

Tadeusz Miśkiewicz

Instytut Technologii Przemysłu Chemicznego

i Spożywczego

Akademia Ekonomiczna,

Wrocław

Osiągnięcia i perspektywy w zakresie kontroli procesów fermentacyjnych

Rozwój badań nad procesami fermentacyjnymi uzależniony jest od postępów między innymi w następujących zagadnieniach:

- konstrukcji nowych czujników i urządzeń pomiarowych,
- automatyzacji, komputeryzacji i sterowania,
- optymalizacji.

Zdobycze w pierwszej grupie mają znaczący wpływ na osiągnięcia w obu pozostałych. W związku z tym warto zapoznać się bliżej z aktualnym stanem i przyszłością czujników oraz urządzeń pomiarowych, które spełniać powinny liczne wymagania. Najważniejsze z nich to: bezpośredni kontakt czujnika ze środowiskiem fermentacyjnym, jego selektywność, precyzja i ciągłość pomiaru, odporność na sterylizację termiczną, trwałość i duża powtarzalność wyników pomiaru, a także krótki czas odpowiedzi. Spełnienie wszystkich warunków jest bardzo trudne i inspiruje do nieustannego doskonalenia rozwiązań oferowanych biotechnologom.

Parametry, których pomiar ma istotne znaczenie dla kontroli procesów fermentacyjnych można podzielić na:

- fizyczne, do których zalicza się: temperaturę, ciśnienie, szybkość obrotów mieszadła, szybkość przepływu gazów i cieczy, objętość, ciężar i poziom roztworu fermentacyjnego oraz poziom piany,
- chemiczne, charakteryzujące warunki środowiskowe, pH, rH, siła jonowa, skład gazów odlotowych, stężenie rozpuszczonego tlenu i dwutlenku węgla, stężenie źródła węgla, azotu i innych składników roztworów fermentacyjnych oraz
- biologiczne, ściśle związane z drobnoustrojami, a wśród nich: koncentracja biomasy, stężenie NAD/NADH, zawartość RNA/DNA, białka, węglowodanów i innych składników komórki.

1. Parametry fizyczne

a) temperatura

Do pomiaru temperatury powszechnie stosowany jest platynowy czujnik rezystancyjny, rzadziej używa się czujników półprzewodnikowych (termistorów). Bardzo dokładny pomiar zapewnia termometr kwarcowy 511 E, produkowany przez Instytut

Tele- i Radiotechniczny w Warszawie. Jego zakres pomiarowy wynosi od 213 do 473 K, a rozdzielczość 0.0001 K przy czasie przetwarzania równym 10 s. Wymienione czujniki zapewniają sygnał elektryczny i mogą być wyjąławiane termicznie.

b) ciśnienie

Najczęściej stosowanymi urządzeniami do pomiaru ciśnienia są diafragmy z przetwornikami elektrycznymi. Zakres pomiarowy tych mierników wynosi od 0 do 16 000 N/m², a czas odpowiedzi 100 ms (61).

c) szybkość obrotów mieszadła

Spośród licznych rozwiązań poleca się czujniki optyczne i magnetyczne, które połączone z odpowiednim przetwornikiem dają sygnał elektryczny. Mocuje się je na obudowie bioreaktora, a dokładność pomiaru wynosi 2% całej skali.

d) szybkość przepływu gazów

W powszechnym użyciu są rotametry, jednak ich poważną wadą jest brak sygnału elektrycznego. Nowością na krajowym rynku jest stałotemperaturowy anemometr PAL'87, opracowany w Instytucie Mechaniki Górotworu PAN w Krakowie. Umożliwia on ciągły pomiar prędkości powietrza w przedziale od 0.1 do 30 m/s. Wyposażony jest w automatyczną kompensację wpływu zmian temperatury od 273 do 333 K.

e) szybkość przepływu cieczy

Parametr ten ważny jest w procesach okresowych, gdzie szybkość dopływu pożywki zmienia się w czasie (procesy fed-batch). Do pomiaru dużych szybkości przepływu (skala przemysłowa) stosowane są przepływomierze elektromagnetyczne. Ich dokładność zależy od własności reologicznych cieczy. Z tego powodu są one produkowane z przeznaczeniem do pomiaru szybkości przepływu ściśle określonego rodzaju cieczy, na przykład roztworu melasy. Do pomiaru małych szybkości przepływu (skala laboratoryjna i półtechniczna) używa się rotametrów i różnego typu pomp, tłoczących zgodnie z nastawioną masową lub objętościową szybkością przepływu. W przypadku pomp perystaltycznych sterylizuje się tylko przewody tłoczące, stosowanie natomiast pomp dozujących wymaga wyjąławiania także całego zespołu tłoczącego. Zaletą pomp jest możliwość ich włączenia w układy automatycznej regulacji.

f) objętość, poziom i ciężar roztworu fermentacyjnego

Objętość roztworu fermentacyjnego można obliczyć drogą pomiaru jego poziomu lub ciężaru w reaktorze. Do określania poziomu w małej skali służą czujniki pojemnościowe (61) oraz pływające fotoczuJNIKI (2). Dokładność pomiaru czujników pojemnościowych wynosi 2 do 4%. Ciężar odczytuje się za pomocą wag elektronicznych z automatycznym tarowaniem. Są bardzo dokładne, ale wrażliwe na wstrząsy, drgania i wibracje oraz drogie. Błąd pomiaru nie przekracza 1 do 2%.

g) poziom piany

Do kontroli poziomu piany służą czujniki przewodnościowe. Sygnał elektryczny pojawia się w momencie przekroczenia przez podnoszącą się pianę określonego poziomu i powoduje wdozowanie substancji gaszącej lub uruchamia mechaniczny system jej łamania. Jednym z producentów urządzeń do automatycznej kontroli i

regulacji poziomu piany jest Instytut Technologii Przemysłu Chemicznego i Spożywczego Akademii Ekonomicznej we Wrocławiu.

2. Parametry chemiczne

Warunki środowiskowe odgrywają decydującą rolę w przebiegu procesów fermentacyjnych. Możliwie dokładna charakterystyka środowiska fermentacyjnego jest zatem szczególnie ważna z punktu widzenia kontroli procesu.

a) pH

Jest to standardowy parametr w procesach fermentacyjnych, a do jego pomiaru stosuje się najczęściej czujniki kombinowane, obejmujące elektrodę szklaną jako wskaźnikową i chlorosrebrową jako porównawczą. Pomiar pH można wykorzystać do sterowania dopływem pożywki (6,17).

b) rH

Podobnie jak pH, jest to parametr rutynowy. Mierzy się go za pomocą ogniwa składającego się z elektrody platynowej jako wskaźnikowej i chlorosrebrowej lub kalomelowej jako porównawczej. Ponieważ na wynik pomiaru rH mają wpływ wszystkie składniki roztworu fermentacyjnego zdolne do utleniania lub redukcji, stąd jest on mało selektywny, a wynik pomiaru bardzo trudny do interpretacji. Mimo tych zastrzeżeń zmiany rH stosowano do sterowania dopływem pożywki (26,33).

c) siła jonowa

Do ciągłego pomiaru siły joniowej stosuje się dzwonne elektrody platynowe mierzące przewodnictwo roztworów fermentacyjnych, jednak pomiar ten jest, podobnie jak rH, mało selektywny i bardzo trudny do wyjaśnienia.

d) skład gazów odlotowych

Znajomość składu gazów odlotowych informuje nie tylko o typie przemiany materii drobnoustrojów, ale może być z powodzeniem wykorzystana także do sterowania dopływem pożywki. Jeśli na przykład w hodowli drożdży piekarskich wartość współczynnika oddechowego ($RQ = \text{szybkość wydzielania } CO_2 / \text{szybkość pobierania } O_2$) przekracza 1, to oznacza, że dominuje beztlenowa przemiana węglowodanów. Metabolizmowi tlenowemu odpowiada natomiast $RQ = 1$. Tę cechę RQ , zależną od rodzaju metabolizmu drożdży piekarskich, wykorzystuje się już od dawna do sterowania dopływem pożywki (1,68). Do pomiaru zawartości tlenu w gazach pofermentacyjnych stosuje się analizatory paramagnetyczne, na przykład PERMOLYT produkcji NRD. Stężenie CO_2 oznacza się natomiast analizatorami pracującymi w podczerwieni, na przykład INFRALYTEM, także produkcji NRD.

Jakościowy przełom w oznaczaniu składu gazów odlotowych nastąpił z chwilą wprowadzenia spektrometrów masowych. Urządzenia te znalazły zastosowanie do ciągłego i bezpośredniego oznaczania składu gazów. Dodatkowy podciśnieniowy próbnik, wyposażony w niewrażliwą na sterylizację termiczną, półprzepuszczalną membranę, rozszerza ich użycie do oznaczania składników lotnych, rozpuszczonych w roztworach fermentacyjnych. Opublikowane dotychczas prace, w których stosowano spektrometry masowe (20,21,22,23,55), zapowiadają wielką przyszłość tych urządzeń. Spełniają one bowiem wiele wymagań stawianych systemom kontrolnym

procesów fermentacyjnych. Wśród najważniejszych zalet są: czułość, wynosząca 10^{-5} mola, czas odpowiedzi krótszy od minuty oraz liniowa zależność wskazań w funkcji stężenia badanego składnika w zakresie stężeń od 10^{-5} do 10^{-1} mola. Ulepszenia wymaga membrana, ponieważ szybkość przenikania przez nią niektórych lotnych substancji rozpuszczonych w roztworze fermentacyjnym jest bardzo mała, co wydłuża czas analizy do kilku minut.

e) stężenie rozpuszczonego tlenu i dwutlenku węgla

Obecność tlenu w roztworach fermentacyjnych jest często niezbędna lub całkowicie niepożądana. W obydwu przypadkach konieczne staje się oznaczanie stężenia tlenu rozpuszczonego, gdyż tylko w tej formie jest on przyswajany przez drobnoustroje. Czujniki do oznaczania tego parametru można podzielić na dwie grupy: potencjometryczne i amperometryczne (polarograficzne lub typu Clarka). Z wyjątkiem metody polarograficznej właściwie mierzą one ciśnienie cząstkowe tlenu w roztworze. Jeśli wziąć pod uwagę zmieniającą się rozpuszczalność tlenu w roztworze fermentacyjnym zależnie od jego składu chemicznego oraz zmienną w czasie charakterystykę czujnika tlenowego, to ilościowa interpretacja jego wskazań staje się bardzo problematyczna. Na ogół wskazania te informują jedynie o warunkach tlenowych w bioreaktorze. Nie przeszkadza to jednak w ich wykorzystaniu do sterowania dopływem pożywki (25,27,47).

W przyszłości konkurencyjne mogą okazać się spektrometry masowe oraz czujniki fluorometryczne (50), które nie zużywają tlenu w czasie pomiaru i są trwalsze mechanicznie od czujników stosowanych dotychczas (40).

Oznaczanie CO_2 rozpuszczonego w roztworze fermentacyjnym nie jest tak powszechne jak rozpuszczonego tlenu, ale ważne w procesach ściśle beztlenowych. Wiadomo przecież, że nadmierne stężenie CO_2 hamuje przemianę materii drobnoustrojów. Obserwuje się nawet stany przesylenia CO_2 w roztworach fermentacyjnych (4). Zasada działania tych czujników polega na przenikaniu CO_2 , a ściślej jonów HCO_3^- , przez membranę do roztworu Na_2CO_3 zmieniając jego pH. Zmiana ta jest następnie rejestrowana czujnikiem pH. Wady czujników CO_2 są zbieżne z wcześniej przedstawionymi elektrodami tlenowymi i należy spodziewać się nowych rozwiązań w tym zakresie. Na przykład można tu z powodzeniem zastosować spektrometry masowe (55).

f) stężenie źródła węgla, azotu i innych składników roztworu fermentacyjnego

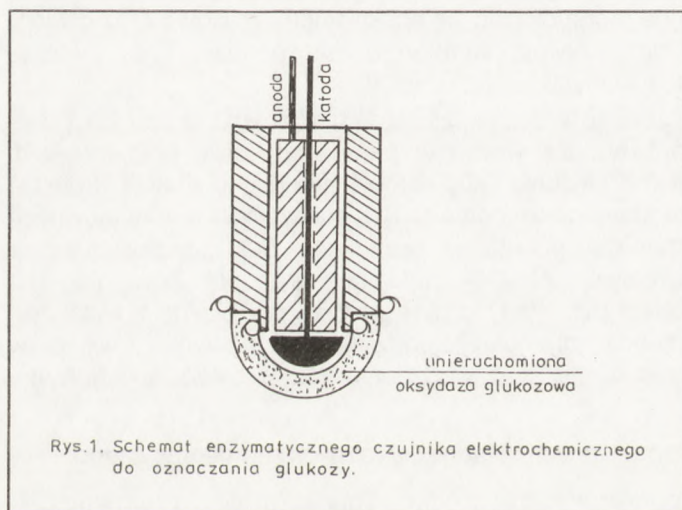
Dokładny i bezpośredni pomiar stężenia źródła węgla w roztworze fermentacyjnym jest wciąż problemem trudnym do rozwiązania. Z konieczności więc stosuje się metody pośrednie. Pobiera się próbę z bioreaktora i dokonuje oznaczenia jedną ze znanych metod. Rozwój tych sposobów zmierza do automatyzacji pobierania prób, przeprowadzenia analizy i przekazywania wyników pomiaru do centralnego systemu zbierania danych. Przykładem może być wykorzystanie wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej do oznaczania zawartości etanolu w roztworze fermentacyjnym *Candida norvegensis* i sterowaniu jego dopływem do bioreaktora (45). Stosowane są także chromatografy gazowe (52), automatyczne analizatory sprzężone z automatycznymi próbnikami (16) i inne rozwiązania. Ich wadą jest długi czas analizy, dochodzący często do 15 minut. Nie przeszkadza to w procesach okresowych (batch) i ciągłych,

ale jest nie do przyjęcia w układach z nadążną regulacją dopływu źródła węgla (procesy fed-batch).

Trudne jest nie tylko bezpośrednio oznaczanie zawartości źródeł węgla, ale i pozostałych składników roztworów fermentacyjnych. Tu także dominują metody pośrednie. Własności reologiczne, zabarwienie, obecność składników przeszkadzających, pH i wiele innych cech utrudniają opracowanie szybkich, selektywnych i precyzyjnych metod analitycznych.

Jedną z dróg przezwyciężenia tych trudności jest konstruowanie czujników, w których wykorzystuje się enzymy (49) i całe komórki drobnoustrojów (36). Wśród metod analitycznych robią one błyskawiczną karierę, wypierając sposoby tradycyjne. Wynika to z ich wysokiej selektywności bez względu na cechy fizyczne, a także oznaczania składników występujących w zakresie stężeń typowych dla procesów fermentacyjnych, a więc od nmoli/dm^3 do mmoli/dm^3 . Ponadto tak można dobrać i spreparować enzymy, czy całe komórki drobnoustrojów, by w połączeniu z czujnikiem elektrochemicznym dawały elektrodę, której sygnał elektryczny będzie proporcjonalny do stężenia badanego składnika. Są wreszcie łatwe do sporządzenia we własnym zakresie.

Zasady działania dwóch różnych czujników enzymatycznych do oznaczania glukozy przedstawiono schematycznie na rys. 1 i 2.



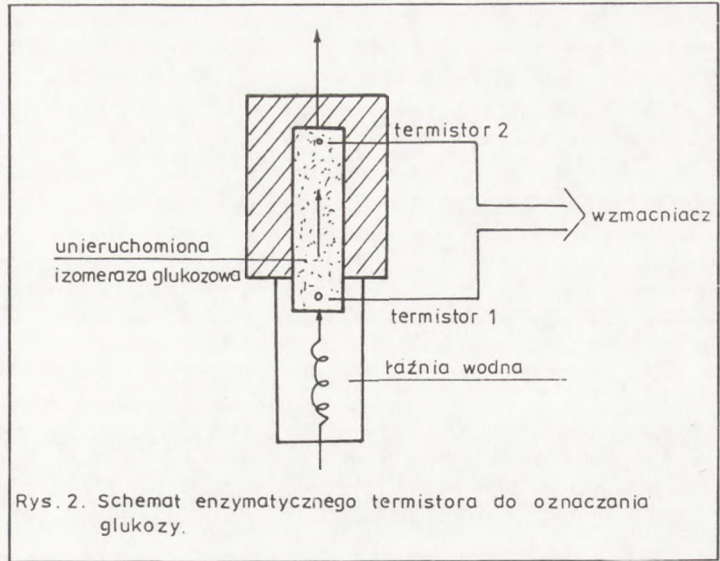
W pierwszym przypadku unieruchomiona oksydaza glukozowa katalizuje utlenianie glukozy do kwasu glukonowego z wydzielaniem nadtlenu wodoru, który jest następnie oznaczany ilościowo za pomocą czujnika tlenowego.

(rysunek 2. na stronie 37)

Możliwość wykorzystania enzymów do konstrukcji czujników biologicznych różniących się sposobem pomiarów jest oczywiście znacznie więcej.

Mogą to być enzymatyczne spektrometry masowe, enzymatyczne spektrofotometry, enzymatyczne tranzystory i inne (14). Prace nad doskonaleniem czujników biologicznych wciąż trwają. Zmierzają one w kierunku konstrukcji czujników mogących znaleźć zastosowanie do ciągłego i bezpośredniego pomiaru. Jedną z trudności, jaką należy pokonać, jest otrzymanie membran odpornych na sterylizację termiczną i umożliwiających kalibrowanie czujników biologicznych bezpośrednio w bioreaktorze.

W drugim rozwiązaniu wykorzystuje się pomiar ilości ciepła wytworzonego w procesie izometryzacji glukozy przez unieruchomioną izomazę glukozy.



Przepuszczalność przyszłościowych błon nie powinna zależeć od starzenia i zatykania w takim stopniu jak obecnie. Sygnalizowane są próby stosowania membran dializacyjnych (11,44) i niewrażliwych na działanie wysokiej temperatury (10). Praktykowane zazwyczaj półgodzinne działanie temperatury 403 K (sterylizacja) nieodwracalnie inaktywuje enzymy. Podejmowane są w związku z tym wielokierunkowe badania nad poprawą ich termostabilności. Polegają one na stosowaniu enzymów pochodzących z drobnoustrojów termofilnych, aktywnych w temperaturach przekraczających 358 K. Niektóre bakterie rodzaju *Bacillus*, *Thermomicrobium* czy *Thermus* dobrze rozwijają się bowiem w takich warunkach, a rodzaj *Pyrodictum* wykazuje żywotność nawet w temperaturze równej 313 K (59).

Obiecującym kierunkiem jest modyfikacja technik unieruchamiania enzymów prowadząca do podwyższenia ich termostabilności (34,35). Być może także i syntetyczne polimery, będące analogami enzymów (69), przybliżą możliwość stosowania czujników biologicznych do bezpośredniej kontroli procesów fermentacyjnych.

Równolegle rozwijane są prace nad czujnikami jonoselektywnymi. Z literatury firmy ORION, znanego producenta tych czujników wynika, że dysponuje ona już kilkudziesięcioma ich modelami. Rośnie także zainteresowanie wykorzystaniem tych czujników do kontroli i sterowania procesami fermentacyjnymi (31). Jako przykłady mogą posłużyć prace nad oznaczaniem i sterowaniem stężenia azotu amonowego w hodowli drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (24,37) i bakterii *Escherichia coli* (38,60). Podobne badania przeprowadzono z azotanami w procesie wzrostu *Corynebacterium glutanicum* (39) i wpływem cynku na przyrost biomasy *Saccharomyces cerevisiae* (62).

Szersze wykorzystanie czujników jonoselektywnych do kontroli procesów fermentacyjnych wymaga rozwiązania wielu problemów. Należy poprawić ich wybiórczość w obecności jonów przeszkadzających, dostosować zakres pH, w których one pracują, do warunków typowych w bioreaktorach, jak również opracować konstrukcje dające

się sterylizować termicznie.

Stwierdzona w 1954 r. zależność między elektrycznymi właściwościami półprzewodników bazujących na tlenkach metali i stężeniem gazów (19) zaowocowała opracowaniem czujników do ilościowego oznaczania substancji lotnych: alkoholi, estrów, ketonów itp. Ilustracją tej techniki analitycznej może być czujnik do ciągłego oznaczania zawartości etanolu w zakresie od 0.1 do 6% objętościowych (32). Jego konstrukcyjną nowinką była membrana silikonowa pozwalająca na bezpośredni pomiar etanolu w roztworze fermentacyjnym. Podobny czujnik wykorzystano do kontrolowania ciągłej biosyntezy etanolu trwającej dwa miesiące (66) oraz w mikrokomputerowym systemie sterowania dopływem melasy w hodowli drożdży piekarskich oferowanym przez firmę ARGE Biotechnologie.

Przyszłościową metodą kompleksowej analizy składu roztworu fermentacyjnego jest spektroskopia w podczerwieni z przekształcaniem wyników za pomocą szybkich transformacji Fouriera. Możliwości tej metody pokazano na przykładzie jednoczesnego oznaczania stężenia glukozy, etanolu i gliceryny w czasie hodowli drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (2). Analizę zawartości substratu (glukozy) i produktów (etanolu i gliceryny) prowadzono w obecności wszystkich pozostałych składników włącznie z komórkami drożdży. Okazało się, że na wynik nie miała istotnego wpływu ani obecność 26 składników podłoża ani niewielka ilość biomasy. Błąd względny oznaczenia wynosił od kilku do kilkudziesięciu procent. Dalsze prace nad skróceniem czasu analizy oraz doskonaleniem statystycznej obróbki danych zapewni, zdaniem autorów, wielką przyszłość tej metodzie.

3. Parametry biologiczne

Coraz więcej uwagi będzie się poświęcać ciągłej analizie materiału biologicznego w procesach fermentacyjnych. Wynika to zarówno z potrzeb poznawczych jak i praktycznych. Stale wzrasta zapotrzebowanie na produkty metabolizmu wtórnego, którego genetycznych jak i środowiskowych uwarunkowań ciągle w pełni nie znamy. Jeszcze więcej białych plam widnieje na mapach przemiany materii komórek zmodyfikowanych genetycznie. Także konieczność automatyzacji procesów fermentacyjnych, i wiele innych czynników, decyduje o potrzebie śledzenia tych procesów na poziomie komórki. Tu bowiem można otrzymać najszybciej wiarygodne informacje o ich przebiegu i następnie stosownie sterować warunkami środowiskowymi.

a) stężenie biomasy

Jest to podstawowy parametr większości procesów fermentacyjnych – i to zarówno w produkcji metabolitów pierwotnych jak i wtórnych, ważny już od momentu inokulacji. Stanowi podstawę sterowania procesem, a także jego modelowania.

Istotne znaczenie stężenia biomasy wymaga precyzyjnych i szybkich metod jego oznaczania. Dotychczasowa praktyka wykazuje, że opracowanie techniki spełniającej te postulaty jest bardzo trudne. Odmiennie cechy fizyczne i chemiczne strzępeków grzybni, komórek drożdży czy bakterii, inna wielkość, kształt i skład chemiczny komórek tych samych drobnoustrojów w zależności od stanu fizjologicznego czy wieku, różne warunki środowiskowe itd., utrudniają znalezienie uniwersalnej metody. Istnieje w związku z tym szereg sposobów mających specyficzne zastosowanie. Najbardziej popularne są metody optyczne: spektrofotometryczne i nefelometryczne.

Wykorzystano je w konstrukcji czujnika biomasy odpornego na sterylizację termiczną (51) oraz urządzeń do ciągłego pomiaru i regulacji koncentracji biomasy (63,71). Jednak możliwości pomiarowe tych rozwiązań sięgają tylko granicy 5 do 10 gsm/dm³. Dwukrotnie wyższe stężenie biomasy można oznaczyć czujnikiem fluorometrycznym (5), mierzącym zawartość dinukleotydu nikotynaminoadeninowego (NADH) w komórkach. Pamiętaj jednak należy, że przyjęte w tej zasadzie pomiaru założenie stałej zawartości NADH w komórkach drożdży w praktyce nigdy nie jest spełnione.

Jeszcze inny sposób polega na ciągłym liczeniu pojedynczych komórek przez urządzenie zwane Coulterem (41). Zawodzi on jednak, gdy roztwór jest zabarwiony lub gdy znajdują się w nim nierozpuszczone, stałe składniki.

Bezpośrednie metody pomiaru koncentracji komórek ustępują pośrednim, w których parametr ten jest estymowany za pomocą komputera na podstawie zestawionego w sposób ciągły bilansu materiałowego (12,70). Całkowita automatyzacja pomiaru i dokładne, szybkie wyniki wyróżniają te metody wśród dotychczas opracowanych.

b) poziom NAD/NADH

Wiele substancji organicznych fluoryzuje w konsekwencji wzbudzenia światłem widzialnym lub leżącym blisko zakresu ultrafioletu. Zjawisko to coraz powszechniej wykorzystywane jest w biotechnologii do ilościowego oznaczania związków organicznych (57).

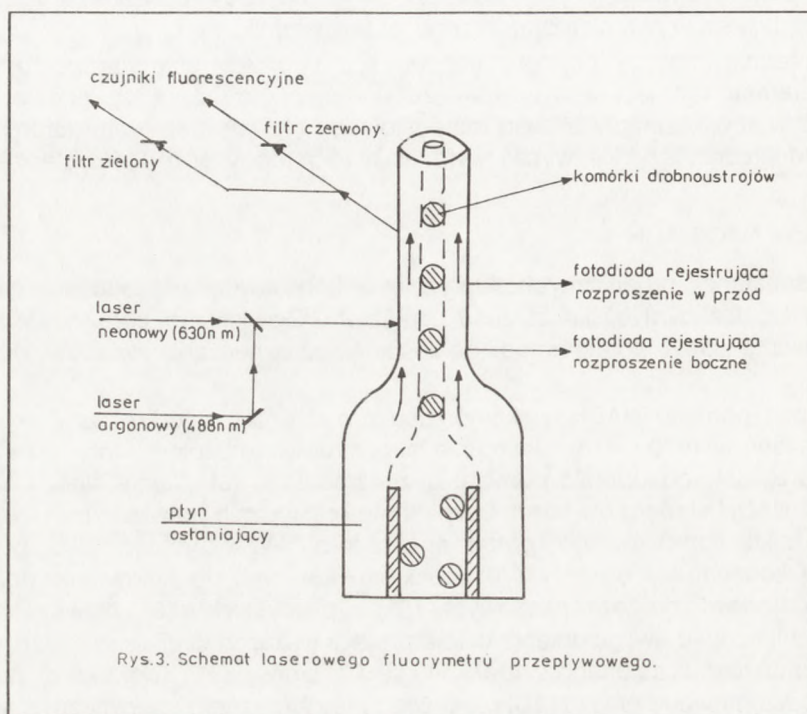
Możliwość pomiaru NADH w komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae* tą drogą pokazano w 1970 r. (18). Następnie, skonstruowano czujnik, który umieszczony w fermentorze dał sposobność pomiaru bezpośredniego (5). Ciągłe śledzenie zmian w poziomie NADH stało się otworem. Dzięki temu praktycznie potwierdzono rolę NADH jako wskaźnika komórkowego potencjału redoks. Wykorzystano jako podstawę oznaczania koncentracji drożdży (70) i bakterii (43) oraz do sterowania dopływem pożywki w hodowli drożdży paszowych (53) i piekarskich (46). Nowsze badania sugerują konieczność uwzględnienia w interpretacji wskazań czujników NADH wpływu stężenia tlenu rozpuszczonego, źródła węgla i biomasy (3). Komórkowy potencjał redoks, reprezentowany przez NADH, ma więc podobnie mało specyficzny charakter, jak środowiskowy. Jest to istotne z punktu widzenia wykorzystania NADH w układach sterowania dopływem pożywki i przy optymalizacji procesów fermentacyjnych. Dostępność czujników NADH na rynkach zachodnich sprawia, że stają się one standardowym wyposażeniem bioreaktorów.

c) zawartość ATP/ADP/AMP

W odróżnieniu od NADH ciągły pomiar zawartości adenosynotrifosforanu w komórkach drobnoustrojów nie jest jeszcze możliwy. Dokonuje się tego w sposób pośredni wykorzystując zjawisko bioluminescencji (29). W procedurze oznaczania ATP istotną rolę odgrywa sposób pobierania próby wymagający błyskawicznego zahamowania zmian w zawartości ATP. Wykazano bowiem, że cała ilość zgromadzonego ATP jest zużywana przez komórkę w ciągu jednej sekundy, jeśli nie jest on jednocześnie odzyskiwany (9,15). Obok oznaczenia ATP istnieje możliwość pośredniego pomiaru adenosynodifosforanu i adenosynomonofosforanu (28,56).

d) inne składniki komórki

Konstrukcja laserowego fluorymetru przepływowego spowodowała wielki postęp w analizie komórek drobnoustrojów. Urządzenie, którego cena sięga od 100 000 do 200 000 dolarów (58), zapewnia ciągłą, niesłychanie precyzyjną analizę pojedynczych komórek z szybkością dochodzącą do 10 000 komórek na sekundę. Umożliwia jednoczesny optyczny pomiar wielkości komórek, ilość rozproszonego i zaabsorbowanego światła oraz ich fluorescencję. Zasadę jego działania przedstawiono schematycznie na rys. 3 (54).



Komórki są hydrodynamicznie kierowane do kapilary i ustawiane w kolejności jedna za drugą. Prostopadle do przepływającego strumienia uszeregowanych komórek pada wiązka promieni laserowych, której średnica może być regulowana. Musi być jednak ona mniejsza od średnicy analizowanych komórek. Wielkość ich powinna zawierać się w przedziale od 2 do 200 mikrometrów. Zaabsorbowane i rozproszone światło jest rejestrowane przez fotodiody. W zależności od składnika komórki, jaki ma być oznaczony, na przykład DNA, RNA, białko itd., komórki barwi się odpowiednim barwnikiem fluorescencyjnym przed wprowadzeniem do fluorymetru. Te z kolei są wzbudzone promieniami laserowymi i fluoryzują. Fluorescencja jest rozszczepiana na wiązkę czerwoną i zieloną, które rejestrowane są oddzielnymi fotodiodami.

Możliwości tej techniki analitycznej są rzęgle (54). Pozwala ona szacować rozkład populacji drobnoustrojów według wielkości i wieku, wykrywać i ustalać rozmiary zakażeń, czy precyzyjnie oznaczać chemiczny skład komórek. Jej zastosowanie

wykracza oczywiście poza procesy fermentacyjne (13) i ma ogromne perspektywy.

Dokonany przegląd metod kontroli procesów fermentacyjnych nie wyczerpuje całego problemu, któremu poświęca się sporo miejsca w literaturze naukowej (7,42,48,61,67). Celem opracowania było zapoznanie z metodami stosowanymi dzisiaj i zarysowania wizji ich przyszłości, w której dominować będą doskonalsze wersje niektórych opisanych metod i zupełnie nowe, jeszcze dzisiaj nie znane. Cechować je będzie wielofunkcyjność i przesyłanie wielkiej ilości danych, przetwarzanie których będzie możliwe tylko za pomocą ultraszybkich techniki cyfrowej.

Literatura

1. Aiba S., Nagai S., Nishizawa.,(1976), *Biotechnol. Bioeng.*, 18, 1001.
2. Alberti J.C., Philips J.A., Fink D.J., Masasz S.M., (1985), *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, 15, 659.
3. Arminger W.B., Forro J.F., Montalvo L.M., Lee J.F., Zabriskie D.W., (1986), *Chem. Eng. Commun.*, 45, 197.
4. Barford J.P., Hall R.J., (1979), *Biotechnol. Bioeng.*, 21, 609.
5. Beyeler W., Einsele A., Fiechter A., (1981), *Eur. J. Appl. Mikrobiotechnol.*, 13, 10.
6. Buettner R., Uebel B., Genz I., (1986) *Acta Biotechnol.*, 6, 129.
7. Bull D.N., (1983), in: *Ann. Rep. Ferment. Processes.*, 6, Academic Press, Inc., chap. 13.
8. Carleysmith S.W., Fox R.I., (1984), *Adv. Biotechnol. Processes.*, 3, 1.
9. Chapman A.G., Atkinson D.E., (1977), *Adv. Microbiol. Physiol.*, 15, 253.
10. Chotani G., Constantinides A., (1982), *Biotechnol. Bioeng.*, 24, 2743.
11. Cleland N., Enfors S.O., (1986), *Anal. Chim.*, 56, 1880.
12. Cooney C.L. Wang H.Y., Wang D.I.C., (1977), *Biotechnol. Bioeng.*, 19, 55.
13. Damjanovich S., Gaspar R., Tron L., Aszalos A., (1985), *Am. Biotechnol.*, 3, 11.
14. Danielsson B., Mosbach K., (1982), in: *Comp. Appl. rd Ferment. Technol.*, 3 Int. Conf. on Comp. Appl. Ferment. Technol., Society of Chemical Industry, London, 137.
15. Fleischaker R.J., Weaver J.C., Sinskey A., (1981), in: *Adv. Appl. Microbiol.*, 27, Perlman D., Ed., Academic Press, New York, 137.
16. Ghou M., Ronat E., Engasser J.M., (1986), *Biotechnol. Bioeng.*, 28, 119.
17. Glenn A.M., Hempling W.P., (1976), *Arch. Microbiol.*, 107, 41.
18. Harrison D.E.F., Chance B., (1970), *Appl. Microbiol.*, 19, 446.
19. Heiland G., (1954), *Physik*, 138, 459.
20. Heinzle E., Furukawa K., Dunn I.J., Bourne J.R. (1983), *Bio/Technology.*, 1, 181.
21. Heinzle E., Moes J., Griot M., Kramer H., Dunn I.J., Bourne J.R., (1984), *Anal. Chim. Acta.*, 163, 219.
22. Heinzle E., (1985), *World Biotech. Rep.*, 1, 719.
23. Heinzle E., Kramer H., Dunn I.J. (1985), *Biotechnol. Bioeng.*, 27, 238.

24. Hill F.F., Thommel J., (1982), *Process Biochem.*, 17, 16.
25. Hospodka J., (1966), *Biotechnol. Bioeng.*, 8, 117.
26. Huang S.Y. Wu C.S., (1974), *J. Ferment. Technol.*, 52, 818.
27. Huang S.Y. Chu W.B., (1981), *Biotechnol. Bioeng.*, 23, 1491.
28. Hysert D.W., Morrison N.M., (1977), *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 35, 160.
29. Hysert D.W., Knudsen F.B., Morrison N.M., von Gheluwe G., Lom T., (1979), *Biotechnol. Bioeng.*, 21, 1301.
30. Johnson A., (1986), in: *IFAC Proc. Ser. (10 Modell Control Biotechnol. Processes)*, 1.
31. Kell D.B., (1980), *Process Biochem.*, 15, 18.
32. Kempe E., Schallenberger W., (1983), *Process Biochem.*, 18, 7.
33. Kjaergaard L., Joergensen B.B., (1979), *Biotechnol. Bioeng.*, Symp. No. 9, 85.
34. Klibanov A.M., (1983), *Adv. Appl. Microbiol.*, 29, 1.
35. Klibanov A.M., (1983), *Science.*, 219, 722.
36. Kobos R.K., (1986), *Anal. Lett.*, 19, 353.
37. Kole M.M., Thompson B.G., Gerson D.F., (1985), *J. Ferment. Technol.*, 63, 121.
38. Kole M.M., Ward D., Gerson D.F., (1986), *J. Ferment. Technol.*, 64, 233.
39. Kole M.M., Thompson B.G., Gerson D.F., Senechal J., (1986), *Biotechnol. Bioeng.*, 28, 659.
40. Kroneis H.W., Marsoner H.J., (1983), *Sensors and Actuators.*, 3, 587.
41. Kubitschek H.E., (1969), in: *Methods Microb.*, 1, Norris J.R., Ribbons D.W., Eds., Academic Press, New York, chap. 17.
42. Lloyd A.K., (1983), *Labor. Pract.*, 32, 21.
43. Luong J.H.T., Carrier D.J., (1986), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 24, 65.
44. Mandenius C.F., Danielsson B., Mattiasson B., (1984), *Anal. Chim. Acta.*, 163, 135.
45. Mathers J.J., Dinwoodie R.C., Talarovich M., Mehnert D.W., (1986), *Biotechnol. Lett.*, 8, 311.
46. Meyer C., Beyeler W., (1984), *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 916.
47. Miśkiewicz T., Leśniak W., Ziobrowski J., (1975), *Biotechnol. Bioeng.*, 17, 1829.
48. Mou D.G., (1983), *Biotechnol. Adv.*, 1, 229.
49. Mullen W.H., Vadgama P.M., (1986), *J. Appl. Bacteriol.*, 61, 181.]
50. Murray R.C. Lefkowitz S.M., opis patentowy Eur. Patent Appl. EP 190829.
51. Ohashi M., Watabe T., Ishikawa T., Watanabe Y., Miwa K., Shoda M., Ishikawa N., Ando T., Shibata T., Kitsunai T., Kamiyama N., Oikawa Y., (1979), *Biotechnol. Bioeng. Symp. No. 9.*, 103.
52. Richardson B., Bubbitt T.F., Orcutt D.M., (1971), *Biotechnol. Bioeng.*, 13, 453.
53. Ristroph D.L., Watteeuw C.M., Arminger W.B., Humphrey A.E., (1977), *J. Ferment. Technol.*, 55, 599.

54. Scheper T., Gebauer A., Sauerbrei A., Niehoff A., Schugerl K., (1984), *Anal. Chim. Acta.*, 163, 111.
55. Schmidt W.J., Meyer H.D., Schugerl K., Kuhlmann W., Bellgardt K.H., (1984), *Anal. Chim. Acta*, 163, 102.
56. Schmiz K.L., Rutten B., Tretter M.,(1981), in: *Adv. Biotechnol.*, 1. 6th Int. Ferment. Symp., Moo-Young M., Robinson C.W., Vezina C., Eds., Pergamon Press, Toronto, 457.
57. Schneckenburger H., Reuter B.W., Schorbeth S.M., (1985), *Trends Biotechnol.*, 3, 275.
58. Schugerl K., Lorenz T., Lubbert A., Niehoff J., Scheper T., Schmidt W., (1986), *Trends Biotechnol.*, 4, 11.
59. Stetter K.O., (1985), *Naturwiss.*, 72, 291.
60. Suzuki T., Yasuda T., Yamane T., Shimizu S., (1986), *J. Ferment. Technol.*, 64, 63.
61. Tannen L.P., Nyiri L.K.,(1979), in: *Microb. Technol.*, second edytion, 2, Pepler H.J., Perlman D., Eds. Academic Press, New York, San Francisco, London, 331.
62. Thompson B.G., (1986), *Biotechnol. Bioeng.*, 28, 1884.
63. Tick S.J., opis patentowy USA nr 3766864.
64. Tworck J.V., Yacynych A.M., (1986), *Biotechnol. Progress.*, 2, 67.
65. Veres A., Nyeste L., Kurucz I., Kirchknopf L., Szigeti L., Hallo J., (1981), *Biotechnol. Bioeng.*, 23, 391.
66. Vorlop K.D., Becke J.W., Klein J., (1983), *Biotechnol. Lett.*, 5, 509.
67. Wang N.S., Stephanopoulos G.N.,(1984), in: *CRC Crit. Rev. Biotechnol.*, 2, CRC Press, Inc., 1.
68. Woehrer W., Hampel W., Roehr M., (1981), *Biotechnol. Bioeng.*, 23, 567.
69. Wulff G., Best W., Akelah A., (1984), *React. Polym. Ion Exch. Sorbents.*, 17, 16.
70. Zabriskie D., (1979), *Biotechnol. Bioeng. Symp. No.9*, 117.
71. Zweig G., Pipher R.E., Hitt J.E., opis patentowy USA, nr 3504175.