

# Ζύμωση και σχεδιασμός φωτομέτρησης

## Βήμα 2 και 3: Ζύμωση της γλυκόζης σε αιθανόλη με ζύμη

**1.4 Διήθηση του υρδολύματος**  
Διηθήστε το υρδόλυμα μετά την υρδόλυση με ένα φίλτρο Nutsche.



## 2. Ζύμωση

**2.1 Προετοιμασία του θρεπτικού μέσου (2 φορές συμπυκνωμένου)**  
Δείτε το σχεδιάγραμμα των καθηγητών.

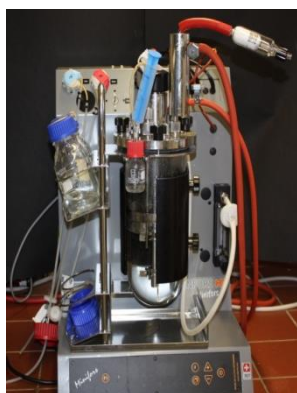
**2.2 Προετοιμασία της αρχικής καλλιέργειας**

1. Προσθέστε 20 g φρέσκιας ζύμης σε 50 ml του 2 φορές συμπυκνωμένου θρεπτικού μέσου και τα 50 ml του αποσταγμένου H<sub>2</sub>O.
2. Ανακινήστε τη φρέσκια ζύμη.



**2.3 Ζύμωση στον βιοαντιδραστήρα**

1. Γεμίστε τον ζυμωτή με
  - 800 ml θρεπτικό μέσο (2 φορές συμπυκνωμένο) και
  - 800 ml διηθημένο υρδόλυμα.
2. Ξεκινήστε την ζύμωση με τις ακόλουθες παραμέτρους:
  - Αναερόβιες συνθήκες
  - 30 °C
  - 200 στροφές το λεπτό
  - pH 4,5



Εισαγάγετε 100 ml της αρχικής καλλιέργειας μέσα στον ζυμωτή, αφού έχουν ρυθμιστεί όλες οι παράμετροι!

Τα δείγματα εξάγονται από την πρώτη στιγμή ( $t_0$ ) και κατά τη διάρκεια της ζύμωσης μετά από 15 ( $t_1$ ), 45 ( $t_2$ ), 90 ( $t_3$ ) και 150 ( $t_4$ ) λεπτά.

1. Πλύνετε τον σωλήνα εξαγωγής πριν από την εξαγωγή κάθε δείγματος και εξαγάγετε 5 ml μέσου ζύμωσης.
2. Αποβάλετε τα 5 ml.
3. Εξαγάγετε 5 ml μέσου ζύμωσης μια ακόμη φορά.
4. Εξαγάγετε με πιπέτα 1 ml του μέσου για τον προσδιορισμό της γλυκόζης και της αιθανόλης (3.2.1) και άλλο ένα 1 ml για τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) (3.2.2) σε δύο δοκιμαστικούς σωλήνες.
5. Φυγοκεντρήστε το σωλήνα για τον καθορισμό της γλυκόζης και της αιθανόλης για ένα λεπτό στις 14000 στροφές το λεπτό.
6. Μετά τη φυγοκέντρηση εξαγάγετε με πιπέτα 500 μl του υπερκρίμενου σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα.
7. Παγώστε αυτό το σωλήνα στους -20 °C μέχρι τον φωτομετρικό προσδιορισμό της γλυκόζης ή της αιθανόλης.

## 3.2 Φωτομετρικός προσδιορισμός

### 3.2.1 Προσδιορισμός αιθανόλης και γλυκόζης

Προσέξτε κατά τη διάρκεια του προσδιορισμού της αιθανόλης τα εξής:

1. Η κυβελίδα πρέπει να καλύπτεται μετά από κάθε βήμα εξαγωγής με πιπέτα και κατά τη διάρκεια της μέτρησης!
2. Προσδιορίστε την συγκέντρωση γλυκόζης και αιθανόλης σύμφωνα με τα συνοδευτικά πρωτόκολλα εξαγωγής με πιπέτα.



### 3.2.2 Προσδιορισμός της οπτικής πυκνότητας

1. Προσδιορίστε την τιμή για το τυφλό με 1 ml μιας φοράς συμπυκνωμένου θρεπτικού μέσου στα 600 nm.
2. Εξάγετε 125 μl από το δείγμα του 1 ml και προσθέστε το σε 875 μl μιας φοράς συμπυκνωμένου θρεπτικού μέσου.
3. Μετρήστε την οπτική πυκνότητα του δείγματος στα 600 nm και καταγράψτε τις τιμές στο συνημμένο φύλλο εργασίας.

## 3. Φωτομετρικές μετρήσεις

### 3.1 Εξαγωγή δείγματος