

Ανάλυση Θεωρίας Βιοτεχνολογία

Αρχές και μεθοδολογία της βιοτεχνολογίας

Η βιοτεχνολογία αποτελεί συνδυασμό επιστήμης και τεχνολογίας. Με την ευρεία έννοια είναι η χρήση ζωντανών οργανισμών προς όφελος του ανθρώπου. Ειδικότερα εφαρμόζει τις γνώσεις που έχουν αποκτηθεί για τις βιολογικές λειτουργίες των οργανισμών με σκοπό τη χρησιμοποίησή τους για τη βιομηχανική παραγωγή διάφορων προϊόντων (τρόφιμα, αντιβιοτικά, ένζυμα, εμβόλια κ.ά.).

Η βιοτεχνολογία στηρίζεται κυρίως σε:

Τεχνικές καλλιέργειας & ανάπτυξης μικροοργανισμών

Χρησιμοποιούνται για την παραγωγή χρήσιμων προϊόντων.

Τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA

Παρέχουν τη δυνατότητα εισαγωγής νέων επιθυμητών ιδιοτήτων στους ζω-
ντανούς οργανισμούς.

Χρόνος διπλασιασμού των μικροοργανισμών

Ο χρόνος διπλασιασμού αποτελεί το ρυθμό με τον οποίο διαιρούνται τα κύτταρα ενός πληθυσμού μικροοργανισμών σε συγκεκριμένες συνθήκες και είναι χαρακτηριστικός για κάθε είδος. Ο χρόνος διπλασιασμού και κατά συνέπεια ο ρυθμός αύξησης του αριθμού των μικροοργανισμών επηρεάζεται από τους ακόλουθους παράγοντες:

Διάθεση θρεπτικών συστατικών	H₂O	
	Πηγές άνθρακα	Αυτότροφοι : CO ₂ της ατμόσφαιρας. Ετερότροφοι : συνήθως υδατάνθρακες.
	Πηγές αζώτου	Αμμωνιακά ιόντα (NH ₄ ⁺). Νιτρικά ιόντα(NO ₃ ⁻).
	Διάφορα μεταλλικά ιόντα που είναι απαραίτητα:	► Για την πραγματοποίηση των χημικών αντιδράσεων στο κύτταρο. ► Ως συστατικά διάφορων μορίων.
pH	Οι περισσότεροι αναπτύσσονται ιδανικά σε pH 6-9 .	Εξαιρεση: Βακτήρια του γένους <i>Lactobacillus</i> (pH 4-5).
O ₂	Η παρουσία ή η απουσία του O ₂ μπορεί να βοηθήσει ή να αναστείλει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών.	Υποχρεωτικά αερόβιοι: Για την ανάπτυξη τους απαιτούν υψηλή συγκέντρωση O ₂ . Παράδειγμα: Βακτήρια του γένους <i>Mycobacterium</i> .
		Προαιρετικά αερόβιοι: Αναπτύσσονται παρουσία O ₂ με ταχύτερο ρυθμό απ' ό,τι απουσία O ₂ . Παράδειγμα: Οι μύκητες που χρησιμοποιούνται στην αρτοποιία.
		Υποχρεωτικά αναερόβιοι: Το O ₂ είναι τοξικό γι' αυτούς. Παράδειγμα: Βακτήρια του γένους <i>Clostridium</i> .
Θερμοκρασία	Οι περισσότεροι αναπτύσσονται ιδανικά σε θερμοκρασία 20-45°C.	<i>Escherichia coli</i> T ^o = 37°C.
		Μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται κοντά σε θερμοπηγές T ^o >45o C
		Μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται σε T ^o < 20o C

Καλλιέργειες μικροοργανισμών

Καλλιέργεια είναι η διαδικασία ανάπτυξης μικροοργανισμών με διάφορους τεχνητούς τρόπους στο εργαστήριο ή σε βιομηχανικό επίπεδο. Δίνεται η δυνατότητα ευκολότερης μελέτης των μικροοργανισμών, ενώ είναι δυνατή και η παραγωγή χρήσιμων προϊόντων από αυτούς.

Θρεπτικά υλικά

Ανάλογα με τη φάση στην οποία βρίσκονται τα θρεπτικά υλικά διακρίνονται σε δύο είδη:

Υγρά

Περιέχουν όλα τα αναγκαία για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών θρεπτικά συστατικά (πηγή άνθρακα, αζώτου και ιόντα) διαλυμένα σε νερό. Η διαδικασία ανάπτυξης μικροοργανισμών σε υγρό θρεπτικό υλικό ονομάζεται ζύμωση και είναι δυνατό να επιτελείται υπό αερόβιες ή αναερόβιες συνθήκες.

Στερεά

Παρασκευάζονται με ανάμειξη υγρού θρεπτικού υλικού με **άγαρ**. Το άγαρ είναι ένας πολυσακχαρίτης που προέρχεται από φύκη. Στερεοποιείται σε θερμοκρασίες κάτω των 45°C.

Πριν από την έναρξη οποιασδήποτε καλλιέργειας τα θρεπτικά υλικά και οι συσκευές αποστειρώνονται, ώστε να «απαλλαχθούν» από διάφορους μικροοργανισμούς.

Καλλιέργεια μικροοργανισμών σε μικρή κλίμακα στο εργαστήριο

- ▶ Απομόνωση μικροοργανισμών.
- ▶ Παρασκευή κατάλληλου θρεπτικού υλικού (υγρού ή στερεού).
- ▶ Διαμόρφωση κατάλληλων συνθηκών ανάπτυξης (pH, O₂).
- ▶ Η καλλιέργεια ξεκινά με την προσθήκη μικρής ποσότητας κυττάρων στο θρεπτικό υλικό - **εμβολιασμός**.
- ▶ Οι μικροοργανισμοί εισάγονται σε κλίβανο που εξασφαλίζει σταθερή θερμοκρασία κατάλληλη για ανάπτυξη.
- ▶ Έπειτα από 12-76 ώρες παράγεται μεγάλος αριθμός μικροοργανισμών.
- ▶ Οι μικροοργανισμοί είναι δυνατό να απομονωθούν και να μελετηθούν.
- ▶ Οι καλλιέργειες αυτές είναι δυνατό να διατηρηθούν σε αδραντοποιημένη μορφή στην κατάψυξη (-80°C) για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα.

Καλλιέργεια μικροοργανισμών σε μεγάλη κλίμακα στον βιοαντιδραστήρα

Χρησιμοποιούνται κατάλληλες συσκευές που ονομάζονται ζυμωτήρες ή βιοαντιδραστήρες, οι οποίες επιτρέπουν τον έλεγχο και τη ρύθμιση όλων των συνθηκών που αφορούν στην καλλιέργεια. Η διαδικασία μιας τέτοιας καλλιέργειας έχει ως εξής:

- ▶ Απομόνωση μικροοργανισμών και δημιουργία καλλιέργειας στο εργαστήριο.
- ▶ **Εμβολιασμός** του βιοαντιδραστήρα με την αρχική καλλιέργεια.
- ▶ Το θρεπτικό υλικό στον βιοαντιδραστήρα είναι πάντα υγρό και σε αυτό χρησιμοποιούνται φθηνές πηγές άνθρακα, όπως είναι η **μελάσα** που αποτελεί παραπροϊόν της επεξεργασίας ζαχαροκάλαμου ή σακχαρότευλων.
- ▶ Οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται σε ιδανικές συνθήκες, καθώς χρησιμοποιούν τα συστατικά του θρεπτικού υλικού.
- ▶ Τα προϊόντα της ζύμωσης είναι:
 - Είτε τα ίδια τα κύτταρα που ονομάζονται βιομάζα.
 - Είτε προϊόντα των κυττάρων όπως πρωτεΐνες, αντιβιοτικά κ.λπ.
- ▶ Η τελική κατεργασία ολοκληρώνεται με τον καθαρισμό του προϊόντος που παραλαμβάνεται από τον βιοαντιδραστήρα: Διαχωρισμός των υγρών από τα στερεά (κύτταρα) με διήθηση ή φυγοκέντρηση.

Με χρήση κατάλληλων μεθόδων παραλαμβάνουμε το επιθυμητό προϊόν από τα στερεά ή υγρά συστατικά που διαχωρίσαμε. Τα προϊόντα αξιοποιούνται μόνο όταν είναι απόλυτα καθαρά και δεν έχουν προσμείξεις.

Τύποι ζύμωσης στον βιοαντιδραστήρα

Κλειστή καλλιέργεια

Στον βιοαντιδραστήρα τοποθετείται ορισμένη ποσότητα θρεπτικού υλικού, η οποία εμβολιάζεται με αρχική καλλιέργεια μικροοργανισμών με σκοπό την τελική παραγωγή του επιθυμητού προϊόντος. Παρατηρούνται τέσσερις φάσεις ανάπτυξης των μικροοργανισμών:

Λανθάνουσα φάση: Ο αρχικός πληθυσμός των μικροοργανισμών παραμένει σχεδόν σταθερός λόγω της προσαρμογής τους στις καινούριες συνθήκες.

Εκθετική φάση: Λόγω των άριστων συνθηκών που επικρατούν, οι μικροοργανισμοί αρχίζουν να αναπτύσσονται: διαιρούνται με ταχύ ρυθμό και ο αριθμός τους αυξάνεται εκθετικά.

Στατική φάση: Ο πληθυσμός των μικροοργανισμών δεν αυξάνεται λόγω:

- Εξάντλησης κάποιου θρεπτικού συστατικού.
- Συσσώρευσης τοξικών προϊόντων από το μεταβολισμό τους.

Φάση θανάτου: Ο αριθμός των μικροοργανισμών μειώνεται λόγω δυσμενών συνθηκών γι' αυτούς στον βιοαντιδραστήρα.

Βλέπε εικόνα 7.4 σελ. 111 του βιβλίου

ΠΡΟΣΟΧΗ

Η διαδοχή των φάσεων σε κάθε κλειστή καλλιέργεια είναι συγκεκριμένη, ενώ η διάρκεια κάθε φάσης διαφέρει ανάλογα με το είδος των μικροοργανισμών.

Οι μικροοργανισμοί παράγουν χρήσιμα προϊόντα συνήθως κατά τη διάρκεια της εκθετικής και της στατικής φάσης ανάπτυξης τους

Συνεχής καλλιέργεια

Οι μικροοργανισμοί τροφοδοτούνται συνεχώς με θρεπτικά συστατικά, ενώ ταυτόχρονα απομακρύνονται κύτταρα και άχρηστα προϊόντα. Με αυτόν τον τρόπο οι μικροοργανισμοί βρίσκονται διαρκώς σε ανάπτυξη.

Παραγωγή πενικιλίνης

Η παραγωγή της πενικιλίνης με τις μεθόδους της βιοτεχνολογίας εξαρτάται από:

- Το στέλεχος του μύκητα που χρησιμοποιείται.
- Το θρεπτικό υλικό στο οποίο αναπτύσσεται.
- Τις συνθήκες καλλιέργειας.

Για την παραγωγή πενικιλίνης ακολουθείται η εξής διαδικασία:

- Σε στερεό θρεπτικό υλικό καλλιεργούνται στελέχη τα οποία έχουν επιλεγεί για την υψηλή απόδοση τους.
- Τα στελέχη χρησιμοποιούνται ως αρχική καλλιέργεια για ανάπτυξη σε βιοαντιδραστήρες - εμβολιασμός.
- Ως πηγή άνθρακα στον βιοαντιδραστήρα χρησιμοποιείται η γλυκόζη.
- Η λανθάνουσα και η εκθετική φάση διαρκούν 30-40 ώρες και η βιομάζα του μύκητα αυξάνεται.
- Προστίθεται γλυκόζη σε χαμηλή συγκέντρωση και η ανάπτυξη του μύκητα σταματά ■ στατική φάση. Σε αυτή τη φάση αρχίζει η παραγωγή της πενικιλίνης.
- Η καλλιέργεια διαρκεί έως και 15 μέρες.
- Η πενικιλίνη παραλαμβάνεται σε καθαρή μορφή με τη χρήση φυσικών και χημικών μεθόδων.