

7. Στοιχεία Θεωρίας

Α. Ορολογία

Βιοτεχνολογία:

♦ πρώτος ορισμός [Kark (Karl) Ereky, 1919]: η διαδικασία παραγωγής προϊόντων από ακατέργαστα υλικά με τη βοήθεια ζωντανών οργανισμών.

♦ σήμερα: ο συνδυασμός 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.

♦ με την ευρεία έννοια: η χρήση ζωντανών οργανισμών* προς όφελος του ανθρώπου.

* συμπεριλαμβάνονται μονοκύτταροι αλλά και πολυκύτταροι οργανισμοί.

Χρόνος διπλασιασμού: ο χρόνος που μεσολαβεί από το τέλος μίας κυτταρικής διαίρεσης του μικροοργανισμού μέχρι το τέλος της επόμενης της.

Βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης: η θερμοκρασία στην οποία, όταν αναπτύσσεται ένας μικροοργανισμός, παρουσιάζει το μεγαλύτερο ρυθμό ανάπτυξης, με την προϋπόθεση ότι όλες οι υπόλοιπες συνθήκες (pH, διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών, συγκέντρωση οξυγόνου) είναι οι καλύτερες δυνατές.

Θρεπτικά συστατικά: ουσίες οι οποίες είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη ενός μικροοργανισμού, επειδή τις χρησιμοποιεί είτε ως πηγές ενέργειας είτε για να προμηθευτεί χημικά στοιχεία απαραίτητα για την κατασκευή των δομικών συστατικών του (π.χ., άνθρακα, άζωτο).

Θρεπτικό υλικό: το υλικό που περιέχει διαλυμένα σε νερό όλα τα θρεπτικά συστατικά που απαιτούνται για την ανάπτυξη ενός μικροοργανισμού (πηγή αζώτου, πηγή άνθρακα, μεταλλικά ιόντα). Χρησιμοποιείται για την παρασκευή καλλιεργειών στο εργαστήριο ή στη βιομηχανία. Με την προσθήκη του πολυσακχαρίτη άγαρ το παραπάνω υγρό θρεπτικό υλικό μετατρέπεται σε στερεό.

Αυτότροφοι μικροοργανισμοί: μικροοργανισμοί οι οποίοι χρησιμοποιούν ως πηγή άνθρακα το διοξείδιο του άνθρακα.

Ετερότροφοι μικροοργανισμοί: μικροοργανισμοί οι οποίοι χρησιμοποιούν ως πηγή άνθρακα διάφορες οργανικές χημικές ενώσεις, όπως τους υδατάνθρακες.

Υποχρεωτικά αερόβιοι μικροοργανισμοί: μικροοργανισμοί οι οποίοι απαιτούν υψηλή συγκέντρωση οξυγόνου για την ανάπτυξή τους.

Προαιρετικά αερόβιοι μικροοργανισμοί: μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται παρουσία οξυγόνου με ταχύτερο ρυθμό από ό,τι απουσία οξυγόνου.

Υποχρεωτικά αναερόβιοι μικροοργανισμοί: μικροοργανισμοί για τους οποίους το οξυγόνο είναι τοξικό.

Άγαρ: πολυσακχαρίτης που προέρχεται από φύκη και χρησιμοποιείται για την παρασκευή στερεών θρεπτικών υλικών, εξαιτίας της ιδιότητάς του να στερεοποιείται σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των 45°C.

Εμβολιασμός: η προσθήκη μικρής ποσότητας κυττάρων από το μικροοργανισμό που θέλουμε να καλλιεργήσουμε μέσα στο θρεπτικό υλικό (υγρό ή στερεό). Τα κύτταρα του μικροοργανισμού συνήθως τα βρίσκουμε από μία άλλη καλλιέργεια που έχει γίνει σε στερεό ή υγρό θρεπτικό υλικό.

Αποστείρωση: διαδικασία θανάτωσης όλων των ζωντανών οργανισμών (ακόμη και των ενδοσπορίων) από κάποιο υλικό. Μπορεί να πραγματοποιηθεί με υψηλή θερμοκρασία ή ακτινοβολία.

Βιοαντιδραστήρας (ζυμωτήρας): συσκευή μέσα στην οποία πραγματοποιείται μία καλλιέργεια (ζύμωση), σε βιομηχανική κλίμακα.

Κλίβανος: συσκευή που μπορεί να διατηρεί στο εσωτερικό της μία επιλεγμένη σταθερή θερμοκρασία για την επιβίωση και την ανάπτυξη των μικροοργανισμών μίας καλλιέργειας.

Μελάσα: παραπροϊόν της επεξεργασίας του σακχαροκάλαμου ή των σακχαρότευτλων που χρησιμοποιείται ως φθηνή πηγή άνθρακα στην καλλιέργεια μικροοργανισμών σε βιοαντιδραστήρες.

Βιομάζα: το σύνολο των κυττάρων (ζωντανών και νεκρών) που προκύπτουν από την καλλιέργεια ενός μικροοργανισμού μέσα σε ένα βιοαντιδραστήρα.

Ζύμωση: η ανάπτυξη μικροοργανισμών σε υγρό θρεπτικό υλικό υπό οποιεσδήποτε συνθήκες (αναερόβιες ή αερόβιες).

Κλειστή καλλιέργεια: η ζύμωση που πραγματοποιείται, όταν σε ένα βιοαντιδραστήρα τοποθετείται περιορισμένη ποσότητα θρεπτικού υλικού και μικροοργανισμών και η καλλιέργεια αναπτύσσεται δίχως περαιτέρω εξωγενή παρέμβαση.

Συνεχής καλλιέργεια: η ζύμωση που πραγματοποιείται σε ένα βιοαντιδραστήρα όταν οι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται σε αυτόν τροφοδοτούνται συνεχώς με θρεπτικό υλικό, ενώ ταυτόχρονα απομακρύνονται από την καλλιέργεια κύτταρα και άχρηστα προϊόντα.

Λανθάνουσα φάση: η περίοδος στην οποία ο αρχικός αριθμός των μικροοργανισμών με τους οποίους έχουμε εμβολιάσει ένα θρεπτικό υλικό παραμένει πρακτικά σταθερός, επειδή οι μικροοργανισμοί διανύουν περίοδο προσαρμογής στις συνθήκες της νέας καλλιέργειας.

Εκθετική φάση: η φάση αύξησης των μικροοργανισμών μίας καλλιέργειας, κατά την οποία οι μικροοργανισμοί αυξάνονται με εκθετικό ρυθμό, επειδή οι συνθήκες ανάπτυξής τους είναι οι άριστες.

Στατική φάση: η φάση ανάπτυξης ενός μικροοργανισμού κατά την οποία ο πληθυσμός των καλλιεργούμενων μικροοργανισμών παύει να αυξάνεται, είτε επειδή έχει εξαντληθεί κάποιο θρεπτικό συστατικό είτε επειδή έχουν συσσωρευτεί στην καλλιέργεια τοξικά προϊόντα από το μεταβολισμό των μικροοργανισμών.

Φάση θανάτου: η τελευταία φάση στην ανάπτυξη μικροοργανισμών σε κλειστή καλλιέργεια. Περιλαμβάνει τη μείωση του αριθμού των καλλιεργούμενων μικροοργανισμών.

Τελική κατεργασία: η διεργασία καθαρισμού του προϊόντος που παραλαμβάνεται από το βιοαντιδραστήρα από τις προσμίξεις που περιέχει.

Β. Παρουσίαση της θεωρίας

Διαφορές της σύγχρονης από την παραδοσιακή Βιοτεχνολογία:

1. Έχει ξεπεραστεί ο εμπειρισμός και εφαρμόζονται οι αποκτηθείσες γνώσεις (Επιστήμη).
2. Τα προϊόντα δεν περιορίζονται στο χώρο των τροφίμων και ποτών (ψωμί, κρασί, μπύρα), της παραδοσιακής Βιοτεχνολογίας, αλλά αφορούν σε φάρμακα, βιομηχανικά προϊόντα, γεωργικά και κτηνοτροφικά κλπ.
3. Η παραγωγή γίνεται σε μαζική κλίμακα –βιομηχανική (ευρεία).
4. Χρησιμοποιούνται σύγχρονες τεχνικές, όπως η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA (το νέο δεν είναι οι ιδέες, αλλά οι τεχνικές).

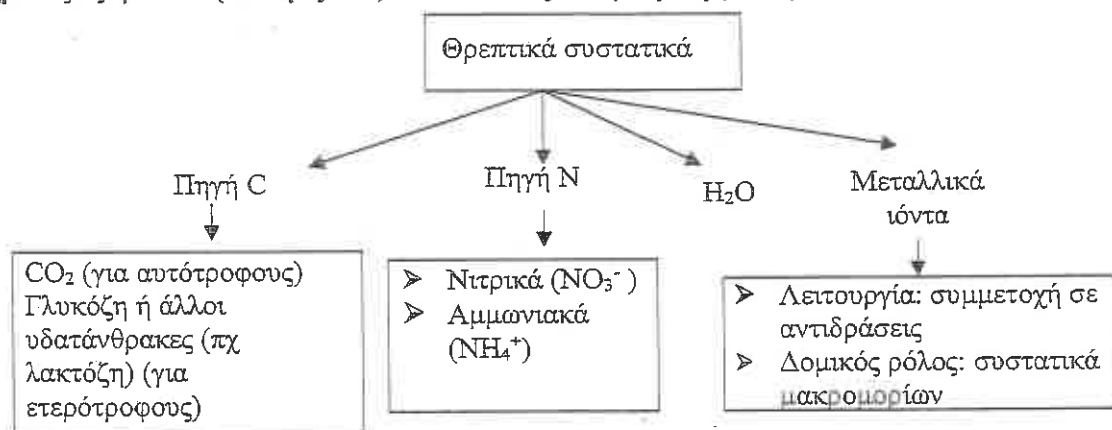
Παράγοντες που επηρεάζουν το χρόνο διπλασιασμού των μικροοργανισμών:

Χρόνος διπλασιασμού → αντιστρόφως ανάλογος του ρυθμού ανάπτυξης του πληθυσμού των μικροοργανισμών.

Παράγοντες:

- Διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών
- pH
- Παρουσία ή απουσία O_2
- Θερμοκρασία

Όταν έχει επιτευχθεί ο ιδανικός συνδυασμός των παραπάνω παραγόντων, ο χρόνος διπλασιασμού έχει ελαχιστοποιηθεί και ο ρυθμός ανάπτυξης έχει μεγιστοποιηθεί. Αυτός ο χρόνος εξαρτάται (καθορίζεται) από το είδος του μικροοργανισμού.

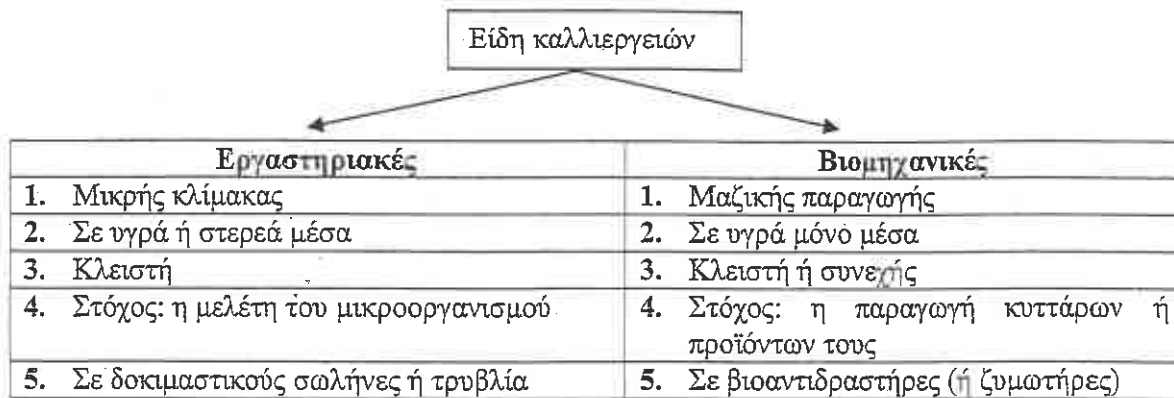


Σχέση των μικροοργανισμών με το O_2 :

- ❑ Υποχρεωτικά αερόβιοι: δεν μπορούν να ζήσουν χωρίς οξυγόνο (π.χ. *Mycobacterium*).
- ❑ Προαιρετικά αερόβιοι: Ζουν είτε υπάρχει οξυγόνο είτε όχι. Όμως αναπτύσσονται ταχύτερα παρουσία οξυγόνου (οι αερόβιες καύσεις παράγουν μεγαλύτερα ποσά ενέργειας). Παράδειγμα οι ζύμες της αρτοβιομηχανίας (*Saccharomyces*).
- ❑ Υποχρεωτικά αναερόβιοι: Ζουν σε περιβάλλοντα που απουσιάζει το οξυγόνο (η παρουσία του είναι τοξική) (πχ. βακτήρια του γένους *Clostridium*).

Χαρακτηρισμός ανάλογα με την ιδανική θερμοκρασία:

- ✓ Ψυχρόφιλα: ανάπτυξη σε $\theta < 20^\circ C$
- ✓ Μεσόφιλα: ανάπτυξη σε θ μεταξύ 20 και $45^\circ C$. Παράδειγμα το *Escherichia coli*: $37^\circ C$ (παχύ έντερο ανθρώπου).
- ✓ Θερμόφιλα: ανάπτυξη σε $\theta > 45^\circ C$, πχ σε θερμοπηγές (*Thermus aquaticus*). Σύμφωνα με τον πίνακα της σελ. 109, μπορούμε να διαιρέσουμε την κατηγορία αυτή σε επιμέρους, πχ από $40-70^\circ C$, από $65-95^\circ C$ και από $80-110^\circ C$. Οι τελευταίες δύο υποκατηγορίες αναφέρονται ως υπερθερμόφιλοι μικροοργανισμοί.



Διαδικασία εργαστηριακής καλλιέργειας:

1. Αποστειρώνουμε τα υλικά και μέσα που θα χρησιμοποιήσουμε.
2. Προετοιμάζουμε το θρεπτικό υλικό και το αποστειρώνουμε:

Υγρό

Θρεπτικά συστατικά + νερό
(σε δοκιμαστικό σωλήνα)

Στερεό

Υγρά θρεπτικά συστατικά + άγαρ
(σε τρυβλίο)

3. Εμβολιασμός: η προσθήκη μικρής ποσότητας μικροβίων στο θρεπτικό υλικό.
4. Τοποθέτηση σε κλίβανο και ρύθμιση της θερμοκρασίας.
5. Αναμονή για 12 – 76 h για να αναπτυχθεί ικανοποιητικός αριθμός μικροοργανισμών. (εάν η καλλιέργεια γίνεται σε στερεό θρεπτικό υλικό, μετά τις 12-76 ώρες είναι εφικτή η παρατήρηση αποικιών).
6. Χρήση των μικροοργανισμών ή / και διατήρησή τους στην κατάψυξη στους -80°C προκειμένου να χρησιμοποιηθούν μελλοντικά.

Το πλεονέκτημα της χρήσης του άγαρ:

Το άγαρ είναι πολυσακχαρίτης που εξάγεται από φύκη του Ειρηνικού και ο οποίος σε θερμοκρασία κάτω από 45°C είναι στερεός, μεταξύ 45°C και 100°C έχει ρευστή μορφή ζελέ (gel), και πάνω από 100°C είναι υγρός. Έτσι, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μέσο καλλιέργειών μικροβίων που απαιτούν υψηλές θερμοκρασίες (θερμόφιλα), γιατί δεν επιτρέπει την πλήρη εξάτμιση του νερού που περιέχεται στο θρεπτικό υλικό (γιατί το νερό παγιδεύεται στο ζελέ).

Διαδικασία βιομηχανικής καλλιέργειας:

1. Αποστείρωση του βιοαντιδραστήρα.
2. Προετοιμασία του υγρού θρεπτικού υλικού (ως πηγή C χρησιμοποιείται η μελάσα, που είναι φθηνή) και αποστείρωσή του.
3. Εμβολιασμός με αρχική καλλιέργεια που έχει γίνει στο εργαστήριο.
4. Ρύθμιση των συνθηκών (ο βιοαντιδραστήρας επιτρέπει ρύθμιση του pH, της θερμοκρασίας, της συγκέντρωσης οξυγόνου κλπ).
5. Ανάπτυξη των μικροοργανισμών (ζύμωση).
6. Παραλαβή των προϊόντων: Α. τα ίδια τα κύτταρα = βιομάζα
B. τα προϊόντα των κυττάρων: πχ πρωτεΐνες ή αντιβιοτικά.

Διαφορές κλειστής – συνεχούς καλλιέργειας:

Κλειστή	Συνεχής
✓ Δεν επεμβαίνουμε στη διαδικασία ανάπτυξης των μικροβίων	✓ Επεμβαίνουμε: α. προσθέτοντας συνεχώς θρεπτικό υλικό όποτε εξαντλείται β. απομακρύνοντας τοξικά προϊόντα των μικροοργανισμών γ. απομακρύνοντας κύτταρα για να αποφευχθεί ο υπερπληθυσμός
✓ Εμφανίζει 4 φάσεις: λανθάνουσα, εκθετική, στατική, θανάτου	✓ Εμφανίζει 2 φάσεις: λανθάνουσα, εκθετική (από ένα σημείο και μετά βρίσκεται μόνιμα στην εκθετική φάση)
✓ Σκοπός: η μελέτη των φάσεων ανάπτυξης των μικροβίων (η διάρκεια των οποίων διαφέρει από είδος σε είδος)	✓ Σκοπός: η μαζική παραγωγή κυττάρων και προϊόντων που τα μικρόβια εκκρίνουν κυρίως κατά την εκθετική φάση
✓ Η κλειστή μπορεί να είναι εργαστηριακή ή βιομηχανική (στην πράξη όλες οι εργαστηριακές είναι κλειστές)	✓ Η συνεχής μπορεί να είναι μόνο βιομηχανική

Γ. Ασκήσεις στην αύξηση των μικροβίων:

Για τις ασκήσεις πάνω στην ανάπτυξη των μικροβίων, θα χρησιμοποιούμε τον τύπο:

$N = N_0 \cdot 2^n$, όπου N είναι ο τελικός αριθμός μικροβίων, N_0 ο αρχικός αριθμός, n είναι ο αριθμός των διχοτομήσεων – διαιρέσεων του μικροβίου. Συνήθως θεωρούμε ότι ένα βακτήριο διαιρείται κάθε 20 λεπτά (εκτός αν η εκφώνηση ορίζει διαφορετικά). Επομένως το n είναι ο αριθμός των εικοσαλέπτων ($n = \frac{t}{T}$, όπου t ο ολικός χρόνος που μας δίνεται και $T = 20'$).

7. 2 Παρατηρήσεις πάνω στη θεωρία του 7^{ου} κεφαλαίου

■ 1. Διαίρεση προκαρυωτικού κυττάρου:

- Το DNA αντιγράφεται (μία θέση έναρξης αντιγραφής – αντιγραφή σε ιδανικές συνθήκες σε χρόνο $< 30 \text{ min}$).
- Το κύτταρο αυξάνεται
- « Σχηματισμός διαφράγματος »
- Τα θυγατρικά κύτταρα διαχωρίζονται (διχοτόμηση) και καθένα παίρνει από ένα μόριο DNA.

■ 2. Αποικία: σύνολο μικροοργανισμών που έχουν προέλθει από διαδοχικές διαιρέσεις ενός κυττάρου, όταν αυτό αναπτύσσεται σε **στερεό** θρεπτικό υλικό. Οι αποικίες είναι ορατές με γυμνό οφθαλμό.

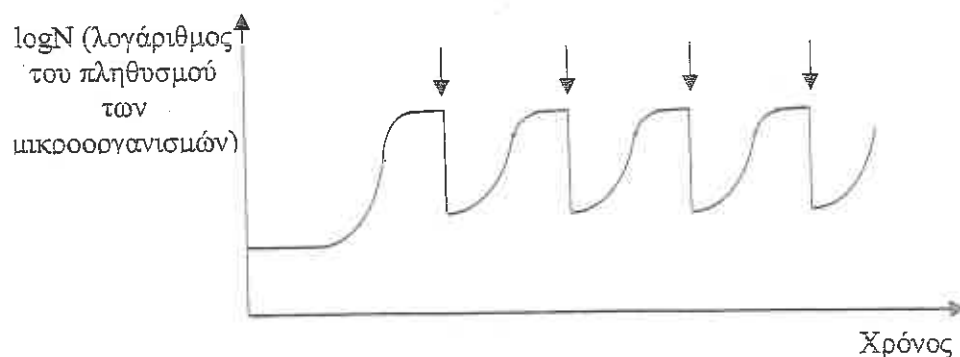
■ 3. Σε θερμοκρασίες ανάπτυξης παρόμοιες με αυτές που διαβιώνουν οι παθογόνοι για τον άνθρωπο μικροοργανισμοί (37°C) το άγαρ είναι στερεό, οπότε είναι εφικτή η δημιουργία αποικιών που είναι ορατές με γυμνό οφθαλμό. Τις περισσότερες φορές, το είδος του μικροοργανισμού διακρίνεται από τη μορφολογία των αποικιών που δημιουργούνται.

■ 4. Επειδή οι γνωστές ζυμώσεις, η αλκοολική και η γαλακτική, γίνονται υπό αναερόβιες συνθήκες, οι ζυμώσεις ορίζονταν ως διαδικασίες που γίνονται μόνο σε τέτοιες συνθήκες. Σήμερα, η έννοια των ζυμώσεων έχει επεκταθεί για όλες τις διαδικασίες ανάπτυξης μικροοργανισμών σε υγρό θρεπτικό υλικό.

■ 5. Το θρεπτικό υλικό στο βιοαντιδραστήρα είναι πάντα υγρό, γιατί αφενός δεν υπάρχει κίνδυνος εξάτμισης του νερού από τις υψηλές θερμοκρασίες, όπως στις εργαστηριακές καλλιέργειες, αφού έχει μόνιμη παροχή νερού (και αντλία απομάκρυνσης των υδρατμών για να μην αυξάνεται η πίεση). Αφετέρου, μόνο το υγρό θρεπτικό υλικό επιτρέπει μαζική ανάπτυξη μικροοργανισμών (στο στερεό θρεπτικό υλικό, τα μικρόβια αναπτύσσονται πάνω στην επιφάνεια του άγαρ).

■ 6. Θα μπορούσε μία συνεχής καλλιέργεια να διαθέτει στατική φάση;

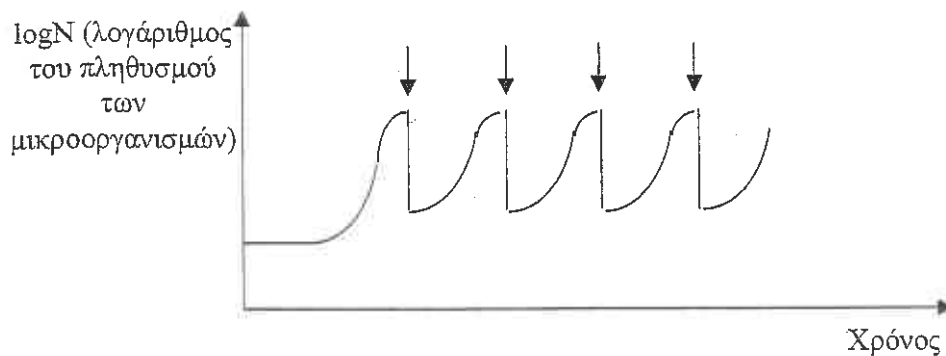
Ναι, στην περίπτωση που απομακρύνονται κύτταρα καθώς και τοξικές ουσίες και άλλα άχρηστα προϊόντα του μεταβολισμού, ενώ ταυτόχρονα προστίθενται θρεπτικά συστατικά κατά τη στατική φάση:



↓: χρονική στιγμή απομάκρυνσης κυττάρων και τοξικών και άχρηστων προϊόντων του μεταβολισμού και ταυτόχρονης προσθήκης νέων θρεπτικών συστατικών.

Αυτός ο τύπος καλλιέργειας μπορεί να προτιμηθεί όταν ο μικροοργανισμός παράγει ένα προϊόν κυρίως κατά τη στατική φάση.

- 7. Διάγραμμα συνεχούς καλλιέργειας όπου απομακρύνονται κύτταρα καθώς και τοξικές ουσίες και άλλα άχρηστα προϊόντα του μεταβολισμού, ενώ ταυτόχρονα προστίθενται θρεπτικά συστατικά κατά την εκθετική φάση:



- ↓: χρονική στιγμή απομάκρυνσης κυττάρων και τοξικών και άχρηστων προϊόντων του μεταβολισμού και ταυτόχρονης προσθήκης νέων θρεπτικών συστατικών.

