



West Pomeranian  
University of Technology  
Szczecin



# BIOIMMOBILIZACJA

*Wydział Nauk o Żywności i Rybactwa*

**Centrum Bioimmobilizacji  
i Innowacyjnych Materiałów  
Opakowaniowych**



ul. Klemensa Janickiego 35  
71-270 Szczecin



## Ćwiczenie 2

**Mikrokapsułkowanie za pomocą  
ekstruzji oraz koekstruzji**

## **Uwaga!**

**Ćwiczenie wymaga kontaktu z mikroorganizmami. Po zakończonej pracy wszystkie zawiesiny zawierające drożdże należy zagotować na płycie grzejnej (15min.). Dopiero po zakończonym procesie gotowania mieszaniny można wylać do zlewu. Użyte szkło laboratoryjne należy dokładnie umyć a stanowisko pracy zdezynfekować alkoholem.**

# 1. Immobilizacja

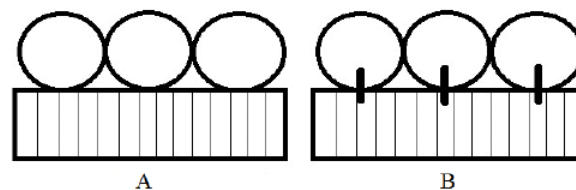
Immobilizacja, inaczej zwana unieruchomieniem, jest zespołem technik, które prowadzą do częściowego lub całkowitego ograniczenia możliwości ruchu, poprzez związanie z nośnikiem cząsteczek, substancji, czy też materiałów biologicznych. Wyróżniamy trzy główne metody:

- unieruchomienie na powierzchni nośnika,
- unieruchomienie wewnątrz nośnika,
- unieruchomienie bez udziału nośnika.

Immobilizacja na powierzchni nośnika opiera się ona na powinowactwie immobilizowanego czynnika (mikroorganizm, enzym, substancje zapachowe, itp.) do nośnika. W metodzie tej wyróżniamy dwie grupy: adsorpcję oraz wiązanie kowalencyjne.

Pierwsza z nich polega na wytworzeniu wiązań wodorowych, oddziaływań: elektrostatycznych, van der Waalsa oraz hydrofobowych. Jest to metoda tania i prosta, jednak bardzo wrażliwa na zmiany w środowisku (pH, temp.), w wyniku czego często dochodzi do desorpcji.

Immobilizacja poprzez wiązania kowalencyjne polega natomiast na wytworzeniu trwałych wiązań chemicznych, przez co układ jest stabilny i bardziej trwały. Wymaga to jednak często zastosowania czynników wiążących o właściwościach toksycznych, które wykluczają zastosowanie tej metody w technologii żywności. Stosowanymi nośnikami w unieruchamianiu powierzchniowym są: szkło porowate, drewno, celuloza, ziemia krzemkowa, pumeks, polimery syntetyczne, spieki ceramiczne oraz tlenki metali. Jako czynniki wiążące stosuje się aldehyd glutarowy, bromocyjan, diaminy, kwasy dikarboksylowe.



**Rys. 1.** Immobilizacja na powierzchni nośnika: A) adsorpcja na powierzchni, B) wiązanie kowalencyjne.

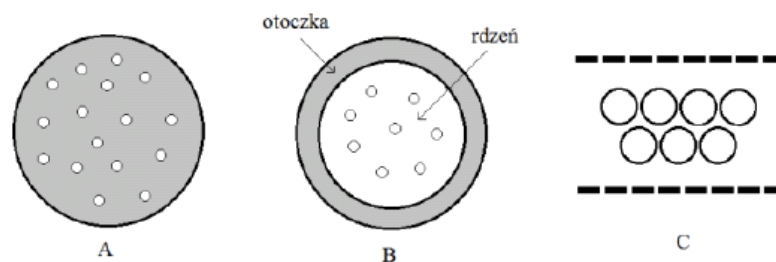
Zamykanie wewnątrz nośnika opiera się na wykorzystaniu materiałów, które tworzą porowate, półprzepuszczalne membrany, umożliwiające dyfuzję. W metodzie tej wyróżniamy trzy grupy: pułapkowanie, mikrokapsułkowanie oraz unieruchomienie pomiędzy membranami.

Pułapkowanie (inkluzyja) jest metodą, w której dana substancja zostaje zawieszona w żelu naturalnym bądź syntetycznym, po czym powstała mieszanina poddawana jest sieciowaniu. W wyniku tego powstają najczęściej kuleczki o wielkości rzędu kilkudziesięciu  $\mu\text{m}$  do paru mm.

Mikrokapsułkowanie polega na utworzeniu kapsułek, w których wyróżniono dwie warstwy; pierwszą jest rdzeń, który może występować w postaci gazowej, ciekłej lub stałej, natomiast drugą warstwę stanowi otoczka utworzona z żelowego polimeru lub półprzepuszczalnej membrany. W metodzie tej możliwe jest utworzenie kilku warstw otoczki, których zadaniem jest lepsza ochrona materiału w rdzeniu przed oddziaływaniem czynników zewnętrznych.

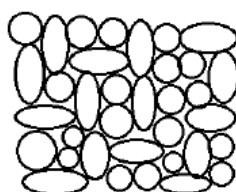
Kolejnym sposobem unieruchomienia jest zamykanie biokatalizatorów wewnątrz przegród zbudowanych z półprzepuszczalnych membran, co umożliwia swobodny przepływ małych cząsteczkowych substratów i produktów. W przypadku zastosowania mikroorganizmów, metoda ta nie zmniejsza ich aktywności oraz nie hamuje ich wzrostu.

Wyżej wymienione metody nie wymagają użycia skomplikowanych urządzeń, cechują się prostotą oraz są ekonomiczne, jednak posiadają kilka istotnych wad, uniemożliwiających ich szersze zastosowanie. Kapsuły niecałkowicie spełniają swoją rolę w przypadku immobilizacji mikroorganizmów, gdyż ograniczają ich wzrost i aktywność, a ponadto część komórek przenika do pożywki. Bardzo często już sam proces sieciowania, przy zastosowaniu syntetycznych nośników, wykazuje toksyczność. W przypadku półprzepuszczalnych membran, dużym minusem jest przenikanie jedynie małych cząsteczkowych substancji; cząsteczki o większych rozmiarach uniemożliwiają swobodny przepływ metabolitów. Jako nośniki w powyższych metodach stosuje się: alginian, karageny, agar, chitozan, pektynę, żelatynę, poliakryloamid, poliuretan, pochodne celulozy, membrany nylonowe, silikonowe, liposomowe, poliwęglanowe.



**Rys. 2.** Immobilizacja wewnątrz nośnika: A) pułapkowanie, B) mikrokapsułkowanie, C) unieruchomienie pomiędzy membranami.

Immobilizacja bez udziału nośnika, zwana inaczej flokulacją, polega na tworzeniu agregatów przez drobnoustroje. W tym procesie wykorzystywana jest naturalna zdolność mikroorganizmów do oddziaływania fizycznego lub chemicznego z grupami funkcyjnymi ścian komórkowych, w wyniku czego zostają one połączone. W celu zwiększenia tego zjawiska stosuje się zmianę pH, składu pożywki, stężenia tlenu, a także innych czynników. Zaletą tej metody jest znaczne zwiększenie koncentracji biomasy, a co za tym idzie aktywności mikroorganizmów, bez stosowania nośników.



**Rys. 3.** Unieruchomienie bez użycia nośnika: flokulacja.

## 2. Zalety i wady immobilizacji

W obecnych czasach w różnych gałęziach przemysłu dąży się do obniżenia kosztów produkcji oraz osiągnięcia przewagi technologicznej poprzez wdrażanie innowacyjnych rozwiązań, dzięki czemu rośnie konkurencyjność danej firmy. Dogodne warunki ku temu stwarza zastosowanie procesów immobilizacji, poprzez:

- możliwość wielokrotnego wykorzystania biokatalizatora,
- zwiększenie stabilności, reaktywności oraz wydłużenie aktywności biokatalizatora/substancji czynnej,
- łatwiejsze oddzielenie końcowego produktu od biomasy,

- eliminacja fazy namnażania, dzięki czemu niemal od razu mikroorganizmy przystępują do produkcji pożądanej substancji (dodatkowo ulega skróceniu czas fermentacji),
- zwiększenie koncentracji pożądanych substancji w bioreaktorze,
- ułatwienie prowadzenia procesów ciągłych, ich automatyzację i kontrolę,
- zmniejszenie występowania zakażeń mikrobiologicznych,
- eliminacja niektórych etapów produkcji (mniejsze zapotrzebowanie na energię, sprzęt, siłę roboczą),
- lepsze wykorzystanie bioreaktora przy procesach ciągłych,
- możliwość zastosowania wydajniejszego mieszania i napowietrzania medium, co może sprzyjać lepszemu wykorzystaniu substratów,
- ochrona immobilizowanej substancji,
- kontrolowane uwalnianie produktów.

Mimo, iż immobilizacja posiada wiele zalet, napotyka ona także pewne ograniczenia w bezpośrednim zastosowaniu, m.in. takie jak:

- ograniczenia dyfuzyjne dot. przenikania substratów i produktów,
- trudności z utrzymaniem długotrwałej stabilności nośnika,
- zmiany metaboliczne wywołane unieruchomieniem i długotrwałym wykorzystaniem tych samych komórek,
- przenikanie/uwalnianie komórek do pożywki,
- strata aktywności biokatalizatorów wraz z upływem czasu.

### 3. Cechy dobrego nośnika

W procesie unieruchamiania istotnym jest nie tylko dobór odpowiedniej techniki, ale także właściwego nośnika, którego powinno cechować:

- brak toksyczności w stosunku do immobilizowanych komórek/substancji czynnych (biokompatybilność),
- łagodny i prosty proces unieruchamiania, np.: temperatura, nietoksyczny odczynnik sieciujący,
- zdolność do efektywnego zatrzymywania komórek/substancji w obrębie nośnika,
- odpowiednia porowatość (umożliwienie kontrolowanego uwalniania substancji lub/i swobodnej dyfuzji substratów i produktów),
- stabilność chemiczna i mechaniczna,
- możliwość regeneracji,
- łatwa dostępność oraz niski koszt.

### 4. Rodzaje nośników

#### 1) Nośniki organiczne

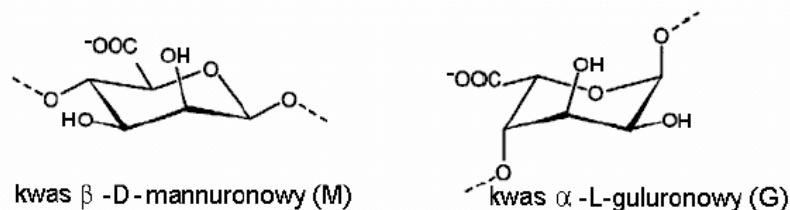
Naturalne biopolimery cieszą się dużym zainteresowaniem w procesach immobilizacji ze względu na szereg zalet. Posiadają wiele grup funkcyjnych, co wpływa na stabilizację biokatalizatorów/substancji w strukturze żelu. Układy takie są hydrofilowe, biodegradowalne, biokompatybilne oraz tanie. Jednak ich niska odporność mikrobiologiczna, wrażliwość na rozpuszczalniki organiczne oraz wąski zakres pH, w którym nośniki są stabilne, niestety bardzo często

przekreśla możliwość ich zastosowania. Najchętniej stosowanymi biopolimerami są: agar, chitozan, alginian, karageny, pochodne celulozy i inne. W celu polepszenia ich właściwości naturalnych polimerów stosuje się liczne modyfikacje, np. nośniki hybrydowe, kopolimery, nowe czynniki sieciujące.

W ostatnim czasie coraz więcej uwagi zwraca się na możliwość zastosowania syntetycznych polimerów. Podobnie jak naturalne, posiadają liczne oraz o zróżnicowanym charakterze grupy funkcyjne. Dodatkowo niewątpliwie ich zaletą jest możliwość regulowania ich struktury na poziomie makromolekularnym, a mianowicie dobór właściwej masy cząsteczkowej, struktury przestrzennej oraz sposób i kolejność rozmieszczenia poszczególnych aktywnych grup funkcyjnych w łańcuchu. Na etapie ich syntezy można wpływać na ich budowę, co może z kolei w konsekwencji regulować porowatość, średnicę porów oraz inne właściwości fizyczne nośnika, takie jak jego polarność, hydrofobowość, a także zmieniać charakter chemiczny powierzchni poprzez występujące określone grupy funkcyjne. Ponadto nośniki takie mogą przybierać najróżniejsze kształty (rurki, membrany, powłoki, nośniki o różnych kształtach od kulistych do owalnych), są łatwo dostępne i stosunkowo tanie, jednak mają ograniczoną możliwość regeneracji, a sam proces ich sieciowania zazwyczaj jest toksyczny. Dodatkowo polimery takie nie są z reguły biodegradowalne. Najczęściej stosowanymi polimerami syntetycznymi jako nośniki, są pochodne polimetakrylanów, poliamin, poliakrylany.

### Alginiany

Alginiany są jednymi z najczęściej stosowanych polimerów naturalnych do immobilizacji. Pozyskiwane są w wyniku ekstrakcji ze ścian komórkowych alg, należących do klasy Brunatnic (Phaeophyceae). Tworzą one jednowartościowe sole kwasu alginowego, np. alginian sodu, który jest szeroko wykorzystywany w różnych dziedzinach przemysłu. Cząsteczka alginianu jest liniowym kopolimerem zbudowanym z kwasu  $\alpha$ -L-guluronowego (G) i  $\beta$ -D-mannuronowego (M). Te dwa monomery zawierające grupy karboksylowe powodują, iż alginian jest typowym polianionem.

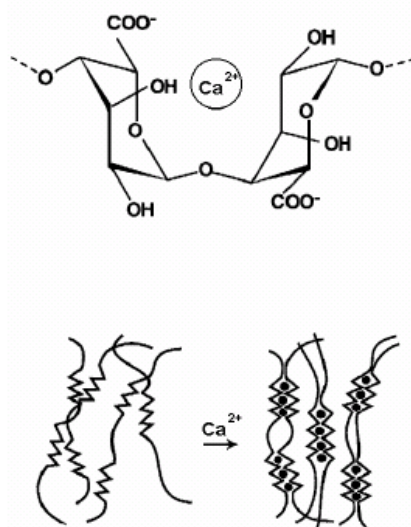


Rys. 4. Monomery alginianu.

W cząsteczce alginianu można wyróżnić trzy regiony. Region zbudowany z kwasu guluronowego (G) lub mannuronowego (M) oraz region mieszany (MG). Zawartość poszczególnych monomerów oraz długość regionów uzależniona jest od gatunku i rodzaju tkanki, z jakiej został pozyskany alginian. Skład chemiczny różnych typów alginianów wpływa na ich właściwości, a także na żele, które tworzą. Alginiany zawierające w swoim składzie dużą ilość regionów G formują żele sztywne i kruche, które ulegają synerezie (kurczenie się żelu z wydzieleniem wody), natomiast alginiany zawierające dużo regionów M oraz MG, tworzą żele słabe, lecz elastyczne, które łatwo się deformują, ale są odporne na synerezę.

Monomery alginianu różnią się między sobą sposobem wiązania oraz strukturą przestrzenną. Dlatego regiony M przybierają kształt rozciągniętej wstążki, natomiast regiony G są regularnie pozaginane. Skutkiem tego jest tworzenie pustych przestrzeni pomiędzy dwoma monomerami G, odpowiadającymi idealnie rozmiarom jonu wapnia, co wiąże się z wykazywaniem większego ich powinowactwa do tych jonów (niż do jonów sodu). Dodanie jonów wapnia do alginianu bogatego w regiony G powoduje powstanie żelu. Regiony M posiadają słabe powinowactwo do jonów wapnia, przez co w żelu będą tworzyły się rejony plastyczne lub wręcz ciekłe. Alginian sodu dodatkowo

tworzy żele w obecności jonów innych metali wielowartościowych, np.: baru, kobaltu, cynku, miedzi, żelaza, glinu, jednak brak biokompatybilności tak wytworzonych żeli, powoduje, iż nie są one stosowane.



**Rys. 5.** Schemat reakcji żelowania alginianu sodu.

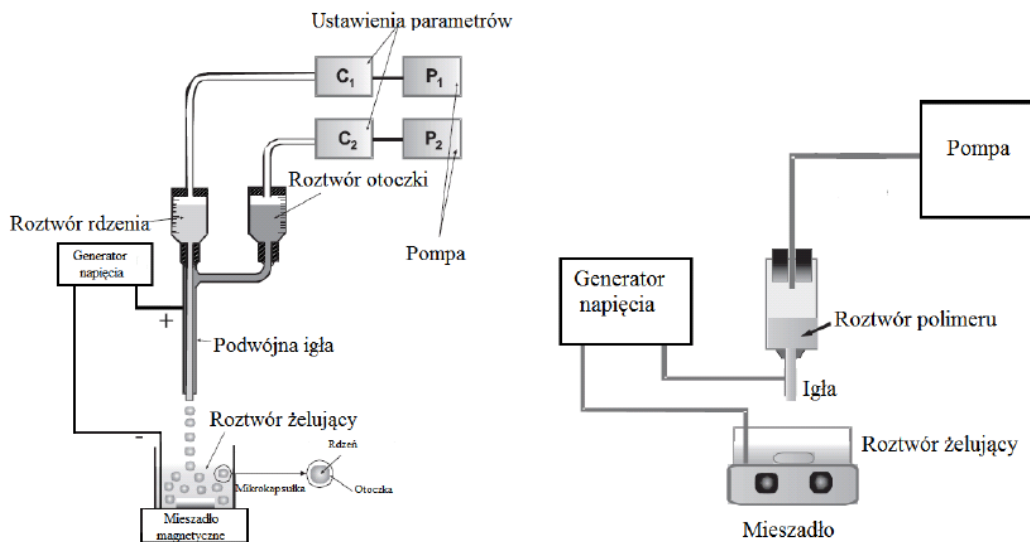
Alginian wapnia jest jednym z lepszych nośników do immobilizacji biokatalizatorów. Na fakt ten wpływają takie czynniki, jak: obecność grup karboksylowych, hydrofilowość, naturalne pochodzenie, stosunkowo dobra wytrzymałość mechaniczna, a także bardzo tania i łatwa procedura otrzymania żelu, który jest nietoksyczny i łagodny dla immobilizowanego materiału.

## 2) Nośniki nieorganiczne

Nośniki nieorganiczne posiadają dużą odporność chemiczną, fizyczną oraz biologiczną. Istotną wadą tych nośników jest występowanie małej liczby grup funkcyjnych, co uniemożliwia dostateczne związanie biokatalizatora, dlatego najczęściej wykorzystuje się je w tworzeniu nośników hybrydowych, zarówno z polimerami naturalnymi, jak i syntetycznymi. Najczęściej stosowanymi nośnikami nieorganicznymi są: krzemionka, tlenki metali, ceramika, szkło porowate oraz zeolity.

## 5. Tworzenie kapsuł przy wykorzystaniu metody elektrostatycznej

Jest to technika wykorzystywana do wytwarzania kapsuł metodą ekstruzji oraz koekstruzji. Opiera się ona na zasadzie, iż napięcie naładowanej cieczy maleje wraz ze wzrostem potencjału elektrostatycznego. Potencjał ten jest wytwarzany pomiędzy elektrodą zanurzoną w roztworze elektrolitu (np. CaCl<sub>2</sub>), a igłą. Roztwór znajdujący się w strzykawce włączany jest za pomocą pompy do igły, na której końcu formuje się kropla. Pod wpływem sił grawitacji oraz pola elektrostatycznego, kropla ta wpada do roztworu żelującego, w wyniku czego powstaje kapsułka. Stosując układ o budowie „igła w igle” można tworzyć mikrokapsułki przy pomocy techniki koekstruzji (współwytłaczania), w których wyróżniamy stałą otoczkę oraz rdzeń w postaci ciekłej, stałej lub gazowej.



Rys. 6. Schemat działania zestawu do koekstruzji (po lewej) oraz zestawu do ekstruzji (po prawej).

## 6. Kapsuły alginianowe

Jak wyżej wspomniano nośniki alginianowe charakteryzują się biokompatybilnością oraz biodegradowalnością, a tania, łatwa i nietoksyczna procedura otrzymywania żelu idealnie nadaje się do immobilizacji biokatalizatorów.

Wytrzymałość kapsuł alginianowych rośnie wraz ze stężeniem oraz zawartością regionów GG, jednak wzrost ten wpływa ujemnie na stopień dyfuzji. Wadą alginianu wapnia jest jego mała odporność na środki chelatujące wapń w postaci anionów wielowartościowych (fosforany, cytryniany, mleczany) oraz kationy metali, mogące wypierać wapń z polimeru, dlatego stosując ten rodzaj nośnika należy brać pod uwagę warunki środowiska, w jakich kapsuły się znajdują. Dodatkowo, aby zachować stabilność kapsuł należy przechowywać je w środowisku wodnym, zwłaszcza żele zawierające dużą ilość regionów G, które ulegają synerezie.

W metodzie ekstruzji dużym problemem jest ograniczona dyfuzja, co w przypadku unieruchomienia mikroorganizmów, powoduje ograniczeniem ich namnażania się oraz gromadzenie się komórek na obrzeżach kapsułki. Skutkiem tego jest osłabienie struktury żelu, następnie jego pękanie i uwalnianie biomasy do medium. Inna budowa mikro kapsułki wytworzonej metodą koekstruzji, może wpływać na lepszy stopień dyfuzji między nośnikiem, a środowiskiem. W przypadku małych cząsteczek, takich jak cukry proste, współczynnik dyfuzji był 5%-20% niższy, niż współczynnik dyfuzji w wodzie, natomiast dla witaminy B12 stanowił jedynie 50%. Znacznie gorsze wyniki uzyskano dla białek, takich jak albuminy i przeciwciała, co może być korzystne przy tworzeniu sztucznych narządów, opartych na immobilizowanych komórkach.

Wielkość mikro kapsuł ma także istotny wpływ na dyfuzję; im mniejsza średnica kapsuł, tym większa powierzchnia wymiany w stosunku do objętości całkowitej kapsuły. Wraz ze zmniejszeniem średnicy kapsuł, aktywność biokatalizatora rośnie, a w przypadku mikroorganizmów zwiększa się ich żywotność. Zmniejszenia stężenia alginianu z 10% do 2%, skutkuje zwiększeniem aktywności biokatalizatora. Wysokie stężenie powoduje gęste usieciowanie, przez co zżęczeniu ulegają pory, zostaje ograniczony dostęp substratów, a także uwalnianie produktów.



## Literatura:

1. Czaczyk K., Olejnik A., Mięzał P., Grajek W., 2005. Poszukiwanie prostych modeli do badania adhezji bakterii probiotycznych. *Żywn. Nauk. Technol. Ja.* 1 (42), 84 – 96.
2. De Ory I., Cabrera G., Ramirez M., Blandino A., 2006. Immobilization of cells on polyurethane foam. *Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and cells*, secondo edition, edited by Guisan J.M., Humana Press In., Totowa. NJ, 357-365.
3. Dulieu C., Poncelet D., Neufeld R.J., 1999. Encapsulation and immobilization techniques. *Cell encapsulation technology and therapeutics*, Birkhause, Boston, 3-17.
4. Górecka E., Jastrzębska M. 2011, Immobilization techniques and biopolymer carriers. *Biotechnol. Food Sci.* 75 (1), 65-86.
5. Guisan J.M. 2006, Immobilization of enzymes and cells. In: *Methods in Biotechnology*, 2nd ed. Walker JM Eds.: Humana Press, Totowa, USA, 22.
6. Peinado P.A., Moreno J.J., Villaba J.M., Gonzalez-Reyes J.A., Ortega J.M., Mauricio JC. 2006, A new immobilization method and their applications. *Enzyme Microb. Tech.* 40, 79-84.
7. Poncelet, D., Lencki R., Beaulieu C., Hallé J.P., Neufeld R.J., Fournier A.1992. Production of Alginate Beads by Emulsification/Internal Gelation: I Methodology. *Appl. Microbiol. Biot.* 38, 39-45.
8. Tuszyński T., 2008. Immobilizacja drobnoustrojów. Możliwości ich przemysłowego wykorzystania. *Laboratorium* 10, 34 – 38.
9. Verstrepen K.J., Klis F.M. 2006. Flocculation, adhesion and biofilm formation in Yeasts. *Mol. Microbiol.* 60 (1), 5–15.
10. Woodward J. 1988. Methods of immobilization of microbial cells. *J. Microbiol. Meth.* 8 (1-2), 91-102.
11. Nag A., Han K., Singh H. 2011. Microencapsulation of probiotic bacteria using pH-induced gelation of sodiumcaseinate and gellan gum, *Int. Dairy J.* 21, 247-253.
12. Burgain J., Gaiani C., Linder M., Scher J. 2011. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications, *J. Food Eng.* 104, 467–483.
13. Annan N.T., Borza A.D., Hansen L.T. 2008. Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. *Food Res. Int.* 41, 184–193.
14. Sohail A., Turner M.S., Coombes A., Bostrom T., Bhandari B. 2011. Survivability of probiotics encapsulated in alginate gel microbeads using a novel impinging aerosols method. *Int. J. Food Microbiol.* 2011, 145, 162-168.
15. Sohail A., Turner M.S, Coombes A., Bhandari Bhesh, 2012. The Viability of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus acidophilus* NCFM Following Double Encapsulation in Alginate and Maltodextrin. *Food Bioprocess Technol.* 6 (10), 2763-2769.
16. Mitropoulou G., Nedovic V., Goyal A., Kourkoutas Y. 2013. Immobilization Technologies in Probiotic Food Production, *J. Nutr. Met.* 10, 1-15.

## Przebieg ćwiczenia nr 2

**1. Cel:** Celem ćwiczenia jest kapsułkowanie drożdży za pomocą metod koekstruzji i ekstruzji oraz porównanie ilości wyprodukowanego przez drożdże etanolu po 7 dniach ich inkubacji w soku jabłkowym (w temp. pokojowej).

### 2. Materiały i odczynniki:

- drożdże piekarskie,
- alginian sodu,
- chlorek wapnia,
- sok jabłkowy

### 3. Wykonanie ćwiczenia:

1. Przygotować 2x100 ml 2,5% roztworu chlorku wapnia w zlewce o pojemności 250 ml. Jedną zlewkę umieścić pod urządzeniem kapsułkującym metodą koekstruzji, drugą postawić na mieszadle magnetycznym;

#### KOEKSTRUZJA

2. Przygotować roztwór na otoczkę:

a) w zlewce umieścić 80 ml wody destylowanej, dodać (powoli!) 0,7 g alginianu sodu. Podczas dodawania alginianu należy użyć mieszadło magnetyczne oraz sitko, aby uniknąć powstawania grudek - mieszać do całkowitego rozpuszczenia. Przygotowany roztwór wlać do cylindra z napisem „otoczka” w urządzeniu kapsułkującym.

3. Przygotować roztwór na rdzeń:

a) w zlewce o pojemności 100 ml umieścić 40 ml wody destylowanej, dodać (powoli!) 0,5g alginianu sodu. Podczas dodawania alginianu należy użyć mieszadło magnetyczne oraz sitko, aby uniknąć powstawania grudek - mieszać do całkowitego rozpuszczenia.

b) do uzyskanego roztworu dodać 10 g pokruszonych drożdży piekarskich i mieszać do uzyskania jednorodnej zawiesiny. Zawiesinę drożdży należy wlać do cylindra z napisem „rdzeń”.

4. Aby otrzymać złożę kulkowe należy zwolnić zawory cylindrów i dobrać odpowiednio prędkość wypływu tak, aby zawiesina drożdży została zamknięta wewnątrz otoczki (w razie potrzeby poproś prowadzącego o pomoc w obsłudze urządzenia).

#### EKSTRUZJA

5. Przygotować roztwór alginianu do ekstruzji:

a) w zlewce umieścić 80 ml wody destylowanej, dodać (powoli!) 0,7 g alginianu sodu. Podczas dodawania alginianu należy użyć mieszadło magnetyczne oraz sitko, aby uniknąć powstawania grudek - mieszać do całkowitego rozpuszczenia.

b) do uzyskanego roztworu dodać 10 g pokruszonych drożdży piekarskich i mieszać do uzyskania jednorodnej zawiesiny.

6. Immobilizowane za pomocą ekstruzji oraz koekstruzji drożdże kondycjonować (sieciować) w zlewkach z roztworem chlorku wapnia przez 15 minut (licząc od ostatniej utworzonej kulki). Po tym czasie odsączyć złożę kulkowe na sitku i przemyć kilkakrotnie wodą destylowaną.

7. Przygotować dwie kolby. Do każdej dodać 200 ml soku jabłkowego. Immobilizowane drożdże w kapsułkach przelać przez sitko i dodać do pierwszej kolby. Do drugiej kolby dodać drożdże immobilizowane za pomocą koekstruzji.

8. Zmierzyć pH świeżego soku.

9. Prowadzić hodowlę stacjonarną przez 7 dni w temperaturze pokojowej.

#### 4. Miareczkowanie

1. Przygotować 6 kolbek. Do dwóch dodać 10 ml świeżego soku, do kolejnych dwóch 10 ml soku po 7 dniach z drożdżami immobilizowanymi za pomocą ekstruzji i do dwóch ostatnich kolbek dodać soku z drożdżami immobilizowanymi za pomocą koekstruzji
2. Do każdej kolbki dodać 10 ml wody destylowanej i kilka kropli fenoloftaleiny.

Zawartość kolb miareczkować 0,1M roztworem NaOH lub KOH.

Obliczyć ogólną kwasowość:

gdzie:

- a- Ilość zużytego do miareczkowania NaOH w  $\text{cm}^3$  lub KOH
- b- Stężenie molowe NaOH lub KOH
- c- Objętość wina nie rozcieńczonego wodą pobrana do miareczkowania

$$\% \text{ kwasu winnego} = \frac{a \cdot b \cdot 7,5}{c}$$

$$\% \text{ kwasu octowego} = \frac{a \cdot b \cdot 6,0}{c}$$

# KARTA PRACY ĆWICZENIE NR 1

Grupa .....

Imię i nazwisko:

1. ....
2. ....
3. ....
4. ....

	Świeży sok	Sok po 7 dniach z drożdżami immobilizowanymi za pomocą ekstruzji	Sok po 7 dniach z drożdżami immobilizowanymi za pomocą koekstruzji
pH			
% kwasu winnego			
% kwasu octowego			

*Obliczenia:*