση της παραγωγής κίτρινων εναέριων υφών που κάλυψε το σύνολο του πυρήνα μετά από 3 ημέρες ζύμωσης.

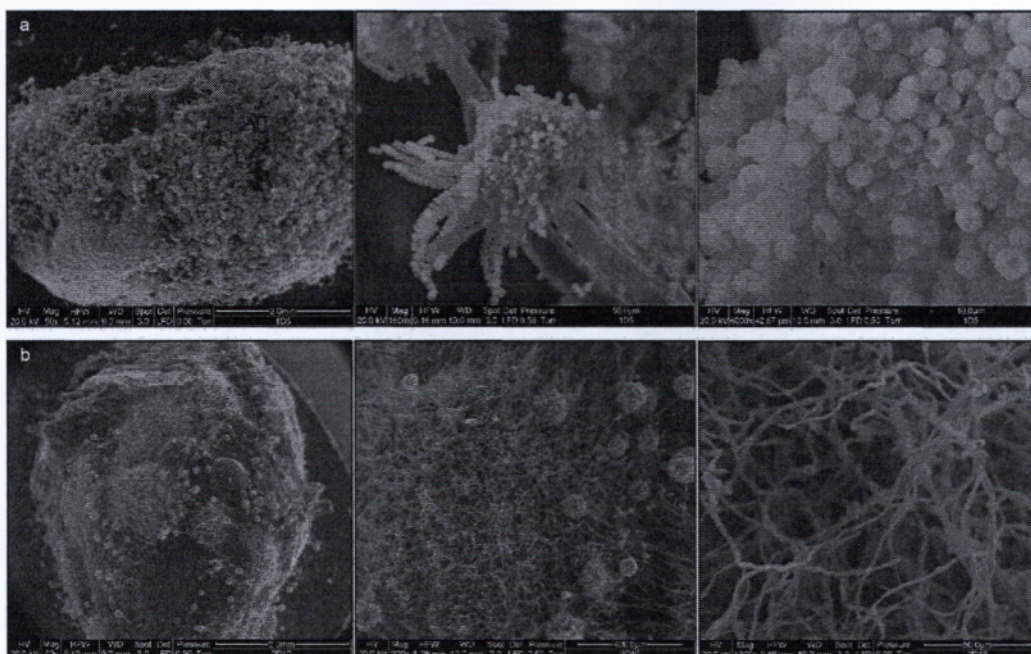
Συνήθως, η ανάπτυξη μικκυλίου επιτρέπει τον ταχύ αποικισμό της επιφάνειας του υποστρώματος και διείσδυση στα σωματίδια, επιτρέποντας την πρόσβαση σε υψηλότερες θρεπτικές συγκεντρώσεις και την επίτευξη υψηλότερης ανάπτυξης.

Η παρουσία νερού επηρέασε σημαντικά τη μορφολογία του μύκητα, οι οποίες παρουσίασαν φυσικά χαρακτηριστικά που δεν παρατηρήθηκαν σε προηγούμενα πειράματα, όταν δεν τροφοδοτούνταν νερό στον βιοαντιδραστήρα. Όταν οι κόκκοι παρατηρήθηκαν κάτω από το ESEM οι διαφορές μπορούσαν να εκτιμηθούν ακόμη καλύτερα. Οι εικόνες του δείγματος χωρίς την προσθήκη νερού δείχνουν σφαιρικά σπόρια 4 μm περίπου με μια τραχειά ανάγλυφη επιφάνεια (Σχ. 10a), ενώ οι εικόνες που ελήφθησαν από τα δείγματα με την προσθήκη νερού δείχνουν τις μακριές ίνες διακλάδωσης των εναέριων υφών (Σχ. 10b).

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι τα ποσοστά παραγωγής βιομάζας και α-αμυλάσης, καθώς και οι συνολική απόδοση ήταν υψηλότερες στις καλλιέργειες *Aspergillus oryzae* με εναέρια μυκήλια⁸⁷. Ως εκ τούτου, πρέπει να αναμένεται ότι, αν η διαλείπουσα εισροή νερού αυξάνει τις εναέριες ύφες στο *A. awamori*, τότε αυτό θα ευνοήσει επίσης τον ρυθμό παραγωγής ενζύμου.

⁸⁶ Raimbault M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. Electron J Biotechnol 1998;1(3):174-88.

⁸⁷ Rahardjo YSP, Weber FJ, Haemers S, Tramper J, Rinzema A. Aerial mycelia of *Aspergillus oryzae* accelerate α-amylase production in a model solid-state fermentation system. Enzyme Microb Technol 2005;36:900-2.



Σχήμα 10: Εικόνες SEM λείων κόκκων σιταριού μετά από 120 ώρες της ζύμωσης με *Aspergillus awamori*, (a) χωρίς προσθήκη νερού, που δείχνει έναν κόκκο που καλύπτεται από τα σπόρια και (b) με διαλείπουσα ενστάλαξη νερού, που δείχνει νήματα υφών που καλύπτουν την επιφάνεια του καρπού

Το νερό που εισάγεται κατά την ζύμωση αντισταθμίζει με το παραπάνω τις απώλειες σε νερό ($6,86 \text{ g νερού g}^{-1}$ κόκκους στερεών), αλλά μπορεί επίσης να έχει αρνητικές συνέπειες, καθώς τα υψηλά επίπεδα υγρασίας οδηγούν σε μείωση του πορώδους υποστρώματος που με τη σειρά του μπορεί να μειώσει τη διείσδυση οξυγόνου⁸⁸. Μπορεί επίσης να αυξήσει τον κίνδυνο μικροβιακής μόλυνσης⁸⁹. Σε εργαστηριακή κλίμακα, οι περιορισμοί οξυγόνου λόγω του νερού δεν τηρήθηκαν, αλλά μπορεί να χρειαστεί να ληφθούν υπόψη κατά την κλιμάκωση της διαδικασίας. Κατά τη διάρκεια του ρέοντος νερού, η εξόρυξη των θρεπτικών συστατικών θα μπορούσε επίσης να επηρεάσει την ανάπτυξη μυκήτων, αλλά το ποσοστό παραγωγής γλυκόζης σε τέτοια συστήματα είναι συνήθως πολύ υψηλότερο από το ρυθμό κατανάλωσης⁹⁰.

⁸⁸ Oostra J, le Comte EP, van den Heuvel JC, Tramper J, Rinzema A. Intra-particle oxygen diffusion limitation in solid-state fermentation. *Biotechnol Bioeng* 2001;75(1):13-24.

⁸⁹ Ramadas M, Holst O, Mattiasson B. Production of amyloglucosidase by *Aspergillus niger* under different cultivation regimens. *World J Microbiol Biotechnol* 1996;12(3):267-71.

⁹⁰ Te Biesebeke R, Ruijter G, Rahardjo YSP, Hoogschagen MJ, Heerikhuisen M, Levin A, et al. *aspergillus oryzae* in solid-state and submerged fermentations. Progress report on a multi-disciplinary project. *FEMS Yeast Res* 2002;2: 245-8.

Η εξόρυξη μπορεί επίσης να είναι επωφελής λόγω της απομάκρυνσης των πιθανών ανασταλτικών μεταβολιτών. Η πρόκληση σε αυτό το σύστημα ήταν η δημιουργία της συχνότητας της διαλείπουσας ροής νερού για να αποκτήσουμε εκχυλίσματα με υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης και FAN. Μετά από κάποιες προκαταρκτικές έρευνες, επελέγη μια συχνότητα μία φορά κάθε 6 ώρες ως επαρκής για να επιτρέπει καλά επίπεδα υδρόλυσης του αμύλου, αλλά χωρίς υπερβολική κατανάλωση της γλυκόζης.

Το Σχ. 11 δείχνει την καθαρή παραγωγή γλυκόζης στο τέλος κάθε κύκλου. Μπορεί να φανεί καθαρά ότι από την 2η ημέρα της ζύμωσης η γλυκόζη παρήχθη πολύ γρήγορα, φθάνοντας μέγιστο ποσοστό μέχρι 177 g L^{-1} την 6η ημέρα [Σχ. 11 (1)]. Μετά το σημείο αυτό η συγκέντρωση στο εκχύλισμα μειώθηκε σε εξίσου δραματικό τρόπο και μέχρι το τέλος της 6ης ημέρας υπήρχε πολύ μικρή περαιτέρω καθαρή παραγωγή γλυκόζης [Σχ. 11 (2)].

Τα επίπεδα γλυκόζης που επιτεύχθηκαν (177 g L^{-1}) κατά τη διάρκεια αυτού του πειράματος αποδεικνύουν τις δυνατότητες του βιομετασχηματισμού σωματιδίων για την παραγωγή υψηλών συγκεντρώσεων προϊόντος.

Σε προαναφερθείσες ζυμώσεις βυθισμένες σε νερό για το ίδιο σύστημα οι υψηλότερες συγκεντρώσεις γλυκόζης που επιτεύχθηκαν με ένα μόνο βήμα ήταν μόνο περίπου 50 g L^{-1} ⁹¹. Αυτό συμβαίνει επειδή το πρακτικό όριο για τις μεσαίες συγκεντρώσεις είναι περίπου 8% w/v αρχικό αλεύρι, κυρίως λόγω του πολύ υψηλού ιξώδους των ζελατινοποιημένων εναιωρημάτων αλεύρου σίτου.

Παρόμοιοι περιορισμοί αντιμετωπίστηκαν επίσης σε ένα άλλο σύστημα χρησιμοποιώντας το SmF για την παραγωγή μιας γενικής πρώτης ύλης στην οποία οι συγκεντρώσεις της γλυκόζης μέχρι και μόλις 37 g L^{-1} αναφέρθηκαν για ζελατινοποιημένο άμυλο⁹². Το πλεονέκτημα της χρήσης βιομετασχηματισμού σωματιδίων είναι απλά ότι μπορούμε να κάνουμε χρήση πλήρων σπόρων σιταριού με περιεκτικότητα σε άμυλο μεταξύ 65% και 85%.

Ο Viesturs και άλλοι⁹³ πρότειναν ένα καινοτόμο σύστημα βιοαντιδραστήρα συνδυάζοντας μια ζύμωση με εμβάπτιση, με ζύμωση στερεάς κατάστασης για τη μετατροπή λιγνοκυτταρινούχου υλικού σε αιθανόλη.

⁹¹ Webb C, Koutinas WR, Wang R. Developing a sustainable bioprocessing strategy based on a generic feedstock. *Adv Biochem Eng/biotechnol* 2004;87: 195-268.

⁹² Abd-Aziz S. Sago starch and its utilization. *J Biosci Bioeng* 2002;94(6): 526-9.

⁹³ Viesturs UE, Strikauska S, Leite M, Berzins A, Tengerdy RP. Combined submerged and solid substrate fermentation for the bioconversion of lignocellulose. *Biotechnol Bioeng* 1987;30(2): 282-8.

Ένα τέτοιο σύστημα, που πρώτο-περιγράφηκε αλλού⁹⁴, θα μπορούσε να είναι πολύ ελκυστικό για τον βιομετασχηματισμό σωματιδίων με βάση το σιτάρι, δεδομένων των υψηλών συγκεντρώσεων της γλυκόζης που δείχθηκαν στο Σχ. 11 (1). Θα μπορούσε να είναι δυνατόν, για παράδειγμα, να συμπεριληφθεί μια δεξαμενή κάτω από το υπόστρωμα των σωματιδίων μέσω των οποίων το ρέον διάλυμα θα μπορούσε να επανεισάγεται και εντός του οποίου μια δεύτερη ζύμωση θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί ταυτόχρονα με τη μυκητιασική ζύμωση.

Ο Viesturs και άλλοι⁹³ ήταν σε θέση να αποδείξουν ότι η επανακυκλοφορία με ταυτόχρονη ζύμωση ζύμης που πραγματοποιήθηκε σε υγρή φάση δεν ήταν μόνο επιτυχημένη, αλλά και επωφελής για τις δύο ζυμώσεις.

Τα βασικά όρια του συστήματος τους περιλαμβάνουν το υπόστρωμα άχυρου σιταριού που χρησιμοποιήθηκε, το οποίο απαιτήσε την προσθήκη δύο επιπλέον θρεπτικών ουσιών και την προ-προσρόφηση της κυτταρίνης για την αύξηση μετατροπής υποστρώματος, καθώς και τη συχνότητα με την οποία πραγματοποιήθηκε η διακοπόμενη ανακύκλωση, μία φορά κάθε 24 ώρες, δηλαδή η περισσότερη από τη γλυκόζη καταναλώθηκε από τον νηματοειδή μύκητα.

Με τη χρήση των σπόρων σίτου και εισροή νερού κάθε 6 ώρες, οι εν λόγω περιορισμοί αποφεύγονται στο δικό μας σύστημα. Παρά τις υψηλές συγκεντρώσεις που επιτεύχθηκαν στα εκχυλίσματα, η σωρευτική απόδοση της γλυκόζης που εξήχθη ανά γραμμάριο αρχικών στερεών κόκκων δεν ήταν πολύ υψηλή, μόνο 0,23 g γλυκόζης ανά g στερεών κόκκων [Σχ. 11 (2)], που αντιστοιχεί σε 0,35 g γλυκόζης g⁻¹ αρχικού συνολικού αμύλου. Αυτό οφείλεται εν μέρει στο ότι ορισμένη γλυκόζη καταναλώθηκε από τον μύκητα κατά την ανάπτυξη αλλά και στο ότι η εξαγωγή δεν ήταν πλήρης. Τα αποτελέσματα που συζητήθηκαν μέχρι τώρα προήλθαν από απλή διήθησης νερού μέσα από το υπόστρωμα κόκκων. Το ανακάτεμα και η επανακυκλοφορία μπορούν να βελτιώσουν αυτή την απόδοση σημαντικά, όπως συζητείται στο επόμενο τμήμα. Το σχήμα της καμπύλης των σωρευτικών αποδόσεων γλυκόζης σαφώς δείχνει ότι μετά από μια φάση υστέρησης υπάρχει μια ταχεία παραγωγή γλυκόζης.

Αυτό συμβαίνει επειδή η παραγωγή του ενζύμου σχετίζεται με την ανάπτυξη και έτσι η δραστηριότητά της αυξάνει εκθετικά κατά τα πρώτα στάδια της ζύμωσης. Είναι σημαντικό επίσης να έχουμε κατά νου ότι σε αυτό το σύστημα η γλυκόζη συνεχώς

⁹⁴ Laukevics JJ, Apsite AF, Viesturs UE, Tengerdy RP. Solid substrate fermentation of wheat straw to fungal protein. *Biotechnol Bioeng* 1984;26(12): 1465-74.

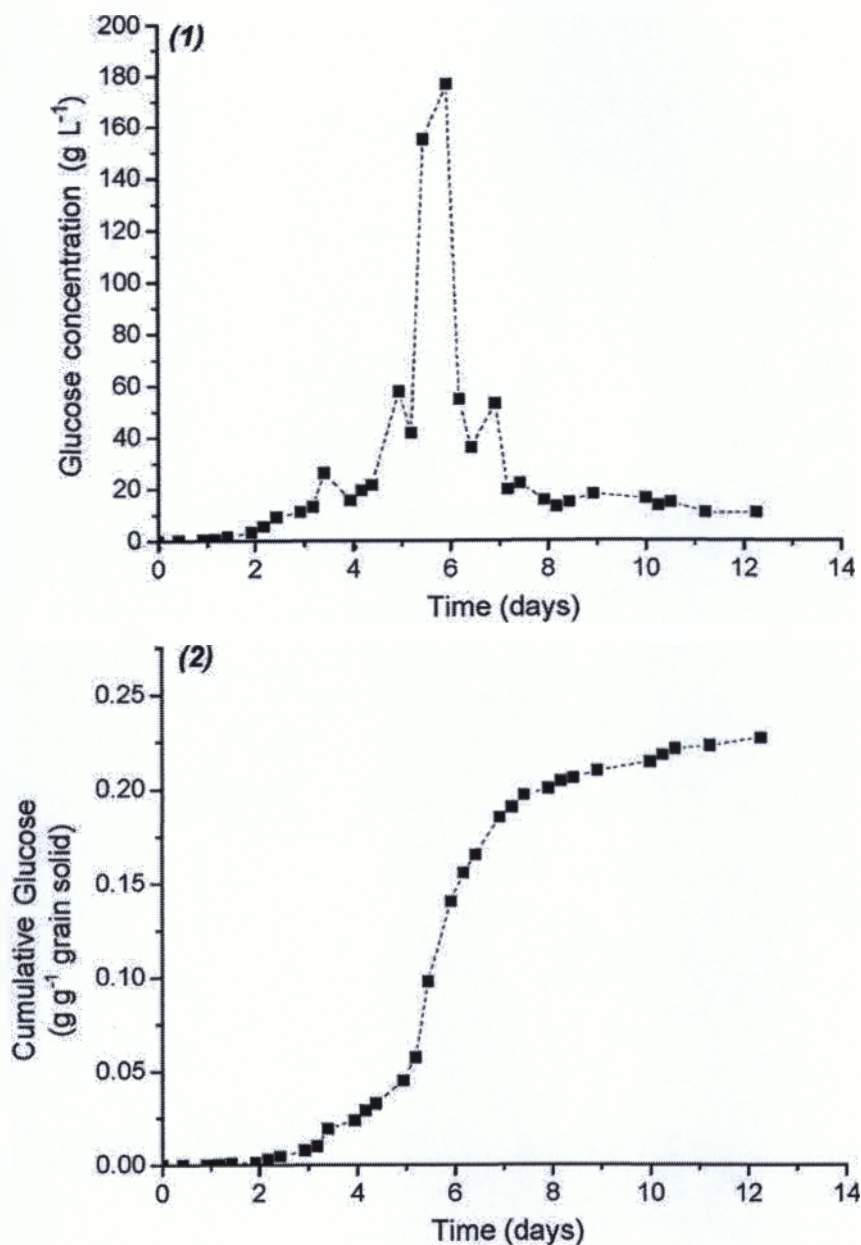
απομακρύνεται με εκχύλιση, οπότε υπάρχει μια φυσική πίεση για το μύκητα να συνεχίσει να παράγει ένζυμα. Ο ρυθμός της συσσώρευσης γλυκόζης μειώνεται μετά την 6η ημέρα της ζύμωσης [Σχ. 11 (2)], πιθανότατα λόγω της εξάντλησης των θρεπτικών συστατικών σίτου, λόγω της διαδικασίας εξόρυξης και κατανάλωση μυκήτων.

Μια άλλη σημαντική πηγή θρεπτικών συστατικών στην πρώτη ύλη είναι το ελεύθερο αμινο-άζωτο.

Οι μετρήσεις της FAN στα εκχυλίσματα [(Σχ. 12 (1))] ακολούθησε μια σταθερή τάση κατά τη διάρκεια των 4 πρώτων ημερών της ζύμωσης, με συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν μεταξύ 4 και 24 mg L⁻¹. Μετά την 4η ημέρα οι τιμές που ελήφθησαν άρχισαν να αυξάνονται, φθάνοντας στο ανώτατο όριο των 67 mg L⁻¹ την 6η ημέρα.

Αν και λίγο ακανόνιστη, η τάση αυτή ήταν παρόμοια με εκείνη για την γλυκόζη, πιθανότατα διότι οι αξίες FAN αποτελούν επίσης τα αποτελέσματα ενός συνδυασμού δραστηριότητας ενζύμων (στην προκειμένη περίπτωση πρωτεάσες), κατανάλωσης από το μύκητα και διαδικασίας εξαγωγής. Υπήρχε, ωστόσο, μια σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο προφίλ: την 9η ημέρα της ζύμωσης η FAN άρχισε να αυξάνεται και πάλι, που θα μπορούσε να είναι μια ένδειξη της φυσικής αυτόλυσης του μύκητα. Οι συγκεντρώσεις FAN που ελήφθησαν απευθείας από τη ζύμωση ήταν αρκετά χαμηλές, μην φθάνοντας ακόμη και τα 100 mg L⁻¹ που ελήφθησαν παλαιότερα χρησιμοποιώντας υγρή ζύμωση για το ίδιο σύστημα.

Αν η συγκέντρωση της FAN στην πρώτη ύλη δεν είναι αρκετή, θα μπορούσε να είναι ένας περιοριστικός παράγοντας για την ανάπτυξη οποιουδήποτε μικροοργανισμού που χρησιμοποιείται σε μια επακόλουθη ζύμωση. Παρά το γεγονός ότι η σωρευτική FAN που συλλέχτηκε αυξήθηκε σχεδόν γραμμικά μέσω της ζύμωσης, η συνολική απόδοση ήταν μόνο 0,24 mg FAN g⁻¹ αρχικοί στερεοί κόκκοι [(Σχ. 12 (2))]. Για να βελτιώσουμε την εξόρυξη, θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί ανάμειξη ή ανακύκλωση.

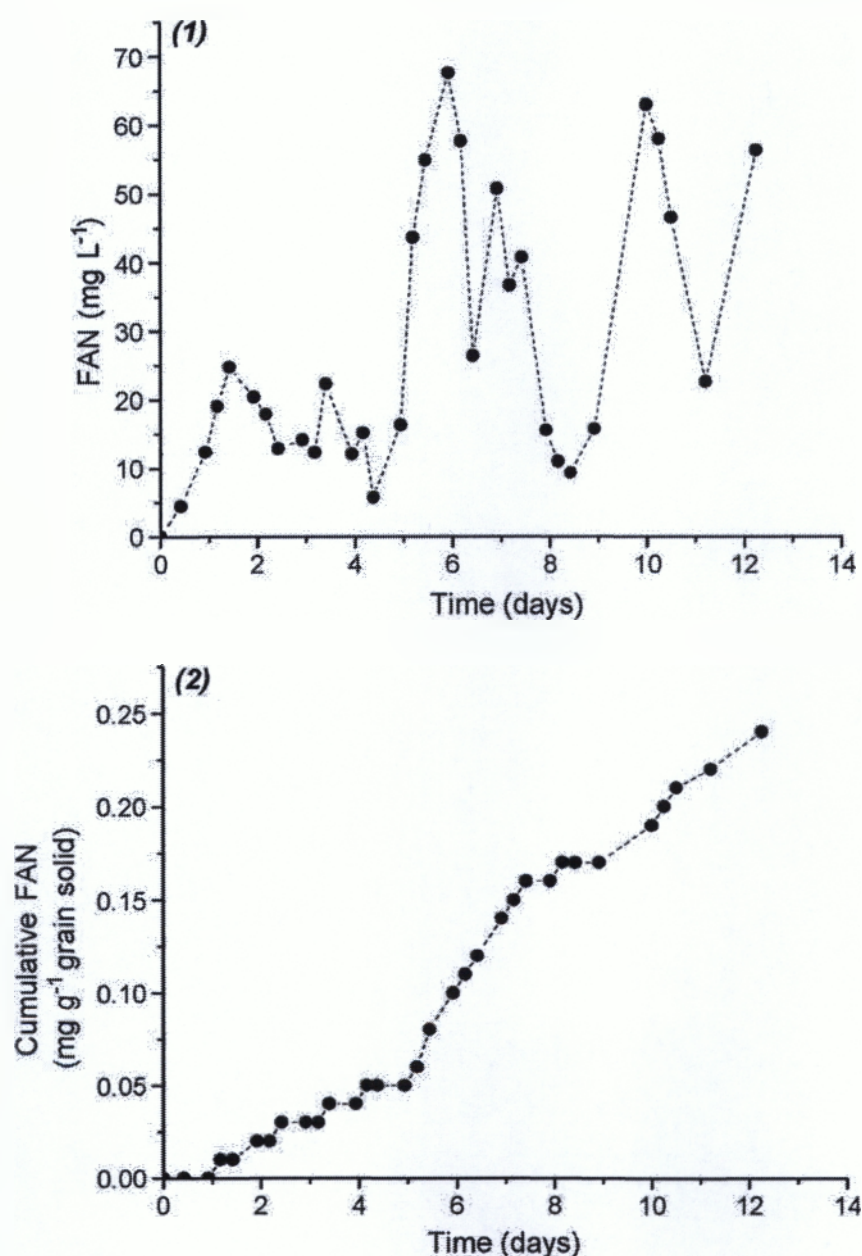


Σχήμα 11: Συγκέντρωση γλυκόζης (1) και σωρευτική γλυκόζη (2) μετρημένες σε εκχυλίσματα που ελήφθησαν κατά τη ζύμωση των σπόρων σιταριού σε ένα κατάμεστο υπόστρωμα με διαλείπουσα ροή νερού.

Μια άλλη προσέγγιση για την αύξηση του περιεχομένου FAN στην πρώτη ύλη είναι να ενσωματώσουμε ένα βήμα αυτόλυσης στη διαδικασία⁹⁵.

⁹⁵ Wang R, Webb C. Autolysis of *Aspergillus awamori*: an approach to nutrient regeneration. IchemE Research Event, Newcastle, 7-8 April: 1998.

Οι Wang και Webb έδειξαν ότι ο περιορισμός του οξυγόνου και οι υψηλές θερμοκρασίες επιτρέπουν στην αυτόλυση του μύκητα, φθάνοντας συγκεντρώσεις FAN έως και 450 mg L^{-1} με μία μόνο παρτίδα ή μέχρι και 1580 mg L^{-1} μετά από επτά επανακυκλοφορίες. Η τελευταία αυτή τιμή είναι ισοδύναμη με το FAN σε εκχύλισμα ζύμης 31 g L^{-1} .



Σχήμα 12: Συγκέντρωση FAN (1) και σωρευτική FAN (2) μετρημένες σε εκχυλίσματα που ελήφθησαν κατά τη ζύμωση σπόρων σιταριού σε ένα κατάμεστο υπόστρωμα με διαλείπουσα ροή νερού

Επίσης μετρήθηκε η δραστηριότητα γλυκοαμυλάσης στο εκχύλισμα (Σχ. 13). Ευτυχώς, φαίνεται ότι η γλυκοαμυλάση δεν είχε εκχυλιστεί πλήρως. Κατά το χρονικό διάστημα από την ημέρα 2 έως την ημέρα 3 η αύξηση της δραστηριότητας γλυκοαμυλάσης ήταν εκθετική και μετά από αυτό η δραστηριότητα συνέχισε να αυξάνεται, αλλά με γραμμικό τρόπο.

Μέσα από την όλη διαδικασία η αθροιστική απόδοση που επιτεύχθηκε ήταν μόνο 68 U g^{-1} αρχικών στερεών κόκκων, και αυτό αντιπροσωπεύει ένα πολύ χαμηλότερο επίπεδο δραστηριότητας από ότι θα απαιτούνταν για την ποσότητα γλυκόζης που παρήχθη. Αυτό ήταν πιθανώς λόγω της χαμηλής αποδοτικότητας της εκχύλισης ενζύμων λόγω του μεγάλου μεγέθους των μορίων ενζύμου και η σύντομη χρονική διαμονή του νερού εκχυλίσματος στο υπόστρωμα.

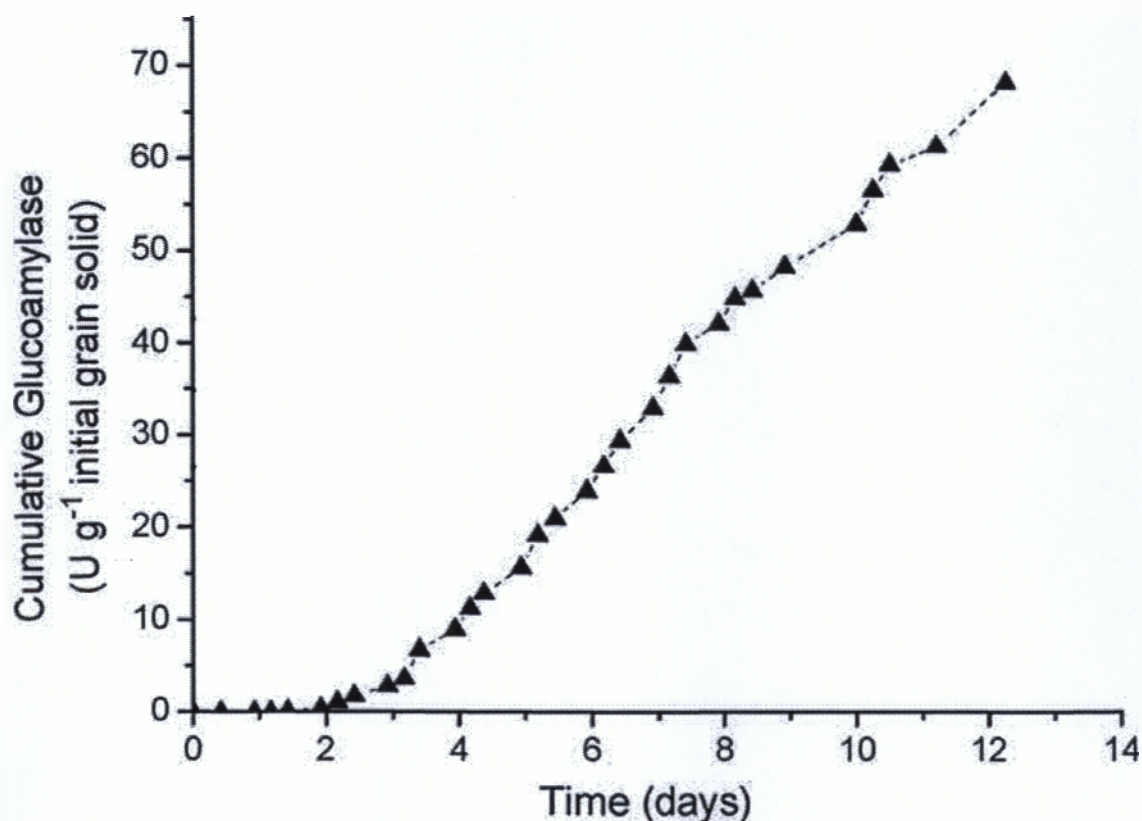
Σε αντίθεση με άλλα υποστρώματα, όπως πίτουρο σιταριού, οι ολόκληροι σπόροι δημητριακών που χρησιμοποιήθηκαν στο σύστημά μας δημιούργησαν ένα πολύ ανοιχτό πορώδες υπόστρωμα, μέσω του οποίου το νερό εκχυλίσματος περνούσε γρήγορα.

Ένα σύστημα που χρησιμοποίησε ένα γεμάτο υπόστρωμα πίτουρων σιταριού με διαλείπουσα εξόρυξη για την παραγωγή της πρωτεΐσης έχει αναφερθεί ότι απορροφούσε το νερό που προσθέτονταν στην πρώτη προσθήκη και απαιτούσε περίπου 10 ώρες για να συλλέξει το νερό μετά από τη δεύτερη πρόσθεση αυξάνοντας την ποσότητα ενζύμου που παρήγαγε⁹⁶.

Το γεγονός ότι στο σύστημά μας η γλυκόζη μπορεί να εξαχθεί χωρίς την εξαγωγή των ενζύμων αντιπροσωπεύει ένα σαφές πλεονέκτημα διαδικασίας.

Τα ένζυμα που διατηρούνται στο υπόστρωμα μοιάζουν περισσότερο με εκείνα που βρίσκονται σε ένα ακινητοποιημένο αντιδραστήρα ενζύμων και μπορούν να συνεχίσουν την υδρόλυση αμύλου, παράγοντας περισσότερη γλυκόζη.

⁹⁶ Aikat K, Bhattacharyya BC. Protease production in solid state fermentation with liquid medium recycling in a stacked plate reactor and in a packed bed reactor by a local strain of *Rhizopus oryzae*. *Process Biochem* 2001;36: 1059-68.



Σχ.13: Σωρευτική γλυκοαμυλάση μετράται στα εκχυλίσματα που λαμβάνονται κατά ζύμωση των σπόρων σιταριού σε μία κλίνη με διαλείπουσα ροή νερού.

10.3.2 Βελτιώνοντας την εξόρυξη των πρώτων υλών

Η διαδικασία εκχύλισης κατά την ζύμωση στερεάς κατάστασης είναι ένα από τα βασικά βήματα στην στρατηγική που προτείνεται στο παρόν έγγραφο.

Τα αποτελέσματα έχουν δείξει ότι η απλή διήθηση του νερού μέσα από το υπόστρωμα σωματιδίων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης μυκήτων μπορεί να εξαγάγει τα θρεπτικά συστατικά που απαιτούνται για την πρώτη ύλη. Είναι σαφές ότι οι προϋποθέσεις υπό τις οποίες η εξόρυξη διενεργείται θα επηρεάσει το ύψος και τη συγκέντρωση των παραγομένων προϊόντων.

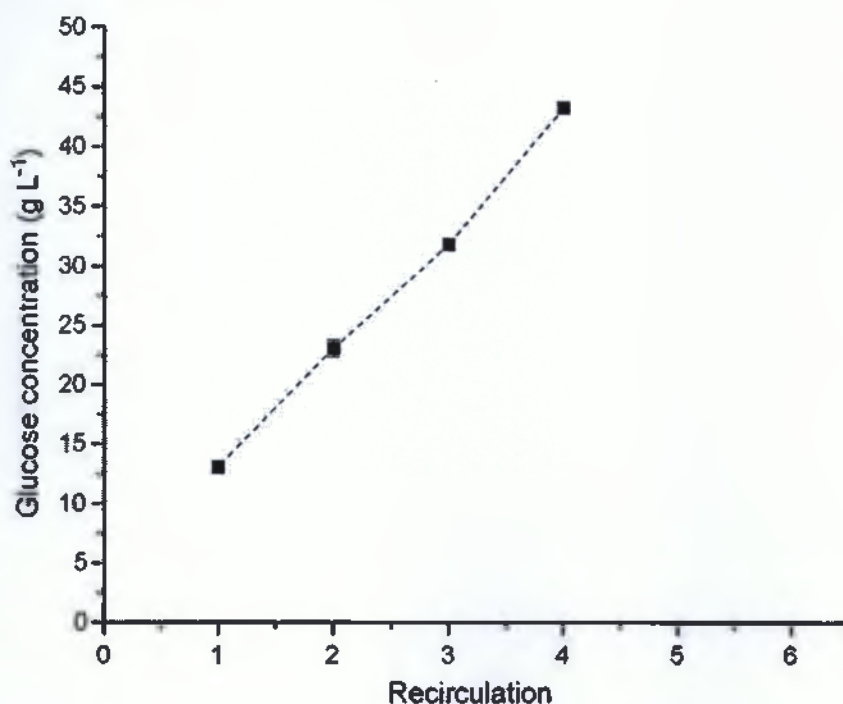
Για τη μελέτη ορισμένων από αυτές τις συνθήκες, αρκετά πειράματα παρτίδων εκχύλισης πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τα εναπομείναντα στερεά στον αντιδραστήρα στο τέλος της ζύμωσης. Αυτά τα πειράματα επιβεβαίωσαν ότι

διαφορετικές θερμοκρασίες γύρω από το βέλτιστο για ζύμωση (30 K) δεν είχαν σημαντικό αντίκτυπο στη διαδικασία εξόρυξης.

Πειράματα εκχύλισης έδειξαν επίσης ότι για ένα στατικό υπόστρωμα τη μέγιστη συγκέντρωση εκχυλίσματος επιτεύχθηκε μέσα σε 3-5 λεπτά, δείχνοντας ότι απλή διήθηση μέσω του υποστρώματος θα πρέπει να είναι επαρκής για την εξαγωγή των θρεπτικών ουσιών. Ανακάτεμα, από την άλλη πλευρά, οδήγησε σε αύξηση της εκχύλισης γλυκόζης και FAN κατά 40.

Για να μειώσουμε την ποσότητα του νερού που χρησιμοποιήθηκε για το εκχύλισμα και να αυξήσουμε τη συγκέντρωση της γλυκόζης, διεξήχθη ένα πείραμα στο οποίο το νερό επαναχρησιμοποιήθηκε για την εξαγωγή περαιτέρω παρτίδων των στερεών (Σχ. 14).

Με τέσσερις τέτοιες επαναχρησιμοποιήσεις, η συγκέντρωση της γλυκόζης αυξήθηκε με συντελεστή 3,3 (από 13,09 μέχρι 43,15 g L⁻¹), γεγονός που υποδηλώνει το υγρό εκχύλισης μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί σε όλη την διάρκεια της μυκητιασικής ζύμωσης, εκχυλίζοντας διαδοχικά γλυκόζη που παράγεται από την τελευταία εκχύλιση. Η διήθηση και ψύξη των εκχυλισμάτων θα ήταν αναγκαία για την πρόληψη μικροβιακής μόλυνσης.



Σχήμα 14: Συγκέντρωση γλυκόζης στο εκχύλισμα μετά από αρκετές επαναχρησιμοποιήσεις του ίδιου εκχυλίσματος υγρού από χρήση νοπών παρτίδων των στερεών.

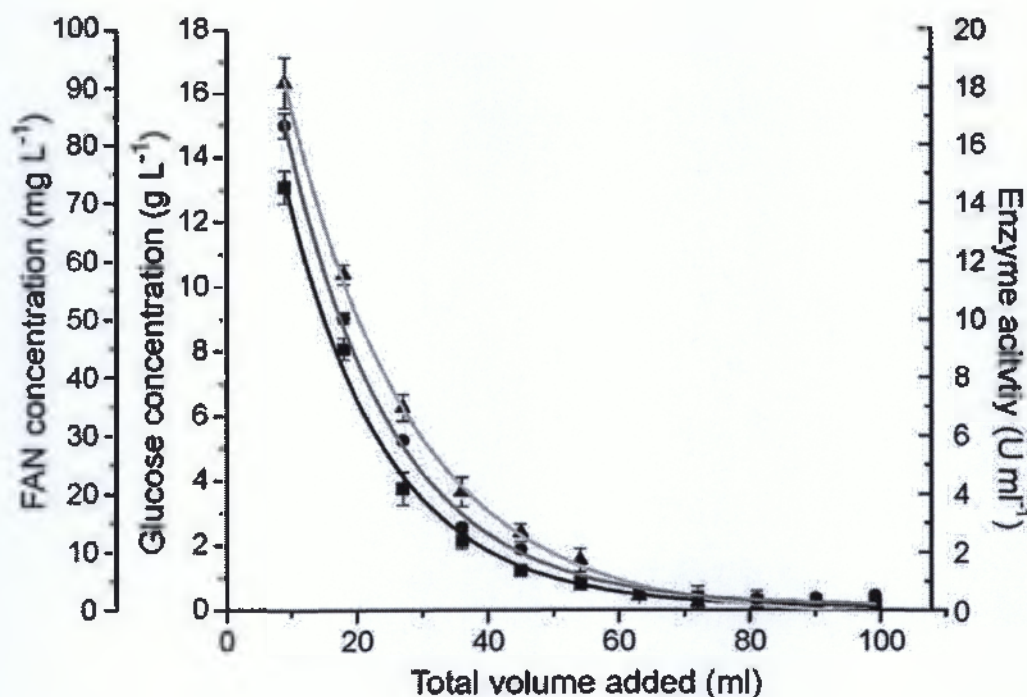
Τέλος, για να πάρετε μια ιδέα για το πραγματικό ύψος των προϊόντων που υπάρχουν στο στερεό, έγινε ένα σύνολο έντεκα εκχυλίσεων χρησιμοποιώντας το ίδιο στερεό ζύμωσης και φρέσκου υγρού.

Το Σχ. 15 παρουσιάζει τις συγκεντρώσεις που μετρήθηκαν στα εκχυλίσματα μετά από κάθε διαδοχική εξόρυξη. Μετά την πρώτη εκχύλιση, περισσότερο από το ήμισυ της συνολικής ποσότητας γλυκόζης παρέμεινε στο στερεό. Μετά από έξι εξορύξεις, η συγκεντρώσεις γλυκόζης, FAN και γλυκοαμυλάσης στο εκχύλισμα ήταν σχεδόν μηδενικές. Τα αποτελέσματα χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό του συνολικού ποσού των αποσπάσιμων προϊόντων από το στερεό χρησιμοποιώντας ένα μοντέλο που παρουσιάστηκε προηγουμένως⁹⁷.

Όπως συζητήθηκε από τον Diaz και άλλους⁹⁷, στην εξόρυξη των ενζύμων σε ζύμωση στερεάς κατάστασης είναι μια διαδικασία της διάλυσης και της έκπλυσης σε ένα ετερογενές σύστημα υγρού-στερεού και η κινητική διαδικασία αναμένεται να ακολουθήσει μια εκθετική μορφή.

Στο σύστημα τα αποτελέσματα μπορεί ακολουθούν εκθετική εξίσωση αποσύνθεσης της μορφής $C = A^{e^{-kv}}$, όπως καταδεικνύεται στο Σχ. 14. Σε αυτή την έκφραση C είναι η συγκέντρωση που εξορύχτηκε, V ο συνολικός όγκος του νερού που χρησιμοποιήθηκε, A σχετίζεται με την ποσότητα που εξορύχτηκε στην πρώτη πτώση και k είναι μια παράμετρος που σχετίζονται με τις συνθήκες της εκχύλισης.

⁹⁷ Diaz AB, Caro I, De Ory I, Blandino A. Evaluation of the conditions for the extraction of hydrolytic enzymes obtained by solid state fermentation from grape pomace. *Enzyme Microb Technol* 2007;41(3): 302-6.



Σχήμα 14: Συγκέντρωση γλυκόζης (■), γλυκοαμυλάσης (▲) και FAN (●) που προήλθε από διαδοχικές εκχυλίσσεις χρησιμοποιώντας τον ίδιο σταθερό και φρέσκο διαλύτη. Οι γραμμές αυτές παράχθηκαν χρησιμοποιώντας μια εκθετική εξίσωση αποσύνθεσης

10.3.3 Αξιολόγηση των πρώτων υλών που ελήφθησαν από βιομετασχηματισμό σωματιδίων

Οι πρώτες ύλες που προήλθαν από τη ζύμωση κόκκων σίτου αξιολογήθηκαν όσον αφορά την διατροφική τους σημασία για τις επόμενες μικροβιακή βιοδιεργασίες. Δύο διαφορετικές βιομετατροπές, η μία με βακτήριο και μια με μαγιά, χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της καταλληλότητας των πρώτων υλών για την παραγωγή των βιοδιασπώμενων πλαστικών πολυ-υδροξυβουτιράτης και αιθανόλης, αντίστοιχα. Ζυμώσεις PHB, χρησιμοποιώντας *W. eutropha*, ελέγχθηκαν από την άποψη μετρήσεων ξηρού βάρους, γλυκόζης και FAN.

Τρία μέσα με διαφορετικές συνθήκες αποστείρωσης και προσθήκης FAN χρησιμοποιήθηκαν για τη δοκιμή των πρώτων υλών και μερικές από τις συνθήκες που επηρεάζουν βακτηριακή ανάπτυξη και την παραγωγή των βιοδιασπώμενων πλαστικών.

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο Σχ. 15 δείχνουν την επίδραση των μέσων αποστείρωσης. Παρατηρώντας τις διαφορές στο προφίλ κατανάλωσης γλυκόζης [Σχ. 15 (2)] μεταξύ του κυψελωτού (αυτόκλειστου) μέσου (C) και του διηθητικού μέσου (D), μπορεί να συναχθεί το συμπέρασμα ότι η διήθηση ήταν η καλύτερη μορφή αποστείρωσης. Η κατανάλωση της γλυκόζης ήταν ταχύτερη και η παραγωγή του PHB ήταν τρεις φορές μεγαλύτερη στο διηθητικό μέσο D ($0,78 \text{ g L}^{-1}$). Αυτό είναι πιθανώς λόγω των ζημιών που προκαλούνται από τις υψηλές θερμοκρασίες και πιέσεις κατά τη διάρκεια του αυτόκαυστου (αυτόκλειστου/κυψελωτού) και την ενδεχόμενη παραγωγή των προϊόντων Maillard. Τα προβλήματα αυτά αποφεύγονται στη διαδικασία διήθησης.

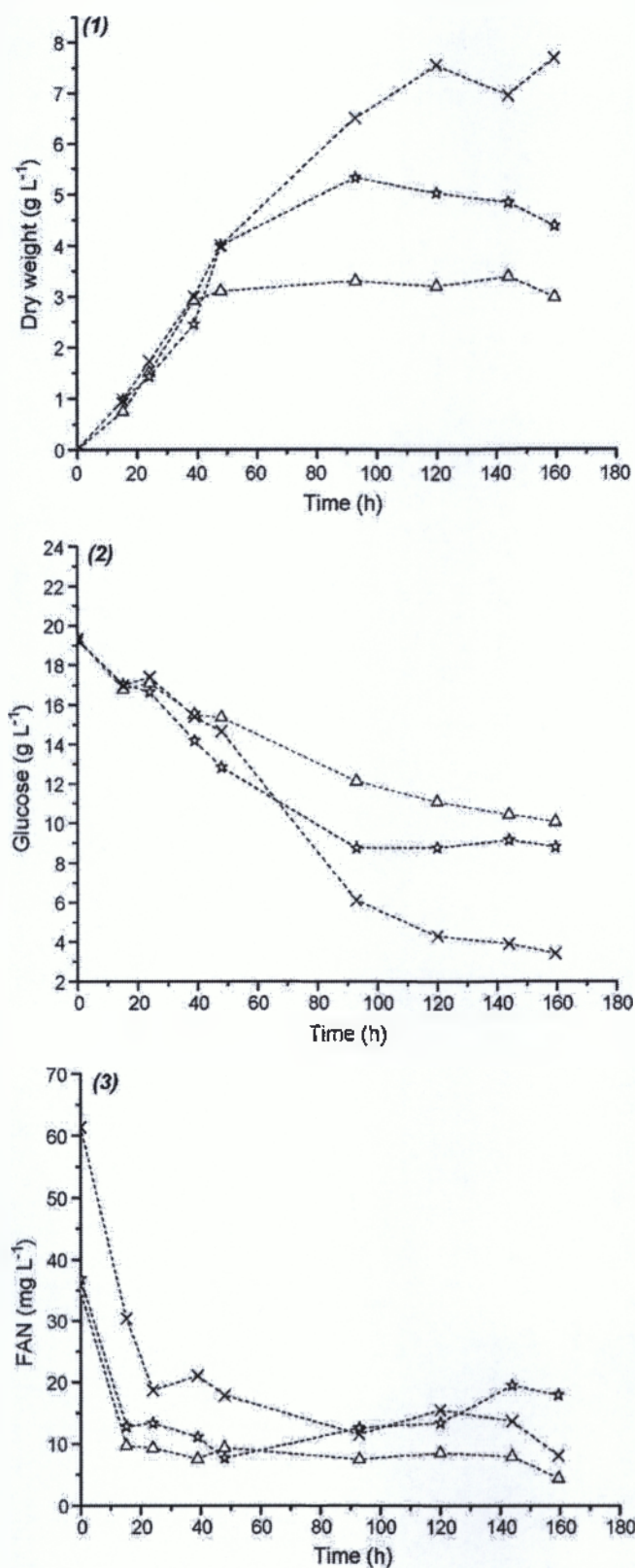
Ένα επιπλέον μέσο, που παρέχεται συμπληρωματικά με μια επιπλέον πηγή αζώτου (εκχύλισμα ζύμης), εξετάστηκε επίσης, καθώς η πρώτη ύλη που παρήχθη για τα συγκεκριμένα πειράματα περιείχε μια σχετικά χαμηλή συγκέντρωση FAN και τα αποτελέσματα (για τα μέσα C και D) έδειξαν κάποιο περιορισμό αζώτου. Το περιεχόμενο FAN αυξήθηκε από 35 σε 61 mg L^{-1} στο μέσο E και αυτό οδήγησε σε ακόμη μεγαλύτερη βακτηριακή ανάπτυξη, αυξημένη κατανάλωση γλυκόζης (Σχ. 15) και μεγαλύτερη παραγωγή PHB ($3,96 \text{ g L}^{-1}$).

Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα πορίσματα που αναφέρθηκαν προηγουμένως, τα οποία κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι μεγαλύτερο περιεχόμενο FAN αυξάνει την παραγωγικότητα PHB⁶².

Ως εκ τούτου, για να επιτύχουμε υψηλότερες αποδόσεις χωρίς την ανάγκη να συμπληρώσουμε την πηγή του αζώτου, θα πρέπει να βελτιώσουμε την εξόρυξης FAN με το να θεσπίσουμε, για παράδειγμα, τα μέτρα που συζητήθηκαν στο προηγούμενο τμήμα.

Η θρεπτική αξία των διαφόρων εκχυλισμάτων, με υψηλότερες συγκεντρώσεις FAN και γλυκόζης, επικυρώθηκε από την ανάπτυξη ζύμης *S.cerevisiae* με αναερόβιες συνθήκες για την παραγωγή αιθανόλης.

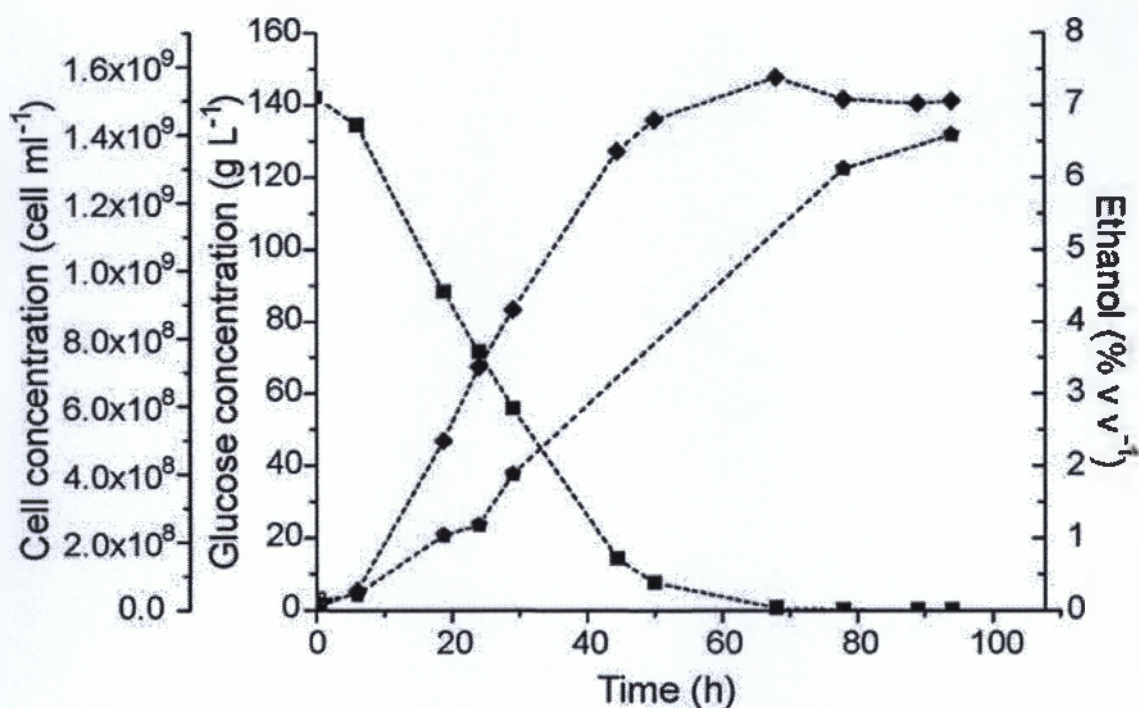
Τα αποτελέσματα απέδειξαν ότι η πρώτη ύλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη του *S. cerevisiae*. Η γλυκόζη καταναλώθηκε μετά από 4 ημέρες ζύμωσης και η αιθανόλη που παρήχθη κατέληξε σε συγκέντρωση του 7% (v/v) (Σχ. 16). Η γλυκόζη στην απόδοση αιθανόλης έφθασε τα $0,41 \text{ g g}^{-1}$, ισοδύναμο με το 80% της θεωρητικής τιμής, αποδεικνύοντας ότι η πρώτη μας ύλη και το προτεινόμενο σύστημα είναι κατάλληλο για την παραγωγή βιοκαυσίμων.



Σχήμα 15. Ξηρό βάρος, γλυκόζη και FAN μετρημένα κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των *Wautersia eutropha* στην πρώτη ύλη που ελήφθησαν χρησιμοποιώντας βιομετασχηματισμό σωματιδίων. [Μέσο C(Δ), μέσο D (⊗), μέσο E (x)]

Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών επιβεβαιώνουν ότι η πρώτη ύλη που λαμβάνεται από τον βιομετασχηματισμό σωματιδίων δεν παρουσιάζουν κάποια σοβαρή αναστολή για τους οργανισμούς που μελετήθηκαν.

Συνεπώς, το σύστημα αυτό θα μπορούσε να χρησιμοποιείται σε ένα ολόκληρο βιοδιυλιστήριο σιτηρών για την παραγωγή PHB και βιοαιθανόλης.



Σχήμα 16: Συγκέντρωση κυττάρων (▲), κατανάλωση της γλυκόζης (■) και παραγωγή αιθανόλης (◆) μετράται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του *Saccharomyces cerevisiae* στην πρώτη ύλη που παράγονται με τη χρήση των σωματιδίων βιομετασχηματισμού.

10.4 Συμπεράσματα

Έχει αναπτυχθεί μια στρατηγική νέας μεθόδου για βιοδιυλιστήρια βασισμένη σε βιομετασχηματισμό σωματιδίων. Πειράματα χρησιμοποιώντας έναν αντιδραστήρα γεμάτου υποστρώματος έχουν επιβεβαιώσει την καταλληλότητα των εν μέρει λείων ολόκληρων σπόρων σίτου για την ανάπτυξη του *A. awamori*.

Η διαλείπουσα εισροή νερού κάθε 6 ώρες κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας μυκήτων φάνηκε να βελτιώνει στην ανάπτυξη του μικκυλίου και την αύξηση της παραγωγής γλυκόζης και FAN.

Η προσθήκη του νερού βοηθά στη διατήρηση της υγρασίας και τα επίπεδα της θερμοκρασίας, και έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για την απομάκρυνση των διαλυτών συστατικών, αποκτώντας τις γενικές πρώτες ύλες ζύμωσης.

Η εξαγωγή μπορεί να βελτιωθεί με ανάδευση και επανακυκλοφορία του εκχυλίσματος, το οποίο μπορεί να αυξήσει τη συγκέντρωση της γλυκόζης κατά περισσότερο από τρεις φορές.

Πειράματα με επαναλαμβανόμενη εξόρυξη έχουν δείξει ότι λιγότερο από το μισό της γλυκόζης στο στερεό εξάγεται με ένα και μόνο πέρασμα αλλά το συνολικό παρόν ποσό μπορεί εύκολα να εκτιμηθεί.

Τα εκχυλίσματα που αποκτήθηκαν με το σύστημα που έχει αναπτυχθεί έχουν ελεγχθεί για παραγωγή PHB και αιθανόλης, επιβεβαιώνοντας την καταλληλότητα του βιομετασχηματισμού σωματιδίων ως ένα χρήσιμο εργαλείο στα μελλοντικά συστήματα βιοδιυλιστηρίων για την παραγωγή βιοκαυσίμων και χημικές ουσίες προστιθέμενης αξίας .

11. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΠΟΛΥ-ΥΔΡΟΞΥΒΟΥΤΙΡΙΚΩΝ ΑΠΟ ΜΙΑ ΝΕΑ ΠΡΩΤΗ ΥΛΗ ΠΟΥ ΠΡΟΕΡΧΕΤΑΙ ΑΠΟ ΕΝΑΝ ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ ΣΙΤΑΡΙ

11.1 Αναλυτικές μέθοδοι

Σιτάρι υδρόλυσης και εκχυλίσματα μυκήτων αναλύθηκαν από την άποψη της γλυκόζης, ολικού άνθρακα, ολικού αζώτου, ελεύθερου αμινο-αζώτου, φωσφόρου, μαγνησίου, ασβεστίου, καλίου και αμινοξέων. Η συγκέντρωση γλυκόζης αναλύθηκε με τη χρήση ενός αναλυτή γλυκόζης Analox GL6⁹⁸. Ο ολικός άνθρακας αναλύθηκε από ένα συνολικό οργανικό αναλυτή άνθρακα (TOC-V, Shimadzu). Το ολικό άζωτο αναλύθηκε από την φασματοφωτομετρική μέθοδο Nessler⁹⁹. Ο φώσφορος, το μαγνήσιο, το ασβέστιο, το κάλιο αναλύθηκαν με φασματομετρία επαγωγικώς συζευγμένης πλασματομικής εκπομπής (ICP-AES).

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των ελεύθερων αμινοξέων σε υδρολύματα αλεύρου σίτου και μυκητιασικών εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε με ένα σετ ανάλυσης GC/MS (EZ: faast GC/MS σετ υδρολύματος πρωτεΐνης, Phenomenex, UK). Το σετ EZ: faast που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη παρέχει αντιδραστήρια, αναλώσιμα και αναλυτική μεθοδολογία για την προετοιμασία του δείγματος, απομάκρυνση πρωτεϊνών / πεπτιδίων, διαδικασία παραγωγών αμινοξέων και ανάλυση GC/MS. Ως εσωτερικό πρότυπο χρησιμοποιείται η Νορβαλίνη. Ιδιόκτητα αντιδραστήρια τροποποιούν και το καρβοξύλιο και τις αμινομάδες των αμινοξέων που σχηματίζουν τα παράγωγα που παραμένουν σταθερά σε θερμοκρασία δωματίου για αρκετές ώρες και σταθερά σε 4 °C για αρκετές ημέρες. Τα αμινοξέα που μπορούν να προσδιοριστούν ποσοτικά με αυτό το σετ είναι τα αλανίνη, γλυκίνη, βαλίνη, λευκίνη, ισολευκίνη, θρεονίνη, σερίνη, προλίνη, ασπαρτικό οξύ, μεθειονίνη, 4-υδροξυπρολίνη, γλουταμινικό οξύ, φαινυλανίνη, λυσίνη, ιστιδίνη, υδροξυλυσίνη, τυροσίνη, τρυπτοφάνη και κυστίνη. Το κατώτερο όριο ανίχνευσης ήταν 1 nmol ml⁻¹ και η ακρίβεια στον ποσοτικό προσδιορισμό ήταν ±15% για όλα τα αμινοξέα που αναλύθηκαν. Ένα κανονικό (πρότυπο) διάλυμα, το οποίο περιείχε 200 nmol l⁻¹ του κάθε αμινοξέου, χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των πρότυπων καμπυλών ($R^2 > 0,993$ για όλα τα αμινοξέα). Τρία σημεία (5,10 και 20 nmol) χρησιμοποιήθηκαν

⁹⁸ Lie S. The EBC-ninhydrin method for determination of free alpha amino nitrogen. J Inst Brew 1973;79: 37-41.

⁹⁹ Berigeri MS. Determination of total protein in plant tissues from nitrogen analysis by a modified Kjeldahl digestion and Nesslerization method. Argonne, IL, USA: Argonne Natl Lab :1975. pp. 62-68.

για κάθε τυποποιημένη καμπύλη καθώς προτάθηκε από τον κατασκευαστή. Το εσωτερικό πρότυπο χρησιμοποιήθηκε να διορθώσει τις συγκεντρώσεις αμινοξέος που υπολογίστηκε από τις πρότυπες καμπύλες.

Ανάλυση GC/MS πραγματοποιήθηκε με ένα χρωματογράφο αερίου Agilent 6890N σε συνδυασμό με έναν φασματογράφο μάζας Agilent 5973 (EI), που λειτουργεί στα 70 eV. Χρησιμοποιούμενη στήλη ήταν μια ZB-AAA GC (10μ × 0,25 χιλιοστά, Phenomenex, UK). Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε He με σταθερή ταχύτητα ροής 1,1 ml min⁻¹. Το βήμα θερμοκρασίας ήταν 30 °C min⁻¹ στην περιοχή από 110 – 320 °C.

Το χρησιμοποιούμενο λογισμικό ήταν Enhanced Chemstation D.01.00. Οι θερμοκρασίες του εισαγωγέα και του ανιχνευτή ήταν 250 και 240 °C, αντίστοιχα. Ο εισαγωγέας λειτουργούσε με έναν τρόπο διαίρεσης 1:15. Η μάζα λειτουργούσε σε λειτουργία σάρωσης (45-500 m/z).

Δείγματα (0,5 έως 3 ml) από βακτηριακές ζυμώσεις ελήφθησαν σε ποικίλα χρονικά διαστήματα της αντίδρασης για τη μέτρηση του συνολικού ξηρού βάρους, πολύ-υδροξυβουτυρικού και τη συγκέντρωση γλυκόζης. Κάθε δείγμα υποβλήθηκε σε φυγοκέντρωση στα 3000 × g για 10 λεπτά και τα στερεά πλύθηκαν με αποσταγμένο νερό και υποβλήθηκαν σε φυγοκέντρωση δύο συνεχόμενες φορές. Τα στερεά επαναιωρήθηκαν σε ακετόνη και μεταφέρθηκαν σε καθολικά μπουκάλια. Μετρήσεις ξηρού βάρους διενεργήθηκαν από ξήρανση των στερεών στους 50 °C σε ξηραντήρα. Ο ολικός άνθρακας που ελήφθη αναλύθηκε κατά την έναρξη και κατά το τέλος κάθε ζύμωσης.

Το πολύ-υδροξυβουτυρικό μετρήθηκε με χρωματογραφία αερίου χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο που προτείνει η Riis και Mai¹⁰⁰. Χρησιμοποιήθηκε ένας αναλυτής χρωματογραφίας αέρος (Hewlett Packard 5890 series II) με αυτόματο δειγματολήπτη και λογισμικό Chemstation Version 6.03. Η στήλη ήταν poraplot Q-HT 10 m × 0,32 mm. Το φέρον αέριο ήταν το ήλιο. Η θερμοκρασία στον εισαγωγέα ήταν 230 °C, η θερμοκρασία ανίχνευσης ήταν 200 °C και η αρχική θερμοκρασία ήταν 120 °C. Για τον προσδιορισμό χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής ιονισμού φλόγας (FID).

11.2 Αποτελέσματα

Πρώτη σειρά από ζυμώσεις σε φιάλες ανακίνησης

¹⁰⁰ Riis V, Mai W. Gas chromatographic determination of poly-β-hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis. J Chromatogr 1988;445: 285-9.

Στον πίνακα 1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις 18 ζυμώσεις ανακινούμενης φιάλης που πραγματοποιήθηκε σε μέσα ζύμωσης που περιείχαν διαφορετικές συγκεντρώσεις αρχικής γλυκόζης (5, 8,7, 16,5, 26 g l^{-1}) και ελεύθερου αμινο-αζώτου (100, 200, 350, 450, 560 mg l^{-1}). Δεν ήταν δυνατόν να παραχθούν μέσα με περιεχόμενο 5 g l^{-1} γλυκόζης και ελεύθερου αμινο-αζώτου υψηλότερο από 300 mg l^{-1} λόγω της σύνθεσης που έχει το υδρολυτικό σιτάρι και το εκχύλισμα μυκήτων. Όλες οι μετρήσεις που παρουσιάζονται στον Πίνακα 1 είχαν ληφθεί όταν η γλυκόζη καταναλώθηκε εντελώς. Κάθε ζύμωση σε φιάλη ανακίνησης επαναλήφθηκε δύο έως τρεις φορές, προκειμένου να προσδιοριστεί με ακρίβεια η διάρκεια κάθε ζύμωσης.

Οι υπολογιζόμενες αποδόσεις που παρουσιάζονται στον Πίνακα 1 αντιστοιχούν σε γραμμάρια αζύμωτης μικροβιακής βιομάζας ή πολυ-υδροξυβουτιρικών παραγόμενο ανά γραμμάριο γλυκόζης που καταναλώνεται. Υψηλότερες αποδόσεις ανάπτυξης παρατηρήθηκαν όταν χρησιμοποιήθηκε μια συγκέντρωση γλυκόζης κάτω από 10 g l^{-1} . Μια απόδοση ανάπτυξης 0,95 g g^{-1} και μια μικροβιακή συγκέντρωση 4,7 g l^{-1} επιτεύχθηκε όταν χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις 5 g l^{-1} γλυκόζης και 300 mg l^{-1} ελεύθερου αμινο-αζώτου. Ελαφρώς υψηλότερη απόδοση ανάπτυξης (0,97 g g^{-1}) αποκτήθηκε όταν η συγκέντρωση γλυκόζης ήταν 8,7 g l^{-1} και η συγκέντρωση ελεύθερου αμινο-αζώτου ήταν 560 mg l^{-1} . Ο πίνακας 1 δείχνει ότι για την ίδια συγκέντρωση γλυκόζης, η αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης ελεύθερου αμινο-αζώτου οδήγησε σε μείωση της παραγωγής των πολυ-υδροξυβουτιρικών και υψηλότερη παραγωγή της βακτηριακής μάζας. Για την ίδια συγκέντρωση ελεύθερου αμινο-αζώτου, αυξάνοντας τις συγκεντρώσεις γλυκόζης οδήγησε σε υψηλότερη μικροβιακή συγκέντρωση.

Θα πρέπει να τονιστεί ότι η γλυκόζη δεν ήταν η μόνη πηγή άνθρακα σε υδρολύματα σιταριού και εκχυλίσματα μυκήτων. Αυτά τα μέσα περιείχαν αμινοξέα, πεπτίδια και άλλους υδατάνθρακες που παρείχαν συμπληρωματικές πηγές άνθρακα. Ωστόσο έχουν επιλέξει να παρουσιάσουν αποδόσεις ανάπτυξης και παραγωγής πολυ-υδροξυβουτιρικών, που σχετίζονται με τη γλυκόζη διότι έχουν ως στόχο να δείξουν τα σημαντικά πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου σε σχέση με τα μέσα, με βάση τη γλυκόζη που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή πολυ-υδροξυβουτιρικών από *C. necator*. Οι παραγωγικότητες για τη μικροβιακή βιομάζα και των πολυ-υδροξυβουτιρικών υπολογίστηκαν για όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας. Για την ίδια συγκέντρωση ελεύθερου αμινο-αζώτου, οι υψηλότερες παραγωγικότητες σε μικροβιακή βιομάζα λήφθηκαν όταν χρησιμοποιήθηκε μια συγκέντρωση γλυκόζης

του 8,7 g l⁻¹. Μικροβιακές παραγωγικότητες ακολούθησαν μια σταθερή αύξηση με υψηλότερη συγκέντρωση ελεύθερου αμινο-αζώτου για όλες τις συγκεντρώσεις γλυκόζης.

Πίνακας 1

Επίδραση των διαφόρων συγκεντρώσεων γλυκόζης και ελεύθερου αμινο-αζώτου στη διάρκεια ζύμωσης, συνολικό ξηρό βάρος, μικροβιακή (*Cupriavidus necator*) βιομάζα καθώς και απόδοση και παραγωγικότητα μικροβιακής βιομάζας και πολυ-υδροξυβουτιρικών.

Flask	Initial glucose content (g l ⁻¹) ^a	Initial FAN content (mg l ⁻¹) ^a	Ft (h) ^b	Total dry weight (g l ⁻¹)	Microbial biomass (g l ⁻¹)	Yield (g g ⁻¹) of Microbial biomass	Yield (g g ⁻¹) of PHB	Productivity (g l ⁻¹ h ⁻¹) of Microbial biomass	Productivity (g l ⁻¹ h ⁻¹) of PHB
1	5	100	18	3.47	2.19	0.44	0.26	0.12	0.07
2	5	200	18	4.05	3.36	0.72	0.15	0.19	0.04
3	5	300	18	5.05	4.73	0.95	0.06	0.26	0.02
4	8.7	100	24	5.65	2.30	0.28	0.41	0.10	0.14
5	8.7	200	18	6.13	3.57	0.42	0.30	0.20	0.14
6	8.7	350	18	7.80	5.50	0.67	0.28	0.31	0.13
7	8.7	450	18	8.65	7.26	0.83	0.17	0.40	0.08
8	8.7	560	18	9.90	8.76	0.97	0.13	0.49	0.06
9	16.5	100	30	7.93	2.65	0.24	0.47	0.09	0.18
10	16.5	200	30	11.22	4.69	0.28	0.40	0.16	0.22
11	16.5	350	30	13.00	7.05	0.40	0.34	0.23	0.20
12	16.5	450	24	13.43	8.53	0.52	0.30	0.36	0.20
13	16.5	560	24	15.03	10.21	0.60	0.28	0.43	0.20
14	26	100	72	13.90	5.06	0.20	0.35	0.07	0.12
15	26	200	51	15.30	5.58	0.21	0.37	0.11	0.19
16	26	350	35	17.35	8.37	0.32	0.35	0.24	0.26
17	26	450	35	19.23	9.84	0.37	0.35	0.28	0.27
18	26	560	35	20.78	11.73	0.47	0.36	0.34	0.26

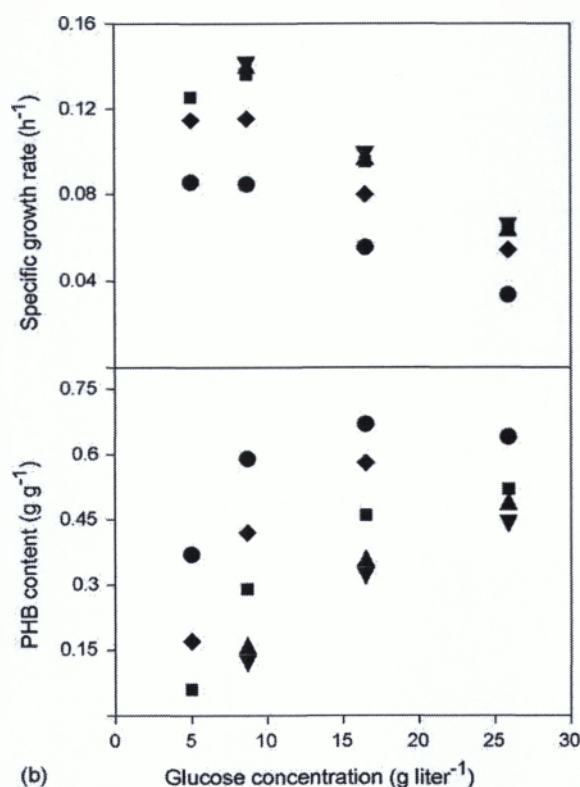
a. Μετρημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης και ΕΑΑ αποκλίνουν κατά $\pm 7\%$ από τις τιμές που παρουσιάζονται σε αυτό το γράφημα.

b. Χρόνος ζύμωσης.

Το Σχ.17 παρουσιάζει τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης και το περιεχόμενο πολυ-υδροξυβουτιρικών για κάθε ζύμωση που έγινε με μέσα υδρολυτικού σιταριού και εκχύλισμα μυκήτων. Όλες οι καμπύλες που παρουσιάζονται στο σχήμα 1 ακολουθούν την ίδια τάση. Η συγκεκριμένη καμπύλη ρυθμού ανάπτυξης που ελήφθη στη συγκέντρωση ελεύθερου αμινο-αζώτου 350 mg l⁻¹ δεν ακολουθεί την ίδια τάση με τις

καμπύλες που ελήφθησαν σε συγκέντρωση 100 και 200 mg l^{-1} όταν χρησιμοποιήθηκε μια συγκέντρωση γλυκόζης 5 gl^{-1} . Αυτή η παρατυπία έγινε γιατί σε 5 gl^{-1} συγκέντρωση γλυκόζης μια μικρότερη συγκέντρωση ελεύθερου αμινο-αζώτου (Περίπου 300 mg l^{-1}) χρησιμοποιήθηκε καθώς δεν ήταν δυνατό να διαμορφώσουμε μια υψηλότερη συγκέντρωση ελεύθερου αμινο-αζώτου με τα μέσα υδρολυτικού σιταριού και εκχύλισμα μυκήτων. Ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης υπολογίστηκε λαμβάνοντας υπόψη το ποσό της εναπομείναντος μικροβιακής βιομάζας που ελήφθη από τη διαφορά μεταξύ του ποσού του συνολικού ξηρού βάρους και των πολυ-υδροβουτιρικών. Ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης αυξάνεται και το περιεχόμενο πολυ-υδροβουτιρικών μειώνεται μετά την αύξηση της συγκέντρωσης ελεύθερου αμινο-αζώτου. Η βέλτιστη συγκέντρωση γλυκόζης ήταν χαμηλότερη από το 10 gl^{-1} για μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης. Ο υψηλότερος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (0,14 h^{-1}) ελήφθη όταν χρησιμοποιήθηκαν 8,7 gl^{-1} γλυκόζης και πάνω από 450 mg l^{-1} συγκεντρώσεις ελεύθερου αμινο-αζώτου. Το περιεχόμενο πολυ-υδροβουτιρικών στα κύτταρα αυξήθηκε όταν χρησιμοποιήθηκαν χαμηλότερα επίπεδα ελεύθερου αμινο-αζώτου και υψηλότερες ποσότητες γλυκόζης.

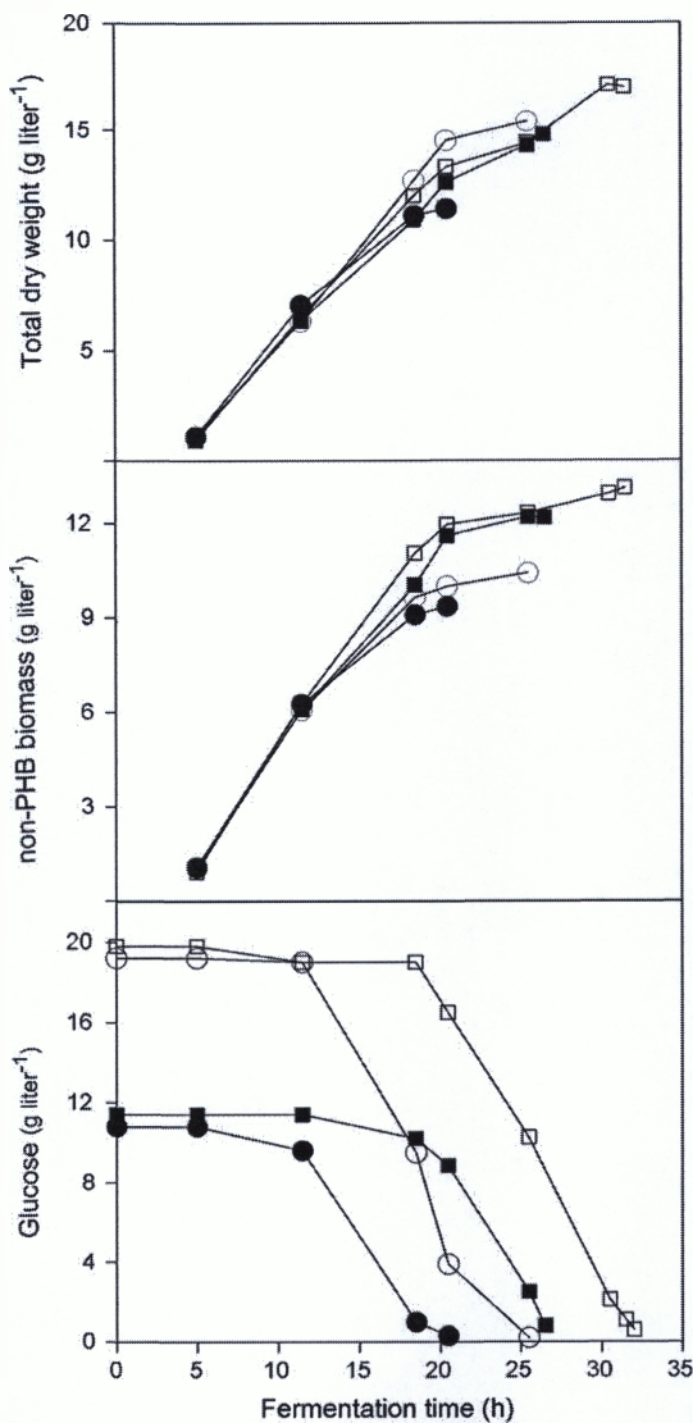
Η πρώτη δέσμη ζυμώσεων, έδειξε ότι η βακτηριακή ανάπτυξη συνέχισε να αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης ελεύθερου αμινο-αζώτου. Αυτό δημιουργήθηκε η ανάγκη προσδιορισμού της μέγιστης συγκέντρωσης ελεύθερου αμινο-αζώτου όταν η βακτηριακή συγκέντρωση παύει να αυξάνεται. Για το λόγο αυτό, διεξήχθη μια δεύτερη ομάδα ζυμώσεων σε φιάλες ανακίνησης με τη χρήση υδρολυτικού σιταριού και εκχύλισμα μυκήτων. Το περιεχόμενο ελεύθερου αμινο-αζώτου στο υδρολυτικό σιτάρι (1,31 gl^{-1}) ήταν πολύ υψηλότερο από ό, τι στη πρώτη σειρά ζύμωσης υδρολυτικού σιταριού (0,6 g l^{-1}) και αυτό επέτρεψε τη χρήση συγκεντρώσεων ελεύθερου αμινο-αζώτου μέχρι 1,2 gl^{-1} .



Σχήμα 17: Ειδικός ρυθμός ανάπτυξης και περιεχόμενο πολυ-υδροβουτρικών για ζυμώσεις *Cupriavidus necator* σε φιάλη ανακίνησης χρησιμοποιώντας μέσα που σχηματίστηκαν από υδρολυτικό σιτάρι και εκχύλισμα μυκήτων. Χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις συγκεντρώσεις γλυκόζης (5, 8.7, 16.5 και 26 g l⁻¹) και πέντε συγκεντρώσεις ελεύθερου αμινο-αζώτου. Σύμβολα για τη διακύμανση ελεύθερου αμινο-αζώτου συγκεντρώσεων σε κάθε πείραμα (mg l⁻¹): (●)100, (♦)200, (■)350, (▲)450, (▼)560. Δεύτερη δέσμη ζυμώσεων σε φιάλες ανακίνησης

Το Σχ. 18 πιο κάτω παρουσιάζει το συνολικό ξηρό βάρος, μικροβιακή βιομάζα και κατανάλωση γλυκόζης όταν χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις γλυκόζης και ελεύθερου αμινο-αζώτου των 11, 20 και 0,4, 0,8 g l⁻¹, αντιστοίχως. Ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις ελεύθερου αμινο-αζώτου (1 και 1,2 g l⁻¹) δεν παρήγαγαν αξιόπιστα αποτελέσματα λόγω καθίζησης στερεών κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Αυτό μπορεί να έχει συμβεί, διότι το pH του ζωμού αυξήθηκε σε μια τιμή πάνω από 8,2 κατά τη ζύμωση προκαλώντας πτώση των πεπτιδίων, υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών ή / και συγκροτήματα που σχηματίστηκαν λόγω της μεγάλης ποικιλομορφίας της σύνθεσης σε υδρολυτικό σιτάρι και εκχύλισμα μυκήτων.

Όπως μπορεί να παρατηρηθεί από την εικόνα. 2, αυξήθηκε η (μη-πολυ-υδροξυβουτιρική) μικροβιακή συγκέντρωση όταν χρησιμοποιήθηκε υψηλότερη συγκέντρωση ελεύθερου αμινο-αζώτου στα μέσα με την ίδια συγκέντρωση γλυκόζης. Για παράδειγμα, σε συγκεντρώσεις 11 g l^{-1} γλυκόζης και $0,8 \text{ g l}^{-1}$ ελεύθερου αμινο-αζώτου, η μικροβιακή συγκέντρωση που επιτεύχθηκε ($12,2 \text{ g l}^{-1}$) ήταν 23% υψηλότερη από εκείνη που επιτεύχθηκε ($9,3 \text{ g l}^{-1}$), όταν χρησιμοποιήθηκαν 11 g l^{-1} γλυκόζης και $0,4 \text{ g l}^{-1}$ ελεύθερου αμινο-αζώτου. Η απόδοση ανάπτυξης ήταν υψηλότερη όταν χρησιμοποιήθηκαν 11 g l^{-1} γλυκόζης και αντιστοιχούσε σε 0,86 και $1,07 \text{ g g}^{-1}$ για 0,4 και $0,8 \text{ g l}^{-1}$ ελεύθερου αμινο-αζώτου, αντίστοιχα. Η απόδοση ανάπτυξης που επιτεύχθηκε σε $0,8 \text{ g l}^{-1}$ ελεύθερου αμινο-αζώτου είναι ελαφρώς υψηλότερη από εκείνη που είχε επιτευχθεί στο προηγούμενο πείραμα ($0,97 \text{ g g}^{-1}$, Πίνακας 2) όταν χρησιμοποιήθηκαν γλυκόζη $8,7 \text{ g l}^{-1}$ (η πραγματική συγκέντρωση ήταν 9 g l^{-1}) και ελεύθερου αμινο-αζώτου $0,56 \text{ g l}^{-1}$.



Σχήμα 18: Χρονικά προφίλ του συνολικού ξηρού βάρους, μη-πολυ-υδροξυβουτυρικής μικροβιακής βιομάζας και γλυκόζης αλλάζουν κατά τη διάρκεια ζυμώσεων *C. necator* σε φιάλες ανακίνησης χρησιμοποιώντας μέσα που σχηματίστηκαν από υδρολυτικό σιτάρι και εκχύλισμα μυκήτων. Συμπληρωμένα (μαυρισμένα) και ανοικτά (κενά) σύμβολα αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις γλυκόζης 11 και 19,5 g l⁻¹ αντίστοιχα. Συγκεντρώσεις ελεύθερου αμινο-αζώτου για κάθε συγκέντρωση της γλυκόζης (mg l⁻¹): (●) 400, (■) 800, (○) 400, (□) 800.

Το Σχ. 19 παρουσιάζει την αλλαγή προφίλ του συνολικού ξηρού βάρους, την συγκέντρωση πολυ-υδροξυβουτιρικών και την συγκέντρωση (μη-πολυ-υδροβουτιρικών) καταλοίπων μικροβιακής βιομάζας κατά τη διάρκεια τριών ζυμώσεων τροφοδοτημένων παρτίδων σε φιάλες ανακίνησης. Το ίδιο αρχικό μέσο εκχύλισμα μυκήτων χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις ζυμώσεις προκειμένου να επιτευχθεί το ίδιο επίπεδο ανάπτυξης βακτηριδίων. Οι ζυμώσεις έγιναν κατά ομαδικό τρόπο για 20 ώρες και από αυτό το σημείο ορισμένο όριο από τρία διαφορετικά μέσα υδρολυτικού σιταριού προστέθηκε περιοδικά σε κάθε φιάλη για να παράσχει αποδεικτικά στοιχεία σχετικά με την επίδραση διαφόρων υδρολυτικών σίτου στη συσσώρευση πολυ-υδροξυβουτιρικών και αύξηση του *C. necator*.

Όπως παρατηρήθηκε τρία υδρολυτικά σίτου περιείχαν ίδια περίπου συγκέντρωση γλυκόζης (το WH3 περιείχε 10% υψηλότερη από τα WH2 και WH1) και ποικίλες ποσότητες άλλων θρεπτικών συστατικών. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα διαφορές στη συσσώρευση πολυ-υδροξυβουτιρικών και στον μικροβιακό πολλαπλασιασμό. Ο πίνακας 2 συνοψίζει τα αποτελέσματα που ελήφθησαν μετά από 152 ώρες για το μέσο WH1 και 167,5 ώρες για τα μέσα WH2 και WH3. Η χαμηλότερη παραγωγή πολυ-υδροξυβουτιρικών ($36,5 \text{ g l}^{-1}$) και μικροβιακής συγκέντρωσης ($18,3 \text{ g l}^{-1}$) επιτεύχθηκε όταν το μέσο WH1 προστέθηκε στον φιάλη 1. Η υψηλότερη μικροβιακή ($29,9 \text{ g l}^{-1}$) και πολυ-υδροξυβουτιρικών ($51,1 \text{ g l}^{-1}$) παραγωγή επιτεύχθηκε όταν χρησιμοποιήθηκαν τα μέσα WH3 και WH2, αντιστοίχως. Η συνολική κατανάλωση γλυκόζης σε κάθε πείραμα ποίκιλε. Το μέσο WH3 υποστήριξε την υψηλότερη μικροβιακή απόδοση, την απόδοση πολυ-υδροξυβουτιρικών και την μικροβιακή παραγωγικότητα.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2

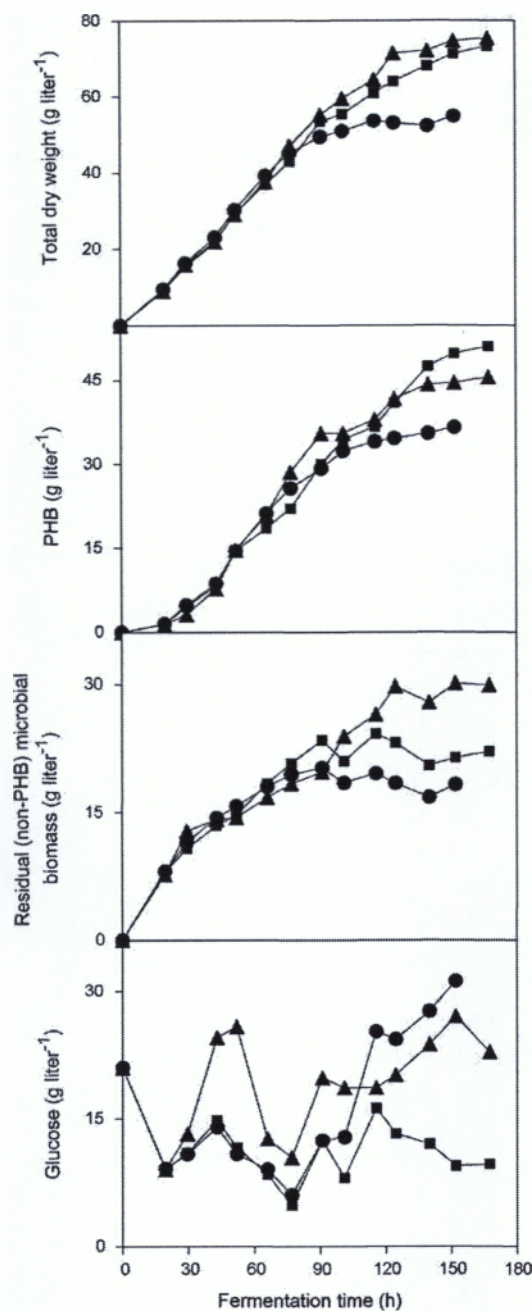
Επίδραση των διαφόρων υδρολυτικών σίτου στο συνολικό ξηρό βάρος και την παραγωγή πολυ-υδροξυβουτιρικών, καθώς και απόδοση και παραγωγικότητα μικροβιακής βιομάζας και πολυ-υδροξυβουτιρικών.

Flask	Feeding medium	Glucose consumed (g)	Total dry Weight (g l ⁻¹)	Cell weight (g l ⁻¹)	PHB contenta (g g ⁻¹)	Yield (g g ⁻¹) of ^a Microbial biomass	Yield (g g ⁻¹) of ^a PHB	Productivity (g l ⁻¹ h ⁻¹) of ^a Microbial biomass	Productivity (g l ⁻¹ h ⁻¹) of ^a PHB
1	WH1	9.5b	54.8	18.3	0.65	0.18	0.35	0.12	0.24
2	WH2	12.8c	73.2	22.1	0.70	0.18	0.41	0.14	0.32
3	WH3	8.9c	75.4	29.9	0.60	0.28	0.43	0.19	0.29

a Μια μέση τιμή των τελευταίων τριών δειγμάτων

b διάρκεια 152 ώρες.

c διάρκεια 167,5 h



Σχήμα 19: Χρονικά προφίλ ολικού ξηρού βάρους, συγκέντρωσης πολυ-υδροξυβουτιρικών, αλλαγή μικροβιακής (μη πολυ-υδροξυβουτιρικών) συγκέντρωσης και συγκέντρωσης γλυκόζης κατά τη διάρκεια της ζύμωσης *C. necator* σε φιάλη ανακίνησης που έγινε με τρόπο τροφοδοτούμενων παρτίδων. Το αρχικό στάδιο πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας μέσο εκχύλισμα μυκήτων, ενώ στην επόμενη φάση τροφοδοσίας μέσα WH1, WH2 και WH3 τροφοδοτούνταν σε φιάλες 1, 2 και 3, αντίστοιχα. (●) φιάλη 1, (■) φιάλη 2, (▲) φιάλη 3. Γλυκόζη προστέθηκε στις φιάλες σε κάθε δείγμα, αλλά τα στοιχεία που εμφανίζονται αντιπροσωπεύουν συνθήκες πριν από την προσθήκη.