



Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Αξιοποίηση Αγρο-Διατροφικών Αποβλήτων

Μέρος ΙΙΙ: Βιοτεχνολογικές μέθοδοι αξιοποίησης

Ενότητα ΙΙΙ.1: *Τεχνολογία ζυμώσεων*

Δημήτρης Π. Μακρής *PhD DIC*

Αναπληρωτής Καθηγητής

dimitrismakris@uth.gr

Στάδια Ζυμωτικής Διεργασίας 1. Ανιούσα Επεξεργασία (Upstream Processing)

Μέσο ζύμωσης

Το μέσο ορίζεται ως η ουσία που περιβάλλει τα κύτταρα και επιτρέπει στους μικροοργανισμούς ν' αυξάνονται και να παράγουν προϊόντα. Ενώ τα διάφορα συστατικά του μέσου αποτελούν το υπόστρωμα, γενικά ως υπόστρωμα ορίζεται η πηγή άνθρακα ενός μέσου (π.χ. γλυκόζη).

Η παρασκευή ενός κατάλληλου μέσου είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την επιτυχία μιας ζυμωτικής διεργασίας. Ένα μέσο το οποίο χρησιμοποιείται για βιομηχανικές ζυμώσεις θα πρέπει να βασίζεται στα παρακάτω κριτήρια:

1. Μέγιστη απόδοση και συγκέντρωση προϊόντος ή βιομάζας ανά μονάδα μάζας υποστρώματος.
2. Ελάχιστη παραγωγή ανεπιθύμητων μεταβολιτών.
3. Σταθερή ποιότητα προϊόντος.
4. Ελάχιστα προβλήματα κατά την αποστείρωση και τη ζύμωση.

Στάδια Ζυμωτικής Διεργασίας 1. Ανιούσα Επεξεργασία (Upstream Processing)

Ένα μέσο που χρησιμοποιείται για ζύμωση μπορεί να οριστεί ως «καθορισμένο», «πολύπλοκο» ή «τεχνικό».

Το «καθορισμένο μέσο» αποτελείται μόνο από υποστρώματα, χημικά επακριβώς καθορισμένα. Σε εργαστηριακό ή πιλοτικό επίπεδο, όπου είναι αναγκαίο να τυποποιηθούν φυσικές, χημικές και φυσιολογικές παράμετροι, μόνο καθορισμένα μέσα μπορούν να χρησιμοποιηθούν.

Το «πολύπλοκο μέσο» αποτελείται από υποστρώματα απροσδιόριστης σύστασης, όπως για παράδειγμα εκχυλίσματα ή υδρολύματα από απόβλητα, τα οποία είναι φθηνά υποστρώματα και χρησιμοποιούνται στη βιομηχανική παραγωγή.

Τα «τεχνικά μέσα» χρησιμοποιούνται σε βιομηχανική κλίμακα και είναι φθηνότερα. Συνήθως, αλλά όχι απαραίτητα, το κύριο συστατικό είναι ένα πολύπλοκο υπόστρωμα.

Οι πηγές των υποστρωμάτων μπορεί να είναι βιομηχανικά απόβλητα, τα οποία είναι συνήθως μίγματα με μεγάλο ποσοστό ανεπιθύμητων ουσιών και απαιτείται προεπεξεργασία πριν τη χρήση τους σε ζυμωτικές διεργασίες.

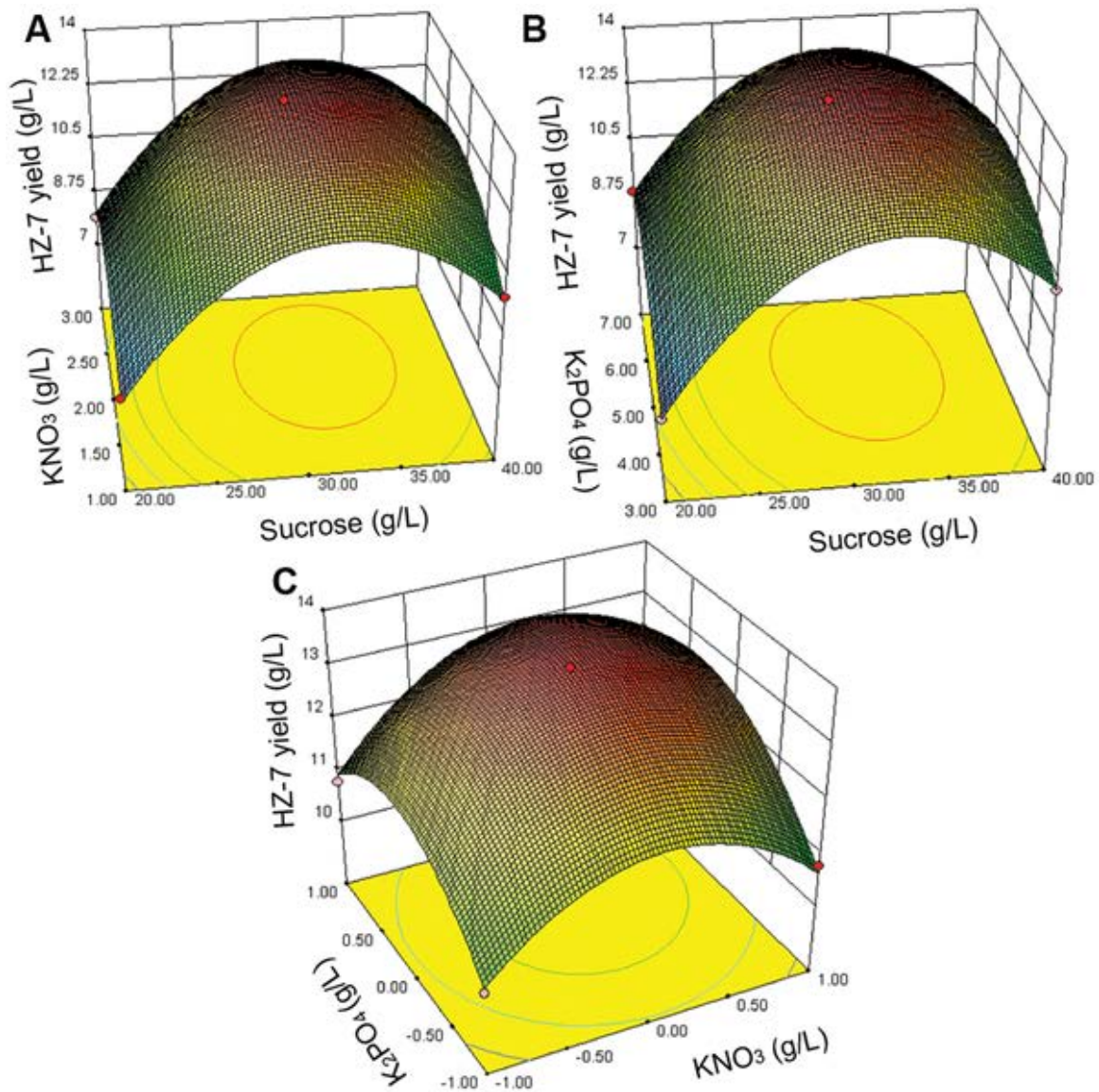
Στάδια Ζυμωτικής Διεργασίας 1. Ανιούσα Επεξεργασία (Upstream Processing)

Βελτιστοποίηση μέσου ζύμωσης: Η βελτιστοποίηση πραγματοποιείται μέσω χρήσης πειραματικού σχεδιασμού, λαμβάνοντας υπόψη μεταβλητές (κυρίως συστατικά του μέσου) που μπορούν να έχουν σημαντική επιρροή στη διεργασία ζύμωσης.

Ο πειραματικός σχεδιασμός αποσκοπεί στον προσδιορισμό της βέλτιστης σύστασης του μέσου, ενώ ταυτόχρονα διασαφηνίζονται οι βέλτιστες παράμετροι της διεργασίας.

Ο πειραματικός σχεδιασμός γίνεται έτσι ώστε να ληφθούν αξιόπιστα πειραματικά δεδομένα με περιορισμένο κόστος, αριθμό πειραμάτων και χρόνο. Ένας σωστός πειραματικός σχεδιασμός είναι πιο σημαντικός από μια λεπτομερή στατιστική ανάλυση.

Ο περιορισμός της μελέτης μιας παραμέτρου τη φορά μπορεί να ξεπεραστεί λαμβάνοντας υπόψη όλες τις σημαντικές παραμέτρους συγκεντρωτικά, με εφαρμογή μεθοδολογίας αποκριτικής επιφάνειας (response surface methodology – RSM), έτσι ώστε να εκτιμηθεί η σχετική σημαντικότητα των μεταβλητών.



Στάδια Ζυμωτικής Διεργασίας 1. Ανιούσα Επεξεργασία (Upstream Processing)

Συστατικά μέσου βιομηχανικής ζύμωσης: Στις βιομηχανικές διεργασίες, χρησιμοποιούνται τα φθηνότερα υποστρώματα, έτσι ώστε να παραμένει χαμηλό το κόστος παραγωγής.

Στα φθηνότερα υποστρώματα συμπεριλαμβάνονται:

- μελάσες σακχαροκάλαμου
- υπολείμματα επεξεργασίας αραβόσιτου (corn meal) και βάμβακος (cotton seed meal)
- αποξηραμένα υπολείμματα απόσταξης (dried distillers' solubles)
- υπολείμματα επεξεργασίας ιχθυρών (fish meal, solubles)
- υπολείμματα επεξεργασίας κρέατος και οστών (meat and bone meal)
- πίτουρο και άλευρο ρυζιού
- υπολείμματα επεξεργασίας σόγιας και σίτου (soybean and wheat meal)
- σκόνη ορού γάλακτος (τυρόγαλου)

Στάδια Ζυμωτικής Διεργασίας 1. Ανιούσα Επεξεργασία (Upstream Processing)

Η σύσταση του μέσου θα πρέπει ν' αντικατοπτρίζει τις ανάγκες που είναι απαραίτητες για την κυτταρική ανάπτυξη και την παραγωγή προϊόντος. Ο λόγος άνθρακας-προς-άζωτο είναι γενικά ένας καλός δείκτης για τη μελέτη των βέλτιστων απαιτήσεων για κυτταρική ανάπτυξη και δημιουργία προϊόντος.

Γενικά, τα μέσα είναι υδατικά διαλύματα που περιέχουν θρεπτικά άλατα και διαλυμένο O_2 .

Το οικονομικό υπόβαθρο μια διεργασίας ζύμωσης παίζει σημαντικό ρόλο στο να καταστεί αυτή η διεργασία επιτυχημένη, γι' αυτό και η επαρκής μετατροπή του υποστρώματος σε προϊόν είναι το πιο κρίσιμο σημείο.

Στο παρόν στάδιο της προηγμένης βιοτεχνολογικής ανάπτυξης, αυτό εμπεριέχει τη γενετική μηχανική του μικροβιακού στελέχους, καθώς και μια πρακτική, εστιασμένη προσέγγιση στη βέλτιστη χρησιμοποίηση του υποστρώματος με τη βοήθεια μεταβολικής μηχανικής (metabolic engineering).

Nutritional sources used in fermentation media (91)

Carbon Source	Nitrogen Source		Inorganic Elements	Vitamins	Medium Additives
	Organic	Inorganic			
Carbohydrates, Alcohols, Carboxylic acids, Fats, Hydrocarbons,	Urea, Aminoacids, Purines, Pyrimidines, Complex	Nitrates, Nitrites, Ammonia, Molecular Nitrogen.	Phosphorus, Sulphur, Magnesium, Potassium, Calcium, Chlorine, Cobalt, Copper, Iron, Manganese, Molybdenum, Zinc.	Thiamine, Riboflavin, Pyridoxin, Biotin, Pantothenic acid, Niacin, Inositol, Choline.	Growth factors, Precursors, Detergents, Antifoaming agents, Anti-microbial agents.
Gaseous substrates.	sources such as CSL, dried yeast, protein hydrolysates.				

Στάδια Ζυμωτικής Διεργασίας 1. Ανιούσα Επεξεργασία (Upstream Processing)

Αποστείρωση: Η αποστείρωση είναι η διεργασία κατά την οποία μικροοργανισμοί είτε θανατώνονται είτε αποβάλλονται από υλικά ή εξοπλισμό. Η αποστείρωση είναι απαραίτητη για να εξασφαλιστεί:

- ότι μόνο ο επιθυμητός μικροοργανισμός θα διεξάγει τη ζύμωση
- ότι τα προϊόντα θα έχουν την προβλεπόμενη ποιότητα
- ότι το περιβάλλον είναι προστατευμένο από ανεπιθύμητη επιμόλυνση
- ότι θα προληφθεί η μικροβιακή αλλοίωση των προϊόντων

Οι τεχνικές αποστείρωσης που εφαρμόζονται σε μέσα ζύμωσης περιλαμβάνουν:

- αποστείρωση με υψηλή θερμοκρασία, με άμεση ή έμμεση θέρμανση με ατμό ή ηλεκτρικό μέσο. Είναι η πιο δημοφιλής και επαρκής τεχνική
- ακτινοβόληση με μικροκύματα, η οποία χρησιμοποιείται στις βιομηχανίες τροφίμων. Προκαλεί κυτταρικό θάνατο
- νέες τεχνικές, όπως π.χ. παλμοί υψηλής τάσης

Στάδια Ζυμωτικής Διεργασίας 1. Ανιούσα Επεξεργασία (Upstream Processing)

Εμβολιασμός (*inoculation*): Η διεργασία του εμβολιασμού είναι η μεταφορά εμβολίου μέσα στο ζυμωτήρα. Σε βιομηχανική κλίμακα αυτό γίνεται με εφαρμογή θετικής πίεσης στον ζυμωτήρα που περιέχει το εμβόλιο και συνδέεται ασηπτικά με το ζυμωτήρα παραγωγής.

Η απόδοση μιας διεργασίας ζύμωσης εξαρτάται κατά πολύ από την φυσιολογική κατάσταση του εμβολίου. Είναι απαραίτητο να προσδιοριστεί πειραματικά σε εργαστηριακή κλίμακα ο χρόνος μεταφοράς του εμβολίου και να καθοριστούν οι συνθήκες ανάπτυξής του.

Έχει επίσης σημασία και η ηλικία της καλλιέργειας (π.χ. φάση λογαριθμικής ανάπτυξης, φάση μείωσης κτλ.).

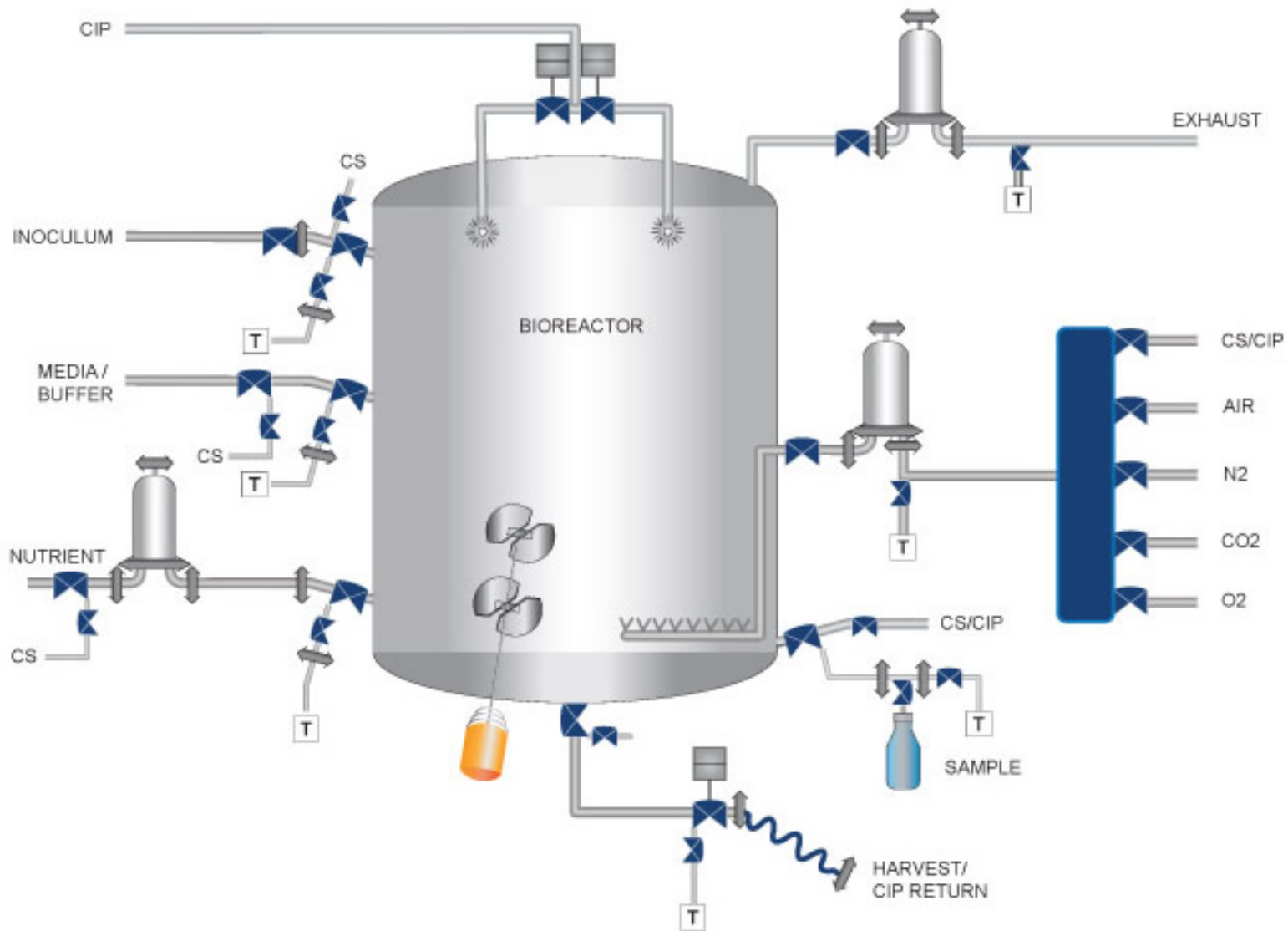
Στάδια Ζυμωτικής Διεργασίας 2. Ζύμωση (Fermentation)

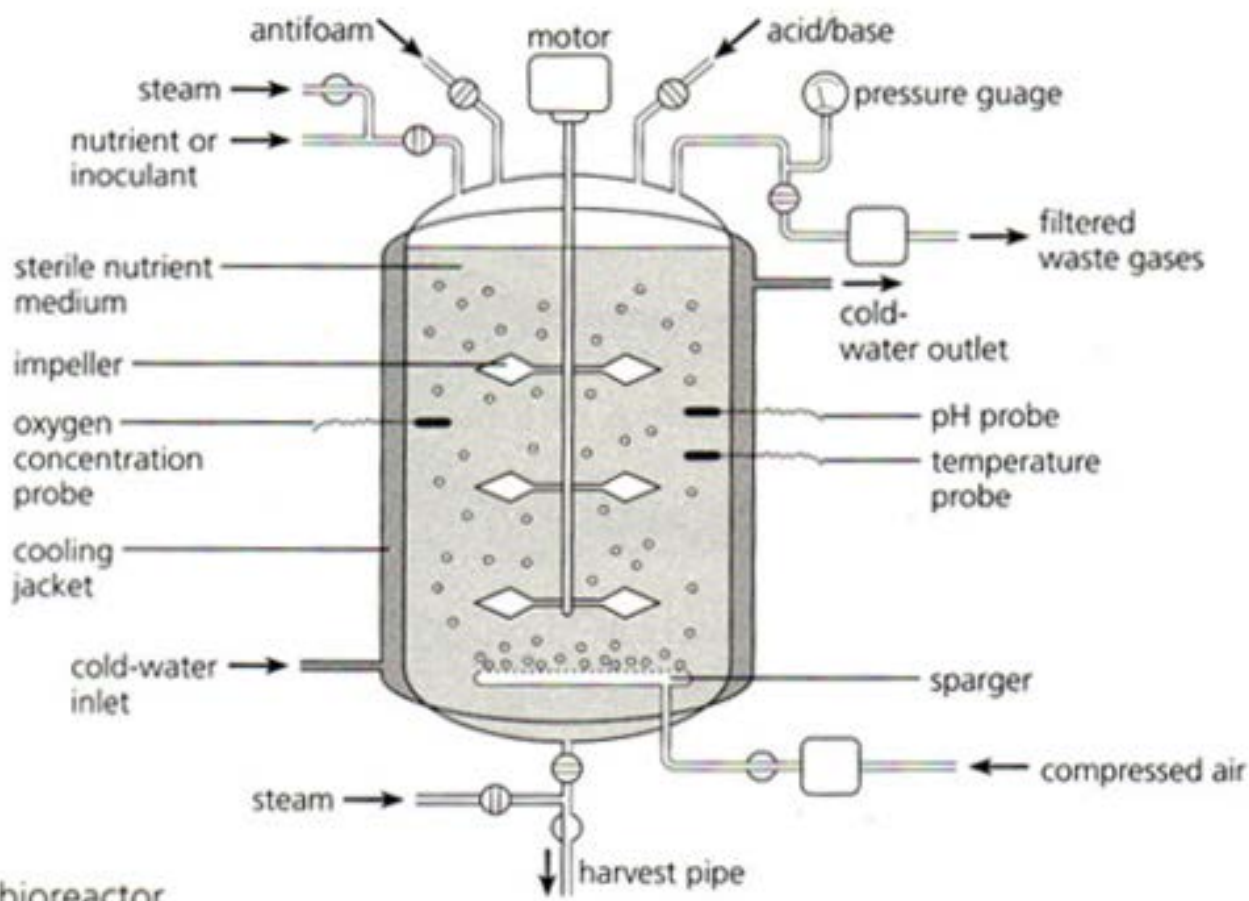
Διαλείπουσα ζύμωση (batch fermentation): Οι διεργασίες αυτού του τύπου ζύμωσης συμπεριλαμβάνουν μια αλληλουχία εργασιών, όπως η ανάπτυξη εμβολίου από εργαστηριακή καλλιέργεια, μέχρι τον εμβολιασμό του ζυμωτήρα παραγωγής.

Το εμβόλιο και ο ζυμωτήρας παραγωγής είναι οι σημαντικότεροι παράγοντες στην ανάπτυξη μιας διεργασίας ζύμωσης. Η ανάπτυξη εμβολίου μπορεί να περιλαμβάνει πολλά στάδια, αλλά η παραγωγή λαμβάνει μέρος μόνο σ' έναν ζυμωτήρα.

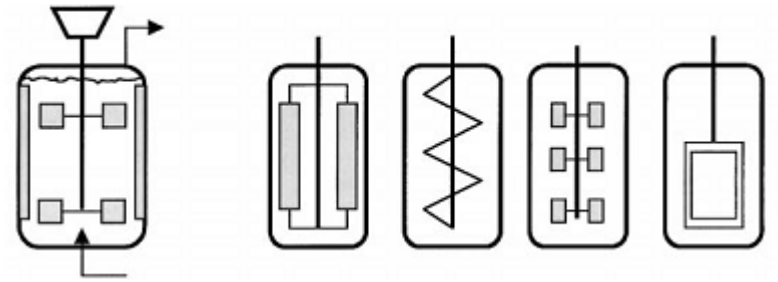
Ο χρόνος που απαιτείται για μια διαλείπουσα ζύμωση κυμαίνεται από μερικές ώρες σε μερικές εβδομάδες, ανάλογα με το είδος της βιομετατροπής και τις συνθήκες που χρησιμοποιούνται. Ο ρυθμός μικροβιακής ανάπτυξης σε μια διαλείπουσα ζύμωση είναι μη-ελεγχόμενος και είναι υψηλότερος στην αρχή.

Η **παραγωγικότητα** μιας διαλείπουσας ζύμωσης υπολογίζεται από την τελική συγκέντρωση βιομάζας ή παραγόμενου προϊόντος, διαιρεμένη με το συνολικό χρόνο της διεργασίας, που περιλαμβάνει το χρόνο ζύμωσης και το χρόνο αλλαγής (εκκένωση, καθαρισμός, αποστείρωση, επαναπλήρωση).





A bioreactor



Στάδια Ζυμωτικής Διεργασίας 2. Ζύμωση (Fermentation)

Παραγωγικότητα συνεχούς ζύμωσης: Σε μια διεργασία συνεχούς ζύμωσης δεν υπάρχει εκκένωση, καθαρισμός, αποστείρωση και επαναπλήρωση. Η παραγωγικότητα ενός συνεχούς ζυμωτήρα υπολογίζεται πολλαπλασιάζοντας την ταχύτητα αραίωσης (D) με τη συγκέντρωση της βιομάζας (X) ή του προϊόντος (P) στην έξοδο:

Cell productivity = DX (kg cells/m³/h)

Product productivity = DP (kg product/m³/h)

Οι πιο κοινές εμπορικές εφαρμογές συνεχούς καλλιέργειας περιλαμβάνουν την παραγωγή ζυμών αρτοποιίας, παραγωγή όξους, και συστήματα παραγωγής αιθανόλης με ζυμομύκητες.

Στάδια Ζυμωτικής Διεργασίας 3. Κατιούσα Επεξεργασία (Downstream Processing)

Τα προϊόντα ζύμωσης συνήθως βρίσκονται σε πολύπλοκα μίγματα αραιών διαλυμάτων και πρέπει να συμπυκνωθούν και να καθαριστούν. Ο διαχωρισμός του προϊόντος από το μέσο ζύμωσης εξαρτάται από τη συσσώρευση του προϊόντος, η οποία μπορεί να είναι ενδοκυτταρική ή έξωκυτταρική.

Οι τυπικές κατιούσες δράσεις και τα επί μέρους στάδια που εμπλέκονται στην επεξεργασία του ζυμωμένου μέσου είναι:

1. Διαχωρισμός κυττάρων (καθίζηση, φυγοκέντριση, διήθηση)
2. Κυτταρική διάρρηξη (ομογενοποίηση υψηλής πίεσης, ξηρή άλεση, λύση)
3. Διαύγαση του εκχυλίσματος (φυγοκέντριση, εκχύλιση, διήθηση)
4. Εμπλουτισμός (καταβύθιση, προσρόφηση, υπερδιήθηση, κατανομή)
5. Τεχνικές υψηλής διαχωριστικής ικανότητας (χρωματογραφία, ηλεκτροφόρηση)
6. Συμπύκνωση (διήθηση, υπερδιήθηση, λυοφιλίωση, καταβύθιση)

Συστήματα Ζύμωσης στην Πράξη

Μικροβιακή καλλιέργεια

Οι μικροβιακοί πρωτογενείς μεταβολίτες που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων συμπεριλαμβάνουν:

1. Αλκοόλες (αιθανόλη)
2. Αμινοξέα (γλουταμινικό, λυσίνη θρεονίνη, φαινυλαλανίνη, τρυπτοφάνη)
3. Οργανικά οξέα (οξικό, προπιονικό, ηλεκτρικό, φουμαρικό, γαλακτικό)
4. Πολυόλες (γλυκερόλη, μαννιτόλη, ξυλιτόλη)
5. Πολυσακχαρίτες (ξανθάνη)
6. Σάκχαρα (φρουκτόζη, ριβόζη, σορβόζη)
7. Βιταμίνες (ριβοφλαβίνη, κυανοκοβαλαμίνη, βιοτίνη)

Μεγέθυνση Κλίμακας Ζυμωτικής Διεργασίας (Scale Up)

Η μεγέθυνση κλίμακας είναι κρίσιμη για την επιτυχή ανάπτυξη μιας ζυμωτικής διεργασίας. Πολλές ζυμώσεις μεγάλης κλίμακας παρουσιάζουν μειωμένη απόδοση εν συγκρίσει με τα εργαστηριακά αποτελέσματα.

Οι παραδοσιακές μέθοδοι μεγέθυνσης βασίζονται σε εμπειρικά κριτήρια (π.χ. σταθερός συντελεστής μεταφοράς μάζας, σταθερός χρόνος ανάδευσης κτλ.), αλλά τα εμπειρικά κριτήρια παρουσιάζουν χάσματα όταν αλλάζει το καθεστώς ελέγχου μιας διεργασίας.

Η μεγέθυνση κλίμακας μέσω της αύξησης του αριθμού των αντιδραστήρων αντί του μεγέθους είναι άλλη μια προσέγγιση, αλλά το κόστος επένδυσης και το εργατικό κόστος αυξάνουν γραμμικά.

Η λειτουργία πολλαπλών μικρών βιοαντιδραστήρων αντί ενός μεγαλύτερου μπορεί να πλεονεκτεί σε σχέση με την ευελιξία της διεργασίας, την ευκολία εκκίνησης, την ετοιμασία εμβολίου, τον καθαρισμό και την αποστείρωση.

Βιβλιογραφία

Raj A. E., Karanth N. G. (2006) Fermentation technology and bioreactor design. In "*Food Biotechnology*", 2nd edition, Shetty K., Paliyath G., Pometto A., Levin R.E. ed., CRC Taylor & Francis.