

# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

Δρ. Ιωάννης Γιαβάσης  
Μικροβιολόγος-Βιοτεχνολόγος Τροφίμων  
Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας  
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής

# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## Περίγραμμα ύλης της Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

- Απομόνωση, χρήση και ιδιότητες μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται σε μικροβιακές ζυμώσεις
- Προετοιμασία καθαρών καλλιεργειών, παραγωγή εμβολίων, ζύμωση και απομόνωση τελικών προϊόντων
- Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών κατά τη ζύμωση, κινητικές παράμετροι ανάπτυξης των μικροοργανισμών
- Τύποι και λειτουργία ζυμωτήρων-βιοαντιδραστήρων, τύποι και στρατηγικές ζύμωσης
- Παραγωγή βιοτεχνολογικών προϊόντων για χρήση στα τρόφιμα
  - Παραγωγή μονοκυτταρικής πρωτεΐνης
  - Παραγωγή αλκοόλης
  - Παραγωγή Οργανικών οξέων
  - Παραγωγή πολυσακχαριτών
  - Παραγωγή αμινοξέων και βιταμινών
  - Παραγωγή ενζύμων
  - Παραγωγή φαρμακευτικών μανιταριών
  - Παραγωγή αντιβιοτικών και βακτηριοσινών
- Εφαρμογές Βιοκατάλυσης (χρήση ακινητοποιημένων ενζύμων ή κυττάρων)

# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

- Έννοια βιοτεχνολογίας – Η Βιοτεχνολογία ασχολείται με την αξιοποίηση μικροβιακών, φυτικών, ζωικών, ή και ανθρώπινων κυττάρων για την παραγωγή ωφέλιμων ουσιών για τον άνθρωπο
- Εφαρμογές Βιοτεχνολογίας στην υγεία, τρόφιμα, περιβάλλον, ενέργεια, κλπ

## Παραδείγματα βιοτεχνολογικών εφαρμογών σε όλες τις επιστήμες

- **(α) Τρόφιμα και Χημική Βιομηχανία:** εδώδιμη πρωτεΐνη, ένζυμα με πολλαπλές εφαρμογές, πολυσακχαρίτες (πηκτικές ουσίες, σταθεροποιητές), οργανικά οξέα (μέσα οξίνισης), βιταμίνες, λιπαρά οξέα, αντιμικροβιακές ουσίες-συντηρητικά, αρωματικές ουσίες, αμινοξέα, ενισχυτικά γεύσης, καλλιέργειες εκκίνησης ζυμούμενων τροφίμων, οργανικοί διαλύτες (αιθανόλη, προπανόλη, βουτανόλη, ακετόνη, κλπ), χρωστικές, αέρια (π.χ. CO<sub>2</sub>), κλπ.
- **(β) Φαρμακευτική-Υγεία:** αντιβιοτικά, ορμόνες, εμβόλια, αντισώματα, αντικαρκινικά πεπτιδία
- **(γ) Παραγωγή ενέργειας:** βιοαιθανόλη, βιοαέριο (CH<sub>4</sub>), παραγωγή βιοντήζελ από βιοκατάλυση, καλλιέργεια μικροφυκών και λιπογενών μικροοργανισμών για χρήση λίπους σε βιοντήζελ, μικροβιακό υδρογόνο
- **(δ) Περιβάλλον:** βιολογικός καθαρισμός αστικών/βιομηχανικών αποβλήτων, αποικοδόμηση ρύπων (π.χ. πετρελαιοκηλίδων) και τοξικών ουσιών (π.χ. βαρέων μετάλλων σε εδάφη) – bioremediation/bioaugmentation, φυτοπροστασία και φυτοδιεγερτικοί μικροοργανισμοί και μυκκόριζες, κλπ.

# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το γεγονός ότι ένας μικροοργανισμός ή ένα κύτταρο παράγει μία ουσία με βιομηχανικό ενδιαφέρον, δεν σημαίνει απαραίτητα ότι αυτή μπορεί να αξιοποιηθεί βιομηχανικά με βιώσιμο τρόπο.

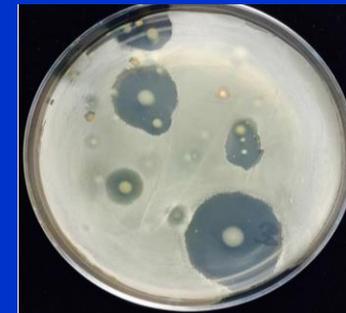
Το κόστος μιας βιοδιεργασίας καθορίζει τη βιωσιμότητα της βιομηχανικής αξιοποίησης κυττάρων.

Για την βελτιστοποίηση των διεργασιών απαιτείται:

- Μελέτη και βελτιστοποίηση φυσιολογίας κυττάρων, δηλ. αριστοποίηση συνθηκών ανάπτυξης
- Μείωση ανεπιθύμητων μεταβολικών μονοπατιών (π.χ. παραγωγή υποπροϊόντων) ή αύξηση βιοσύνθεσης προϊόντων με μεταβολική μηχανική
- Εφαρμογές Μοριακής Βιολογίας-Γενετικής Μηχανικής (γενετική βελτίωση στελεχών, προσθήκη ή αφαίρεση γονιδίων, διαγονιδιακά μικρόβια, φυτά και ζώα)
- Βελτιστοποίηση σχεδιασμού και λειτουργίας Βιοαντιδραστήρων (upstream processing)– χημική μηχανική
- Βελτιστοποίηση απομόνωσης και καθαρισμού προϊόντων (downstream processing) – χημική μηχανική
- Διαρκής αναζήτηση και ανακάλυψη νέων (μικρο)οργανισμών με χρήσιμες ιδιότητες με εμπορική εφαρμογή (Βασική Μικροβιολογική έρευνα)



κύτταρα που παράγουν πολυσακχαρίτες

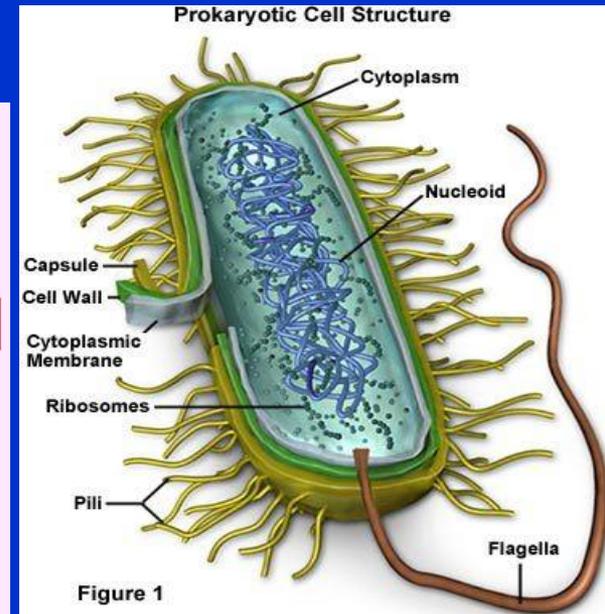
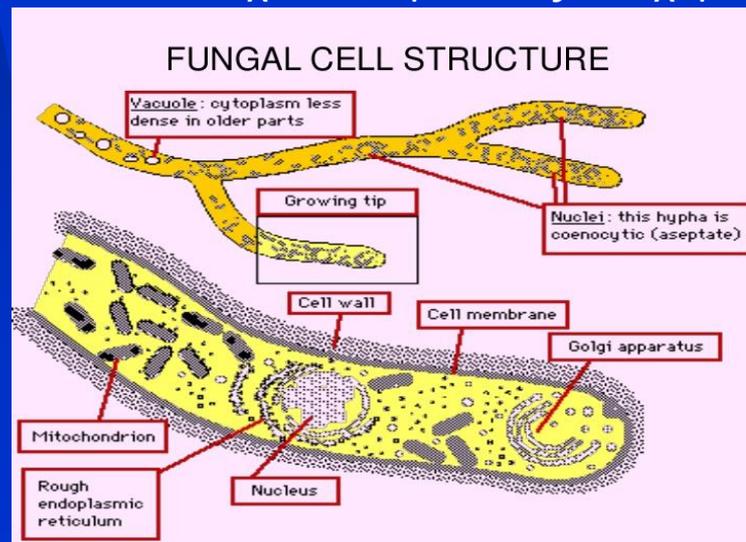
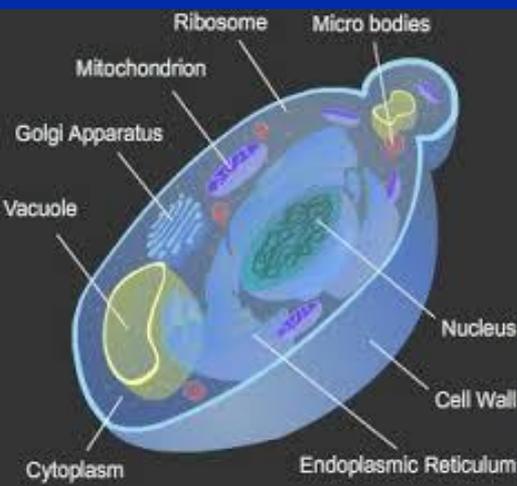


κύτταρα που παράγουν αντιβιοτικά/αντιμικροβιακά

# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

- Είδη κυττάρων με βάση το επίπεδο οργάνωσης:
  - **Ευκαρυωτικά** (ζύμες-μύκητες) με πυρηνική μεμβράνη, μιτοχόνδρια, ενδοπλασματικό δίκτυο, κλπ, (μέγεθος ~10-1000 x προκαρυωτικά)
  - **Προκαρυωτικά** (βακτήρια) χωρίς πυρηνική μεμβράνη, χωρίς μιτοχόνδρια, συχνά με δυνατότητα κίνησης
- **Βασικά δομικά μέρη του μικροβιακού κυττάρου:**
  - Πυρήνας: χρωμοσώματα με (δίκλωνο μόριο DNA-165 βάσεις + ιστόνες για σύνθεση RNA)
  - Κυτταρική μεμβράνη και τοίχωμα : πρωτεΐνες – λίπη, πολυσακχαρίτες (γλυκολιπίδια, πρωτεογλυκάνες, γλυκοπρωτεΐνες)
  - Κυτταρόπλασμα – ρόλος?
  - Κυτταρικά οργάνιδια : Ριβοσώματα, μιτοχόνδρια/χλωροπλάστες (αυτόνομο DNA και ριβοσώματα), Λυσοσώματα, σύστημα Golgi, αποθηκευτικά όργανα (κενοτόπια)
- **Σύσταση κυττάρου:** Νερό 70-80% τουλάχιστον, πρωτεΐνες, σάκχαρα, λιπίδια, DNA, RNA, ιόντα



# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Καλλιέργειες κυττάρων (cell culture)

- μ/ο
- ζώων (έντομα, τρωκτικά κλπ)
- φυτών

### ■ Καλλιέργειες μ/ών

- >100.000-1.000.000 μ/οί στη φύση
- ~100-200 σε βιομηχανική χρήση : ζύμες – μύκητες, βακτήρια, φύκη, ζωικά κύτταρα
- Παραδείγματα:

#### Ζύμες

- *Saccharomyces cerevisiae*
- *Kluyveromyces marxianus*
- *Yarrowia lipolytica*
- *Pichia pastoris*

#### Μύκητες

- *Aspergillus niger*
- *Aureobasidium pullulans*
- *Bysochlamys fulva*
- *Fusarium venenatum*

#### Βακτήρια

- *Xanthomonas campestris*
- *Bacillus subtilis*
- *Streptomyces natalensis*
- *Lactobacillus casei*

## Διαχωρισμός μικροοργανισμών ως προς συνθήκες ζύμωσης:

- Αερόβια / Αναερόβια/προαιρετικά αναερόβια-μικροαερόφιλα
- Θερμόφιλα/μεσόφιλα/ψυχρόφιλα
- Οξεόφιλα, αλκαλόφιλα, ουδετερόφιλα
- Ωσμóφιλα, ωσμοάντοχα

# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΓΙΑ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΕΣ ΖΥΜΩΣΕΙΣ

### ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΠΙΛΟΓΗΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

- Να έχουν υψηλή παραγωγικότητα, δηλ. να παράγουν υψηλή συγκέντρωση προϊόντος σε σύντομο χρόνο
- Να έχουν υψηλή απόδοση, δηλ. να μετατρέπουν όσο το δυνατόν μεγαλύτερο ποσοστό των θρεπτικών ουσιών (π.χ. σακχάρων) σε τελικό προϊόν. Π.χ. αν παράγουν πολλά παραπροϊόντα ζύμωσης, ή δεν αξιοποιούν όλα τα σάκχαρα του υποστρώματος η απόδοση πέφτει.
- Να αξιοποιούν αν είναι δυνατόν φτηνά υποστρώματα ή γεωργικά ή άλλα απόβλητα (π.χ. αποπρωτεϊνωμένο τυρόγαλο)
- Να είναι εύκολος ο καθαρισμός των τελικών προϊόντων που παράγουν
- Να μην υπόκεινται σε μεταλλάξεις και απώλεια σημαντικών ιδιοτήτων τους κατά τη ανακαλλιέργεια

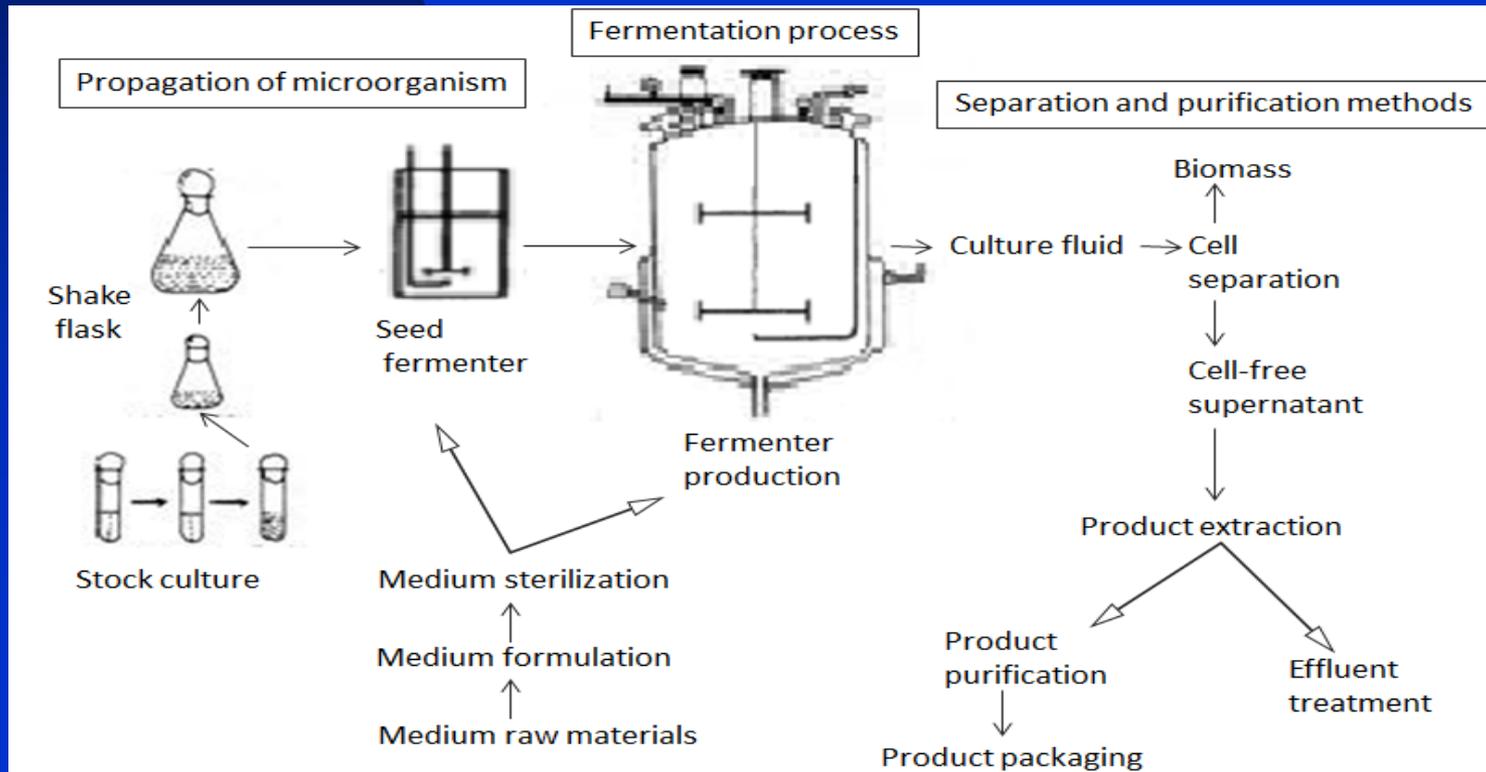
### ΤΡΑΠΕΖΕΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

- Απομόνωση στελεχών (άγρια, βελτιωμένα)
- Συντήρηση με – λυοφυλίωση (stock culture)
  - βαθιά κατάψυξη -80C (με ~20% γλυκερίνη) (stock culture)
  - Ψύξη για 15-30 μέρες και έπειτα ανακαλλιέργεια

# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

Απαραίτητα στάδια για ανάπτυξη βιομηχανικής καλλιέργειας μικροοργανισμών

- Απομόνωση στελεχών / προμήθεια από Τράπεζες καλλιεργειών
- Ανακαλλιέργεια σε κατάλληλο υπόστρωμα και θερμοκρασία για δημιουργία stock culture
- Παρασκευή και αποστείρωση θρεπτικού υποστρώματος για ζύμωση (συνήθως διαφορετικό από το αρχικό υπόστρωμα της μητρικής καλλιέργειας)
- Αποστείρωση συνοδευτικών υλικών (π.χ. οξέα, βάσεις για έλεγχο pH, αντιαφριστικό διάλυμα)
- Εμβολιασμός καλλιέργειας στο υγρό ζύμωσης σε ποσοστό 1-10%
- Ζύμωση σε βιοαντιδραστήρες διαδοχικά αυξανόμενων μεγεθών (upstream processing)
- Απομόνωση – καθαρισμός προϊόντων (downstream processing)



# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑΣ ΕΜΒΟΛΙΟΥ ΚΑΙ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑ

1. Φιαλίδιο καλλιέργειας  
λυοφυλ./κατεψυγμ./υπό ψύξη



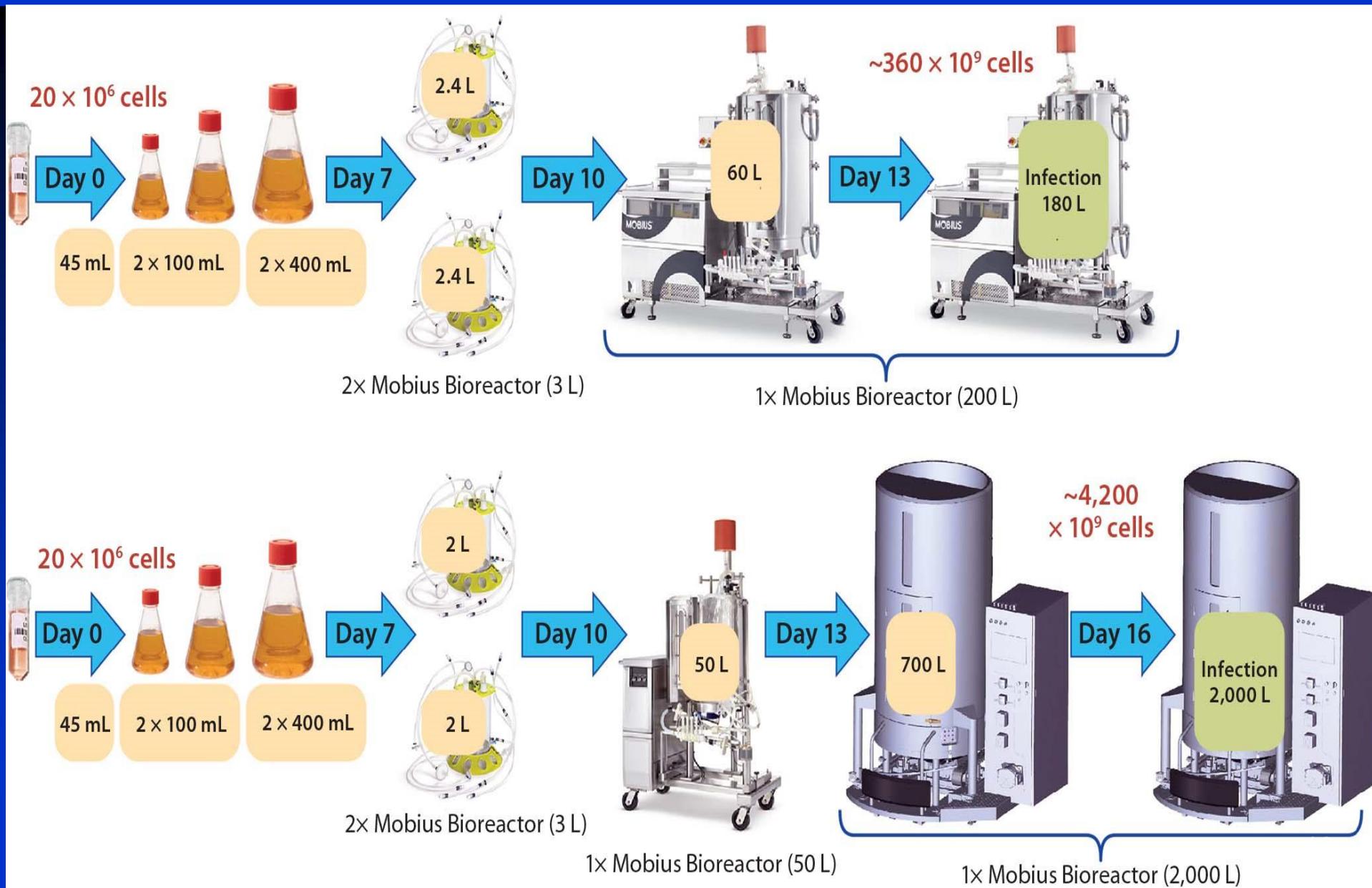
2. ανάπτυξη σε κωνική φιάλη



3. εμβολιασμός σε  
βιοαντιδραστήρα



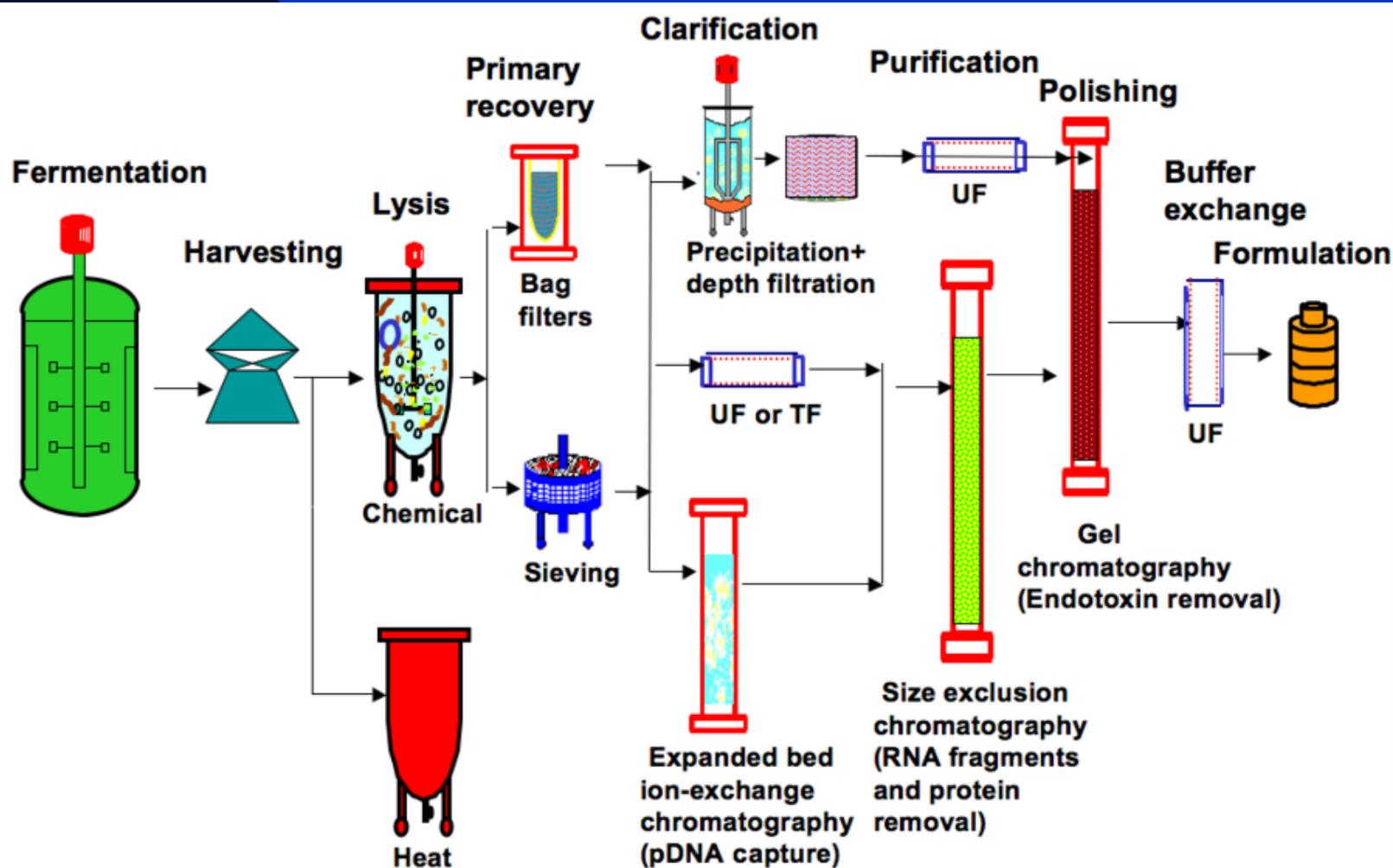
# Ανιούσα επεξεργασία (upstream processing): από την καθαρή αποικία/καλλιέργεια μέχρι την ολοκλήρωση της βιομηχανικής ζύμωσης



# Κατιούσα επεξεργασία (downstream processing):

Από το τέλος της βιομηχανικής ζύμωσης μέχρι τον καθαρισμό και την απομόνωση-ξήρανση-συσκευασία του τελικού προϊόντος

Ενδεικτικές μέθοδοι καθαρισμού προϊόντων: φυγοκέντρηση για αφαίρεση βιομάζας, υγρή χρωματογραφία για καθαρισμό πρωτεϊνών-πολυσακχαριτών, καθίζηση με οξέα πρωτεϊνών και φυγοκέντρηση, απόσταξη αλκοολών, κλπ. Και στο τέλος ξήρανση με θέρμανση, spray-drying, freeze-drying (λιοφυλίωση)



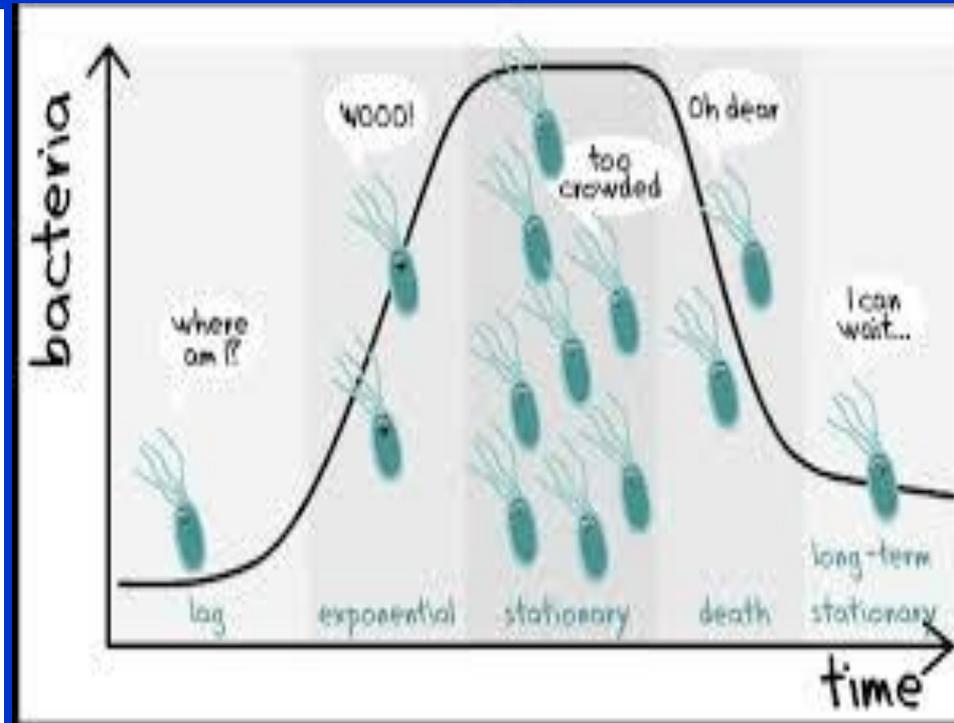
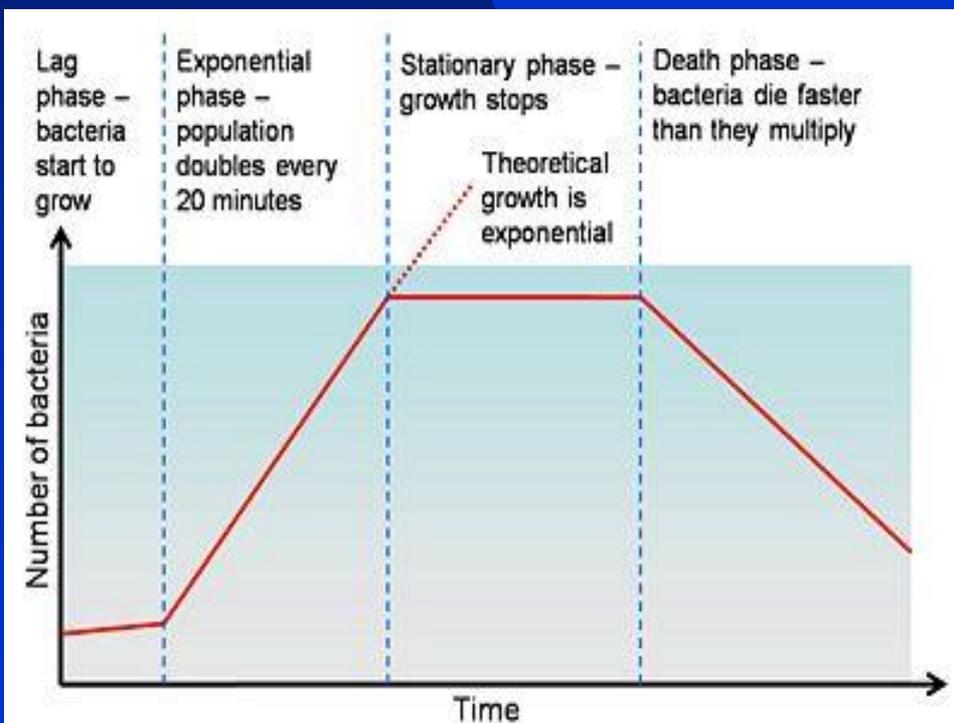
# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ

- Σύσταση ανάλογα με είδος μικροοργανισμού
- Απαιτείται: πηγή C, N, P, S, ιόντων K, Na, Ca, κλπ, αυξητικοί παράγοντες (αμινοξέα-βιταμίνες)
- Διαφορές θρέψης σε φυτικά/ζωικά κύτταρα

## ΑΝΑΠΤΥΞΗ Μ/Ο ΣΕ ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑ

- Φάσεις ανάπτυξης μικροοργανισμών: φάση προσαρμογής, εκθετικής ανάπτυξης, στασιμότητας, θανάτου (μη αντιστρεπτή)



# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

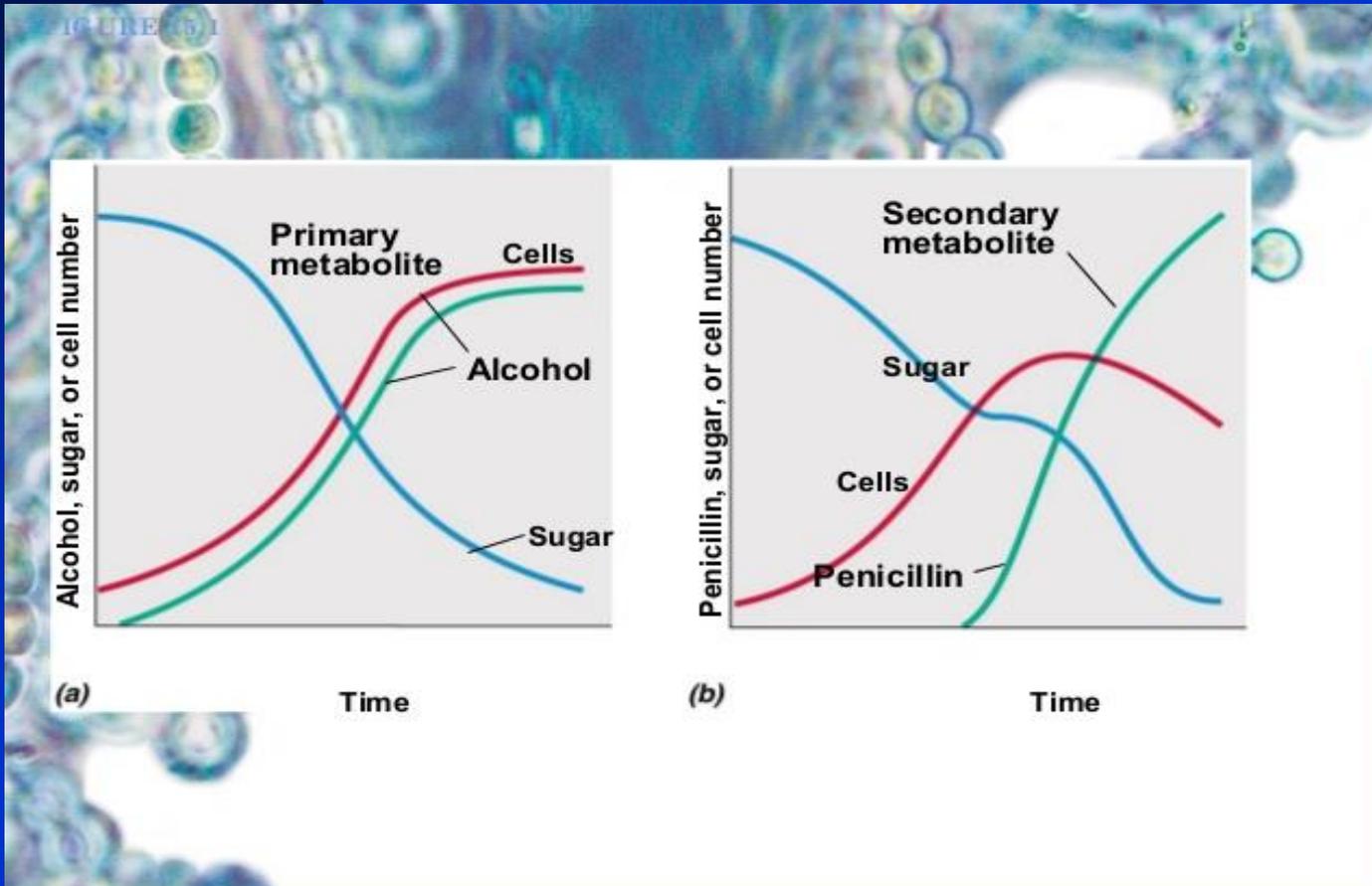
## ΑΝΑΠΤΥΞΗ Μ/Ο ΣΕ ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑ

- **Παράγοντες που ευνοούν ή αναστέλλουν την ανάπτυξη κυττάρων στο βιαντιδραστήρα:**
  - επάρκεια/εξάντληση θρεπτικών ουσιών
  - παρουσία ανασταλτικών ουσιών στο υπόστρωμα (υψηλή συγκέντρωση στερεών, οργανικά οξέα, φαινόλες, βαρέα μέταλλα, κλπ)
  - συσσώρευση ανασταλτικών προϊόντων του μεταβολισμού (οργανικά οξέα, αλκοόλες, κετόνες, CO<sub>2</sub>, κλπ)
  - παρουσία/απουσία αερισμού (οξυγόνου) ή άλλων αερίων απαραίτητων για την ανάπτυξη (π.χ. CO<sub>2</sub>)
  - (επαρκής) ανάδευση ή (υψηλή) διατμητική τάση-shear stress, ή (υψηλό) ιξώδες
  - pH ζύμωσης
  - θερμοκρασία ζύμωσης

# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## ΑΝΑΠΤΥΞΗ Μ/Ο ΣΕ ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑ

- **Πρωτογενείς μεταβολίτες:** απαραίτητοι για την ανάπτυξη των κυττάρων, αναπόσπαστο κομμάτι του βασικού μεταβολισμού για τη διατήρηση των κυττάρων
- **Δευτερογενείς μεταβολίτες:** ουσίες μη απαραίτητες για την ανάπτυξη των κυττάρων, που παράγονται όταν ο μικροοργανισμός είναι σε φάση στασιμότητας ή και θανάτου.



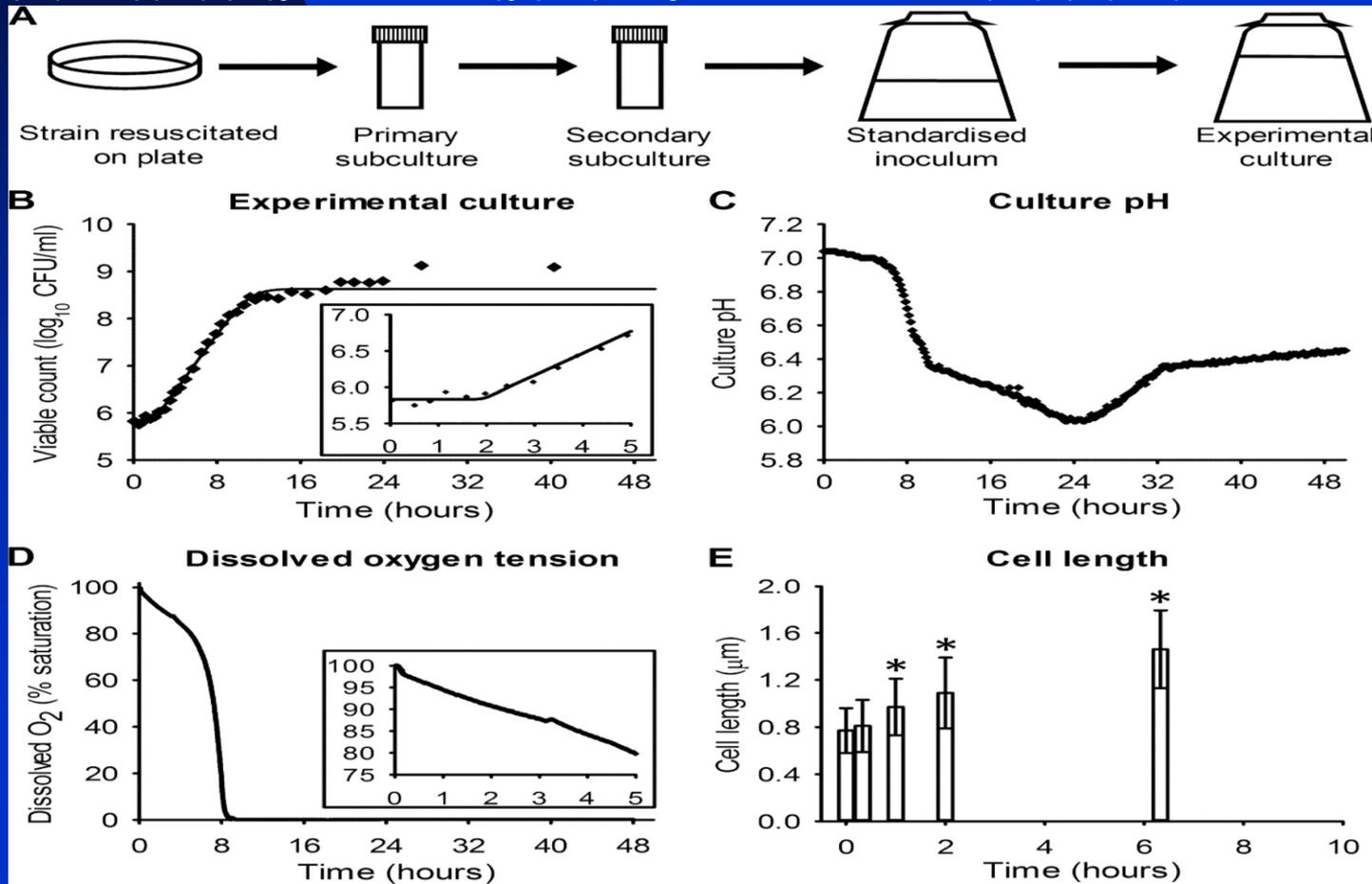
# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## ΑΝΑΠΤΥΞΗ Μ/Ο ΣΕ ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑ

### ■ Παραλαβή προϊόντων (harvesting): πότε πρέπει να γίνει και πώς?

- Στο σημείο της μέγιστης συγκέντρωσης του προϊόντος
- Στο σημείο της μέγιστης συγκέντρωσης βιομάζας
- Στο σημείο που το προϊόν έχει τα βέλτιστα ποιοτικά χαρακτηριστικά (π.χ. Μοριακό Βάρος)

**Έμμεσοι δείκτες προσδιορισμού του harvest point:** Διαλυτό οξυγόνο (DO), pH, οπτική πυκνότητα (OD), ιξώδες, μέτρηση απορρόφησης/αντανάκλασης φάσματος NIR/IR/FTIR/NMR, μέτρηση πτητικών ουσιών (electronic nose)



# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## ΑΝΑΠΤΥΞΗ Μ/Ο ΣΕ ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑ

Έμμεσοι δείκτες προσδιορισμού του **harvest point**: Διαλυτό οξυγόνο (DO), pH, οπτική πυκνότητα (OD), ιζώδες, μέτρηση απορρόφησης/αντανάκλασης φάσματος NIR/IR/FTIR/NMR, μέτρηση παραγωγής πτητικών ουσιών (electronic nose)

### On-line sensor positioning for bioreactors

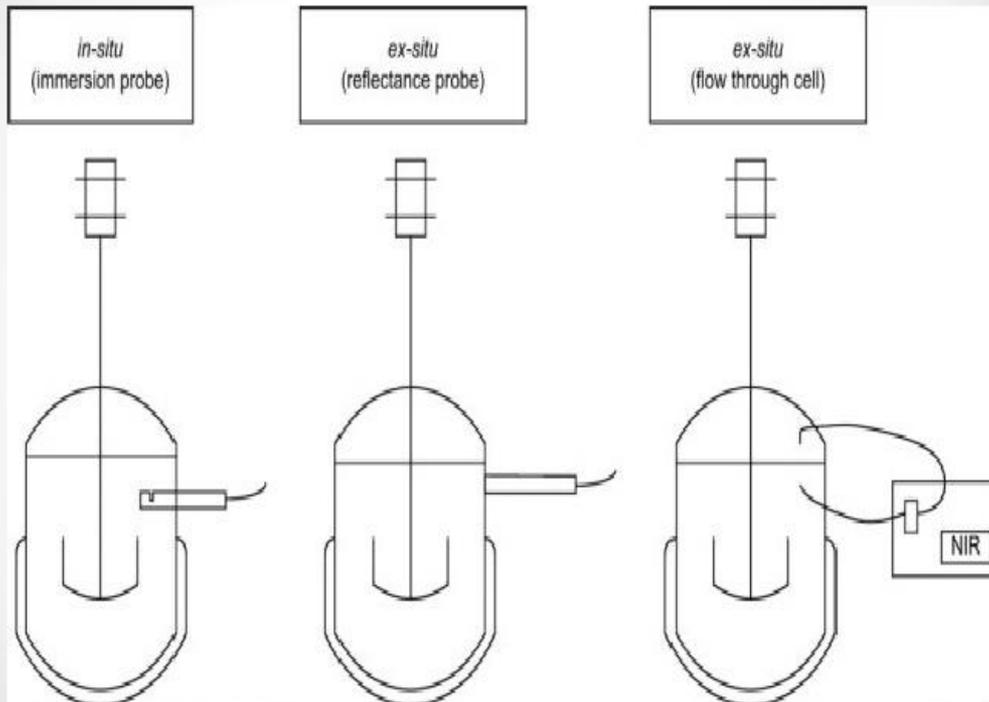
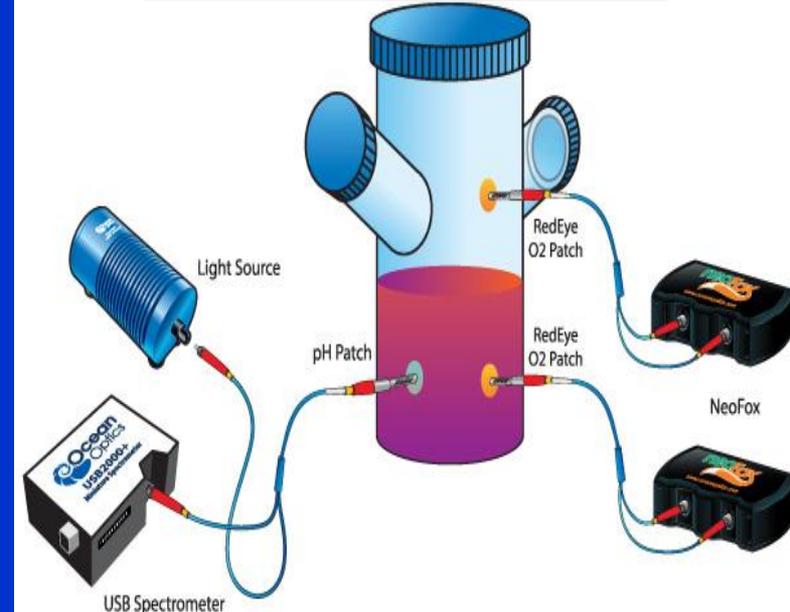


Figure 1 taken from Cervera, A. *et al.*(2009)



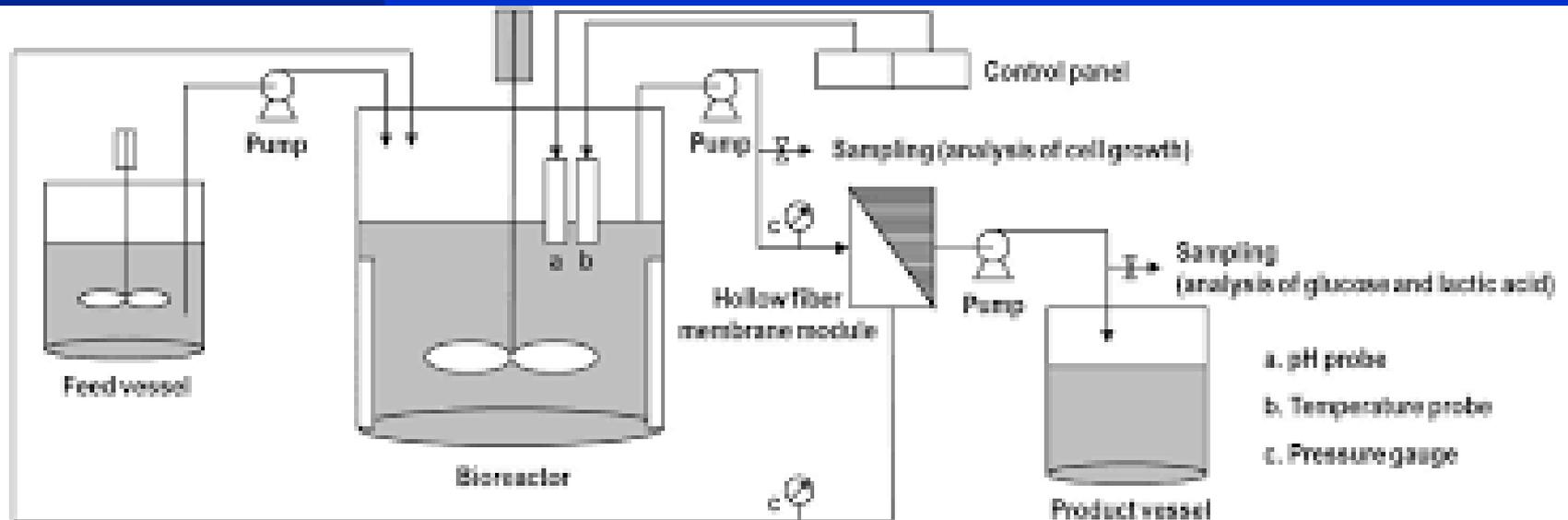
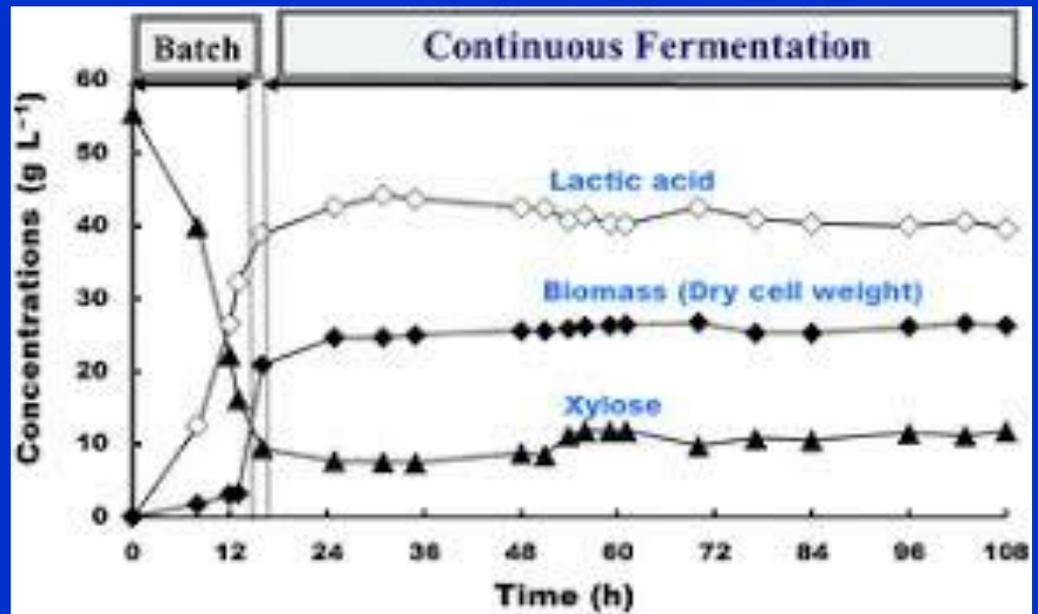
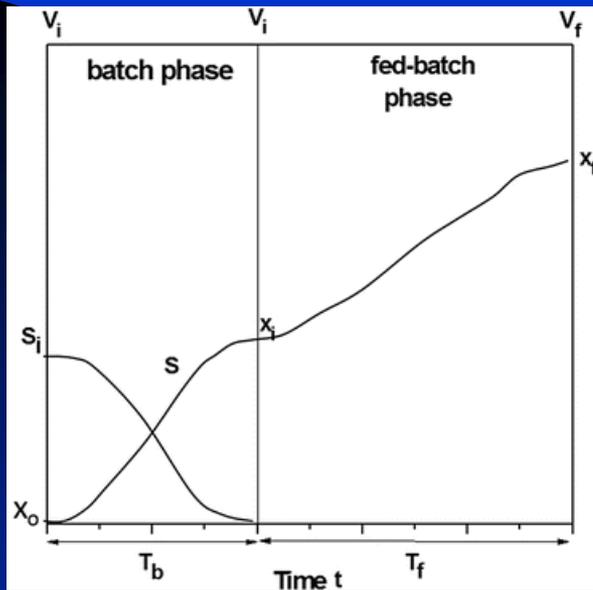
# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## Είδη βιομηχανικής καλλιέργειας και στρατηγικές ζύμωσης:

- Ζύμωση υγρής φάσης / στερεής φάσης / μικτή, ανάλογα με το είδος του υποστρώματος (υγρό/στερεό)
- Ζύμωση Ασυνεχής (batch)/συνεχής(continuous)/ασυνεχής με τροφοδοσία(fed-batch)/δύο ή περισσότερων σταδίων (bi-staged)
- **Ασυνεχής (continuous):** μετά τον εμβολιασμό του υποστρώματος το σύστημα είναι κλειστό και η καλλιέργεια έχει μια φάση προσαρμογής, λογαριθμικής ανάπτυξης, στασιμότητας και θανάτου. Αντίστοιχα και τα προϊόντα ακολουθούν μια καμπύλη αύξησης, στασιμότητας και μείωσης/αποικοδόμησης, λόγω του θανάτου των κυττάρων.
- **Συνεχής:** Μετά τον εμβολιασμό και τη φάση προσαρμογής, τα κύτταρα αναπτύσσονται για λίγο λογαριθμικά μέχρι να φτάσουν σε ένα επιθυμητό επίπεδο (πληθυσμό), και στη συνέχεια αφαιρείται συνεχώς υπόστρωμα+βιομάζα, ενώ προστίθεται περίπου ισόποσος όγκος νέου υποστρώματος ώστε να μην υπάρχει πλέον αύξησης της βιομάζας, αλλά μία σταθερή συγκέντρωση βιομάζας και σταθερός ρυθμός παραγωγής προϊόντος. Δεν μπαίνει ποτέ σε φάση θανάτου η καλλιέργεια και η παραγωγή προϊόντος δεν έχει αυξομειώσεις.
- **Ημιασυνεχής (fed-batch):** Ξεκινάει όπως μια ασυνεχής ζύμωση, αλλά λίγο πριν τελειώσουν τα θρεπτικά συστατικά, προσθέτουν νέο θρεπτικό υπόστρωμα, ώστε να παρατείνουμε την φάση ανάπτυξης των μικροοργανισμών και την παραγωγή προϊόντος.
- **Δύο σταδίων (bi-staged):** Χωρίζεται σε δύο στάδια παραγωγής, ένα που είναι σχεδιασμένο για την άριστη ανάπτυξη της βιομάζας, και ένα με βάση την άριστη παραγωγή του προϊόντος (όταν οι συνθήκες παραγωγής βιομάζας και προϊόντων διαφέρουν). Μοιάζει με την ημιασυνεχή, αλλά για επιπλέον υπόστρωμα, στη δεύτερη φάση αλλάζουμε κάποια από τις συνθήκες ζύμωσης (θερμοκρασία, pH, αερισμό, κλπ).

# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

Είδη βιομηχανικής καλλιέργειας μ/ο:

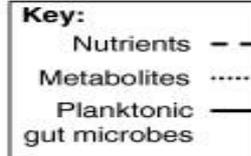
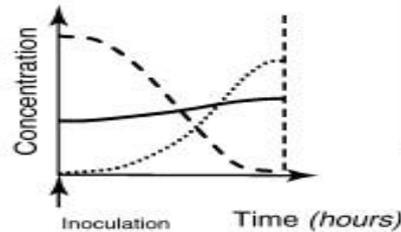
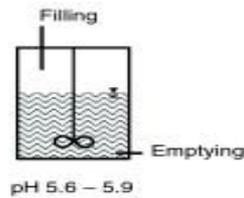


# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

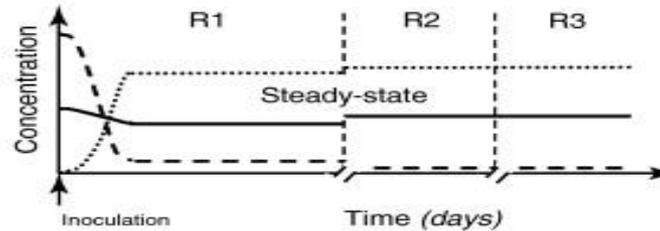
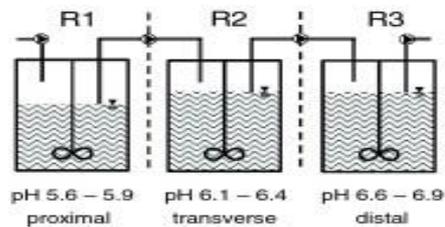
Είδη βιομηχανικής καλλιέργειας μ/ο:

■ Ασυνεχής (batch)/συνεχής(continuous)/ασυνεχής με τροφοδοσία(fed-batch)/δύο ή περισσότερων σταδίων (bi-staged)

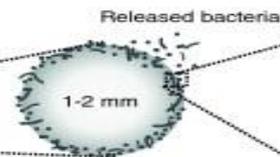
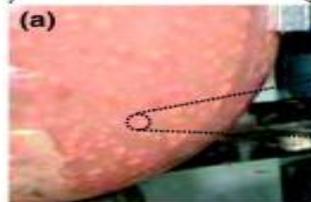
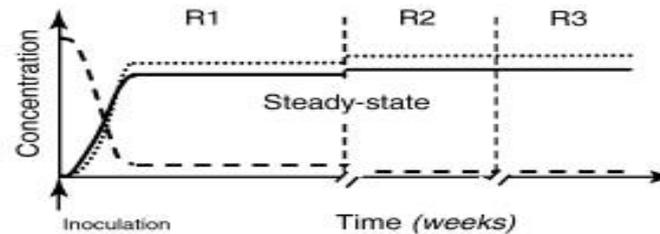
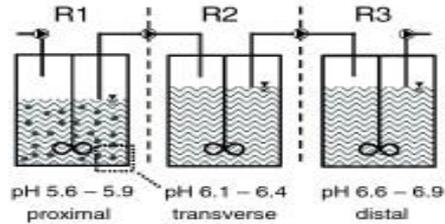
## Batch



## Continuous



## Continuous with immobilized feces

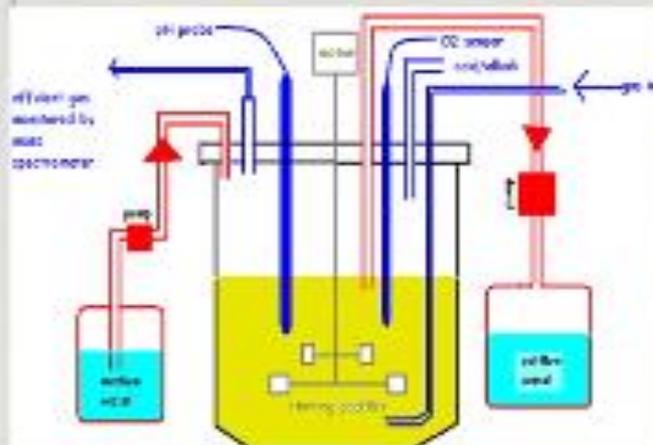


# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## Είδη βιομηχανικής καλλιέργειας:

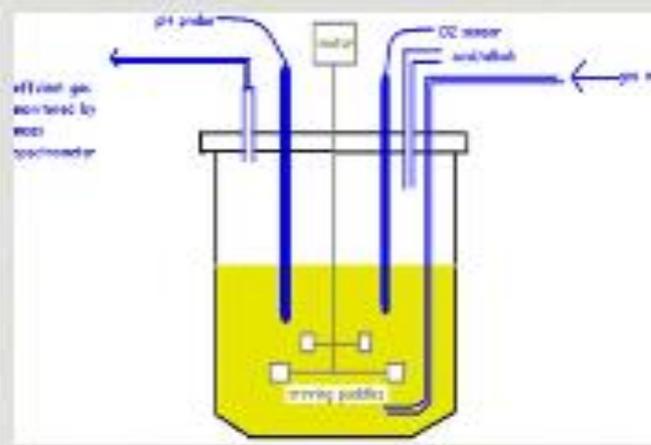
■ Σύγκριση ασυνεχούς και συνεχούς ζύμωσης (batch vs continuous culture)

Continuous culture



- OPEN system
- used for making metabolites in log phase
- constantly made and removed

Batch culture



- CLOSED system
- used for making secondary metabolites in the stationary phase
- removed when concentration is high

- material is constantly added, everything in excess except one limiting factor

- Nutrient levels stays the same throughout procedure
- waste removed

- Waste products constant

- Product constantly made and can be removed

- No new materials added

- Nutrients depleted

- No waste removed

- Waste accumulates

- Product removed at end of time period and then new batch is produced

# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## Είδη βιομηχανικής καλλιέργειας:

■ Σύγκριση ασυνεχούς και συνεχούς ζύμωσης (batch vs continuous culture)

Continuous culture	Batch culture
Smaller vessels required because of higher productivity in log phase	Larger vessels
More expensive to set up	Cheaper
Good for producing enzymes from log phase	Secondary metabolites from stationary phase made
Requires specialised equipment and staff to operate. It is difficult to get the exact conditions needed	Easy to set up and operate
Productivity and biomass are high so will be cost effective when running	Run in batches so each time need to start from beginning
Any contamination will affect long term production	Any contamination will only affect one batch
Microbes produce foam and cells that may block pipes	The right conditions for secondary metabolite production are difficult to obtain

# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## Είδη βιομηχανικής καλλιέργειας μ/ο:

Επιλογή της κατάλληλης στρατηγικής ζύμωσης (ασυνεχής, ασυνεχείς με ενδιάμεση τροφοδοσία, δύο σταδίων ή συνεχής ζύμωση), ανάλογα με κριτήρια ή ερωτήματα, όπως:

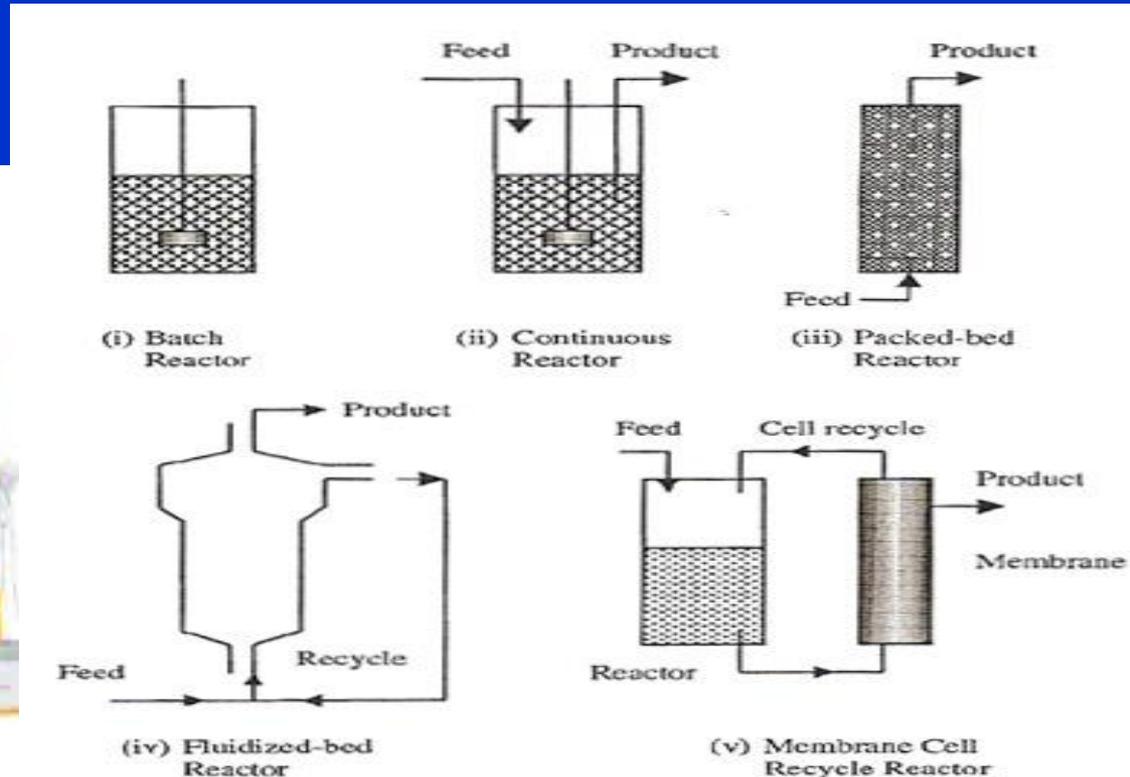
- Τα προϊόντα είναι πρωτογενείς ή δευτερογενείς μεταβολίτες? (π.χ. η συνεχή ζύμωση δεν είναι κατάλληλη για δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται σε φάση στασιμότητας, ενώ η ασυνεχής είναι κατάλληλη τόσο για πρωτογενείς, όσο και για δευτερογενείς μεταβολίτες)
- Αναστολή υποστρώματος ή υψηλής συγκέντρωσης προϊόντος? Αν συμβαίνει ένα από τα δύο, τότε ίσως προτιμηθεί μια ασυνεχή ζύμωση με τροφοδοσία ή μια συνεχή ζύμωσης, αντί μιας ασυνεχούς
- Πιθανότητα επιμολύνσεων και ασηπτικές συνθήκες? Εάν υπάρχει κίνδυνος επιμόλυνσης, η συνεχής ζύμωση είναι πολύ πιο ευάλωτη
- Οι βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης βιομάζας συμπίπτουν με αυτές για την παραγωγή προϊόντος? Αν όχι, ίσως προτιμηθεί μια ζύμωσης δύο σταδίων (με διαφορετική θερμοκρασία, ή pH, ή αερισμό ή ανάδευση για τη βελτιστοποίηση χωριστά κάθε σταδίου).
- Αξία προϊόντος και μέγεθος βιοαντιδραστήρων? Οι φαρμακευτικές ουσίες που έχουν μεγάλη αξία, παράγονται σε μικρομεσαίους βιοαντιδραστήρες, και συνήθως σε ασυνεχή ζύμωση ή ασυνεχή με τροφοδοσία. Οι πολύ φτηνές ουσίες (π.χ. συστατικά τροφίμων) πρέπει να παραχθούν είτε σε μεγάλου όγκου βιοαντιδραστήρες, είτε με συνεχή ζύμωση, ώστε να είναι συμφέρουσα η παραγωγή (αύξηση παραγωγικότητας σε συνεχή ζύμωση).

# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## ΤΥΠΟΙ ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΩΝ

Βιοαντιδραστήρες υγρής (submerged) ή στερεάς (solid state) ζύμωσης

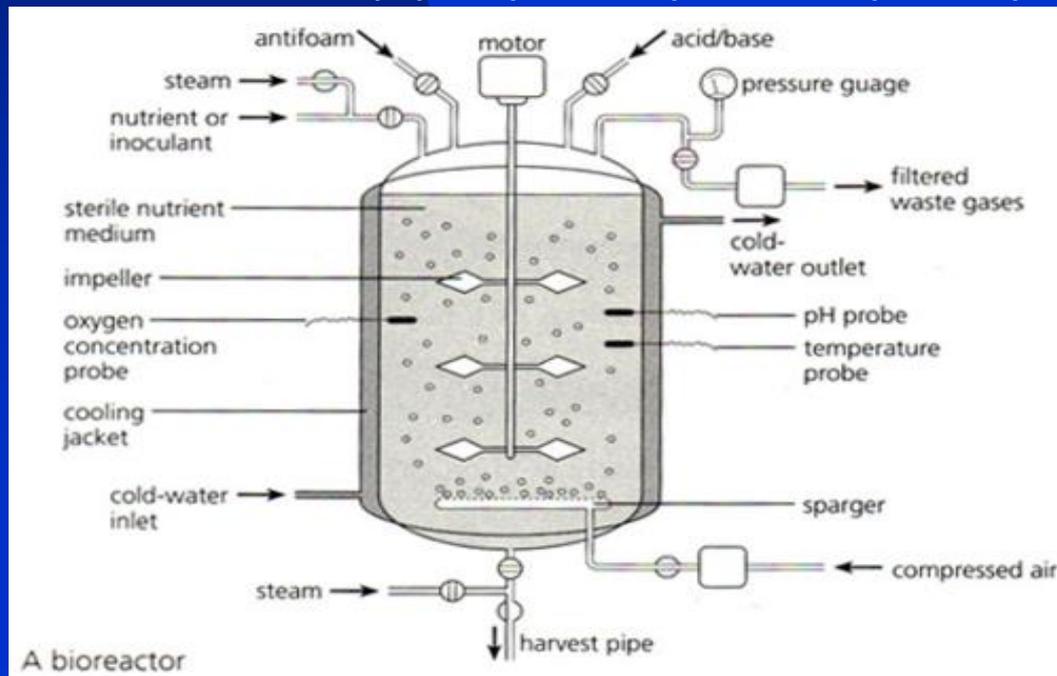
- Βιοαντιδραστήρας αναδευόμενης δεξαμενής (stirred tank reactor-STR)
- Βιοαντιδραστήρας με εξωτερική ή εσωτερική ανακύκλωση αέρα και υποστρώματος (air-lift reactor)
- Βιοαντιδραστήρας μεμβρανών διαχωρισμού βιομάζας-προϊόντος ή ενζύμου-προϊόντος (για βιοκατάλυση)
- Βιοαντιδραστήρας ρευστοστερεάς κλίνης (fluidized bed reactor) (για βιοκατάλυση ή επεξεργασία αποβλήτων)
- Φωτοβιοαντιδραστήρας
- Βιοαντιδραστήρας στερεάς ζύμωσης



# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ-ΚΥΡΙΑ ΜΕΡΗ ΕΝΟΣ ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑ STR (stirred tank reactor)

- Σύστημα ανάδευσης (ρότορας και αναδευτήρες)
- Σύστημα αερισμού και ρύθμισης διαλυτού οξυγόνου
- Σύστημα εισόδου και εξόδου υποστρώματος, προϊόντος, οξέων, βάσεων, κλπ (με αντλίες)
- Σύστημα εισόδου και εξόδου αερίων (αέρας, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, N)
- Σύστημα ρύθμισης pH, θερμοκρασίας, διαλυτού οξυγόνου
- Σύστημα αντιαφρισμού
- Σύστημα on-line παρακολούθησης-έλεγχου παραμέτρων
- Κατάλληλος για όλα τα είδη μικροβιακής ζύμωσης
- Πλεονεκτεί σε ότι αφορά την έντονη ανάδευση υποστρώματος

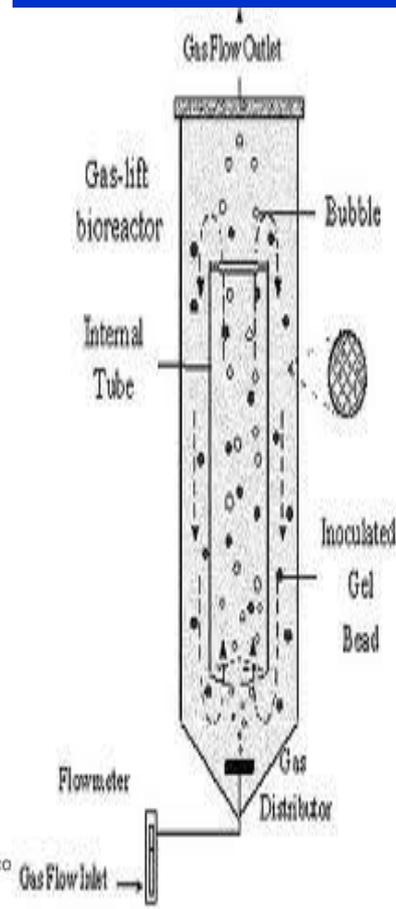
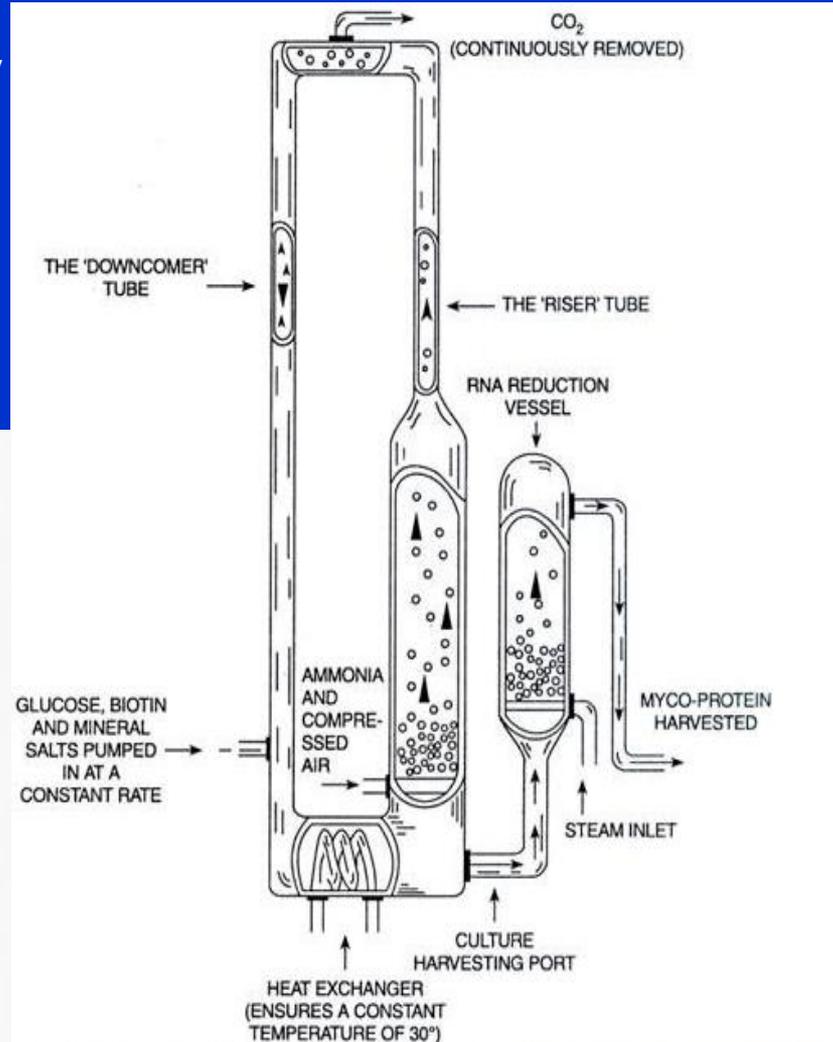


# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## ΤΥΠΟΙ ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΩΝ

Βιοαντιδραστήρας ανοδικού ρεύματος αέρα, με εξωτερική/εσωτερική ανακύκλωση αέρα-υποστρώματος (air-lift reactor)

- Έντονος αερισμός, χωρίς μηχανική ανάδευση
- Η ανάδευση οφείλεται στην είσοδο πεπιεσμένου αέρα στον πυθμένα και την ανακύκλωση του υγρού ζύμωσης με τη βαρύτητα
- Κατάλληλος για μύκητες, που είναι αερόβιοι κι ευαίσθητοι σε έντονη διατμητική τάση (shear stress)
- Εφαρμογή: Μυκοπρωτεΐνη



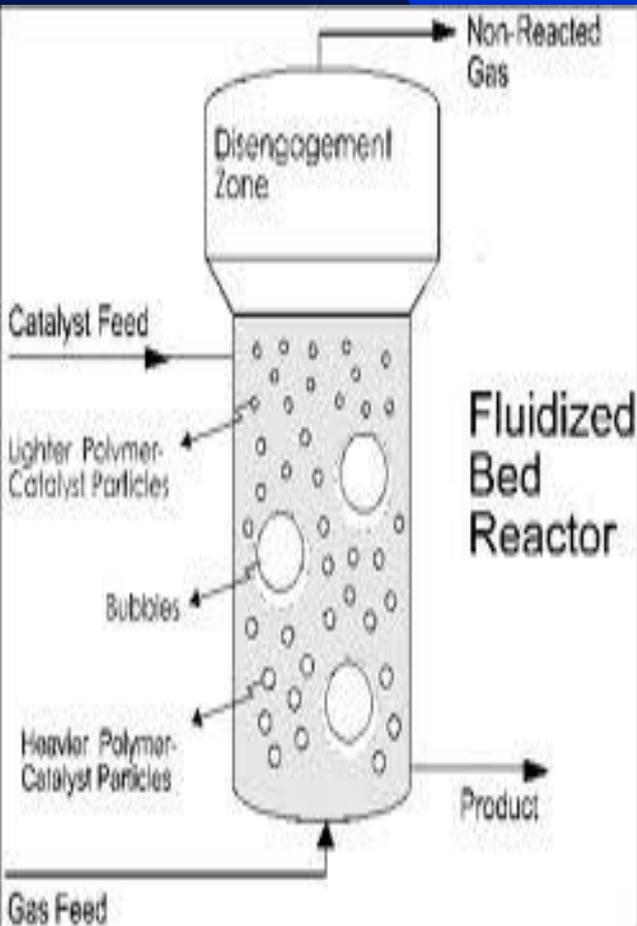
A schematic diagram of the air-lift fermenter used by Marlow Foods, U.K. for the production of myco protein Quorn in continuous flow culture.

# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

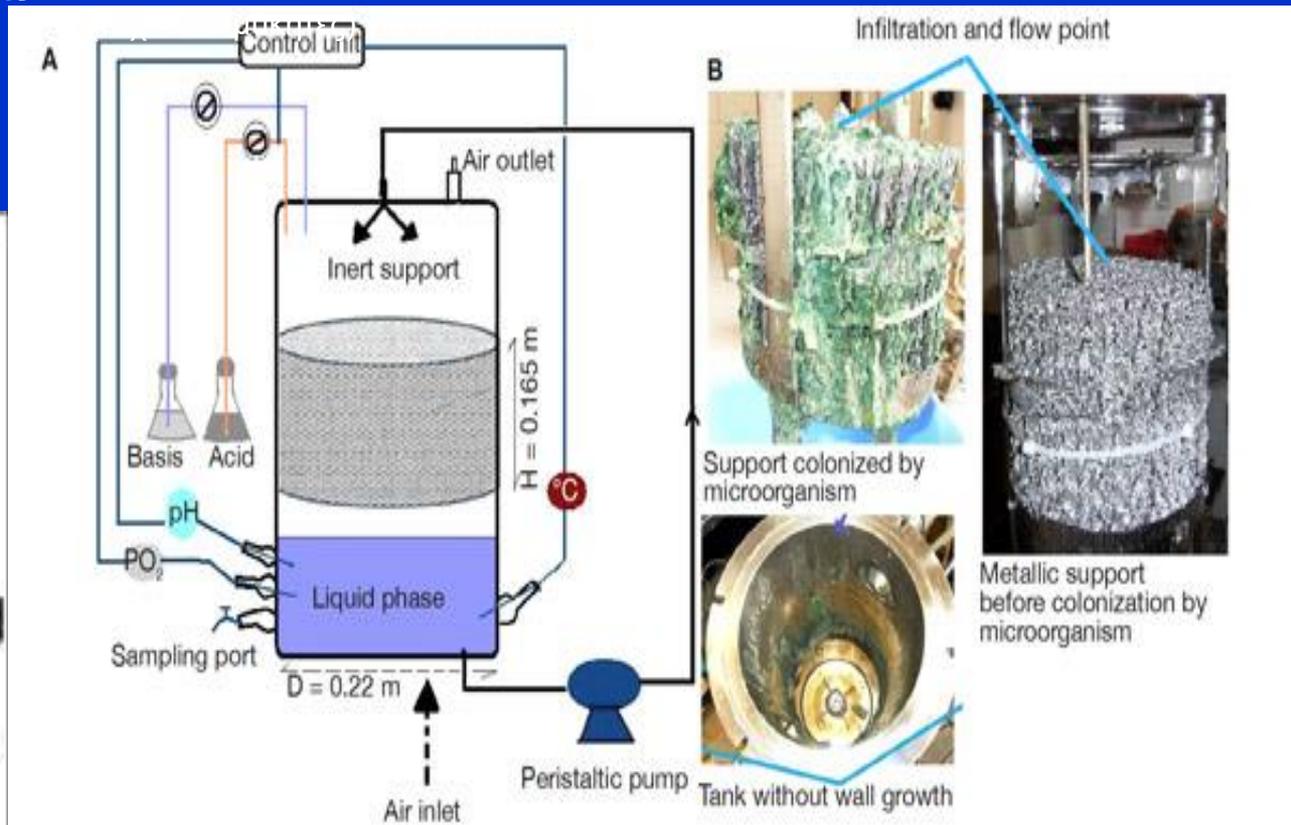
## ΤΥΠΟΙ ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΩΝ

### Βιοαντιδραστήρας ρευστοστερεάς κλίνης (fluidized bed reactor)

με προσθήκη πολυμερικού υλικού (π.χ. πολυσακχαρίτες) όπου εγκλωβίζονται ακινητοποιημένα ένζυμα/κύτταρα για εφαρμογές βιοκατάλυσης



### Biofilm bioreactor (Βιοαντιδραστήρας ρευστοστερεάς κλίνης με σχηματισμό βιοφίλμ)



**Figure 3.** Scheme of a bioreactor used in biofilm fermentation and illustration of the biomass accumulated on support bioreactors with biofilm fermentation of *Trichoderma harzianum* — Schéma d'un bioréacteur utilisé en culture à biofilm avec support inerte et illustration de la biomasse formée en culture submergée et biofilm.

**A:** Biofilm bioreactor with inert support adapted form a mechanically stirred tank to which an inert support can be added and medium circulated in system during fermentation — bioréacteur à biofilm avec système de circulation du milieu aspergé sur le garnissage métallique structuré; **B:** biomass accumulated on an inert support and an empty one — incrustation de biomasse dans le garnissage métallique structuré et un autre sans dépôt.

# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

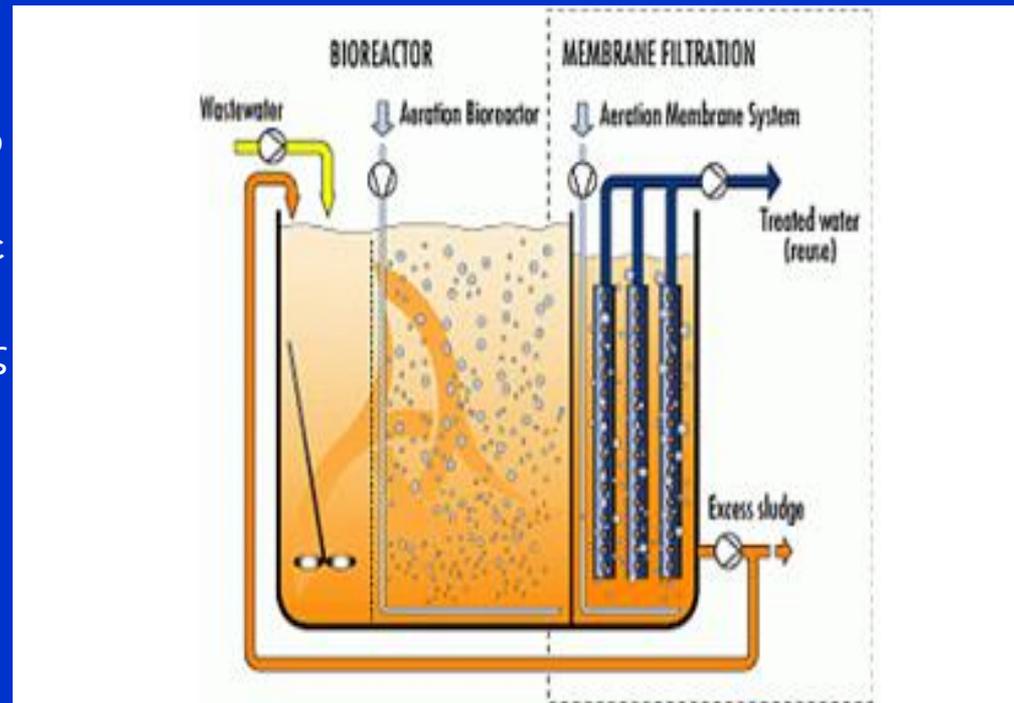
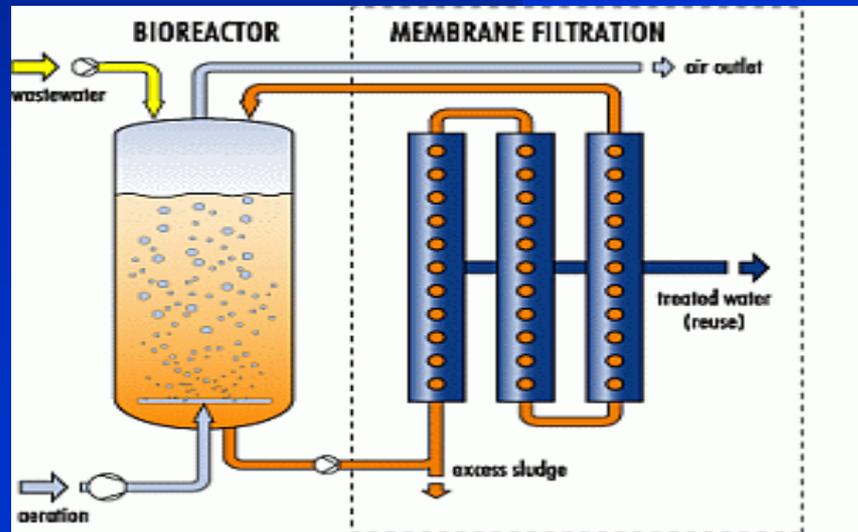
## ΤΥΠΟΙ ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΩΝ

Βιοαντιδραστήρας με εσωτερικό ή εξωτερικό σύστημα μεμβρανών διαχωρισμού βιομάζας-προϊόντος ή ενζύμου προϊόντος για εφαρμογές βιοκατάλυσης

- Υπάρχει ήπια ανάδευση και διάχυση υποστρώματος

Μέσω των μεμβρανών (φίλτρων)

- Τα ένζυμα/κύτταρα ακινητοποιούνται στα φίλτρα και μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν
- Είναι εύκολος ο καθαρισμός του προϊόντος
- Το μέγεθος πόρων των φίλτρων είναι κατάλληλο ώστε να περνάει επιλεκτικά το προϊόν
- Μειονέκτημα/περιορισμός: κορεσμός φίλτρων με συνέπεια να μειώνεται η διαπερατότητα & απόδοση
- Εκτός από την παραγωγή προϊόντων κατάλυσης Χρησιμεύει και στην επεξεργασία αποβλήτων



Membrane Bioreactor

Triqua. SubTriq<sup>®</sup> for the treatment of household and well degradable wastewater. URL:

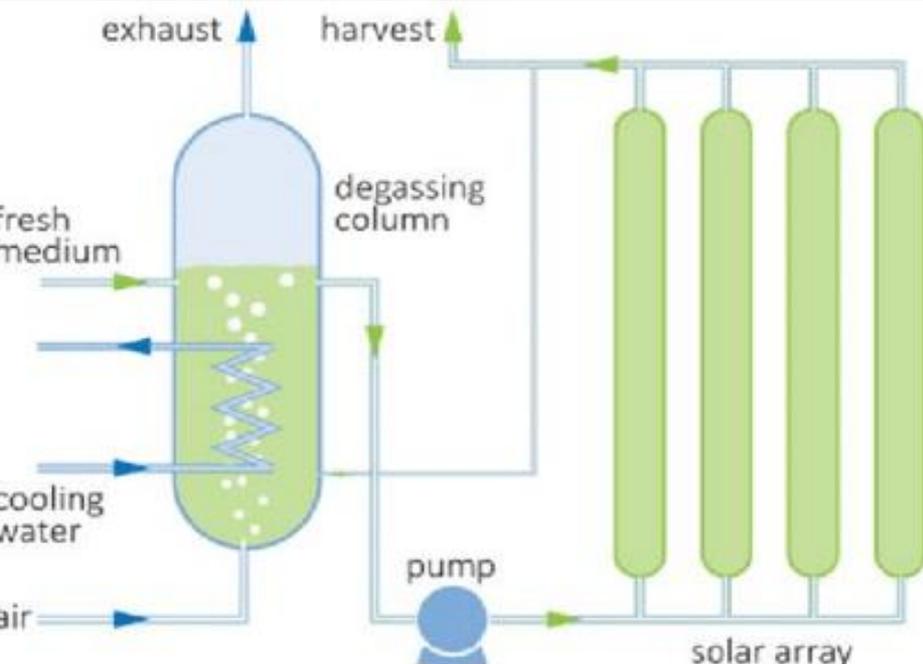
[http://www.triqua.eu/Triqua/fs3\\_site.nsf/htmlViewDocuments/C679E5A29C032314C12573D00043C20E](http://www.triqua.eu/Triqua/fs3_site.nsf/htmlViewDocuments/C679E5A29C032314C12573D00043C20E)

# Βιοτεχνολογία Τροφίμων- Βιομηχανική Μικροβιολογία

## ΤΥΠΟΙ ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΩΝ

Φωτοβιοαντιδραστήρας με χρήση ηλιακού φωτός

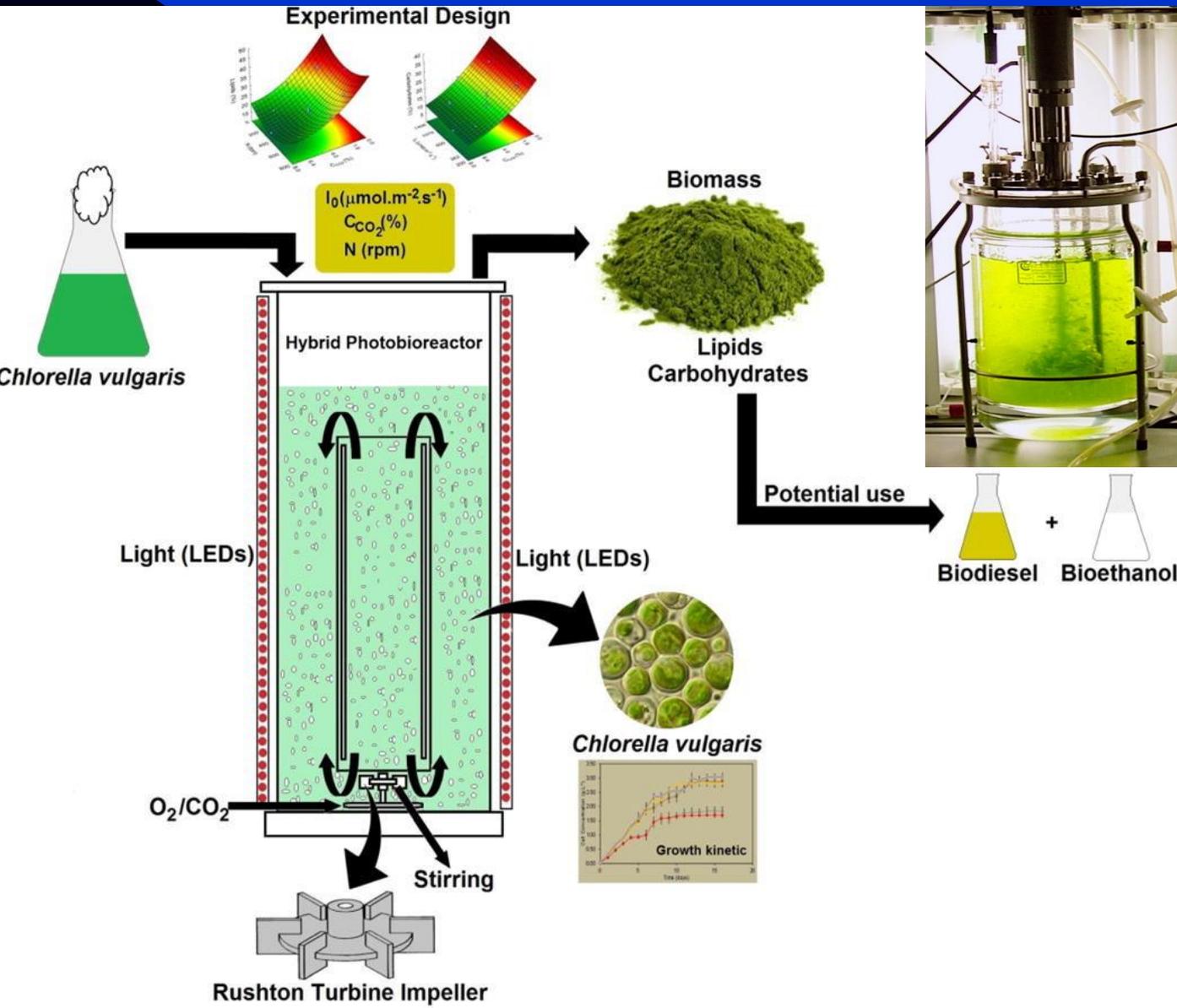
- Κατάλληλος για καλλιέργεια άλγερων και φωτοσυνθετικών βακτηρίων (κυανοβακτήρια, ροδοβακτήρια, κλπ)
- Η ανάδευση επιτυγχάνεται με αντλίες που ανακυκλοφορούν το νερό
- Θρεπτικά συστατικά υποστρώματος: Ανόργανη πηγή άνθρακα ( $\text{CaCO}_3$ ), άλατα μετάλλων.
- Σημαντικός παράγοντας παραγωγικότητας: ηλιοφάνεια
- Χρήσεις: παραγωγή πρωτεΐνης από *Spirulina*, *Chlorella*, χρωστικών από άλγη, καλλιέργεια άλγης ως τροφή/ζωοτροφή, παραγωγή μικροβιακού λίπους για τρόφιμα/biodiesel



# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## ΤΥΠΟΙ ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΩΝ

Εργαστηριακός Φωτοβιοαντιδραστήρας με χρήση λαμπτήρων UV

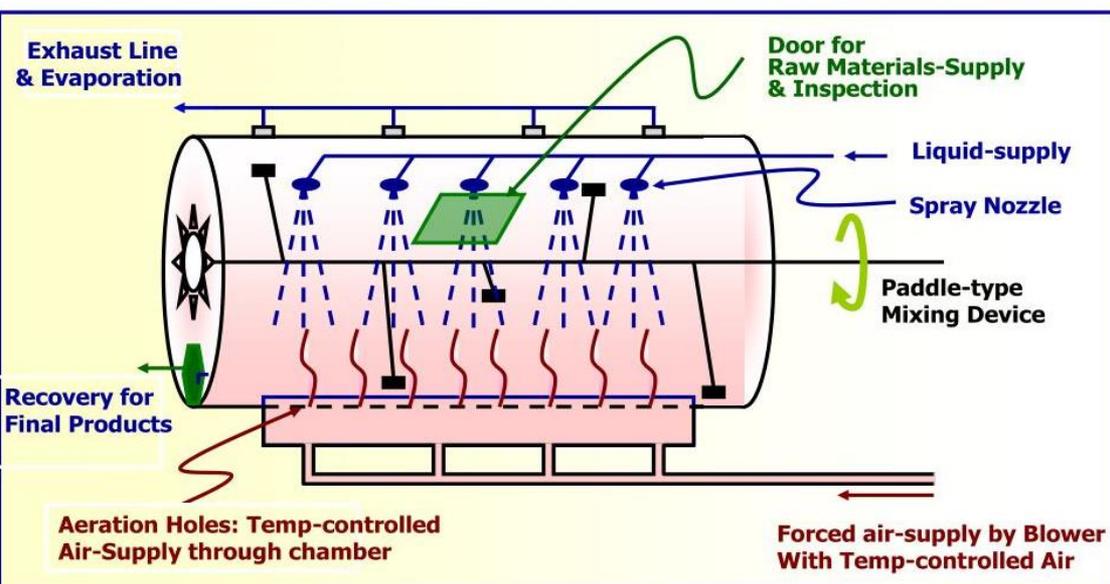


# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## ΤΥΠΟΙ ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΩΝ

- Περιστρεφόμενος Βιοαντιδραστήρας στερεάς ζύμωσης
- Κατάλληλος για παραγωγή μεθανίου (βιοαέριου) από στερεά αγροτικά υποπροϊόντα, επεξεργασία στερεών αποβλήτων, παραγωγή ενζύμων σε στερεό υπόστρωμα (π.χ. κυτταρινάσες), κλπ.
- Με σύστημα ελέγχου θερμοκρασίας και δυνατότητα ψεκασμού με νερό/θρεπτικό διάλυμα

## Design of Solid-state Fermentor



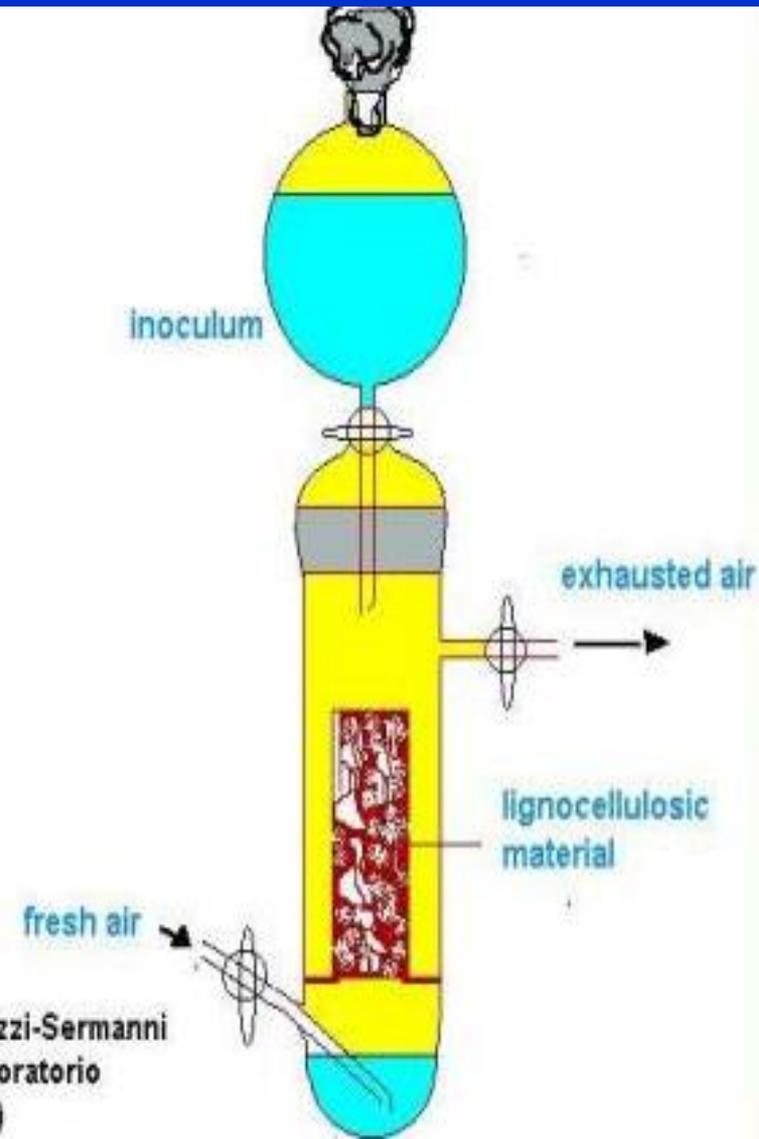
# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## ΤΥΠΟΙ ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΩΝ

- Βιοαντιδραστήρας στερεάς ζύμωσης με δίσκους (tray bioreactor)
- Απουσία ανάδευσης, στατική ζύμωση (πιο αργή) σε σχέση με την αναδευόμενη στερεή ζύμωση
- Απλή λειτουργία με λιγότερες ρυθμίσεις

SSF (Maize crop)

AgSF (Agar media)



G Giovannozzi-Sermanni  
Attualita' laboratorio  
5, 8-11 (1959)

# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## Επιλογή βιοαντιδραστήρα

Απαιτούνται γνώσεις βιοχημείας, μηχανικής, μικροβιολογίας

- Πλεονεκτήματα/μειονεκτήματα βιοαντιδραστήρων ανάλογα με ανάγκες της βιοδιεργασίας:
  - - **ανάγκες αερισμού (vvm)**: Καλύτερος αερισμός είτε σε STR, είτε σε air-lift reactor
    - **ανάγκες ανάδευσης (rpm)**: ανάλογα με το ιξώδες του υγρού ζύμωσης και την αντοχή κυττάρων στην ανάδευση. Καλύτερη, έντονη ανάδευση σε STR, πιο ήπια ανάδευση με air-lift reactor κατάλληλη για ευαίσθητα στην μηχανική θραύση κύτταρα και μυκήλια μυκήτων, ελάχιστη ανάδευση με Fluidized Bed reactor ή Bubble column reactor, ή Membrane reactor
    - **ανάγκη άμεσης μεταφοράς μάζας και ελέγχου θερμοκρασίας** υγρού ζύμωσης: καλύτερη μεταφορά μάζας-θερμότητας και καλύτερος έλεγχος σε STR
    - **ανάγκες συσσωμάτωσης ή παρουσίας ελεύθερων κυττάρων**: καλή πρόληψη συσσωμάτωσης και εναιώρηση κυττάρων σε STR, ενώ ευνοείται η συσσωμάτωση ακινητοποιημένων κυττάρων σε Fluidised Bed/Packed Bed/Membrane reactor
    - **ανάγκες ελέγχου pH και πρόληψης αφρισμού**: καλύτερος έλεγχος pH σε STR, περισσότερος αφρισμός σε υψηλή ταχύτητα ανάδευσης σε STR ή σε έναν βιοαντιδραστήρα air-lift reactor.

# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

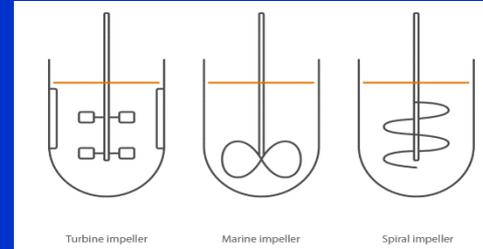
## Επιλογή βιοαντιδραστήρα

- Τύποι βιοαντιδραστήρων:
  - <https://www.youtube.com/watch?v=fQOzHC828aM>
  - <https://www.youtube.com/watch?v=B7LfT7BIYSQ>
- Single Use Bioreactors : <https://www.youtube.com/watch?v=QGq9XOdNdYg>
- Βιομηχανικοί Βιοαντιδραστήρες: <https://www.youtube.com/watch?v=iTVbqcHvpmg>
- STR Fermenter controller: <https://www.youtube.com/watch?v=Y4HTiXTuPno>
- Industrial bioreactor-bioprocessing facility: <https://www.youtube.com/watch?v=uZUnd1OSXck>

# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## ΒΗΜΑΤΑ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ ΚΑΙ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ :

- (α) Επιλογή κατάλληλου μικροοργανισμού / κυττάρων για την κάθε ζύμωση
- (β) Επιλογή βιοαντιδραστήρα ανάλογα με το προϊόν, το βιοκαταλύτη, το είδος του υποστρώματος, τις ανάγκες λειτουργίας κάθε βιοδιεργασίας (ανάδευση, αερισμός, μεταφορά μάζας, θερμότητας, ύπαρξης ακινητοποιημένων βιοκαταλυτών, κλπ)
- (γ) Επιλογή συστήματος ανάδευσης (turbines) και αερισμού
- (δ) Επιλογή τρόπου λειτουργίας βιοαντιδραστήρα:
  - Ζύμωση συνεχής/ασυνεχής/ημισυνεχής με τροφοδοσία/δύο σταδίων
  - (ε) Συλλογή δεδομένων μέσω controller για μοντελοποίηση ζύμωσης (ρυθμός ανάπτυξης, ρυθμός παραγωγής, απόδοση, συντελεστής μεταφοράς μάζας, κλπ)
- (στ) Βελτιστοποίηση της ζύμωσης μέσω scale-up βιοδιεργασιών από μικρούς σε μεγάλους όγκους : από εργαστηριακής κλίμακας, σε πιλοτικής κλίμακας και έπειτα σε βιομηχανικής κλίμακας βιοαντιδραστήρες (επικρατούν διαφορετικές συνθήκες μεταφοράς μάζας-θερμότητας και ανάδευσης-αερισμού σε κάθε κλίμακα).
- (ζ) Επιλογή βιοκαταλύτη για περιπτώσεις βιοκατάλυσης: ένζυμα σε διασπορά (ελεύθερα) / ένζυμα ακινητοποιημένα / κύτταρα ακινητοποιημένα [για απλές βιομετατροπές μπορεί να χρησιμοποιηθούν ελεύθερα ένζυμα, αλλά η ακινητοποίηση, αν και έχει ένα επιπλέον κόστος, έχει αρκετά πλεονεκτήματα]



Η ακινητοποίηση ενζύμων/κυττάρων συνεπάγεται συνήθως:

- συνεχή βιοδιεργασία και αύξηση ρυθμού παραγωγής με αύξηση συγκέντρωσης βιοκαταλύτη
- επαναχρησιμοποίηση βιοκαταλύτη
- εύκολος καθαρισμός προϊόντος, καθώς δεν αναμιγνύεται με τον βιοκαταλύτη
- προστασία ενζύμου από μετουσίωση και πιο αργή μείωση δραστηριότητας με το χρόνο

# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## Κινητική (ασυνεχών) μικροβιακών ζυμώσεων

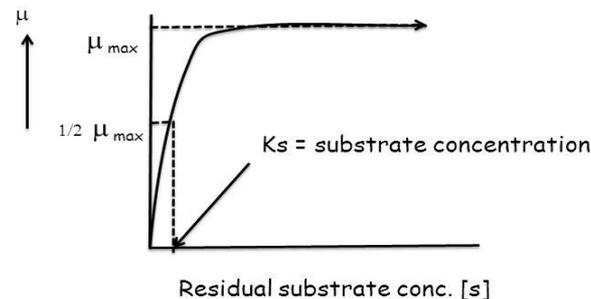
- Σημαντικές κινητικές παράμετροι της ανάπτυξης μ/ών:
- Ρυθμός ανάπτυξης κυττάρων (βιομάζας) ή growth rate: biomass/time (B/t) ή  $dC_b/dt$  (g/l/h)
- Ρυθμός παραγωγής προϊόντος (Productivity ή production rate): Product/time (P/t) ή  $dC_p/dt$  (g/l/h)
- Απόδοση Yield,  $Y=dC_p/dC_s$ , ή  $Y=P/S$  (προϊόν που παράχθηκε/υπόστρωμα που καταναλώθηκε)
- Ειδικός ρυθμός ανάπτυξης  $\mu$  ( $h^{-1}$ ) =  
 $C$  biomass/Growth rate = (g/l)/(g/l/h)
- $V$ : ταχύτητα αύξησης (κυττάρων)
- Εξίσωση Monod:  $\mu = \frac{\mu_{max} C_s}{K_s + C_s}$
- $C_s$  (ή  $S$ ): συγκέντρωση υποστρώματος  
 $K_s$ : σταθερά της αντίδρασης
- $K_s=C_s$ , όταν  $\mu=\mu_{max}/2$
- Η παραπάνω εξίσωση, μας επιτρέπει να υπολογίσουμε τη βέλτιστη συγκέντρωση υποστρώματος, ώστε να πετύχουμε τον Μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης  $\mu_{max}$
- Η εξίσωση Monod περιγράφει την κινητική ζυμώσεων όταν η συγκέντρωση υποστρώματος δεν αναστέλλει την κυτταρική αύξηση
- $\uparrow C_s \Rightarrow \uparrow \mu$ , μέχρι ένα σημείο!

$$Vn = \frac{dCn}{dt} = \mu Cn \Rightarrow \mu = \frac{dCn}{Cn} * \frac{1}{dt}$$

### Batch culture: Growth Kinetics

During log phase growth reaches maximum (max)  
After depletion of substrate, growth rate decreases and finally ceases

$$\mu = \frac{\mu_{max} s}{(K_s + s)} \quad \mu = \text{specific growth rate}$$



# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## Κινητική μικροβιακών ζυμώσεων

### ΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟΤΗΤΑ ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑ

#### ■ Μοντέλο Luedeking-Piret

$$\frac{dp}{dt} = a * \frac{dB}{dt} + \beta * B \quad \leftarrow \text{Ρυθμός παραγωγής προϊόντων από μη αναπτυσσόμενα κύτταρα}$$

Ρυθμός παραγωγής προϊόντων από αναπτυσσόμενα κύτταρα

- Περιγράφει το βαθμό συνεισφοράς των αναπτυσσόμενων και των στάσιμων κυττάρων στην παραγωγικότητα προϊόντος (που είναι διαφορετική, ανάλογα με το αν πρόκειται για παραγωγή πρωτογενή η δευτερογενή μεταβολίτη)
- Εξίσωση μετατροπής υποστρώματος σε κύτταρα και προϊόν: δείχνει προς ποια κατεύθυνση αξιοποιείται το υπόστρωμα (είτε για παραγωγή βιομάζας, είτε για παραγωγή προϊόντος).

$$-\frac{ds}{dt} = \frac{1}{Y_{B/S}} \left( \frac{dB}{dt} \right) = \frac{1}{Y_{P/S}} \left( \frac{dP}{dt} \right)$$

- Σημαντικό, ειδικά για παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών, όπου θέλουμε πολύ προϊόν και λίγη σχετικά βιομάζα
- Απόδοση σε Βιομάζα  $Y(B)=dB/dS$  συγκέντρωση βιομάζας ανά υπόστρωμα που καταναλώθηκε
- Απόδοση σε Προϊόν  $Y(P)=dP/dS$  συγκέντρωση προϊόντος ανά υπόστρωμα που καταναλώθηκε

# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## Παραγωγή θερμότητας κατά τη μικροβιακή ζύμωση

- Οι μικροοργανισμοί παράγουν θερμότητα λόγω εξώθερμων αντιδράσεων του μεταβολισμού Η λειτουργία της ζύμωσης λόγω μηχανικής ανάδευσης δημιουργεί τριβή και αύξηση θερμοκρασίας
- Η διάσπαση του υποστρώματος μπορεί επίσης να απελευθερώσει ενέργεια
- Για να είναι σταθερή η θερμοκρασία του υγρού ζύμωσης απαιτείται συνήθως ήπια ψύξη (με κυκλοφορία κρύου νερού στα εξωτερικά τοιχώματα του βιοαντιδραστήρα)
- Από την άλλη, αν η θερμοκρασία δεν διατηρείται σταθερή, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέτρο ανάπτυξης της βιομάζας (έντονη ανάπτυξη συνεπάγεται μεγάλη αύξηση θερμοκρασίας)
- Ο υπολογισμός της εξώθερμης ενέργειας (θερμότητας)  $\Delta H(s)$  που παράγεται μας επιτρέπει να υπολογίσουμε και τις απαιτήσεις ψύξης ενός βιοαντιδραστήρα.

### Batch Growth

#### Heat generation by microbial growth

For actively growing cells, the maintenance requirement is low, and \_\_\_\_\_ is directly related to \_\_\_\_\_.

The heat of combustion of the substrate is equal to the sum of the metabolic heat and the heat of combustion of the cellular material.

$$\frac{\Delta H_s}{Y_{X/S}} = \Delta H_c + \frac{1}{Y_H}$$

$\Delta H_s$  is the heat of combustion of the substrate (kJ/g substrate)

$Y_{X/S}$  is the cell mass yield per substrate consumption (g cell/g substrate)

$\Delta H_c$  is the heat of combustion of cells (kJ/g cells)

$\frac{1}{Y_H}$  is the metabolic heat evolved per gram of cell mass produced (kJ/g cells)

### Batch Growth Kinetics

#### Heat generation by microbial growth

Re-arrange the above equation:

$$\frac{1}{Y_H} = \frac{\Delta H_s}{Y_{X/S}} - \Delta H_c$$

The total rate of heat evolution in a batch fermentation  $Q_{GR}$  is

$$Q_{GR} = V_L \mu_{net} X \frac{1}{Y_H} \quad (\text{kJ/h})$$

$X$  is the cell mass concentration (g/l);  $V_L$  is the liquid volume (l)

Heat removal: by circulating cooling water through a cooling coil or cooling jacket in the fermentation.

# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## Κινητική συνεχούς ζύμωσης

■ Σημαντικός παράγοντας: τιμή D (dilution rate) ή ρυθμός αραιώσης

• Στο δοχείο C της ζύμωσης: επιλογή σταθερού λόγου αραιώσεως

$$D = \frac{\text{ροή εισόδου υποστρώματος}}{\text{όγκος δοχείου C}} = \frac{\text{ml/h}}{\text{ml}} = \text{h}^{-1}$$

(ταχύτητα αλλαγής βιομάζας σε συνεχή καλλιέργεια) = (ταχύτητα ανάπτυξης στο δοχείο ζύμωσης) – (ταχύτητα εξόδου από το δοχείο ζύμωσης)

$$\frac{dx}{dt} = \mu x - Dx$$

για σταθερή συγκέντρωση βιομάζας:  $\mu x = Dx$

- Υπολογίζοντας τον ρυθμό αραιώσης D σε συνεχή ζύμωση, υπολογίζουμε και τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης  $\mu$  (που θέλουμε να είναι ο βέλτιστος δυνατός, για πρωτογενής μεταβολίτες)
- Συνεχής είσοδος υποστρώματος, συνεχής έξοδος υποστρώματος (+ κύτταρα + προϊόν)
- $\sigma$ : χρόνος παραμονής (retention time)
- Για συνεχή ζύμωση  $\sigma = 1/D$ , ή  $\sigma = 1/\mu$
- Επιδίωξη: μείωση του χρόνου παραμονής ( $\sigma$  ή Tr)
- Παραγωγικότητα συνεχούς ζύμωσης =  $dC(p)/dt$
- Όμως για πολύ χαμηλό tm (ή αλλιώς πολύ υψηλό D) υπάρχει κίνδυνος έκπλυσης κυττάρων (wash out)

# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΚΑΙ ΜΥΚΟΠΡΩΤΕΪΝΗΣ (single cell protein or mycoprotein)

- Αποξηραμένα κύτταρα μ/ο (φύκη, βακτήρια, ζύμες, πλαγκτόν, μύκητες)
- Στην περίπτωση των μυκήτων αναφέρεται ως mycoprotein
- Εκτός από πρωτεΐνη, και άλλα θρεπτικά συστατικά (σάκχαρα, βιταμίνες, λιπαρά οξέα, άλατα, κλπ)
- Πρόβλημα: παρουσία νουκλεοτιδίων αυξάνει το ουρικό οξύ στο αίμα (μπορεί να αφαιρεθεί)
- Λύση: παραμονή στους 60-65°C  $\Rightarrow$  ενεργοποιεί τις υδρολάσες του RNA (το RNA εκκρίνεται εξωκυτταρικά)
- Πολλαπλασιασμός σε βιοαντιδραστήρα σε αερόβιες συνθήκες με έντονη ανάδευση διήθηση κυττάρων/ φυγοκέντρηση  $\Rightarrow$  ξήρανση βιομάζας
- Π.χ. *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, *Spirulina platensis*, *Chlorella*, *Fusarium venenatum* (Quorn)
- Υποστρώματα: αμυλοσιρόπια, μελάσσα, παραφίνη, αιθανόλη κτλ. +  $\text{NH}_4^+$ , αζωτούχες ενώσεις, άλατα φωσφόρου, καλίου, κλπ.
- Μπορεί να παραχθεί με συνεχή καλλιέργεια με σταθερή συγκέντρωση βιομάζας στο δοχείο



*Fusarium venenatum*



*F. venenatum* mycoprotein

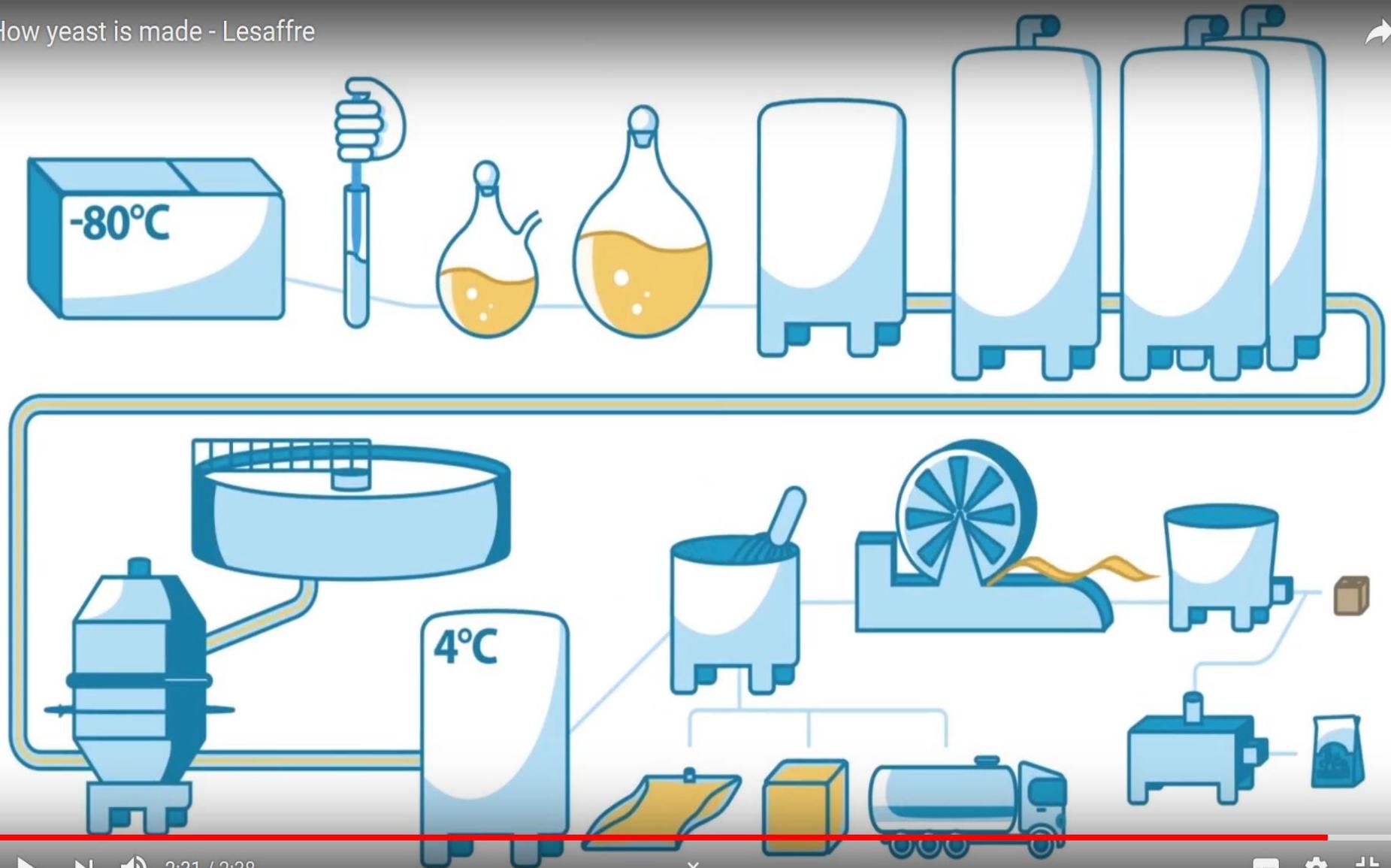


Quorn

# Στάδια Παραγωγής Ζύμης αρτοποιίας

- <https://www.youtube.com/watch?v=PDHb91>

How yeast is made - Lesaffre



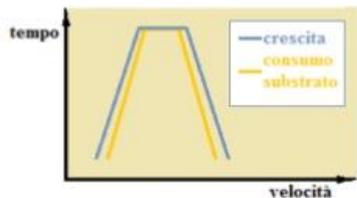
# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΥΚΟΠΡΩΤΕΪΝΗΣ (Mycoprotein)

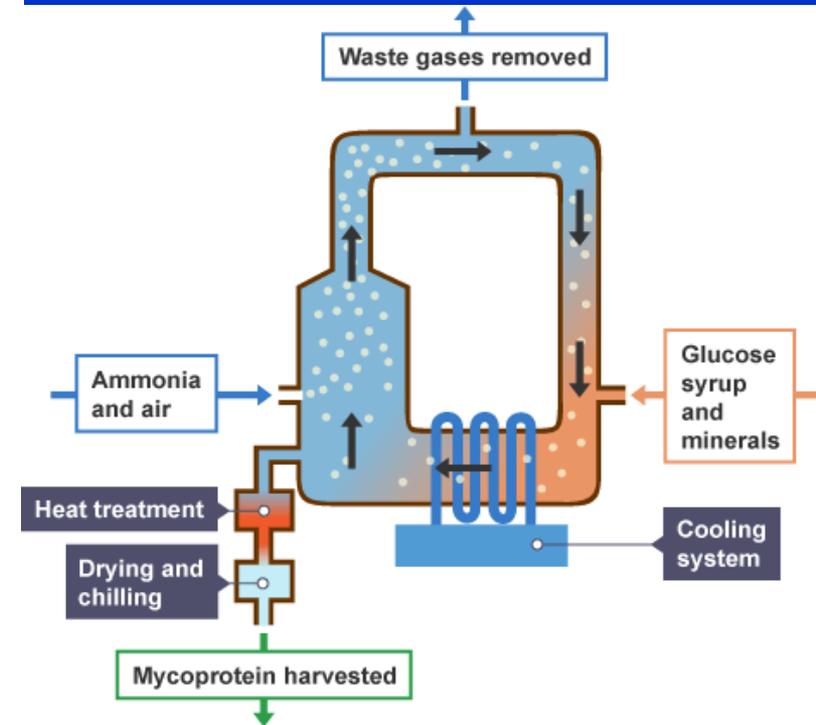
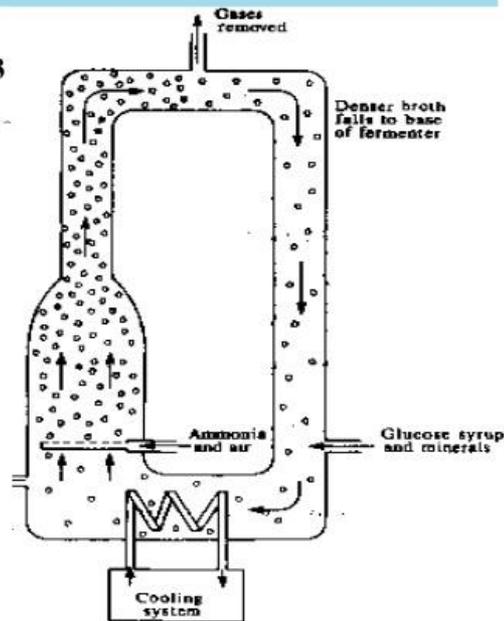
### Fusarium venenatum (Quorn)

#### QUORN® PROCESS

- Fermenter 50 m high/150m<sup>3</sup>
- 1<sup>st</sup> Type Fermentation: phase of interest: log



- continue culture (6/2weeks)
- dilution rate: 0.17-0.2 h<sup>-1</sup>
- biomass [ ]: 10-15 g L<sup>-1</sup>
- loop fermenter: air lift

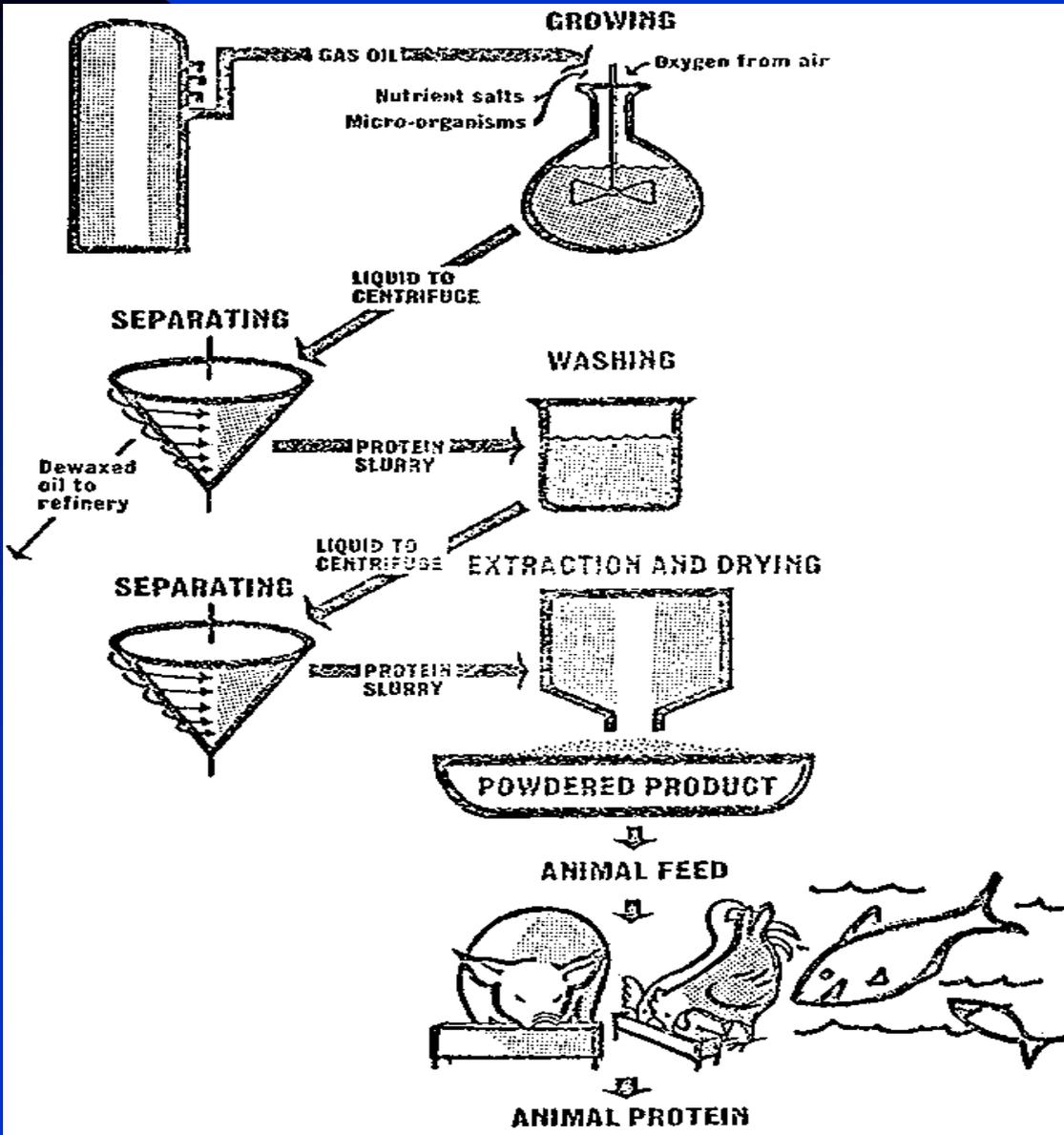


# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ (single cell protein)

■ Παραγωγή SCP για ζωοτροφή

■ Παραγωγή SCP για ανθρώπινη τροφή



# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ (single cell protein)

Σύγκριση διαφορετικών βιοδιεργασιών για παραγωγή SCP

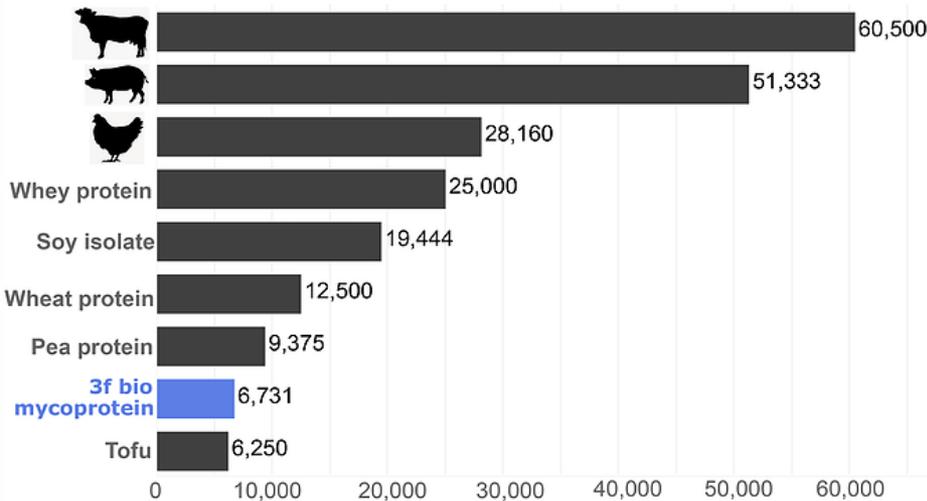
**TABLE 16.15. Some important features of different microorganisms and the SCP produced from them**

<b>Feature</b>	<b>Algae</b>	<b>Bacteria</b>	<b>Yeast</b>	<b>Filamentous fungi</b>
Growth Rate	Low	Highest	Quite high	Lower than bacteria and yeast
Substrate	Light, inorganic carbon sources, <i>e.g.</i> , CO <sub>2</sub> (preferably)	A wide range of substrates	Most substrates, except hydrocarbons and CO <sub>2</sub>	Limited substrates (mostly starchy and cellulosic materials)
pH range	Up to 11	5-7	5-7	3-8
Cultivated in	Open ponds, tanks; in sunlight	Bioreactors	Bioreactors	Bioreactors
Risk of contamination	Serious	High; precautions necessary	Low	Low if grown below pH 5
Biomass recovery	Difficult and costly with unicellular algae	Problematic; improved methods are needed	Easy; by centrifugation	Easy for filamentous or pellet forms
Protein content (crude)	Up to 60%	Up to 80% or more	55-60%	50-55%
Amino acid profile	Generally, good; low in S-containing amino acids	Generally, good; a small deficit in S-containing amino acids	Generally, good; deficit in S-containing amino acids	Low in S-containing amino acids
Nucleic acid content	—	Very high (20% RNA)	High (15% RNA)	High (15% RNA)
Removal of nucleic acids	—	Necessary	Necessary	Necessary
Toxins	—	Gram-bacteria may produce endotoxins	None	Many species produce mycotoxins
Other features	1. Low yield (1-2 g dry wt/l) 2. High chlorophyll content; unsuitable for humans	—	High B-vitamin content	Chitin may contain a significant proportion of N-content, which is unavailable.

# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

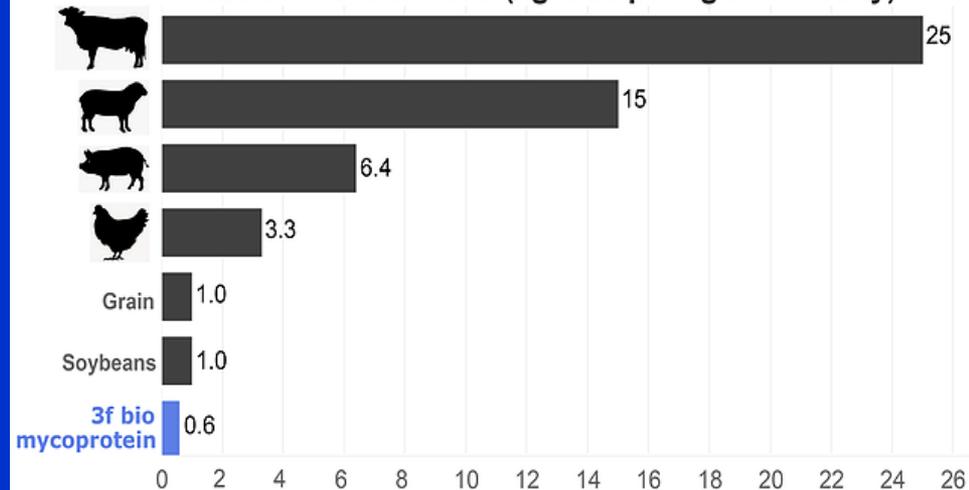
## ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ και ΜΥΚΟΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΆΛΛΕΣ ΠΗΓΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ (ΖΩΙΚΕΣ ΚΑΙ ΦΥΤΙΚΕΣ)

Cost of protein (US\$ per tonne protein)



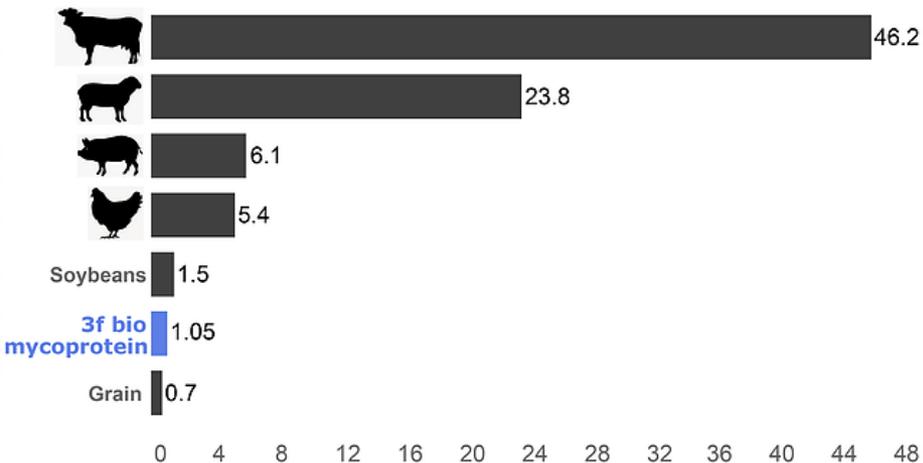
Source: USDA ERS Meat Price Spreads; USDA Nutritional Database; Frost & Sullivan. 'Size, Share, Sources and Segments: Analysis and Forecasts for Value-added Protein Ingredient'; 3f bio Analysis with Biorefinery Economic Validation.

Transformative resource efficiency  
Feed conversion ratio (kg feed per kg commodity)



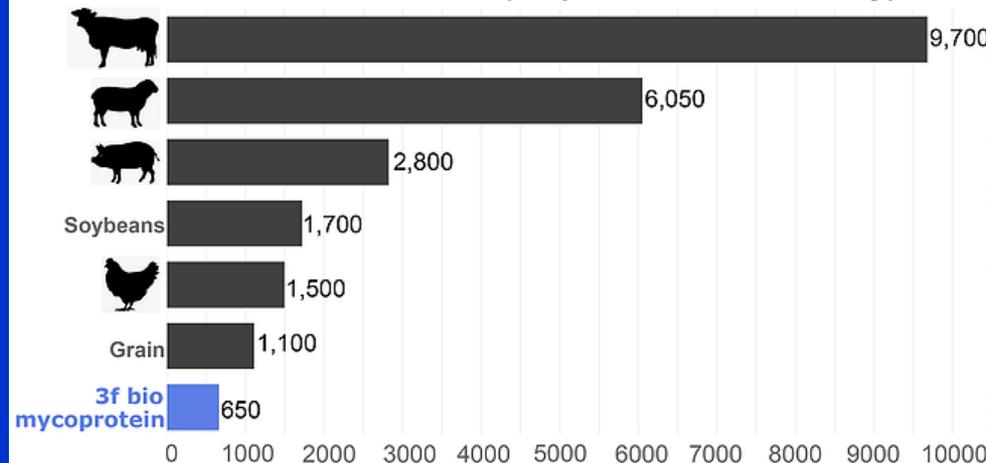
Source: Alexander et al. (2016). 'Human appropriation of land for food: The role of diet.' & 3f bio analysis.

Carbon intensity (kg CO2e per kg commodity)



Source: Gerber, P.J., Steinfeld, H., Henderson, B., Mottet, A., Opio, C., Dijkman, J., Falcucci, A. & Tempio, G. 2013. Tackling climate change through livestock – A global assessment of emissions and mitigation opportunities. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome & 3f bio analysis.

Virtual water use (m<sup>3</sup> per tonne commodity)

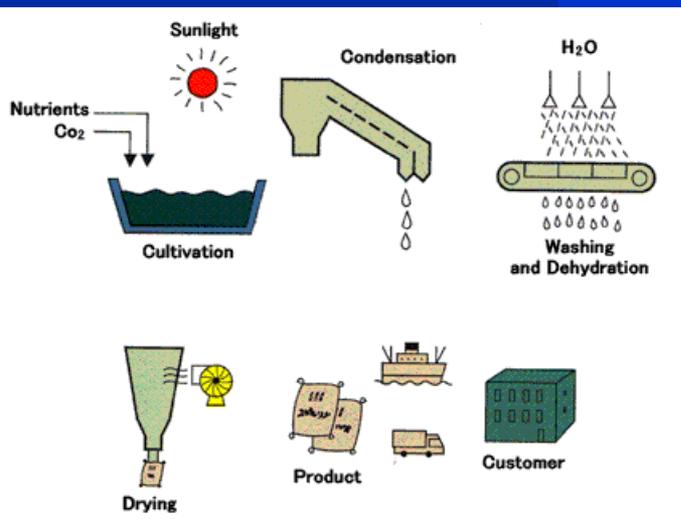
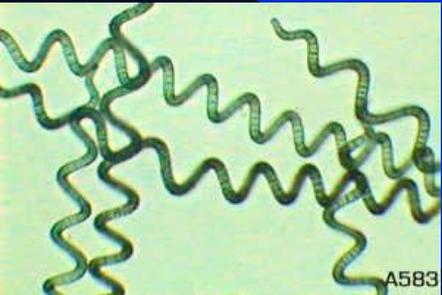


Source: Chapagain, A. K., & Hoekstra, A. Y. (2003). 'Virtual water flows between nations in relation to trade in livestock and livestock products'; & 3f bio analysis.

# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ (single cell protein)

- Καλλιέργεια Σπιρουλίνα : *Spirulina platensis* (*Arthrospira platenis*)
- Φωτοσυνθετικό κυανοβακτήριο, απαιτεί μόνο CO<sub>2</sub>, άζωτο, θερμά νερά και οξυγόνο για να συνθέσει βιομάζα



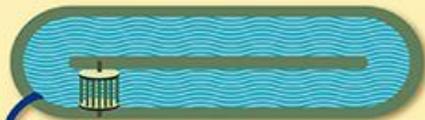
# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ (single cell protein)

■ Καλλιέργεια Σπιρουλίνα

■ Φωτοσυνθετικό κυανοβακτήριο, απαιτεί μόνο CO<sub>2</sub>, άζωτο, θερμά νερά και οξυγόνο για να συνθέσει βιομάζα

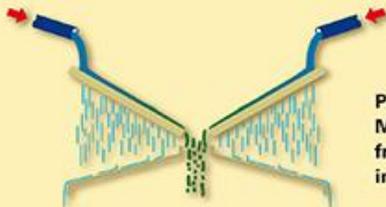
### How Marcus Rohrer Spirulina™ is Harvested



Optimal density after 7 days.  
2/3 of the algae water is pumped off.

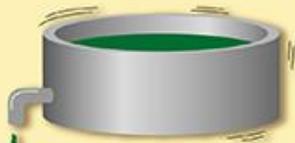


Daily quality controls during the growing period

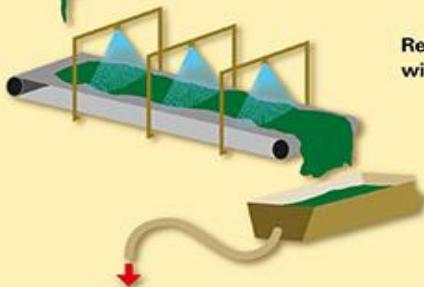


Pre-filtration using sheet sieves.  
Most of the water is separated from the algae and flows back into the basin.

The algae in the basin continue growing.



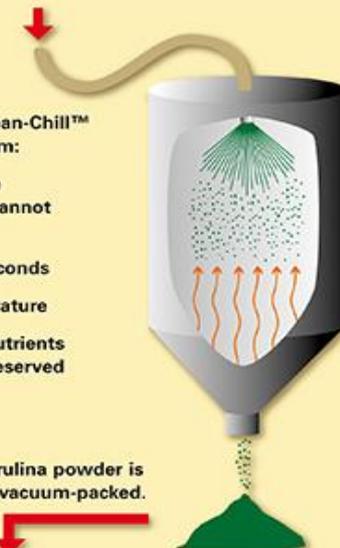
Filtration with fine-mesh oscillating sieves: the remaining water runs off, leaving a firm algae paste.



Repeated rinsing of the algae paste with fresh water.

### Patented Ocean-Chill™ Drying System:

- oxygen-free (nutrients cannot oxidise)
- in just 5 seconds
- low temperature
- essential nutrients are fully preserved



The pure Spirulina powder is immediately vacuum-packed.



### Exclusive to Marcus Rohrer Spirulina™

For maximum freshness, tablets and capsules are custom manufactured directly at the Hawaiian facility.

Storage in VioSol® foil sacks provides optimum protection during transport from Hawaii to Europe.

In Holland: Transferred into VioSol® energy-storage glass.

No loss of quality from source to jar!

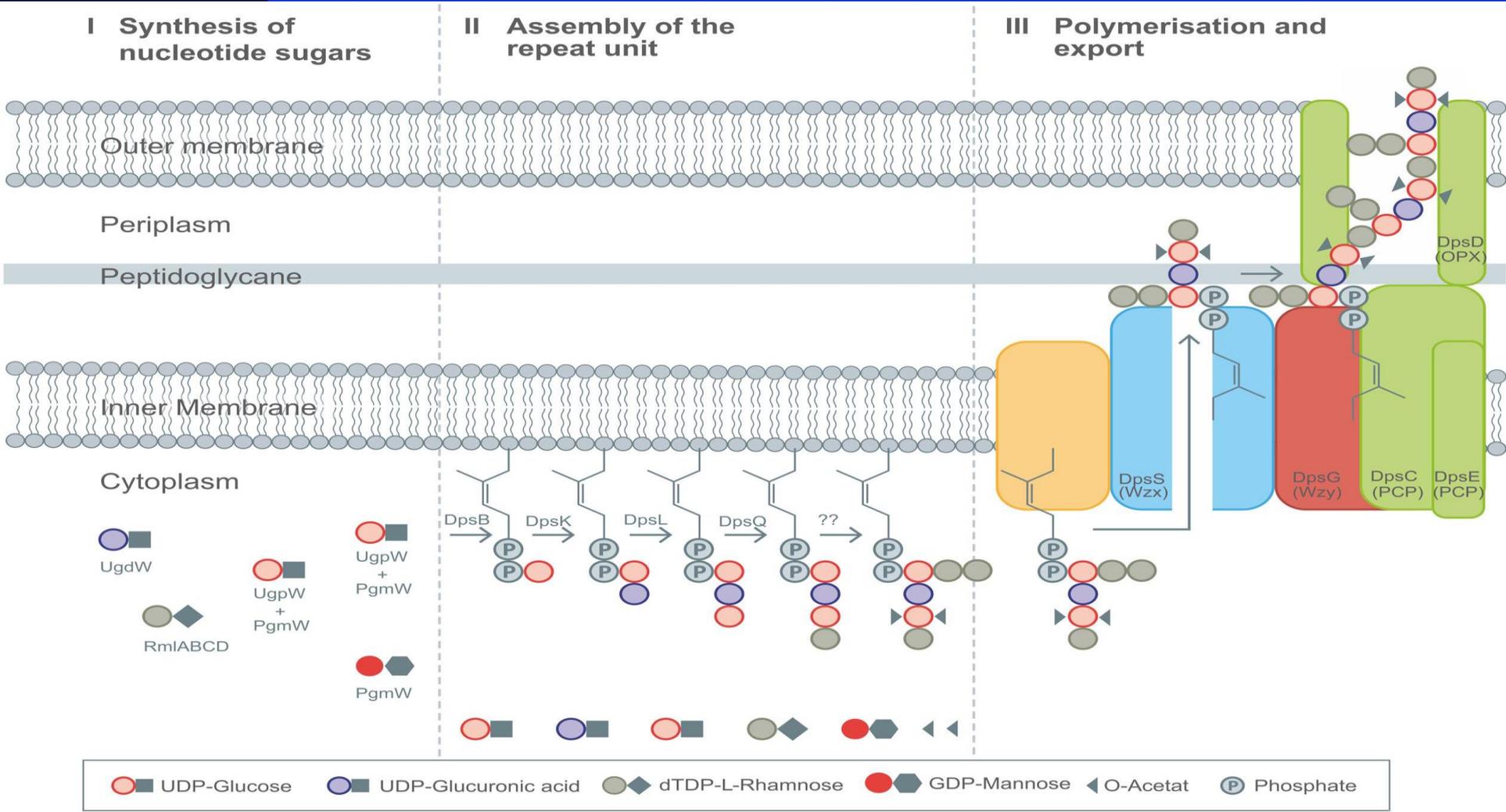
# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ ΚΑΙ ΒΙΟΠΟΛΥΜΕΡΩΝ (BIOPOLYMERS)

- Φυσικοί(πρωτογενείς/δευτερογενείς) μεταβολίτες βακτηρίων, ζυμών, μυκήτων.
- Π.χ. ξανθάνη από *Xanthomonas campestris*, τζελλάνη από *Sphingomonas paucimobilis*, αλγινικό από *Azotobacter vinelandii* (βακτήρια), Πουλουλάνη από *Aureobasidium pullulans*, Scleroglucan από *Sclerotium rolfsii*, Schizophyllan από *Schizophyllum commune* (μύκητες).
- Πολυμερή από κύρια επαναλαμβανόμενη ομάδα ολιγοσακχαρίτη με ή χωρίς πρόσθετες πλευρικές ομάδες οργανικών οξέων, αμινοξέων, ακετυλίου, κτλ.,
- **Κατηγορίες :** ενδο-π/σ ή εξο-π/σ (παραγωγή εντός ή εκτός κυττάρου), ομο-π/σ ή ετερο-π/σ (αποκλειστικά από μόρια ενός σακχάρου ή περιέχουν και άλλα μόρια ή διαφορετικά σάκχαρα)
- **Χρήσεις των π/σ για τα κύτταρα:** πηγή ενέργειας (ενδο-π/σ, εξο-π/σ), δομικά στοιχεία του κυτταρικού τοιχώματος (ενδο-π/σ), μέσο πρόσδεσης σε επιφάνειες και άλλα κύτταρα και δημιουργία προστατευτικού γλυκοκάλυκα έξω από το κυτταρικό τοίχωμα (εξο-π/σ)
- **Βιομηχανικές Χρήσεις :** πηκτικές ουσίες, σταθεροποιητές, υλικά ενθυλάκωσης, ρύθμιση ιξώδους σε τρόφιμα ή για εξόρυξη πετρελαίου, δημιουργία εδώδιμων φιλμ, κλπ
- **Υποστρώματα ζύμωσης:** πηγή C σε υψηλή συγκέντρωση (γλυκόζη, άμυλο, αμυλοσιρόπια, τυρόγαλα, μελάσσα), κάποια πηγή N σε μικρότερη συγκέντρωση (αμμωνιακά άλατα,  $\text{NO}_3^-$ ).
- Σημαντικό να υπάρχει καλή ανάδευση (λόγω υψηλού ιξώδους), και υψηλό λόγος C/N
- **Βιοσύνθεση πολυσακχαριτών:** νουκλεοτίδια-νουκλεοτιδοσάκχαρα μεταφέρουν μονάδες απλών σακχάρων (π.χ. γλυκόζης) μέσω ενός λιπιδικού φορέα στο κυτταρικό τοίχωμα όπου γίνεται ο πολυμερισμός με πολυμεράσες και τυχόν προσθήκη πλευρικών ομάδων, και έπειτα έκκριση από τη μεμβράνη με τη βοήθεια ενζύμων (**λυάσες**)
- Η έκκριση λυασών μειώνει το Μοριακό Βάρος (και τη λειτουργικότητα) των πολυσακχαριτών.

# Βιοσύνθεση πολυσακχαριτών στα κύτταρα

- **Βιοσυνθετική οδός για τη βιοσύνθεση πολυσακχαριτών:** νουκλεοτίδια-νουκλεοτιδοσάκχαρα μεταφέρουν μονάδες απλών σακχάρων (π.χ. γλυκόζης) μέσω ενός λιπιδικού φορέα στο κυτταρικό τοίχωμα όπου γίνεται ο πολυμερισμός με πολυμεράσες και τυχόν προσθήκη πλευρικών ομάδων, και έπειτα έκκριση από τη μεμβράνη με τη βοήθεια ενζύμων (λυάσες)
- Βιοσύνθεση (τζελάνης) σε 3 φάσεις: Σύνθεση νουκλεοτιδίων-σακχάρων, σχηματισμός επαναλαμβανόμενης μονάδας, πολυμερισμός μονάδας σακχάρων (και πλευρικών μορίω) και έκκριση

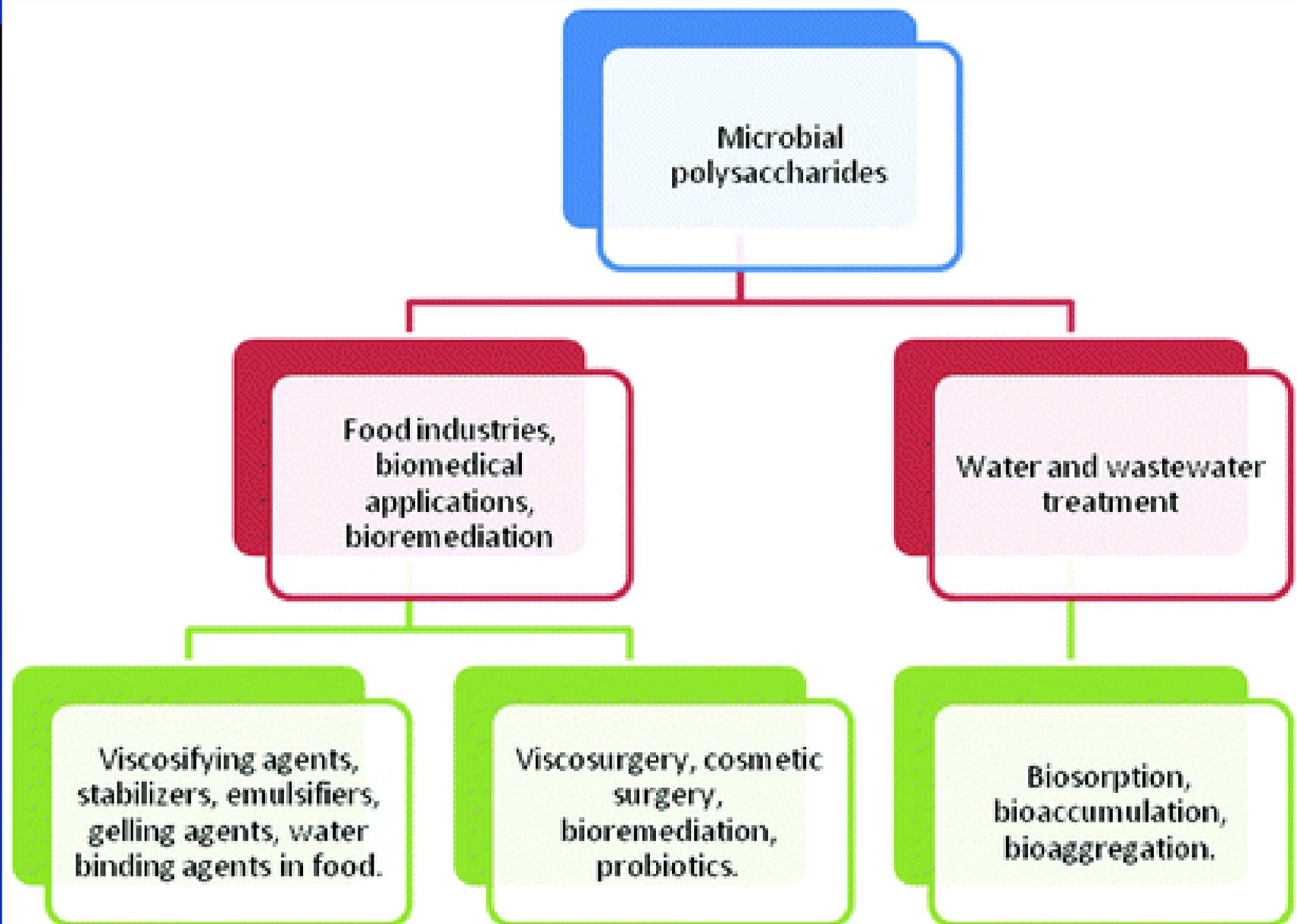


# Σημαντικοί βιομηχανικοί πολυσακχαρίτες

**TABLE 30.1 Commercially important microbial polysaccharides and their applications**

<i>Polysaccharide</i>	<i>Producing organism(s)</i>	<i>Application(s)</i>
<b>Xanthan</b>	<i>Xanthomonas campestris</i>	As a food additive for stabilization, gelling and viscosity control, i.e. for the preparation of soft foods e.g. ice cream, cheese. In oil industry for enhanced oil recovery. In the preparation of toothpastes, and water based paints.
<b>Dextran</b>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Acetobacter</i> sp., <i>Streptococcus mutans</i>	Blood plasma expander Used in the prevention of thrombosis, and in wound dressing (as adsorbent). In the laboratory for chromatographic and other techniques involved in purification. As a foodstuff.
<b>Alginate</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Azobacter vinelandii</i>	In food industry as thickening and gelling agent. Alginate beads are employed in immobilization of cells and enzymes. Used as ion-exchange agent.
<b>Scleroglucan</b>	<i>Sclerotium glucanicum</i> <i>S. rolfsii</i> , <i>S. delphinii</i>	Used for stabilizing latex paints, printing inks, and drilling muds.
<b>Gellan</b>	<i>Pseudomonas elodea</i>	In food industry as a thickener and solidifying agent.
<b>Polluan</b>	<i>Aureobasidium pollulans</i>	Being a biodegradable polysaccharide, it is used in food coating and packaging.
<b>Curdian</b>	<i>Alcaligenes faecalis</i>	As a gelling agent in cooked foods (forms a strong gel above 55°C) Useful for immobilization of enzymes.
<b>Emulsan</b>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Arthrobacter</i> sp	In oil industry for enhanced recovery. For cleaning of oil spills.

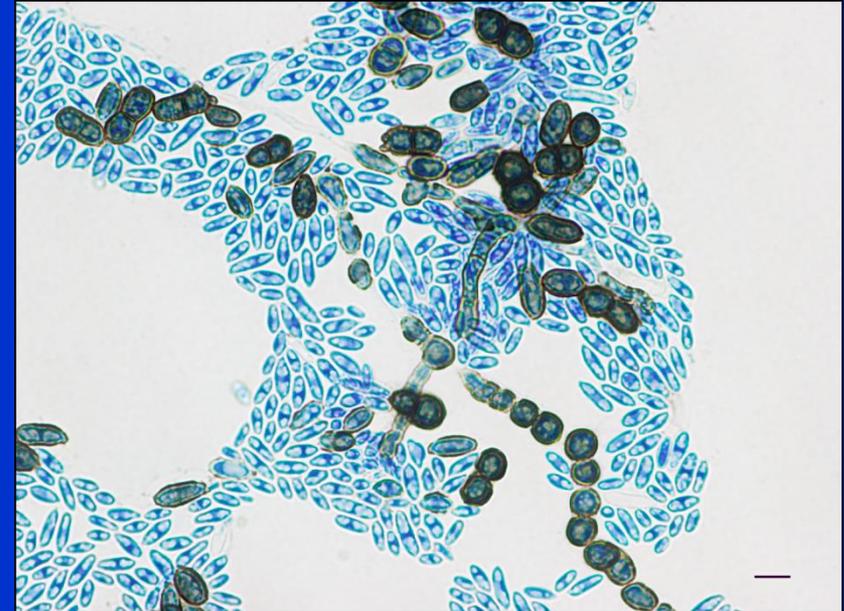
# Χρήσεις μικροβιακών πολυσακχαριτών



# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ ΚΑΙ ΒΙΟΠΟΛΥΜΕΡΩΝ (ΒΙΟΠΟΛΥΜΕΡΩΝ)

- Παραγωγή Πουλλουάνης από *Aureobasidium pullulans*



**Table 3: Pullulan production from different percentages of soybean oil by *A. pullulans* strain NRRL Y-2311-1**

Oil (%)	pH	Pullulan Production (g/L)		
		72h	96h	120h
0.0	3.7	15.46	19.04	18.66
1.0	4.2	18.54	21.26	19.14
2.0	4.3	18.99	22.24	21.50
3.0	4.4	19.73	27.04	25.12
4.0	4.5	20.35	27.02	25.98
5.0	4.4	23.05	29.58	28.04
SBO*	6.9	**	**	**

\* Soybean oil as a sole carbon source at 50 g/L.

\*\* No pullulan production.

# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ ΚΑΙ ΒΙΟΠΟΛΥΜΕΡΩΝ (ΒΙΟΠΟΛΥΜΕΡΩΝ)

### Βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή

#### α) Πολύ-υδροξύ – αλκανοϊκά οξέα (PHA)

- Φυσικό αποικοδομήσιμο πολυμερές για αντικατάσταση πλαστικού
- Πολυ-υδροξυ-βουτυρικό (PHB) από *Bacillus magaterium*
- Πολύ-υδροξυ-βαλερικό (PHV) από *Alcaligenes eutrophus* / *E. Coli*
- Συσσώρευση ενδοκυτταρικά του PHB/PHA υπό αντίξοες συνθήκες για το κύτταρο (υπό έλλειψη N, P, αλάτων Mg κτλ) μέχρι 90% ξηρού βάρους
- Πηγή C : γλυκόζη, προπιονικό, μεθανόλη
- Χρήσεις : συσκευασία τροφίμων, μικροενθυλάκωση, επούλωση τραυμάτων
- Παραγωγή από φυτά : κλωνοποίηση και εισαγωγή γονιδίων στο φυτό *Arabidopsis thaliana* (μείωση κόστους)

#### β) Πολύ-γαλακτικό οξύ (PLA)

- Πολυμερές γαλακτικού οξέος (από ζύμωση λακτόζης)
- Από *Lactobacillus* παράγεται γαλακτικό οξύ από γλυκόζη/λακτόζη, το οποίο στη συνέχεια πολυμερίζεται με χημική σύνθεση (κατάλυση) για να παραχθεί το πολυγαλακτικό οξύ.

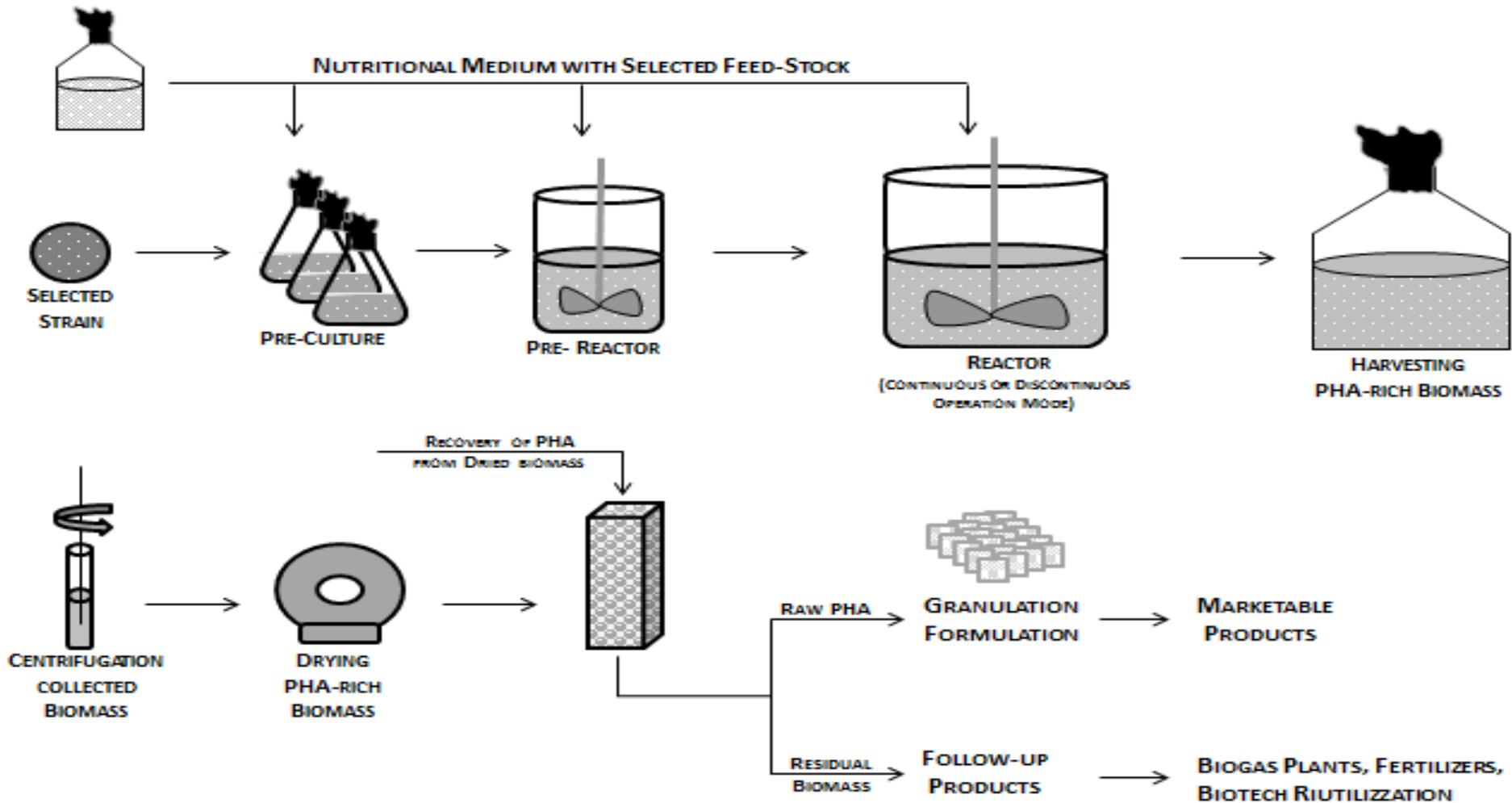
#### γ) Μετάξι

- Πολυμερές γονιδίων από γενετικά τροποποιημένη *E.coli* με γονίδια από αράχνη
- Παραγωγή από πρωτεΐνες, Ισχυρή αντοχή κλωστής με πολλές πιθανές εφαρμογές

# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

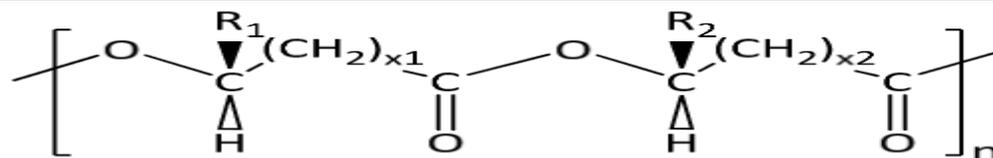
## ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ ΚΑΙ ΒΙΟΠΟΛΥΜΕΡΩΝ (ΒΙΟΠΟΛΥΜΕΡΩΝ)

Διάγραμμα βιομηχανικής παραγωγής ενδοκυτταρικού πολυσακχαρίτη πολυδρόξυαλκανοϊκών οξέων (PHA):

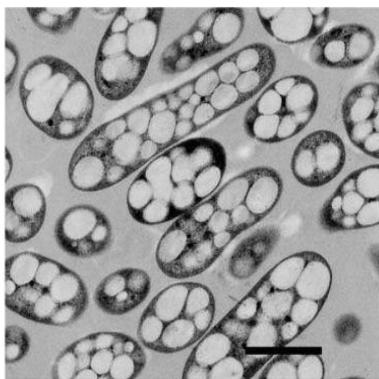


# Βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά

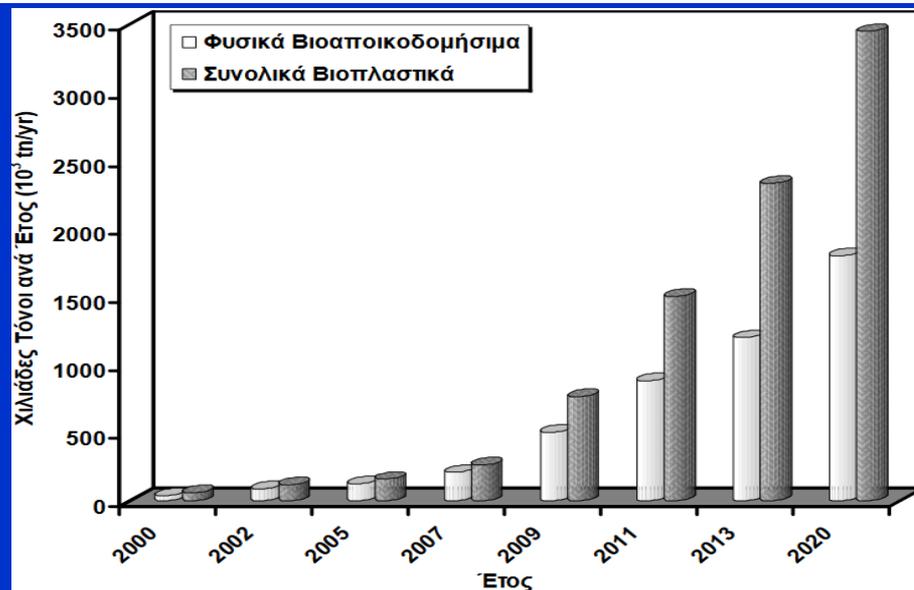
**Πίνακας 1.3** Δομή των σημαντικότερων συμπολυμερών των PHAs.



$X_1$	$X_2$	$R_1$	$R_2$	Όνομασία	Τύπος
1	1	CH <sub>3</sub>	H	Πολύ(3-ύδροξυ βουτυρικός-co-3-ύδροξυ προπιονικός) Εστέρας	P(3HB-3HP)
1	1	CH <sub>3</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	Πολύ(3-ύδροξυ βουτυρικός-co-3-ύδροξυ βαλερικός) Εστέρας	P(3HB-3HV)
1	2	CH <sub>3</sub>	H	Πολύ(3-ύδροξυ βουτυρικός-co-4-ύδροξυ βουτυρικός) Εστέρας	P(3HB-4HB)



Φωτογραφία Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Διέλευσης (Transmission Electron Microscopy, TEM) κυττάρων *Alcaligenes eutrophus* με κόκκους PHB σε συσσώρευση μεγαλύτερη του 80% της ξηρής μάζας τους. Η μπάρα αντιπροσωπεύει 2 μm (φωτογραφία από Xu et al. (2010)).

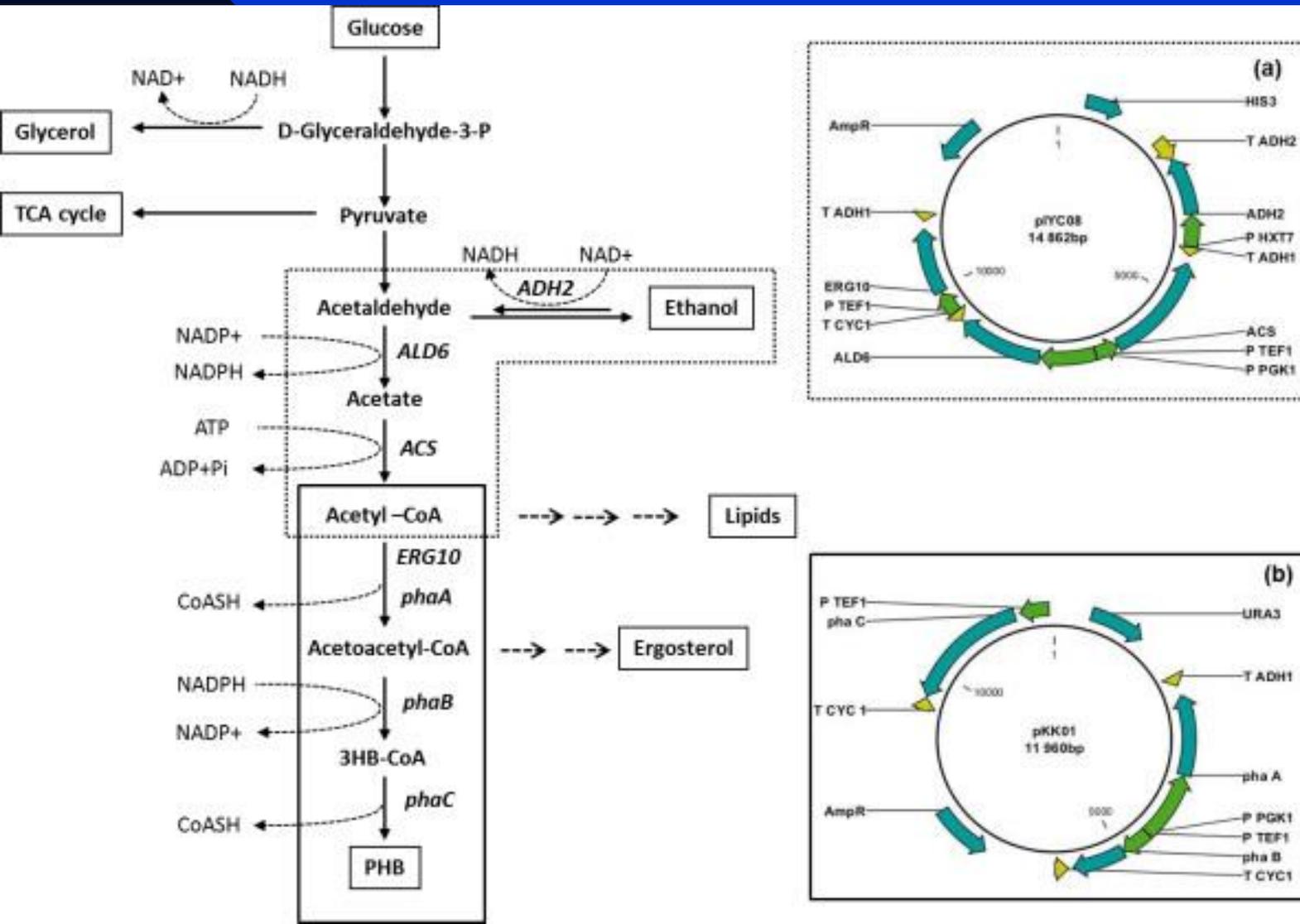


Παγκόσμια παραγωγή βιοπλαστικών τα τελευταία 10 χρόνια και πρόβλεψη παραγωγής για τα έτη 2011, 2013 και 2020.

# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ ΚΑΙ ΒΙΟΠΟΛΥΜΕΡΩΝ (ΒΙΟΠΟΛΥΜΕΡΩΝ)

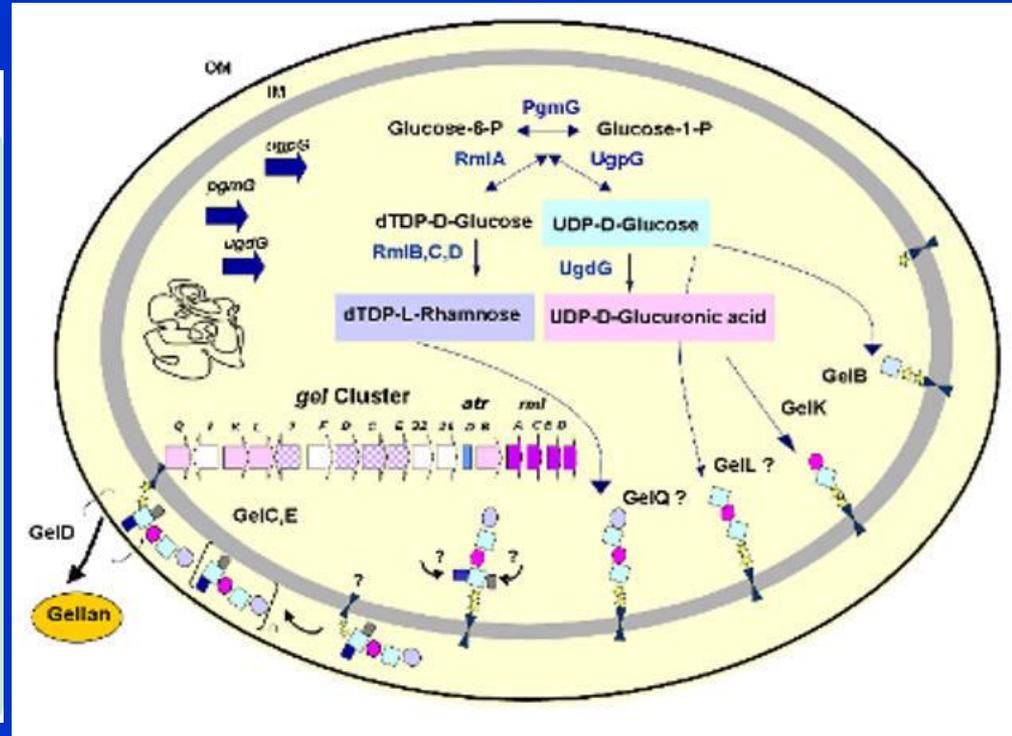
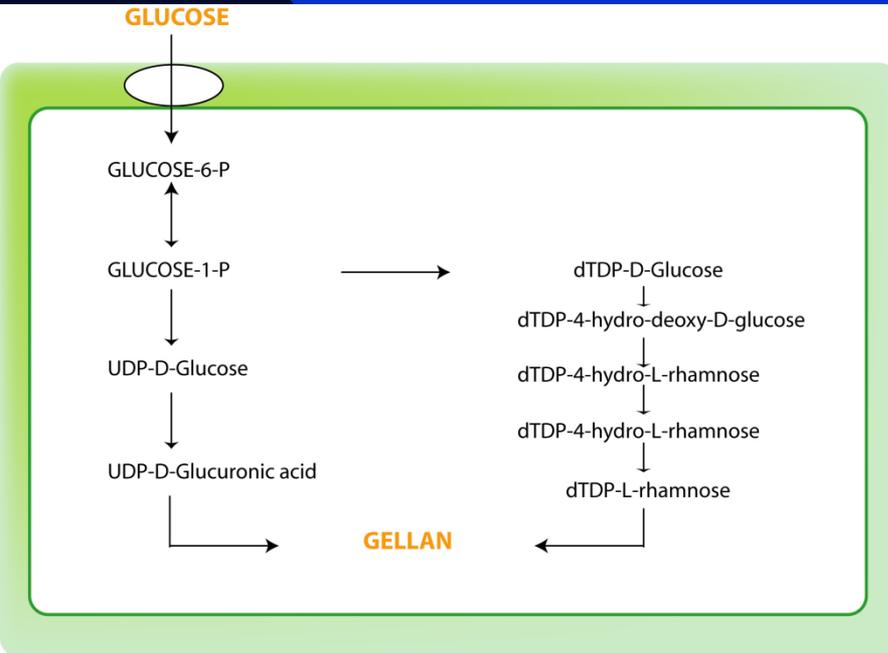
Βιοσύνθεση Πολύ-υδρόξυ-βουτυρικού (PHA) - Βιοαποικοδομήσιμο πλαστικό



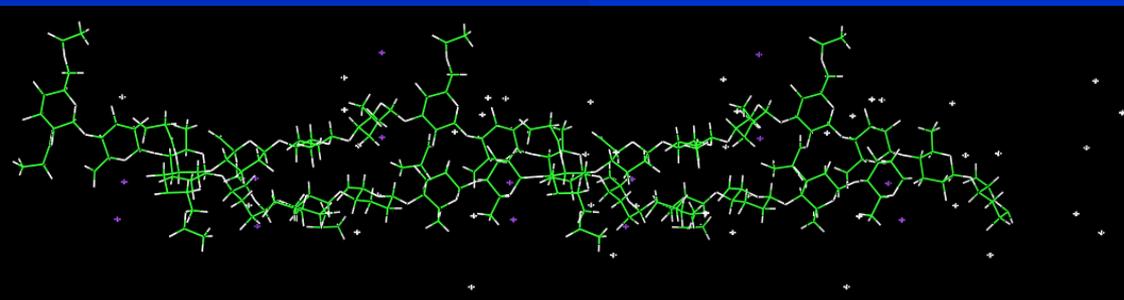
# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ ΚΑΙ ΒΙΟΠΟΛΥΜΕΡΩΝ (ΒΙΟPOLYMERS)

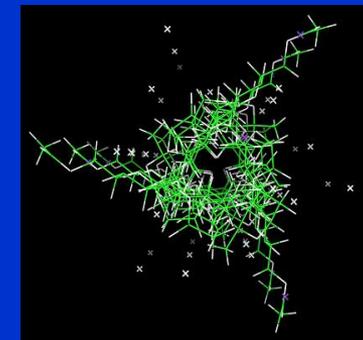
- Βιοσύνθεση Τζελλάνης (Gellan gum) - πηκτική ουσία (εξοπολυσακχαρίτης) από το βακτήριο *Sphingomonas raucimobilis*



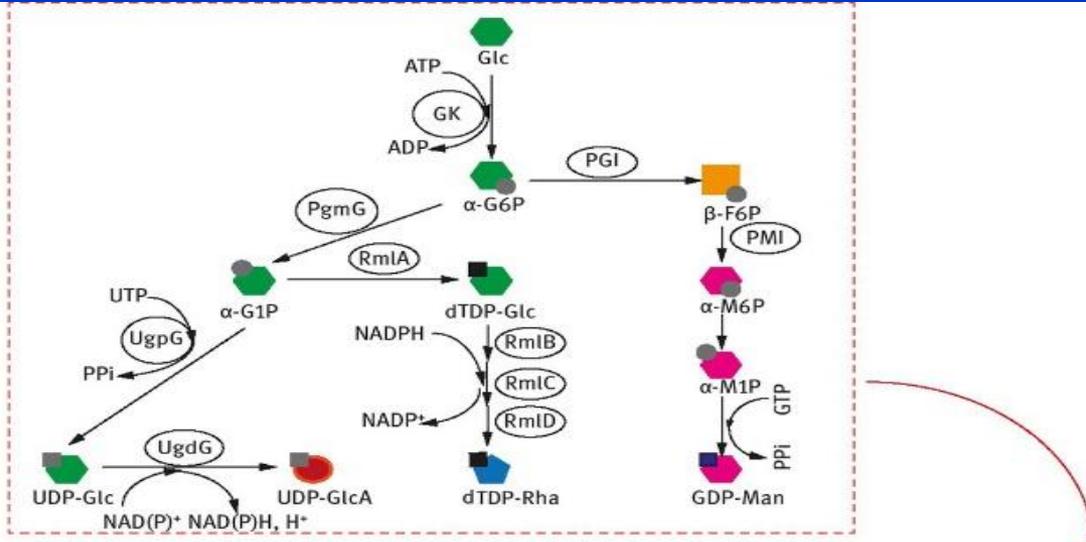
- Επιμήκης εικόνα της δομής διπλής έλικας της τζελλάνης



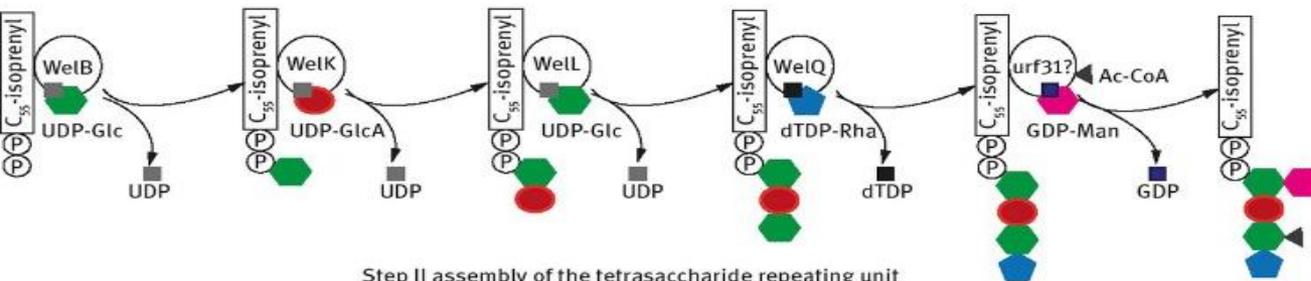
- εγκάρσια εικόνα της δομής της τζελλάνης



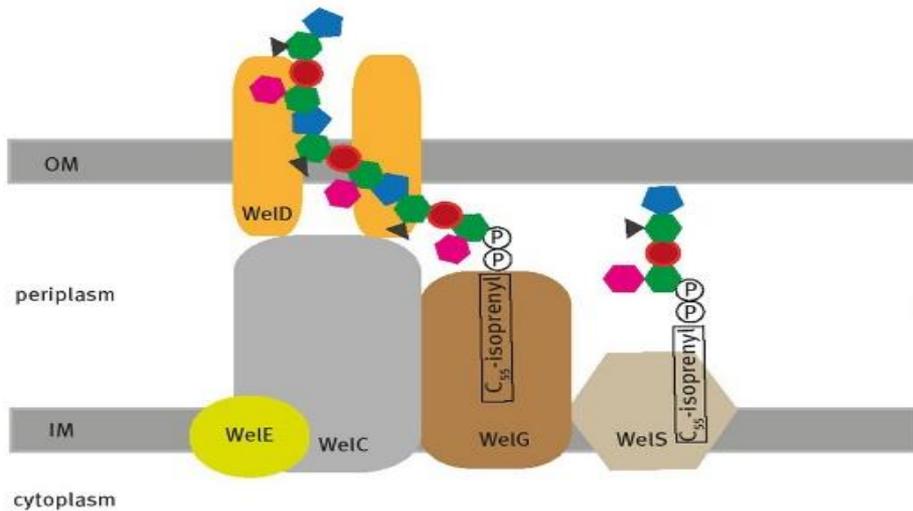
# Βιοσυνθετικό μονοπάτι Wellan gum (παρόμοιο με Gellan gum)



Step I synthesis of the nucleotide-sugar precursors in cytoplasm



Step II assembly of the tetrasaccharide repeating unit



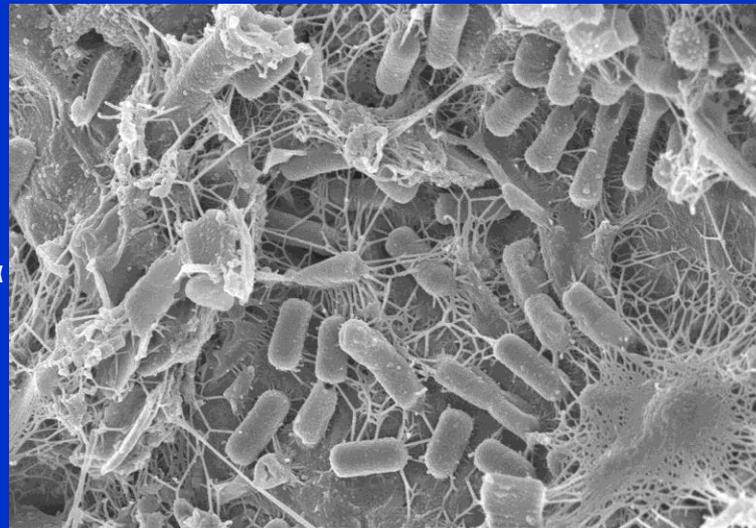
Step III polymerization and export

- Κύτταρα *Xanthomonas campestris* σε τρυβλία και σε φυτά: η ξανθάνη είναι το μέσο προσκόλλησης των κυττάρων στην επιφάνεια των φυτών



- Εξοπολυσακχαρίτες από κύτταρα βακτηρίων στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

- Στο τέλος της ζύμωσης, αφού αφαιρεθεί η βιομάζα από το υγρό της ζύμωσης, καταβυθίζονται οι εξοπολυσακχαρίτες (όπως ή ξανθάνη) με προσθήκη αλκοόλης ή ακετόνης και απομονώνονται με φυγοκέντρηση (και χρωματογραφία μοριακής διήθησης) και ξήρανση



## ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ ΚΑΙ ΒΙΟΠΟΛΥΜΕΡΩΝ (ΒΙΟΠΟΛΥΜΕΡS)

### Παραδείγματα πολυσακχαριτών, είδους δεσμών άνθρακα και MB:

Πολυσακχαρίτες	Οργανισμός	Μονάδες μονομερών	Τύπος γλυκοζιτικού δεσμού	Μοριακό Βάρος (Da)
Δεξτράνια	Leuconostoc Klebsiella	D-γλυκοπυρανόζη	α 1-6 (κύρια αλυσίδα) α 1-3 (διακλαδούμενη αλυσίδα)	1*10 <sup>5</sup> - 2*10 <sup>7</sup>
Σκληρογλυκάνη	Sclerotium	D-γλυκοπυρανόζη	β 1-3 (κύρια αλυσίδα) β 1-6 (διακλαδούμενη αλυσίδα)	1,9*10 <sup>4</sup> - 2,5*10 <sup>4</sup>
Πουλλουλάνη	Aureobasidium	D- γλυκοπυρανόζη	α 1-4 (σύνδεση τριμερών ή τετραμερών) β 1-6	1*10 <sup>4</sup> - 1*10 <sup>5</sup>
Αλγινικό οξύ	Azotobacter	D-μανουρονικό οξύ L-γλυκουρονικό οξύ	β 1-4  α 1-4	5*10 <sup>5</sup>
Ξανθάνες	Xanthomonas	D-γλυκόζη 6-ακετυλο- D-μαννόζη D-γλυκουρονικό οξύ 4,6-πυροσταφιλική-D- μαννόζη	β 1-4 (κύρια αλυσίδα) α 1-3 β 1-2  β 1-2	2*10 <sup>6</sup> - 5*10 <sup>7</sup>

# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ ΚΑΙ ΒΙΟΠΟΛΥΜΕΡΩΝ (BIOPOLYMERS)

■ Δομή, χημική σύσταση, και παραγωγή μ/οι διαφόρων πολυσακχαριτών

GUM	AVERAGE MOLECULAR WEIGHT
Oat β (1-3) β (1-4) glucan	500,000 - 1,000,000
Pullulan	50,000 - 100,000
Curdlan	~500,000
Methyl cellulose	10,000 - 200,000
Carrageenan	4,500,000
Xanthan	15,000,000 - 50,000,000
Sodium alginate	10,000 - 18,000,000

EPS	Producing strain	Composition	Substrates	Production (g/L)	Productivity (g/L·day)	Reference
Gellan gum	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Rhamnose, glucose, and glucuronic acid	Sucrose	19.9–22.6	6.6–9.0	Zhang et al. (2015)
			Glucose	12.4	7.4	Giavasis et al. (2003)
			Whey	1.6–3.1	0.6–1.2	Dlamini and Peiris (1997)
			Acetyl and glyceryl groups	Soluble starch	37.5–43.6	14.5–18.8
Welan	<i>Alcaligenes sp.</i>	Rhamnose, glucose, and glucuronic acid	Molasses	13.8	n.a.	Banik et al. (2007)
			Glucose	25.0–26.3	8.3–8.8	Li et al. (2011)
			Corn starch	22.8	7.6	Li et al. (2010)
Clavan	<i>Clavibacter michiganensis</i>	Fucose, glucose, and galactose Acetyl, pyruvyl, and succinyl groups	Glucose	0.7	0.06	van den Bulk et al. (1991)
FucoPol	<i>Enterobacter A47</i>	Fucose, glucose, galactose, and glucuronic acid	Glycerol	7.5–8.0	2.0–2.5	Torres et al. (2012)
			Glucose	13.4	3.4	Freitas et al. (2014)
			Xylose	5.4	1.4	Freitas et al. (2014)
			Acetyl, pyruvyl, and succinyl groups			
Hyaluronic acid	<i>Streptococcus sp.</i>	Glucuronic acid and acetylglucosamine	Glucose	0.4–6.9	0.8–1.5	Huang et al. (2008)

# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ ΚΑΙ ΒΙΟΠΟΛΥΜΕΡΩΝ (ΒΙΟΠΟΛΥΜΕΡΩΝ)

■ Το μοριακό βάρος των π/σ εξαρτάται από τον μικροοργανισμό, το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται (είδος σακχάρου), τις συνθήκες ζύμωσης (ταχύτητα ανάδευσης, αερισμός, θερμοκρασία, κλπ) και από τη δράση υδρολυτικών ενζύμων (λυασών) που παράγονται από τον μικροοργανισμό και διασπούν τον πολυσακχαρίτη σε μικρότερα μόρια (π.χ. εάν υπάρχει έλλειψη πηγών C στο υπόστρωμά ή εάν μπει σε φάση θανάτου ο μικροοργανισμός)

■ Δομή, χημική σύσταση και μοριακά βάρια διαφόρων γλυκανών

Name	Source	Solubility	Structure	Weight (kDa)
Glucan from Euglenoids	Algae	Particulate	$\beta$ -(1,3) unbranched	200-500
Glucan from Saccharomyces cerevisiae	Yeast	Particulate	$\beta$ -(1,3) $\beta$ -(1,6) branched (30:1)	200
Curdlan	Gram negative bacteria	Particulate	$\beta$ -(1,3) unbranched	50-200
Laminarin	Brown seaweeds	Soluble	$\beta$ -(1,3) with some $\beta$ -(1,6) branching (30:1). The $\beta$ -(1,6) side chains are composed of two glucose units.	7.7
Scleroglucan	Fungus	Soluble	$\beta$ -(1,3) $\beta$ -(1,6) branched (6:1). The $\beta$ -(1,6) side chains are composed of two glucose units.	1020

# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## Δομή, χημική σύσταση και μοριακά βάρια διαφόρων γλυκανών

**Table 1** Source and structure of some important glucans

Structure	Trivial name(s)	Sources	Physiological role	References
(1→3)-α-D-glucan	Pseudonigeran	Fungi	<i>Aspergillus niger</i>	Wall component (2)
(1→4)-α-D-glucan	Amylose <sup>c</sup>	Higher plants		Storage (3)
(1→6)-α-D-glucan		Fungi	<i>Armillariella tabescens</i> <i>Sarcodon aspratus</i>	(4) (5,6)
(1→3)(1→4)-α-D-glucan <sup>a</sup>	Nigeran	Fungi	<i>Aspergillus niger</i>	(7)
	Elsinan		<i>Elsinoe leucospila</i>	(8)
	Isolichenan	Lichens	<i>Cetraria islandica</i>	(9)
(1→4)(1→6)-α-D-glucan <sup>a</sup>	Pullulan	Fungi	<i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Teloschistes flavicans</i>	(10-12) (13)
(1→4)(1→6)-α-D-glucan <sup>b</sup>	Amylopectin <sup>c</sup>	Higher plants		Storage (3)
	Glycogen	Animals		(14)
(1→6)(1→3)-α-D-glucan <sup>b</sup>	Dextran	Microorganisms	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Exopolysaccharide (15)
(1→3)-β-D-glucan	Callose	Higher plants		Wall anti-stress component (16)
	Paramylon	Protozoa	<i>Euglena gracilis</i>	Storage (17,18)
	Curdlan	Microorganisms	<i>Agrobacterium sp.</i> , <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Alcaligenes faecalis</i>	Exopolysaccharide (18,19)
	Pachyman	Fungi	<i>Poria cocos</i>	Wall component (20)
	Laminarin	Algae, lichens		Storage (21)
(1→4)-β-D-glucan	Cellulose	Algae, high plants		Wall component, fibrils (22)
	Microbial cellulose	Microorganisms		Exopolysaccharide (23)
(1→6)-β-D-glucan	Pustulan	Lichens	<i>Lasallia pustulata</i>	(24)
		Fungi	<i>Guignardia citricarpa</i>	Exopolysaccharide (25)
(1→3)(1→4)-β-D-glucan <sup>a</sup>	Lichenan	Lichens	<i>Cetraria islandica</i>	(26)
	Cereal β-D-glucan	Higher plants	<i>Cereals</i>	Wall component (27)
(1→3)(1→4)-β-D-glucan <sup>b</sup>	Calocyban	Fungi	<i>Calocybe indica</i>	Wall component (28)
(1→3)(1→6)-β-D-glucan <sup>b</sup>	Lentinan	Fungi	<i>Lentinula edodes</i>	Wall component (29)
	Grifolan		<i>Grifola frondosa</i>	Wall component (30,31)
	Schizophyllan		<i>Schizophyllum commune</i>	Exopolysaccharide (32)
	Scleroglucan		<i>Sclerotium sp.</i>	Exopolysaccharide (33)
	Pleuran		<i>Pleurotus ostreatus</i>	Wall component (34)
	Botryosphaeran		<i>Botryosphaeria sp.</i>	Wall component (35)
(1→4)(1→3)-α,β-glucan <sup>a</sup>		Fungi	<i>Termitomyces microcarpus</i>	Wall component (36)
(1→6)(1→4)-α,β-glucan <sup>a</sup>		Fungi	<i>Astraeus hygrometricus</i>	Wall component (37)
(1→6)(1→4)-α,β-glucan <sup>b</sup>		Fungi	<i>Calocybe indica</i>	Wall component (28)
(1→3)(1→6)-α,β-glucan <sup>b</sup>	Piptoporan I		<i>Piptoporus betulinus</i>	Wall component (38)

<sup>a</sup>, linear; <sup>b</sup>, branched; <sup>c</sup>, starch component.

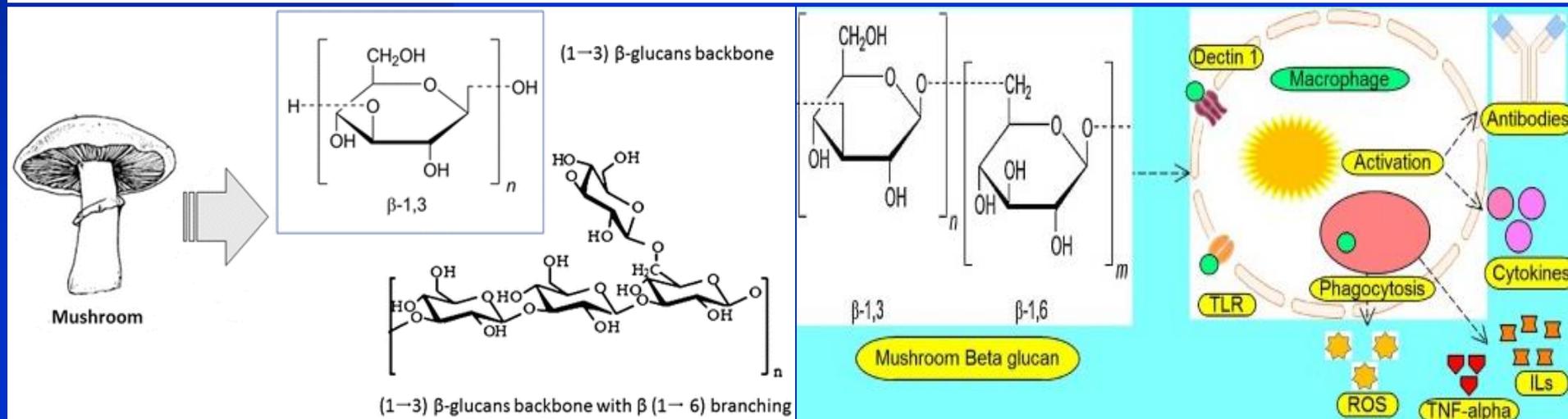
# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ ΚΑΙ ΒΙΟΠΟΛΥΜΕΡΩΝ (ΒΙΟΠΟΛΥΜΕΡΩΝ)

- Σημαντικοί βιοδραστικοί πολυσακχαρίτες μυκήτων που έχουν οδηγήσει σε φαρμακευτικά προϊόντα
- Βιολεπουργικές δράσεις β-γλυκανών (παρουσία β-1,3, β-1,6 γλυκοζιτικών δεσμών C): Αντικαρκινική, υποχοληστεριναιμική, υπογλυκαιμική, αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή, αντιθρομβωτική, υπατοπροστατευτική, κλπ δράση (ανάλογα με τον πολυσακχαρίτη)

Table 1: Polysaccharides with immunostimulatory properties produced from Basidiomycetes.

Product	Origin	Action	Phase
Lentinan	<i>Lentinus edodes</i>	Anticancer	Launched
Schizophyllan	<i>Shizophyllum commune</i>	Anticancer	Launched
Krestin (PSK)	<i>Coriolus versicolor</i>	Anticancer	Launched
Coporeng	<i>Coriolus versicolor</i>	Anticancer	Launched
Meshima-ex	<i>Phellinus linteus</i>	Anticancer	Launched
Licavek	<i>Coriolus versicolor</i>	Hepatic	Launched
Livax	<i>Coriolus versicolor</i>	Hepatic	Launched
Sizofiran	<i>Shizophyllum commune</i>	Lung cancer Hepatitis B	Pending preregistration Filling phase III
Acylfulvene	<i>Omphalotus illudens</i>	Cancer	Phase I

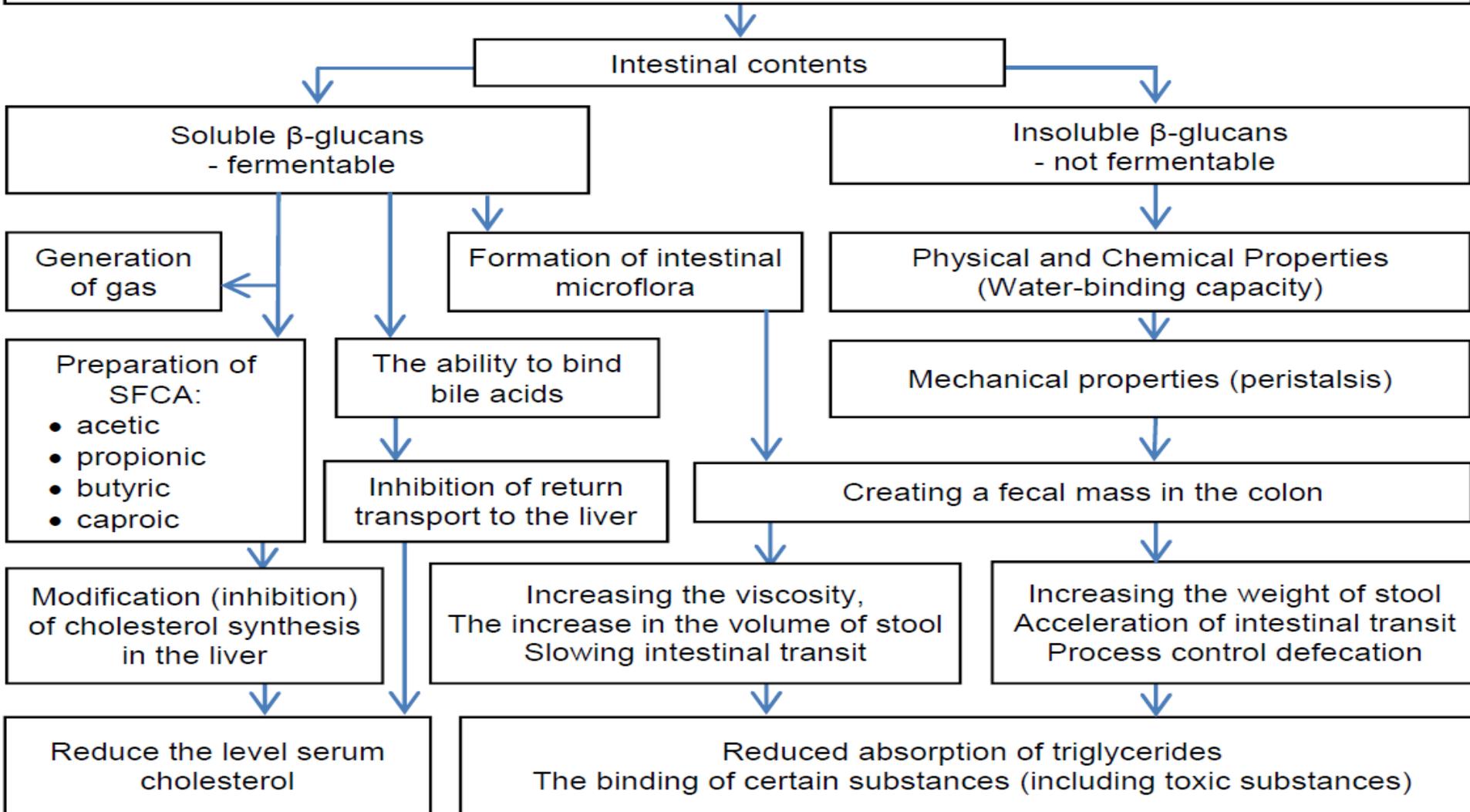


# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ ΚΑΙ ΒΙΟΠΟΛΥΜΕΡΩΝ (ΒΙΟΠΟΛΥΜΕΡΩΝ)

Βιολειτουργικές ιδιότητες β-γλυκανών από *S. cerevisiae* σε σχέση με τη μείωση της χοληστερόλης

### HYPOCHOLESTEROLEMIC EFFECT OF β-GLUCANS AND SPENT BREWER'S YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*



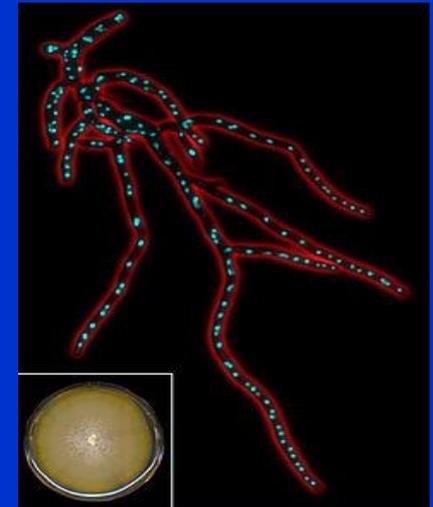
# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΤΑΜΙΝΩΝ

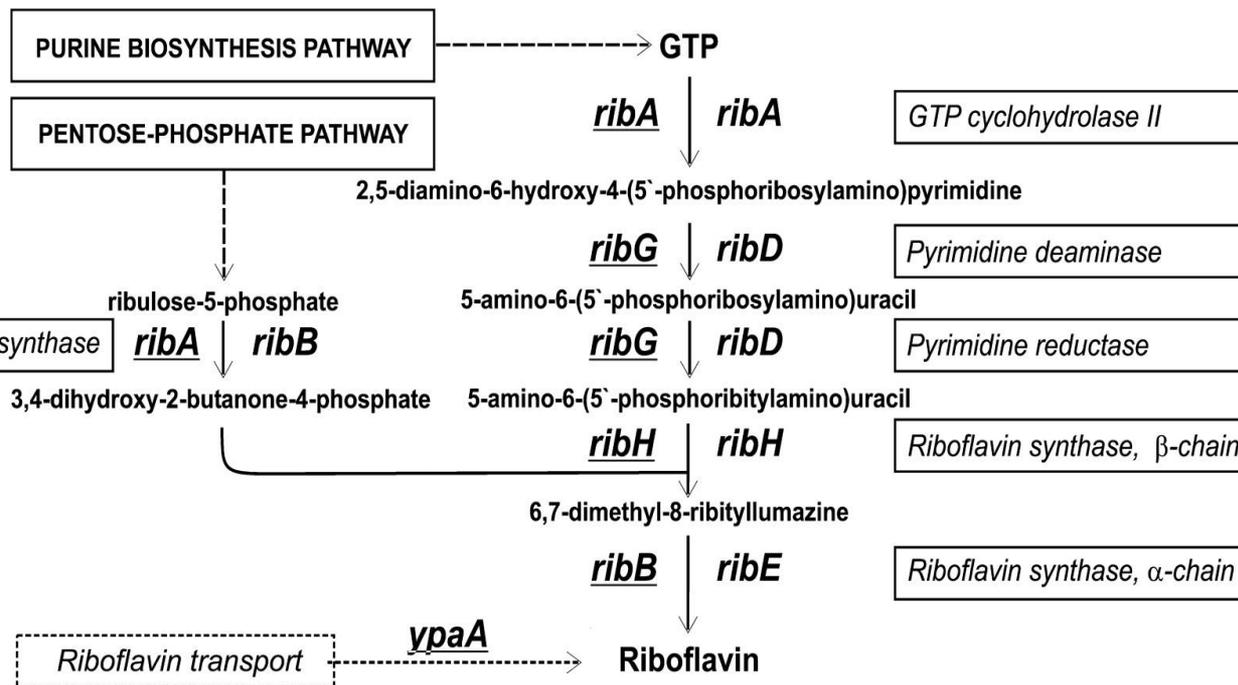
### α) Βιταμίνη Β2 (ριβοφλαβίνη)

- Με αποκλειστικά μικροβιακή παραγωγή, ή με συνδυασμό μικροοργανισμών και ενζυμικών μεθόδων, ή με αποκλειστικά χημική σύνθεση
- Από μύκητες : *Eremothecium gossypii* (*Ashbya gossypii*), *Candida famata*, *Candida flaveri*,
- Από βακτήρια: *Corynebacterium ammoniagenes*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*
- Υποστρώματα : γλυκόζη, ριβόζη, πυριμιδίνη, σακχαρόζη
- Βιοσυνθετική οδός ριβοφλαβίνης σε βακτήρια:

*Ashbya gossypii*



Riboflavin solution (right)



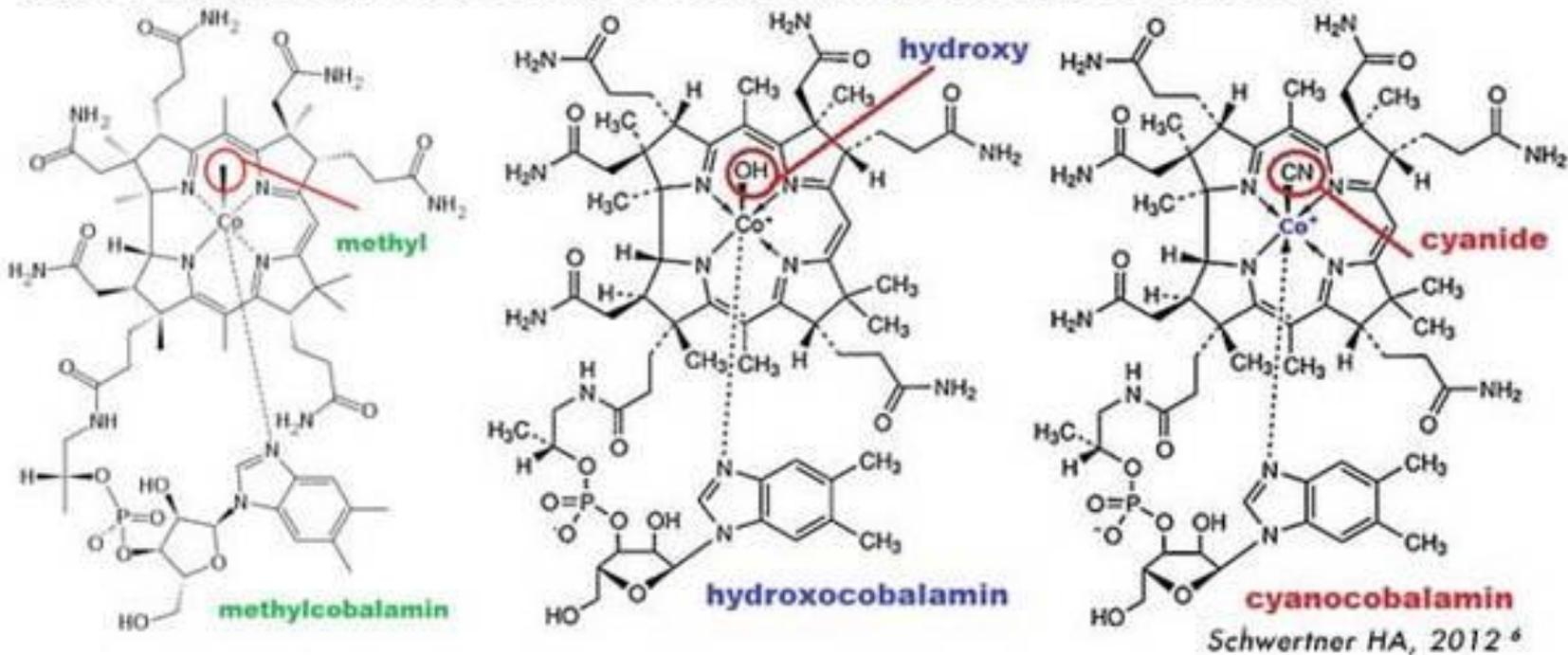
# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΤΑΜΙΝΩΝ

β) Βιταμίνη B12 (κυανοκοβαλαμίνη) (με χημική ή μικροβιακή σύνθεση)

- Από *Propionibacterium freudenreichii* subs. *shermanii*, *Pseudomonas dinitrificans*, *Methanobacterium lacus*, *Streptomyces griseus*
- Υποστρώματα: γλυκόζη, μελάσσα, μεθανόλη

Fig. 1. Chemical structure of hydroxocobalamin and cyanocobalamin

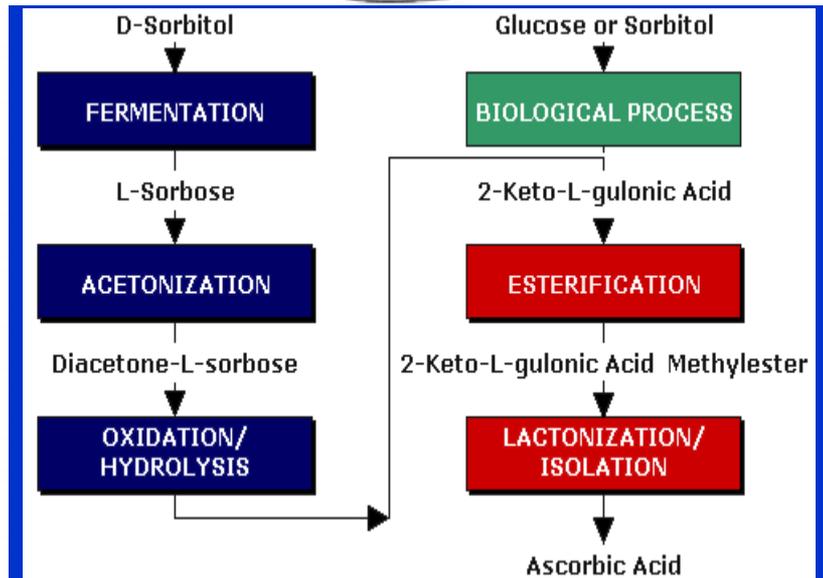
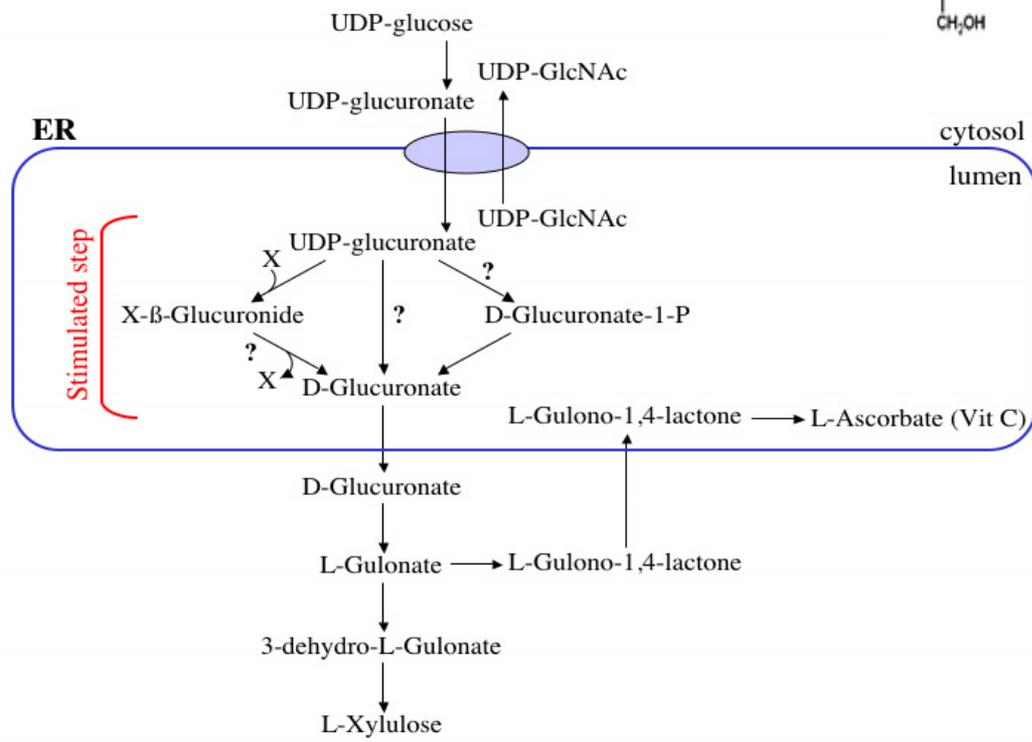
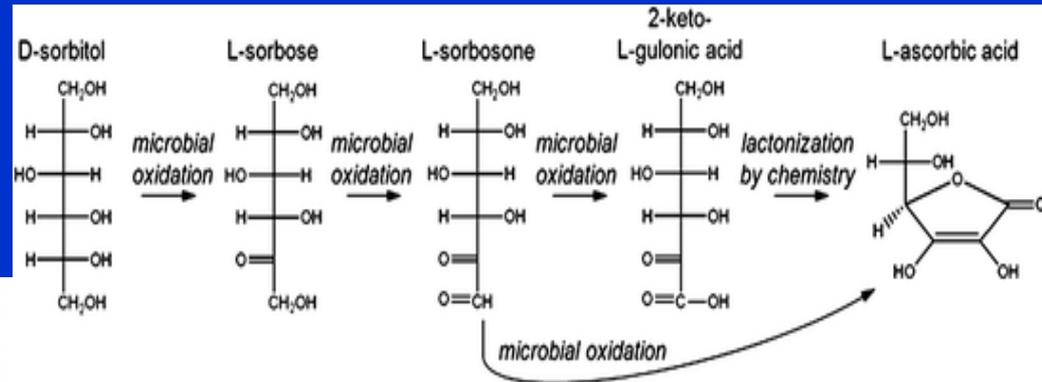


# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΤΑΜΙΝΩΝ

### γ) βιταμίνη C

- Συνδυασμός μικροβιακών και ενζυμικών μεθόδων
- α' ύλη: D-γλυκόζη ή D- sorbitol
- Μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται για την οξειδωση σε ασκορβικό : *Acetobacter suboxydans*, *Gluconobacter oxydans*
- στάδια βιοσύνθεσης-παραγωγής:

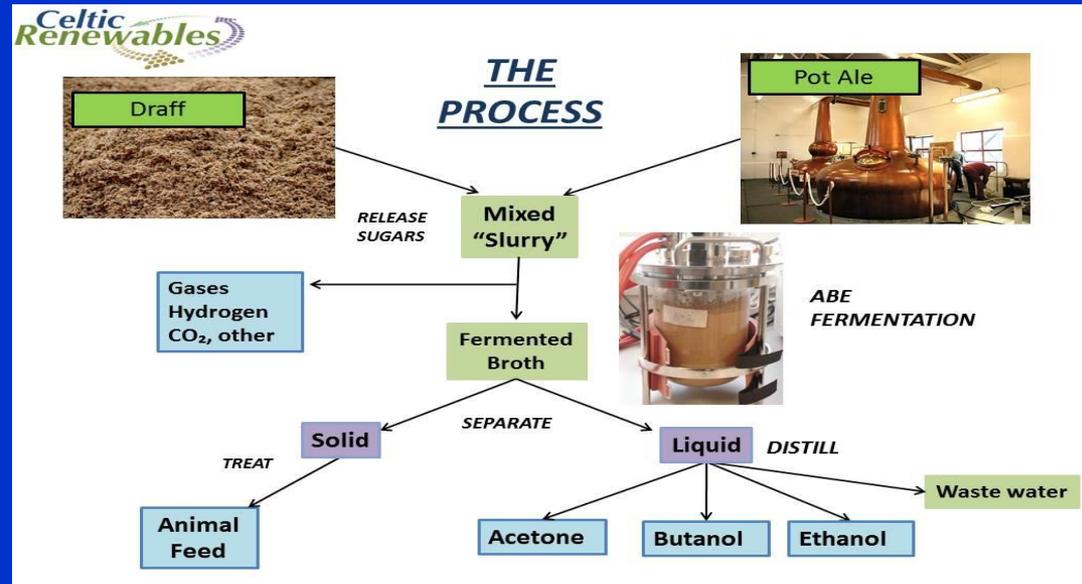
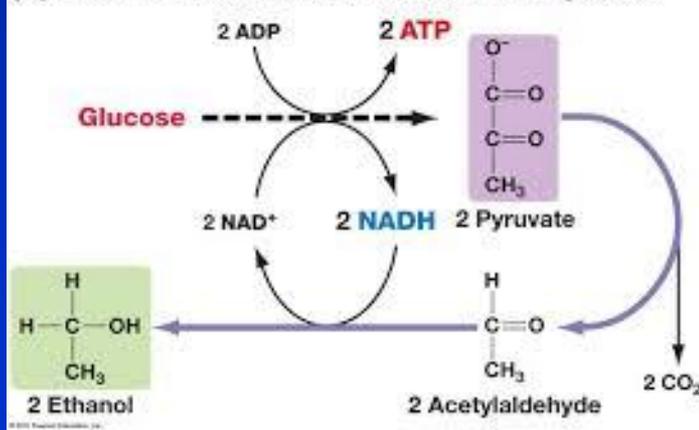


# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΛΚΟΟΛΗΣ

- ΧΡΗΣΕΙΣ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ: τρόφιμα, ενέργεια (βιοαιθανόλη), χημική βιομηχανία
- α) Αλκοολική ζύμωση
- - Μικροοργανισμοί: *Saccharomyces cerevisiae*, *S. carlsbergensis*, *Kluyveromyces marxianus* (ζυμώνει τη λακτόζη σε αντίθεση με *Saccharomyces*), *Zygotomonas mobilis*
- - Υποστρώματα: διάφορα σάκχαρα ( απλά ή πολυσακχαρίτες)  
π.χ  $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2$  (αλκοολική ζύμωση μέσω γλυκολυτικής οδού)
- Τελικό στάδιο καταλύεται από την αλκοολική αφυδρογόνωση
- Απόδοση 90-95% , ανάλογα με τρόπο και βαθμό απόσταξης
- Θερμοκρασία ζύμωσης: 37°C για *S. cerevisiae*, χαμηλότερη θερμοκρασία (30 °C) για *S. carlsbergensis*, *Kluyveromyces marxianus*
- Σύνθεση υποστρώματος: σάκχαρα (~12% w/v), οργανικό ή ανόργανο N, βιταμίνες, K,Na,NH<sub>3</sub>P,Mg,Ca
- pH ~5 (ελαφρώς όξινο) → αποφυγή επιμολύνσεων
- ανεκτή συγκέντρωση αλκοόλης *Z. mobilis* ~7% και *S. cerevisiae* ~12-15%
- Σε αναερόβιες συνθήκες → αιθανόλη
- Σε αερόβιες → βιομάζα (κύτταρα ζύμης)

(b) Alcohol fermentation occurs in yeast.



# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

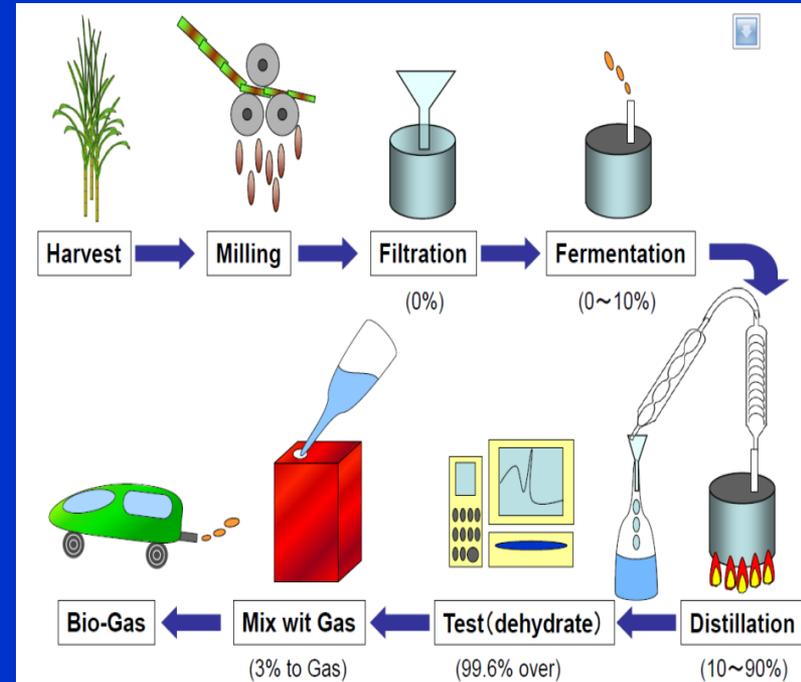
## ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΛΚΟΟΛΗΣ

β) Βιοαιθανόλη (καύσιμο): σημαντική εναλλακτική πηγή ενέργειας, μετά από ανάμιξη με άλλο καύσιμο

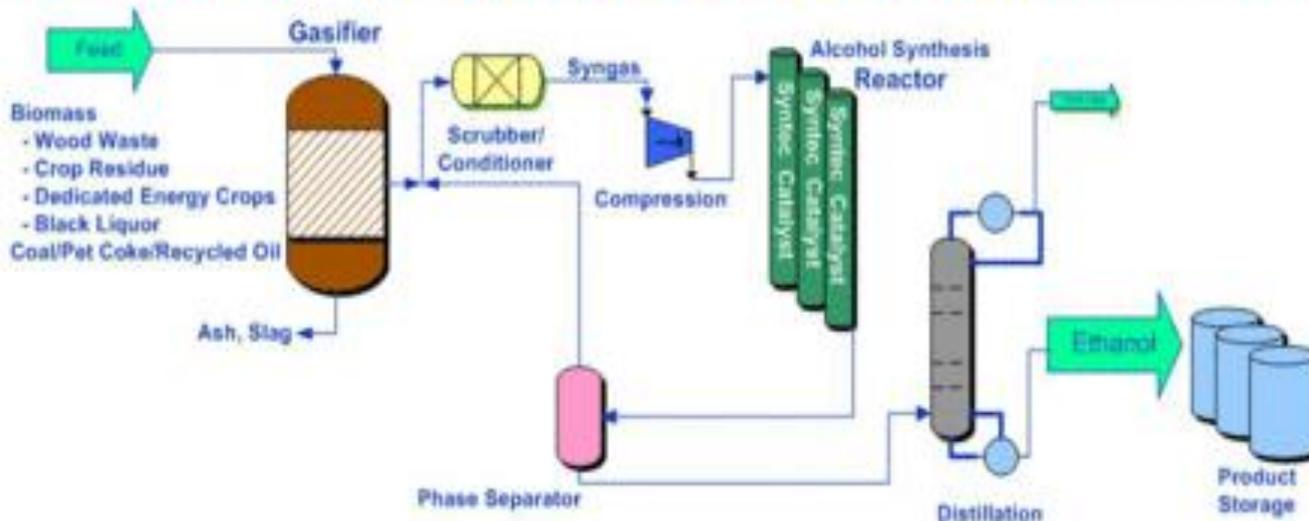
- α' ύλες: σακχαρούχα υποστρώματα – γεωργικά υποπροϊόντα (μελάσσα, αμυλοσιρόπια, εκχύλισμα τεύτλων, καλαμποκιού)

- βιομετατροπή υποστρώματος (με ακινητοποιημένα κύτταρα/ένζυμα) σε αιθανόλη μετά από όξινη υδρόλυση πολυσακχαριτών ή αεριοποίηση βιομάζας

- παραγωγή καυσίμου συμβατού/εναλλακτικού του πετρελαίου, μετατροπή βιοαιθανόλης σε ακετόνη, αιθυλένιο, βουτανόλη, PVC, PE



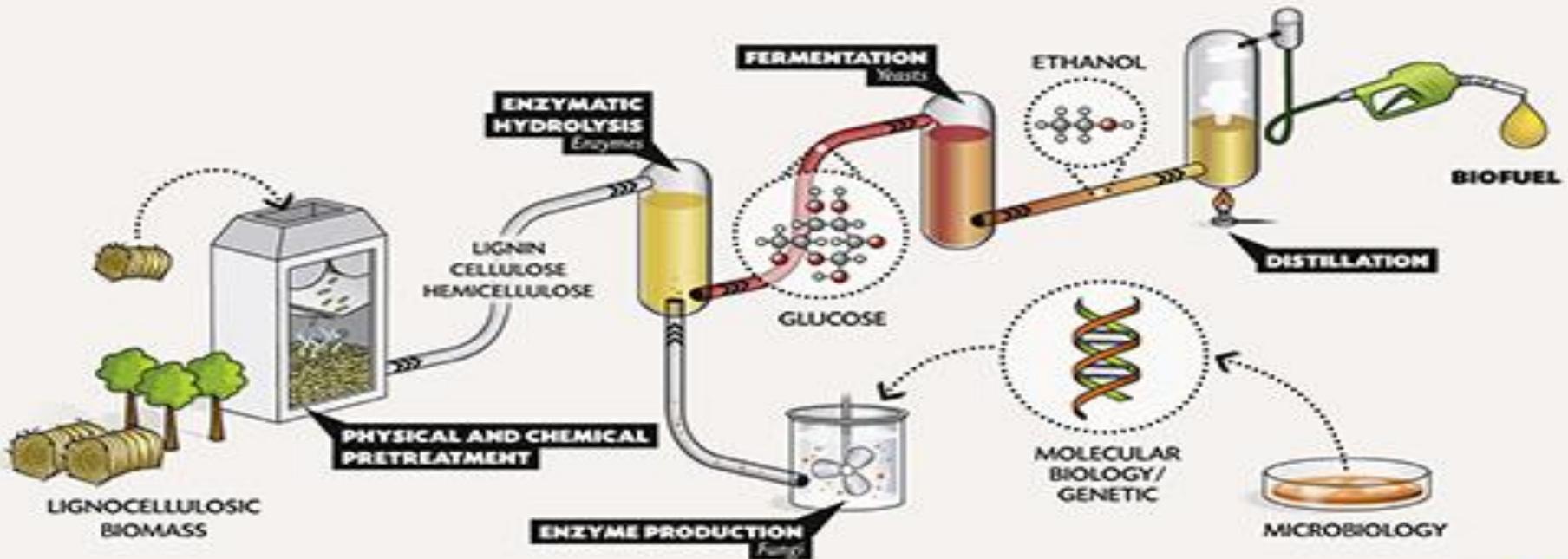
## Ethanol From Solid/Liquid Carbonaceous Material



# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## γ) Παραγωγή αλκοόλης από κυτταρίνη – λινίνη

- καθημερινή παραγωγή 70Kg λιγνοκυτταρίνης/άνθρωπο
- μετατροπή κυτταρίνης σε γλυκόζη → θρέψη, αιθανόλη, ενέργεια
- Λιγνοκυτταρίνες: αδιάλυτοι μεγαλομοριακοί π/σ
- β-1,4 γλυκοζιτικοί δεσμοί κυτταρίνης: Συμπαγής κρυσταλλική δομή κυτταρίνης → αδυναμία διάσπασης σε μικρότερα μόρια (λόγω εσωτερικών δεσμών H και δεσμών van der Waals)
- Οι περισσότεροι οργανισμοί υδρολύουν α-1,4 δεσμούς (άμυλο, γλυκογόνο)
- Υδρόλυση κυτταρίνης με ένζυμα του *Trichoderma reesei* (παράγει ~20 ενδογλυκανάσες, εξογλυκανάσες, κελλοβιουδρολάσες, β-γλυκοσιδάσες) + μικρότερα ενδιάμεσα προϊόντα
- Εναλλακτικά : Χημική (όξινη) υδρόλυση με  $H_2SO_4$
- Αξιοποίηση των ενδιάμεσων προϊόντων (ολιγοσακχαριτών) από *Clostridium thermocellum* (παραγωγή οργανικών οξέων + αιθανόλη), *Cl. thermosaccharolyticus*



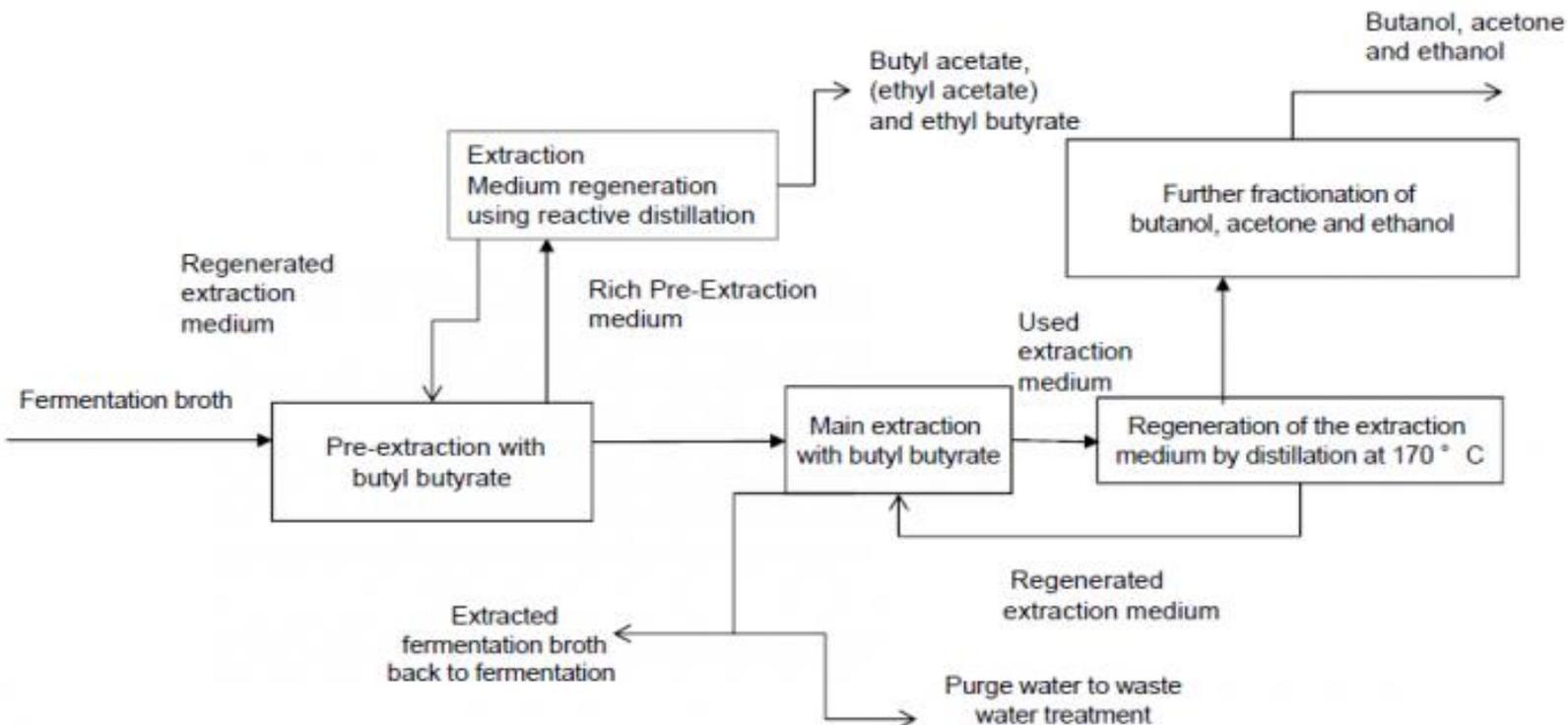
# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΚΕΤΟΝΗΣ ΚΑΙ ΒΟΥΤΑΝΟΛΗΣ, ΙΣΟΠΡΟΠΑΝΟΛΗΣ

### δ) Παραγωγή ακετόνης και βουτανόλης

- Βουτανόλη: Μετατροπή σακχάρων σε βουτυρικό, μετατροπή βουτυρικού σε ακετόνη, μετατροπή σε ισοπροπυλική αλκοόλη
- Παραγωγή από *Clostridium acetobutylicum* : υψηλή αποδόση σε ακετόνη και βουτανόλη-αιθανόλη 30-33%
- Παραγωγή από *Cl. auriantibutyricum*: Υψηλή απόδοση σε ισοπροπυλική αλκοόλη + άλλες αλκοόλες 30-40%
- Διάρκεια ζύμωσης: 40-80h σε 30-32C

## Block Diagram of the Process for ABE Fermentation

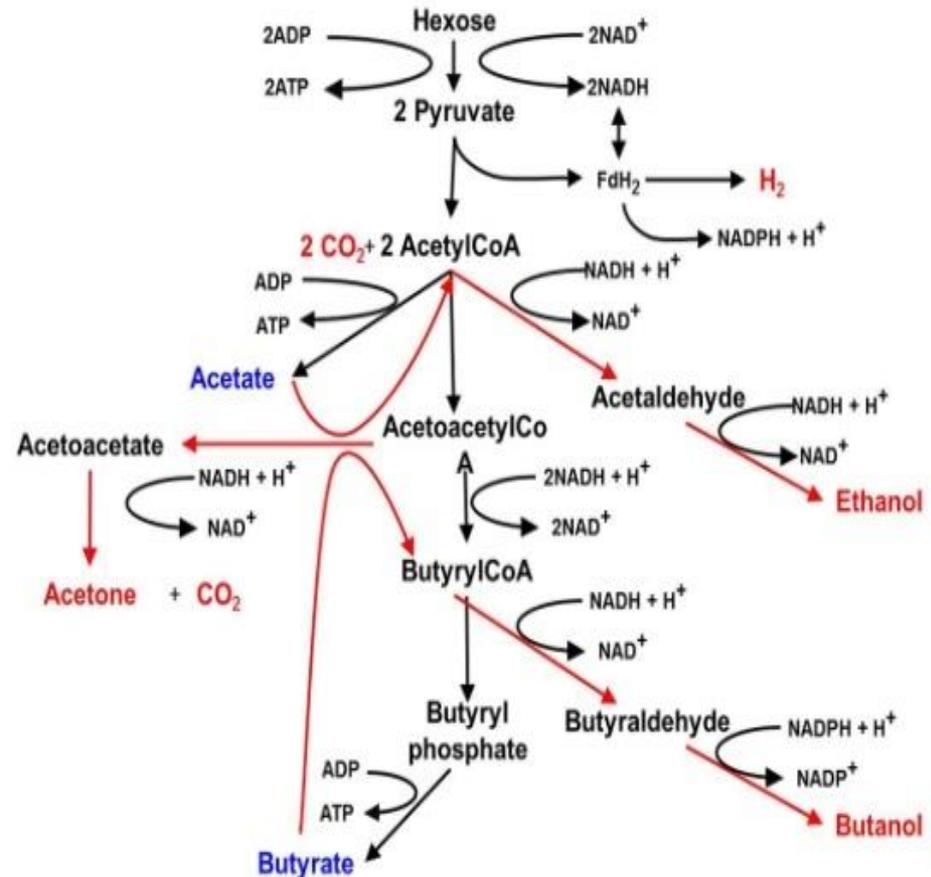
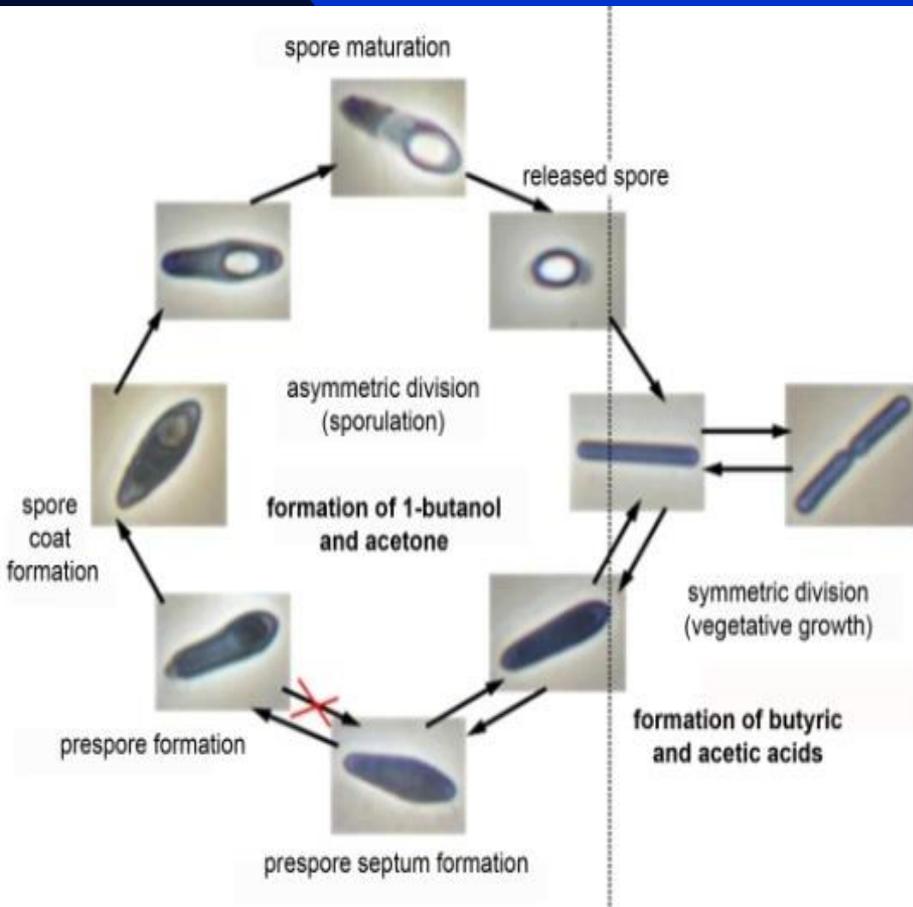


# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΚΕΤΟΝΗΣ ΚΑΙ ΒΟΥΤΑΝΟΛΗΣ, ΙΣΟΠΡΟΠΑΝΟΛΗΣ

δ) Παραγωγή ακετόνης και βουτανόλης (στάδια βιοσύνθεσης) από *Clostridium acetobutylicum*

Στάδια σπορογονίας και σύνθεση βουτυρικού, οξικού, βουτανόλης, αιθανόλης, ακετόνης

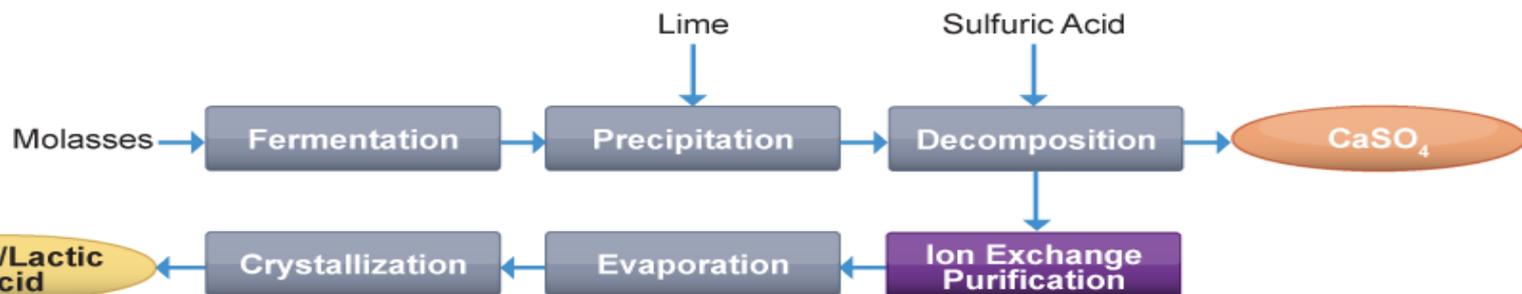
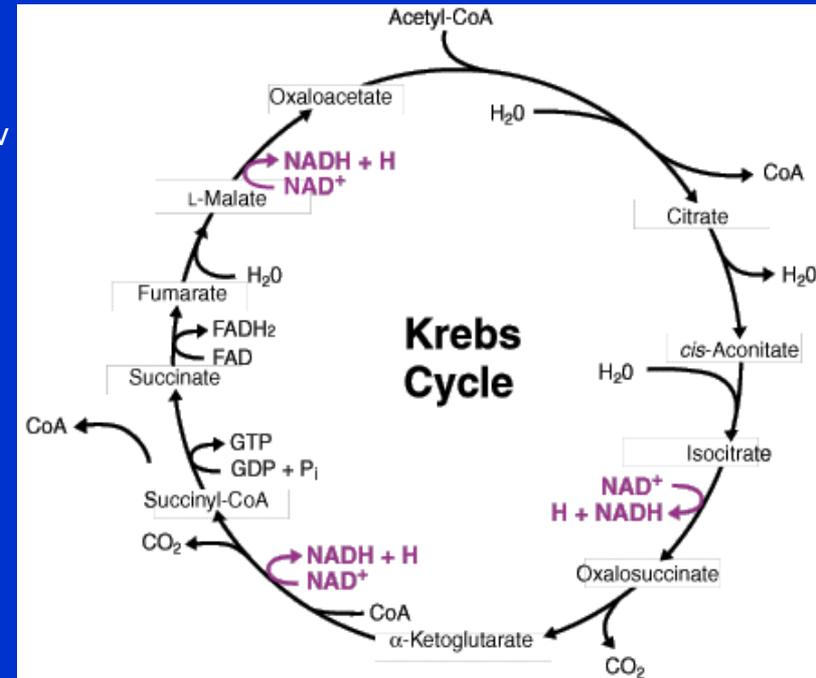


# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

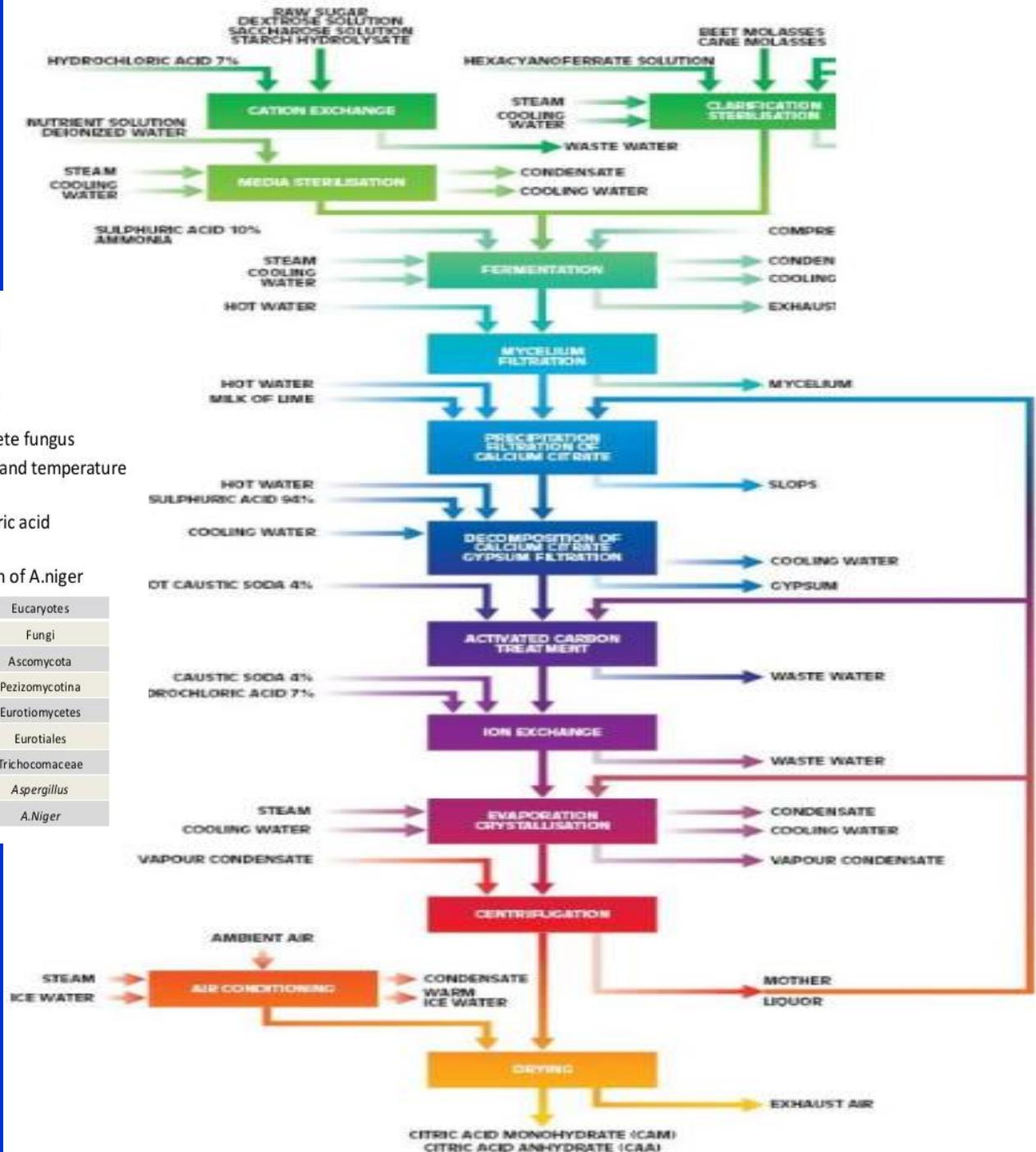
## ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

### A) ΚΙΤΡΙΚΟ ΟΞΥ

- Μέσο οξίνισης στα τρόφιμα, ήπια αντιμικροβιακή δράση
- Παραγωγή από τον μύκητα *Aspergillus niger*, από ζαχαρούχα δυαλύματα (άμυλο, μελάσσα, κλπ), μέσω του κύκλου Krebs ή κύκλο των τρικαρβοξυλικών οξέων (γλυκόλυση)
- Η παραγωγή κιτρικού απαιτεί αυστηρά αερόβιες συνθήκες
- Έλλειψη οξυγόνου οδηγεί σε μειωμένη παραγωγή κιτρικού
- Η μορφολογία του μυκηλίου μακροσκοπικά αλλάζει ανάλογα με την ταχύτητα ανάδευσης στο υγρό ζύμωσης: σε χαμηλή ανάδευση ινώδη μυκκήλια και σε έντονη ανάδευση σφαιρικά pellets, το μέγεθος των οποίων μειώνεται όσο αυξάνεται η ταχύτητα ανάδευσης
- Σχηματισμός κυττάρων σε σφαιρική μορφή pellet οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή (ενώ οι πολλές μυκηλιακές υφές έχουν συνήθως μικρότερη παραγωγή κιτρικού)
- Διάρκεια ζύμωσης 5-7 μέρες
- Απόδοση (από μελάσα)  $\approx 70\%$
- Δυνατή η παραγωγή και από *Candida lipolytica* (ταχύτερη ζύμωση, υψηλή απόδοση, αλλά απαιτεί περισσότερα θρεπτικά συστατικά και ενδεχομένως ακριβότερα υποστρώματα)



## A) στάδια παραγωγής κιτρικού



## SOURCE OF RAW MATERIALS

### Beet Molasses

- the source of sugar for microbial production of citric acid
- low cost and high sugar content
- low content of trace metals
- acts as carbon source of the fermentation

### Aspergillus Niger

- filamentous ascomycete fungus
- maintained at pH 4.5 and temperature at 5 °C
- The best strain for citric acid production
- Scientific classification of A.niger

Domain	Eucaryotes
Kingdom	Fungi
Phylum	Ascomycota
Subphylum	Peizozomycotina
Class	Eurotiomycetes
Order	Eurotiales
Family	Trichocomaceae
Genus	<i>Aspergillus</i>
Species	<i>A.Niger</i>

### Microorganism

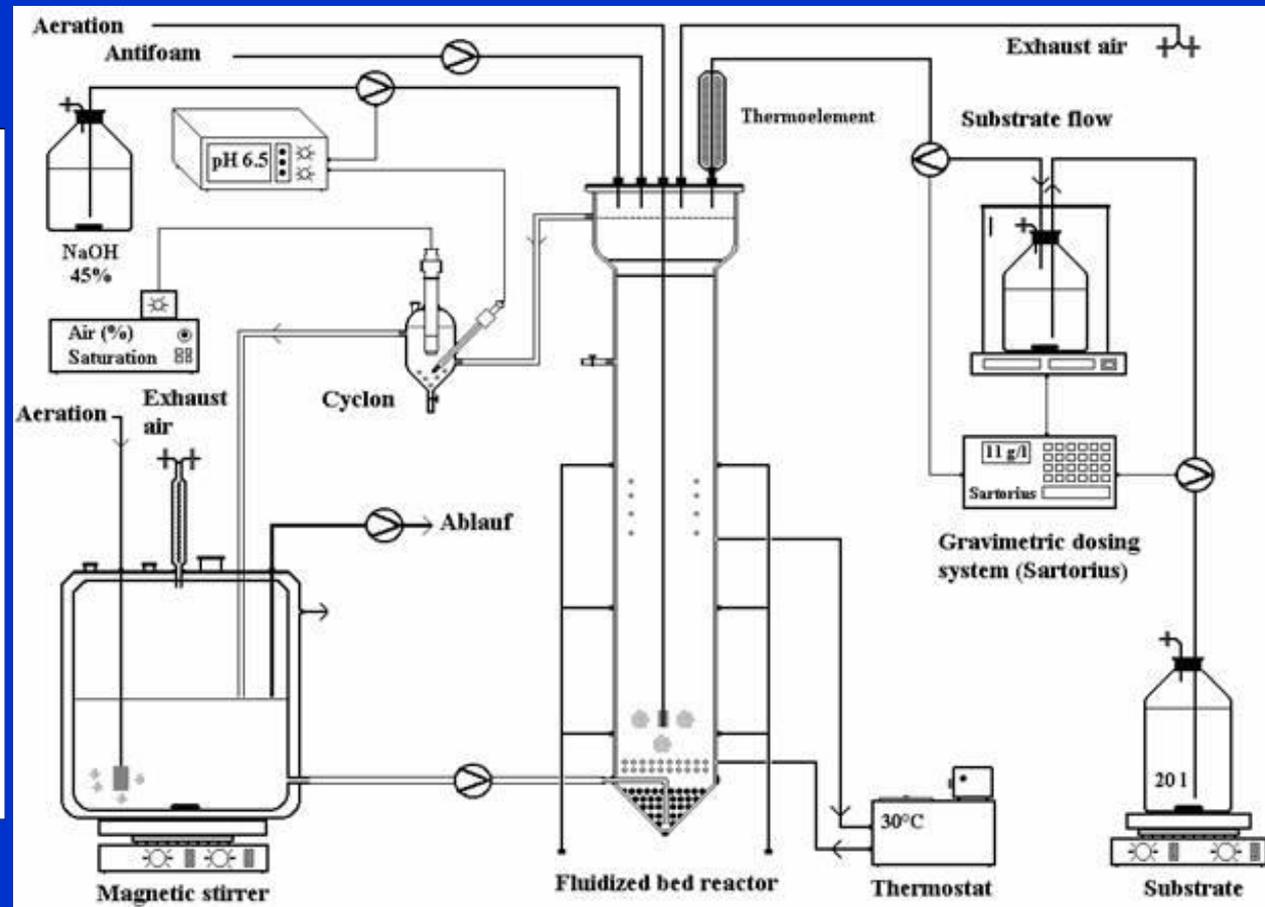
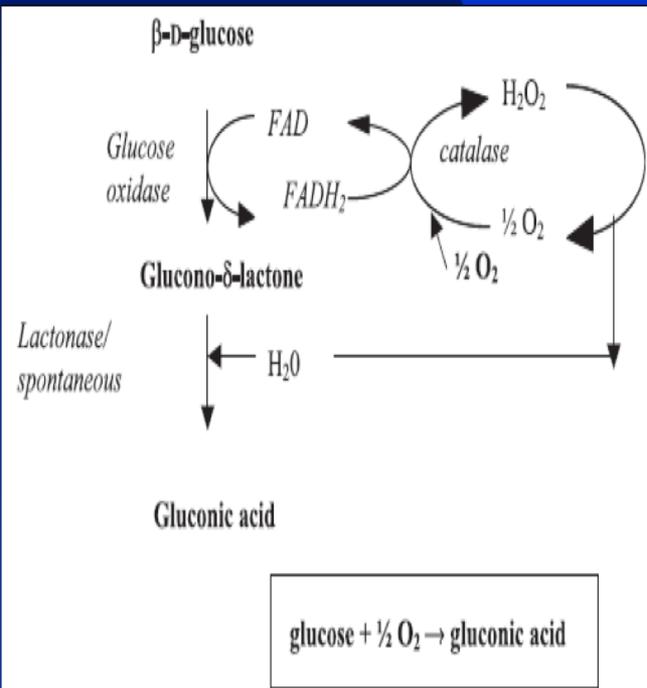
- mycomycetes of *A.niger* species can produce high yield
- consequence of incomplete respiration

# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

### Β) ΓΛΥΚΟΝΙΚΟ ΟΞΥ

- γλυκονικό – Ca ή γλυκονικό -Fe για θεραπεία έλλειψης ασβεστίου/σιδήρου
  - οργανικό οξύ, ρυθμιστής οξύτητας για βιομηχανία Τροφίμων, μετάλλων κτλ.
  - Παραγωγή από *Aspergillus niger*/*Gluconobacter*, *Aureobasidium pullulans*: οξείδωση γλυκόζης (με την οξειδάση γλυκόζης) σε γλυκονικό σε δ/μα γλυκόζης με καλή οξυγόνωση
- Ενδιάμεσο στάδιο της βιοσύνθεσης γλυκονικού : η γλυκονο-δ-λακτόνη (πρόσθετο για τεχνητή οξίνιση αλλαντικών)
- Το παραγόμενο οξύ εξουδετερώνεται με NaOH ή Ca(OH)<sub>2</sub>



# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

### Γ) ΟΞΙΚΟ ΟΞΥ

- Από *Acetobacter aceti* με οξείδωση αιθανόλης (απόδοση ≈90%) , ή από *Gluconobacter oxydans* από γλυκόζη
- Η ζύμωση γίνεται αεροβίως με έντονο αερισμό και ανάδευση σε όξινο pH
- Ρυθμιστής οξύτητας σε τρόφιμα με αντιμικροβιακή δράση, πολλές χρήσεις στη χημική βιομηχανία

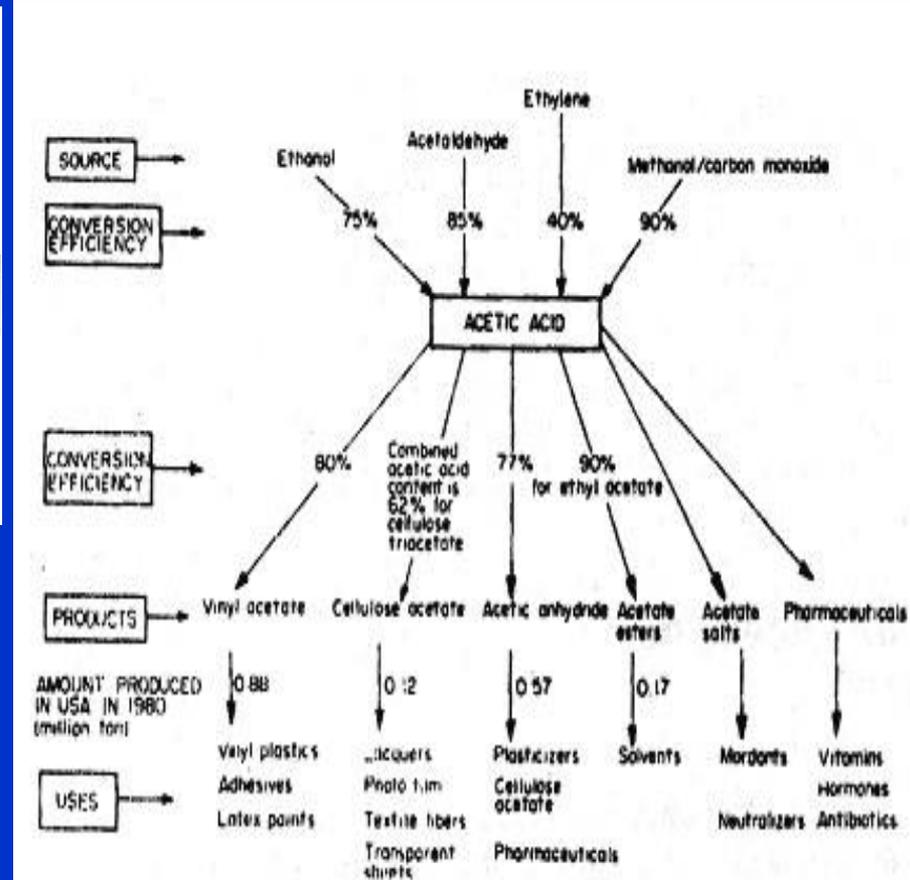
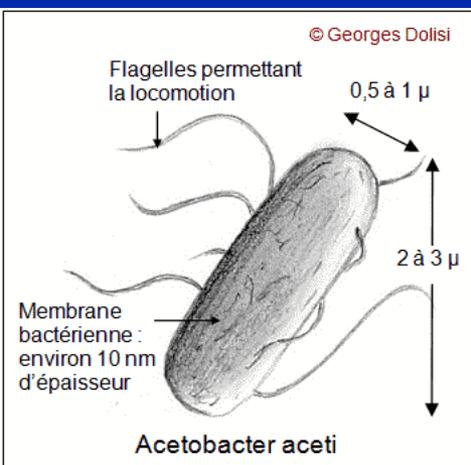
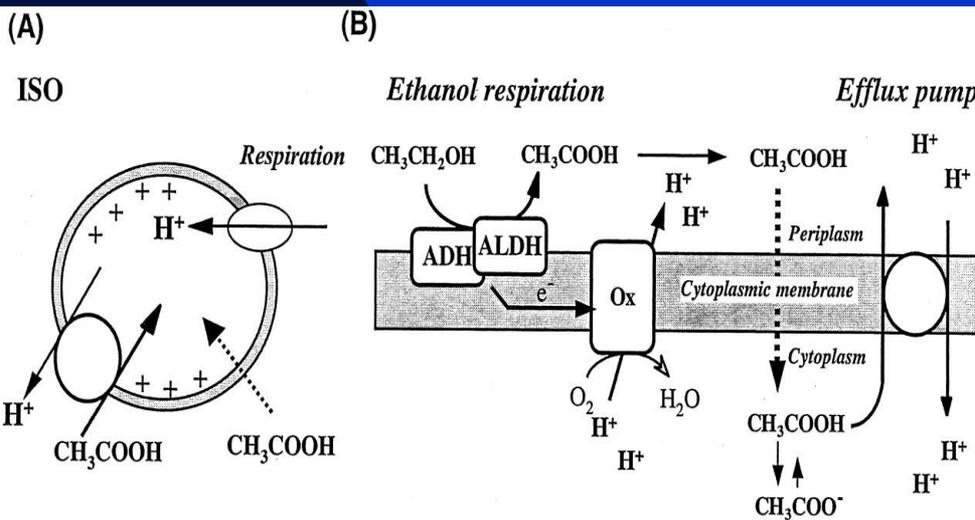


Figure 48 Market for acetic acid

# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

### Δ) ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ

- Παράγεται από *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, αναερόβια σε pH 6.0 και  $\theta=37-44^{\circ}\text{C}$ , με αναερόβια ζύμωση γλυκόζης, λακτόζης, ή αποπρωτεϊνωμένου τυρογάλακτος
- Εκτός από ρυθμιστής οξύτητας σε τρόφιμα και φάρμακα έχει αντιμικροβιακή δράση & ωραία γεύση
- Αν πολυμεριστεί με χημική κατάλυση μπορεί να συντεθεί το πολυγαλακτικό (PLA), που είναι βιοαποικοδομήσιμο πλαστικό
- Απομόνωση γαλακτικού γίνεται από το υγρό ζύμωσης μέσω των παρακάτω σταδίων (κατιούσα επεξεργασία)

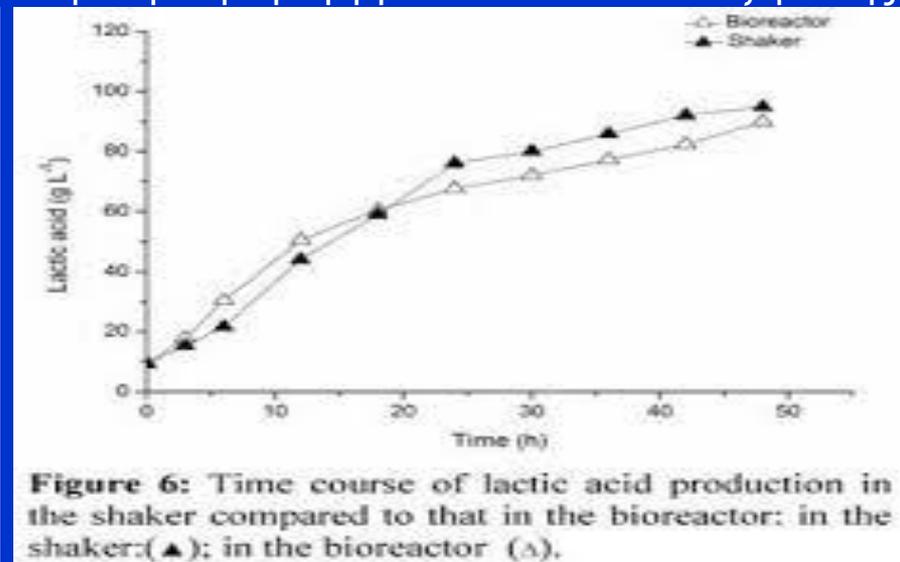
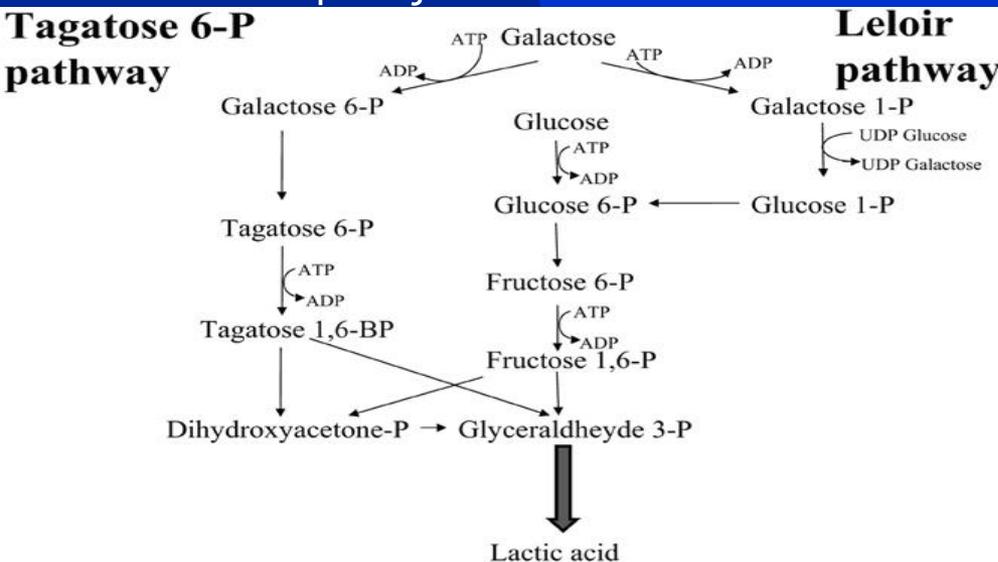
(α) καταβύθιση γαλακτικού με  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  ή  $\text{NaOH}$  προς παραγωγή γαλακτικού ασβεστίου/νατρίου,

(β) διήθηση/φυγοκέντρηση ιζήματος γαλακτικού ασβεστίου/νατρίου και

(γ) προσθήκη θειϊκού/υδροχλωρικού οξέος για μετατροπή του άλατος και πάλι σε γαλακτικό οξύ

### ■ Βιοσυνθετική οδός

Μέγιστη παραγωγή γαλακτικού σε ~48h ζύμωσης



# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

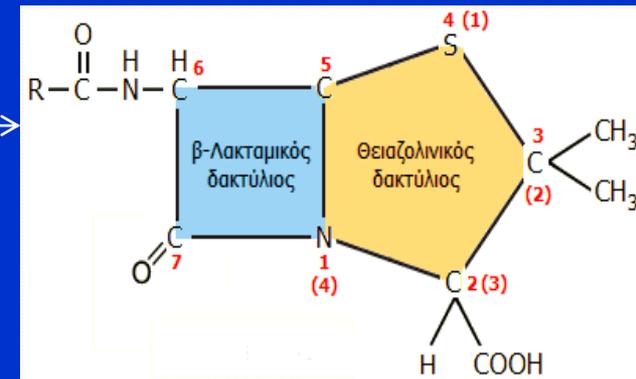
## ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΒΑΚΤΗΡΙΟΣΙΝΩΝ

### ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

- Αντιμικροβιακές ουσίες ευρέως φάσματος με ένα β-λακταμικό δακτύλιο και ένα θειαζολικό δακτύλιο (διακόπτουν τη σύνθεση πεπτιδογλυκάνης στο κυτταρικό τοίχωμα βακτηρίων)
- Διαφορετική βιοσύνθεση ανάλογα με το μικροοργανισμό. Συνήθως είναι δευτερογενής μεταβολίτες (παράγονται στη φάση στασιμότητας και θανάτου των μικροοργανισμών)
- Διαφορετική χημική δομή → διαφορετικές ιδιότητες

### A) ΠΕΝΙΚΙΛΛΙΝΗ (ανακαλύφθηκε από τον FLEMMING)

- Αντιβιοτικό με λακταμικό δακτύλιο που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία πολλών βακτηριακών λοιμώξεων
- παράγεται από τον μύκητα *Penicillium chrysogenum* και *P. notatum*)



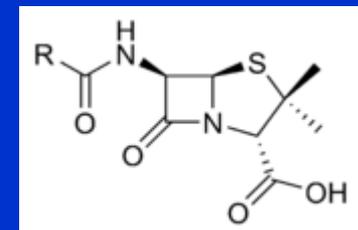
■ ακυλάση  
Βένζυλό-πενικιλίνη  $\xrightarrow{\text{σε pH 3-6}}$  6-αμινο πενικιλλικό οξύ+φαινυλοξικό οξύ  $\xrightarrow{\text{σε pH 7-8}}$

■ Υπάρχουν ≈20 ημισυνθετικές Πενικιλίνες : παράγονται με αλλαγή ακυλοομάδας και εισαγωγή νέων πλευρικών αλυσίδων με ένζυμα από γενετικά τροποπ. *E. Coli*

- - propicillin
- - oxacillin
- - ampicillin
- - amoxyllin

Η ακυλίωση της πενικιλίνης σε βιοαντιδραστήρα από γενετικά τροποπ. *E. coli*

■ Προσοχή: η παραγωγή λακταμάσης (πενικιλιάσης διασπάει την πενικιλίνη)



(Penicillin)

# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

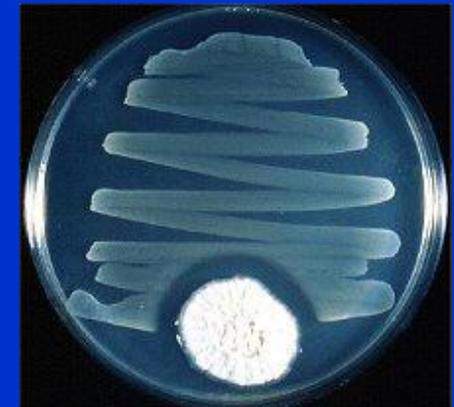
## ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΒΑΚΤΗΡΙΟΣΙΝΩΝ

### A. Penicillin

- Διαφήμιση του 1940 για τη δράση της πενικιλίνης
- Penicilium chrysogenum
- Τεστ αντιβιοαντοχής του S. aureus σε διαφορετικά αντιβιοτικά



- Αναστολή βακτηρίου από μύκητα που παράγει αντιβιοτικά

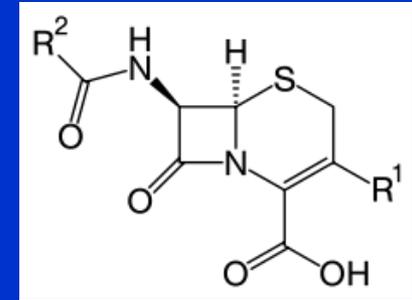


# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΒΑΚΤΗΡΙΟΣΙΝΩΝ

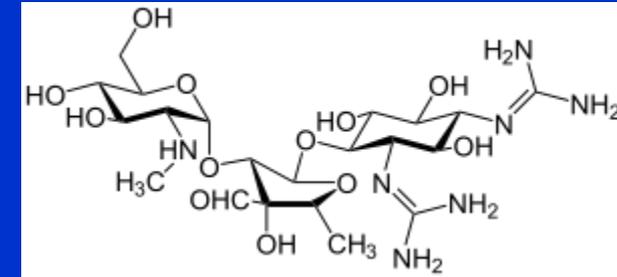
### B) ΚΕΦΑΛΟΣΠΟΡΙΝΕΣ

- ευρύ φάσμα, χαμηλή τοξικότητα, αντίσταση σε λυάσεις
- παραγωγή από τον μύκητα *Acromonium* (*Cephalosporium*)
- περιέχουν β-λακταμικό δακτύλιο όπως οι πενικιλίνες, με αντικατάσταση φαινυλοξικού οξέως με 7-αμινοκεφαλοσπορανικό
- Όπως και η πενικιλίνες διακόπτουν τη σύνθεση πεπτιδογλυκάνης στο κυτταρικό τοίχωμα βακτηρίων

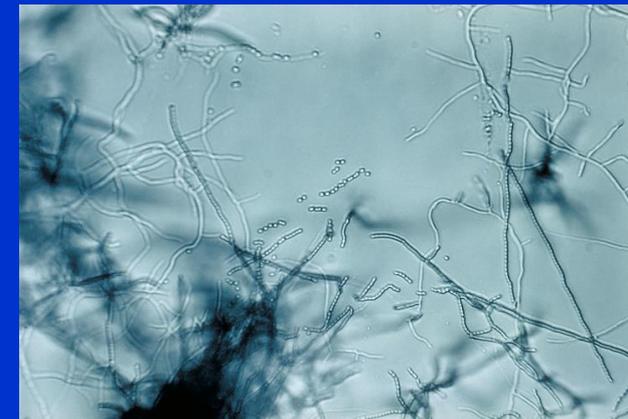
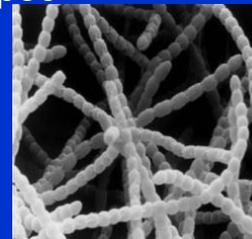


### Γ. Streptomycin

- Η στρεπτομυκίνη ήταν η πρώτη αμινογλυκοσίδη (μόρια με συνδυασμό ομάδων αμινοσακχάρων και κυκλοεξανίων), που ανακαλύφθηκε ήδη από το 1944 από την ομάδα του Selman Waksman. Στην συνέχεια απομονώθηκαν πολλές όμοιες δραστικές ουσίες από ακτινομύκητες ιδίως των γενών *Streptomyces* και *Micromonospora*.
- ισχυρά βακτηριοκτόνα δια της αναστολής της πρωτεϊνοβιοσύνθεσης σε πολλαπλασιαζόμενα ή ανενεργά βακτήρια, καθώς συνδέονται με την 30 S-υπομονάδα του ριβοσώματος και επάγουν λάθη στην ανάγνωση του mRNA κατά την μετάφραση. Συντίθενται έτσι λανθασμένες μη λειτουργικές που οδηγούν στην καταστροφή του κυττάρου



### Streptomyces griseus

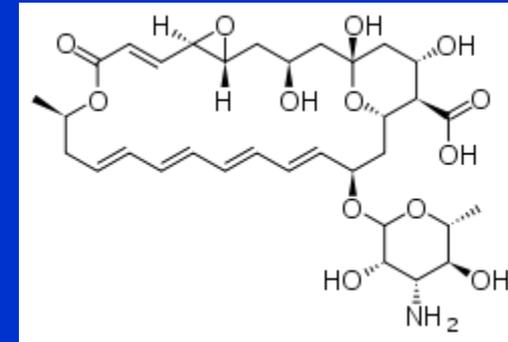


# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΒΑΚΤΗΡΙΟΣΙΝΩΝ

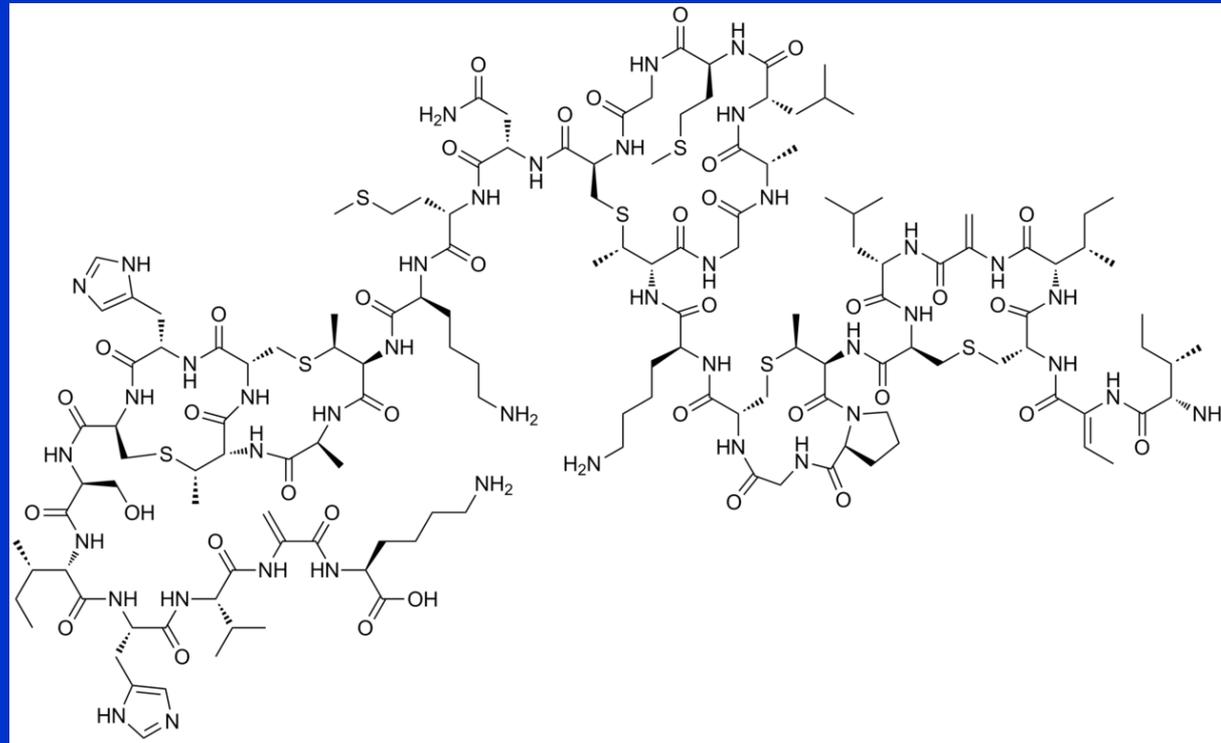
### Δ) ΝΑΤΑΜΥΚΙΝΗ (Natamycin/Pimaricin)

- Συντηρητικό με μυκητοκτόνες ιδιότητες (E235). Έχει την μορφή λευκής σκόνης.
- Παράγεται από το βακτήριο *Streptomyces natalensis* και έχει αντιμυκητιακή δράση (ενάντια σε *Candida*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, κλπ)
- Χρήση: Στην επιφάνεια σκληρών και ημίσκληρων τυριών, καθώς και στην επιφάνεια αποξηραμένων αλλαντικών. Δεν υπάρχουν αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία (έλλειψη τοξικότητας).

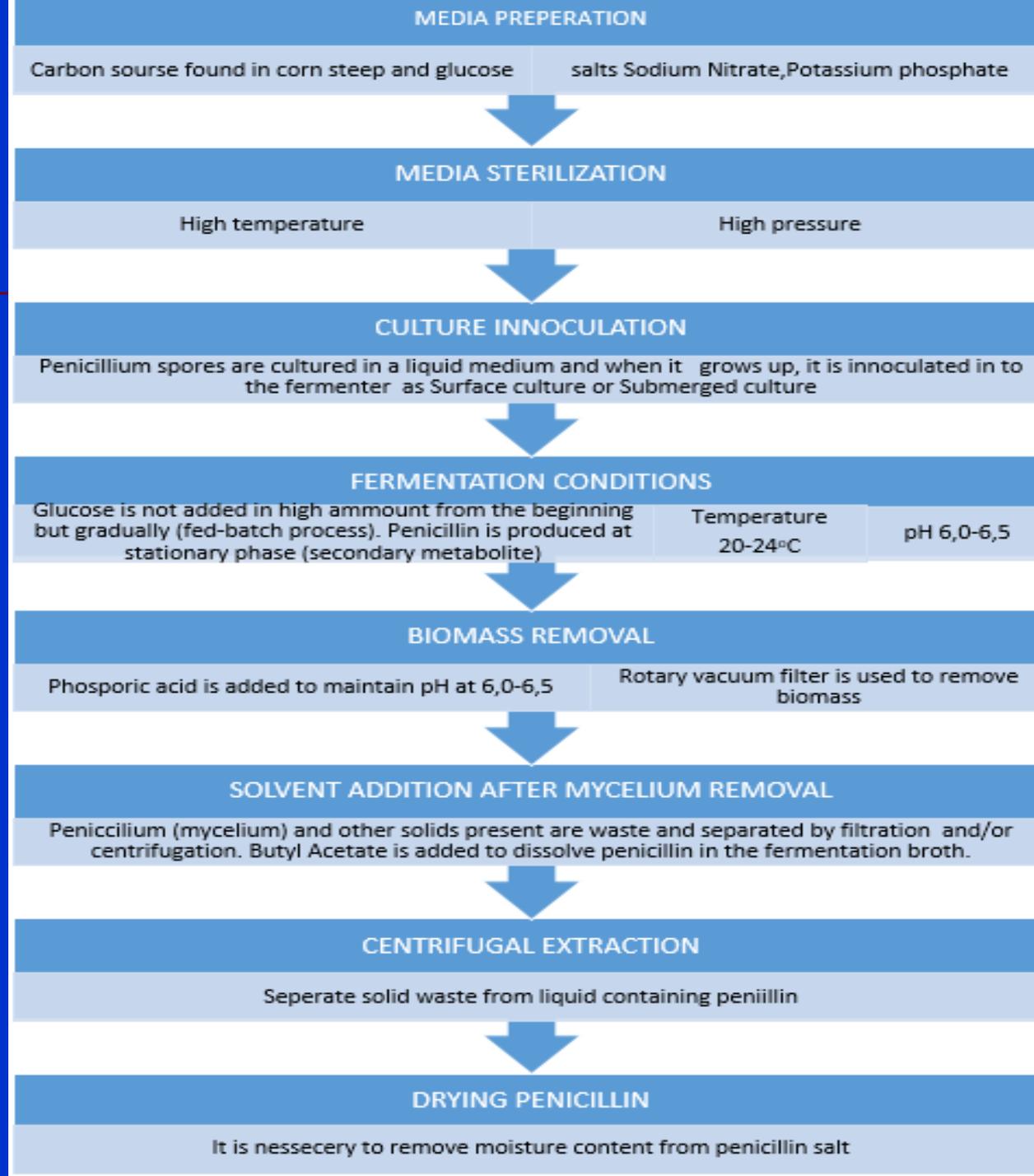


### Ε. ΝΙΣΙΝΗ (Bacteriocin)

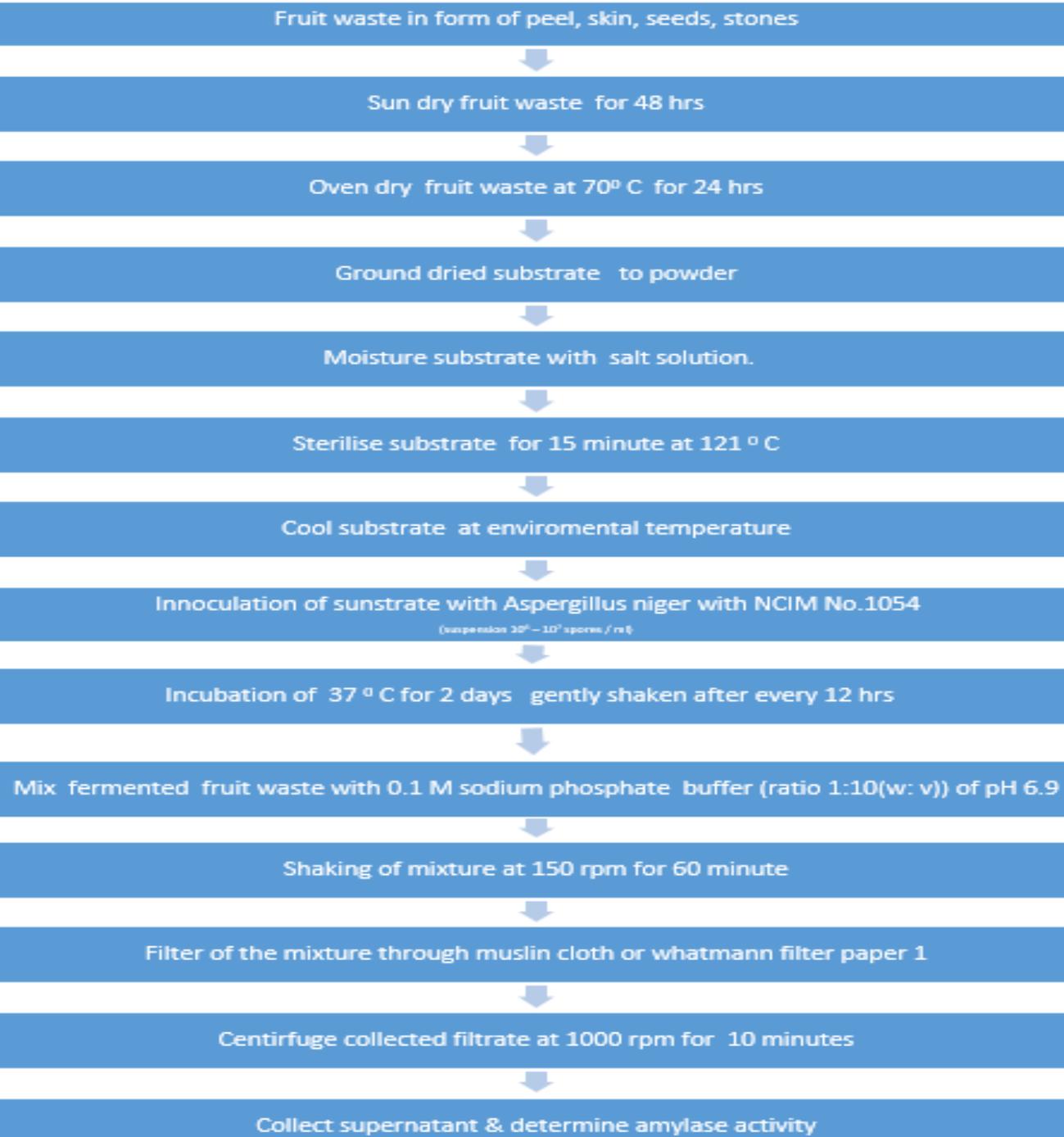
- Πολυκυκλικό πεπτιδίο με δράση ενάντια σε Gram+ βακτήρια
- Αντίθετα με άλλες βακτηριοσίνες έχει σχετικά ευρύ φάσμα δράσης ενάντια σε *Clostridium*, *S. aureus*, *B. cereus*, *L. monocytogenes* (αναστέλλει σπόρια *Clostridium*)
- Παράγεται από το βακτήριο *Lactococcus lactis* με ζύμωση γάλακτος ή υποστρωμάτων γλυκόζης
- Χρησιμοποιείται σε αλλαντικά-τυριά



# Παράδειγμα διαγράμματος ροής για παραγωγή πενικιλίνης

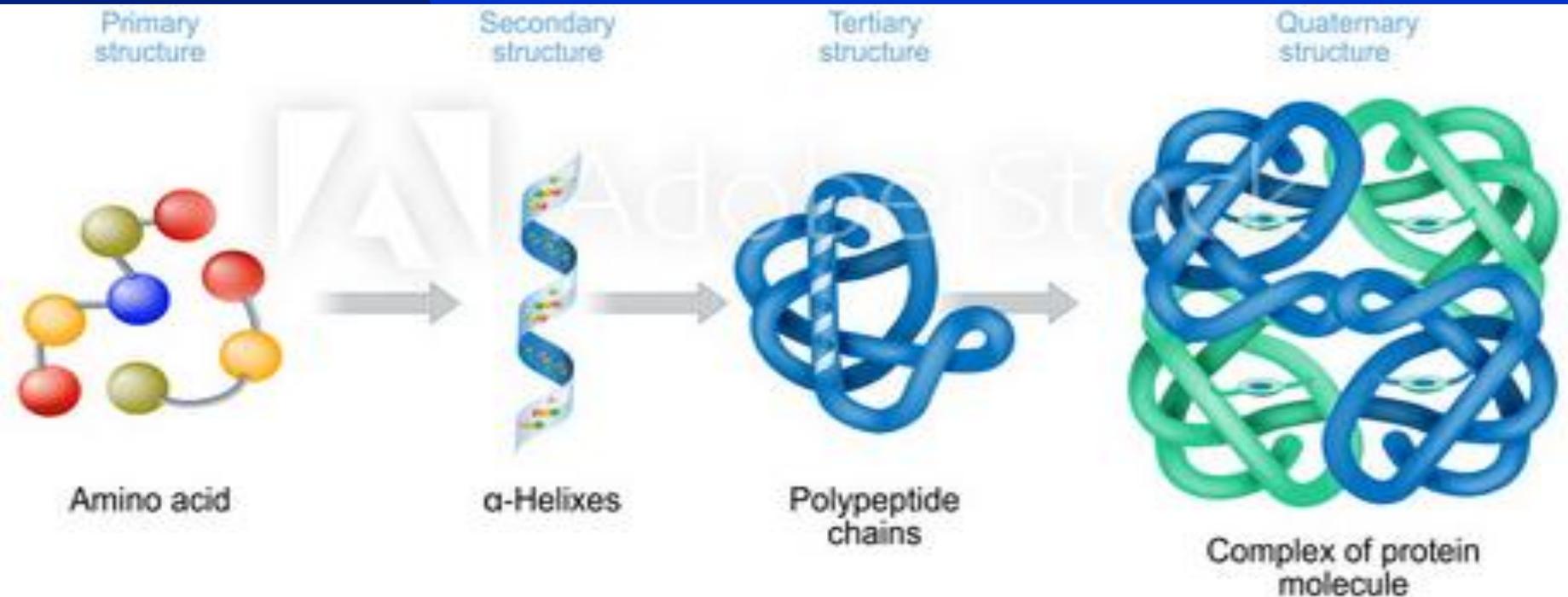


Παράδειγμα  
διαγράμματος ροής για  
παραγωγή α-αμυλάσης  
με στερεή ζύμωση από  
πούλπα φρούτων



# Εφαρμοσμένη Ενζυμολογία και Βιοκατάλυση

- **Βιοκατάλυση:** η χρήση ενζύμων, σε ελεύθερη ή ακινητοποιημένη μορφή, ή εναλλακτικά ακινητοποιημένων κυττάρων που διαθέτουν πολλά ένζυμα, με σκοπό την **βιομετατροπή** βιολογικών μορίων σε νέα προϊόντα, μέσω κατάλυσης μια βιοχημικής αντίδρασης από τα ένζυμα
- Παράδειγμα: η μετατροπή του αμύλου σε γλυκόζη
- Τα ένζυμα είναι πρωτεΐνες και η **δομή τους παίζει καθοριστικό ρόλο στη λειτουργικότητά τους**
- Υπάρχει πρωτοταγής, δευτεροταγής, τριτοταγής και τεταρτοταγής δομή



# Εφαρμοσμένη Ενυμολογία και Βιοκατάλυση

## Μηχανισμός Δράσης των ενζύμων

■ Η εξίσωση *Michaelis & Menten* περιγράφει την κινητική των ενζυμικών αντιδράσεων:

$$v = V_{\max} \cdot s / K + s$$

■ όπου :  $v$  = ταχύτητα αντίδρασης,  $V_{\max}$  = μέγιστη ταχύτητα αντίδρασης,  $S$  = συγκέντρωση υποστρώματος,  $K$  = κινητική σταθερά χαρακτηριστική για κάθε αντίδραση και κάθε ένζυμο

■ Για να προχωρήσει μια ενζυμική αντίδραση πρέπει το υπόστρωμα να προσδεθεί στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, αφού το ένζυμο πάρει την κατάλληλη διαμόρφωση

■ Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του υποστρώματος, αυξάνει και η ταχύτητα της αντίδρασης, μέχρι ενός ορίου, πέραν του οποίου δεν υπάρχει περαιτέρω αύξηση, λόγω κορεσμού (των ενεργών κέντρων) των ενζύμων

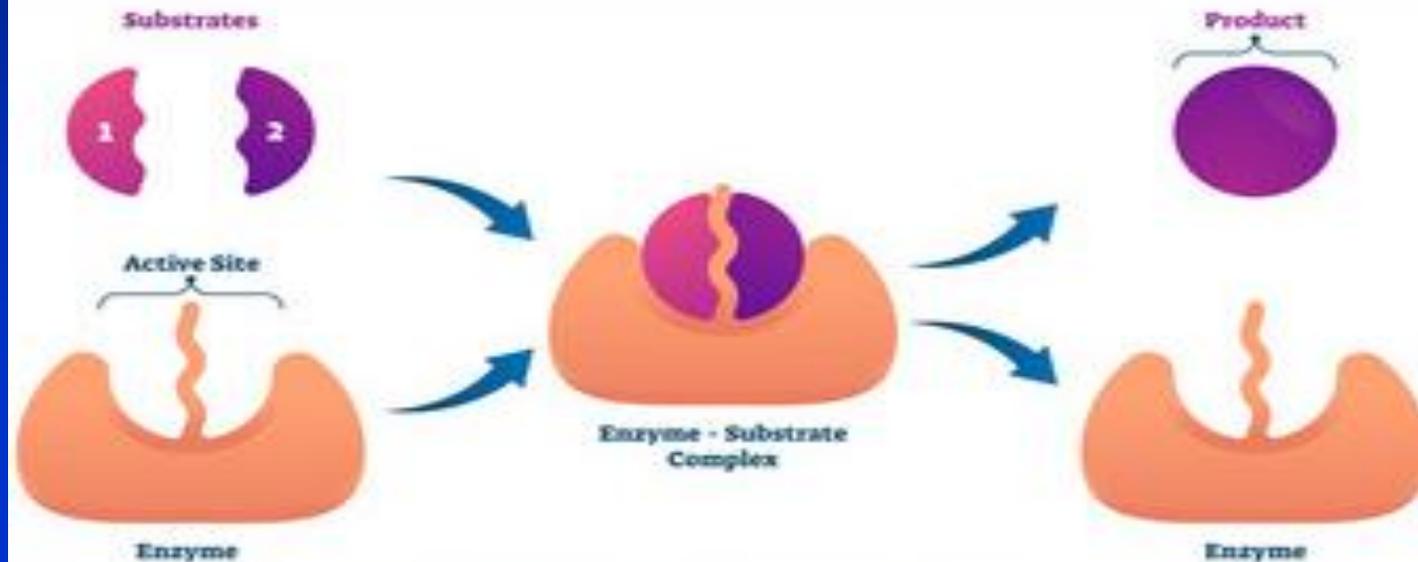
# Εφαρμοσμένη Ενυμολογία και Βιοκατάλυση

## Μηχανισμός Δράσης των ενζύμων

(α) Υδρόλυση υποστρώματος (επάνω) σε 2 νέα μόρια



(β) Βιοσύνθεση βιομορίου (κάτω) με συνδιασμό 2 ξεχωριστών μορίων



# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΝΖΥΜΩΝ (ΖΥΜΩΤΙΚΑ) & ΧΡΗΣΗ ΤΟΥΣ ΣΤΗ ΒΙΟΚΑΤΑΛΥΣΗ

### ΠΗΓΕΣ ΚΑΙ ΧΡΗΣΕΙΣ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ

- ≈2500 γνωστά ένζυμα,
- ≈30 σε βιομηχανική χρήση
- Πηγές ενζύμων :
  - ◆ Ιστοί (πάγκρεας) και υγρά θηλαστικών
  - ◆ Φυτικοί ιστοί (φτηνοί)
  - ◆ Μικροοργανισμοί (Bacillus, Aspergillus, Rhizopus, Mucor, Trichoderma)
- Απαραίτητα χαρακτηριστικά ενζύμων:
  - ◆ Ασφάλεια
  - ◆ Ποιότητα
  - ◆ Επαναληψιμότητα
  - ◆ Απουσία υποπροϊόντων
- Γιατί ένζυμα και βιοκατάλυση αντί ζύμωσης με ελεύθερα κύτταρα?
  - ◆ Μεγάλη ποικιλία ενζύμων στη φύση
  - ◆ Σχετικά εύκολη βιομηχανική παραγωγή από λίγους (μικρο) οργανισμούς
  - ◆ Εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα και παραγωγή καθαρού προϊόντος
  - ◆ Οικονομική παραγωγή υπό προϋποθέσεις (βιοσύνθεση, επαναχρησιμοποίηση, απουσία ανεπιθύμητων υποπροϊόντων)

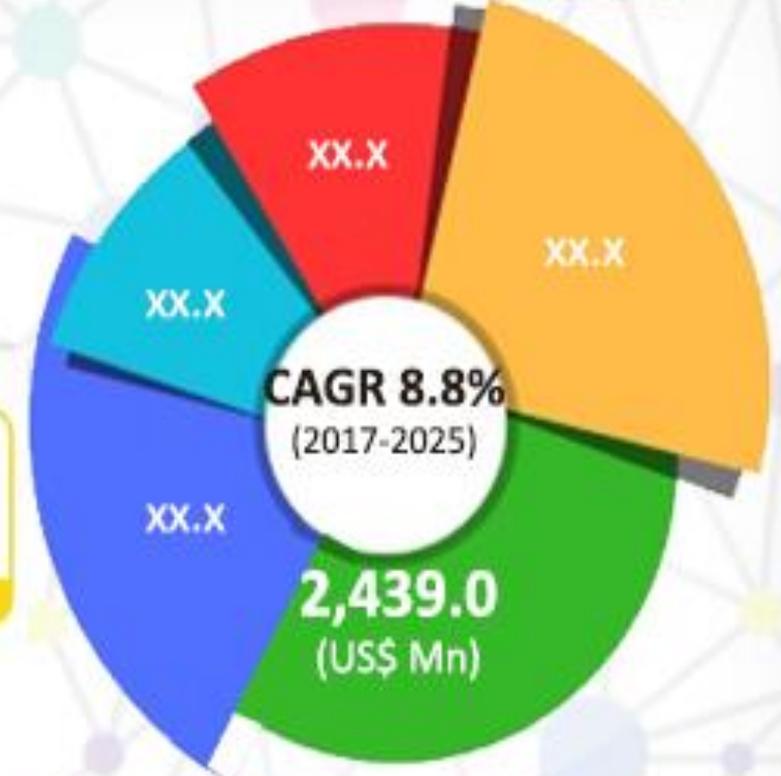
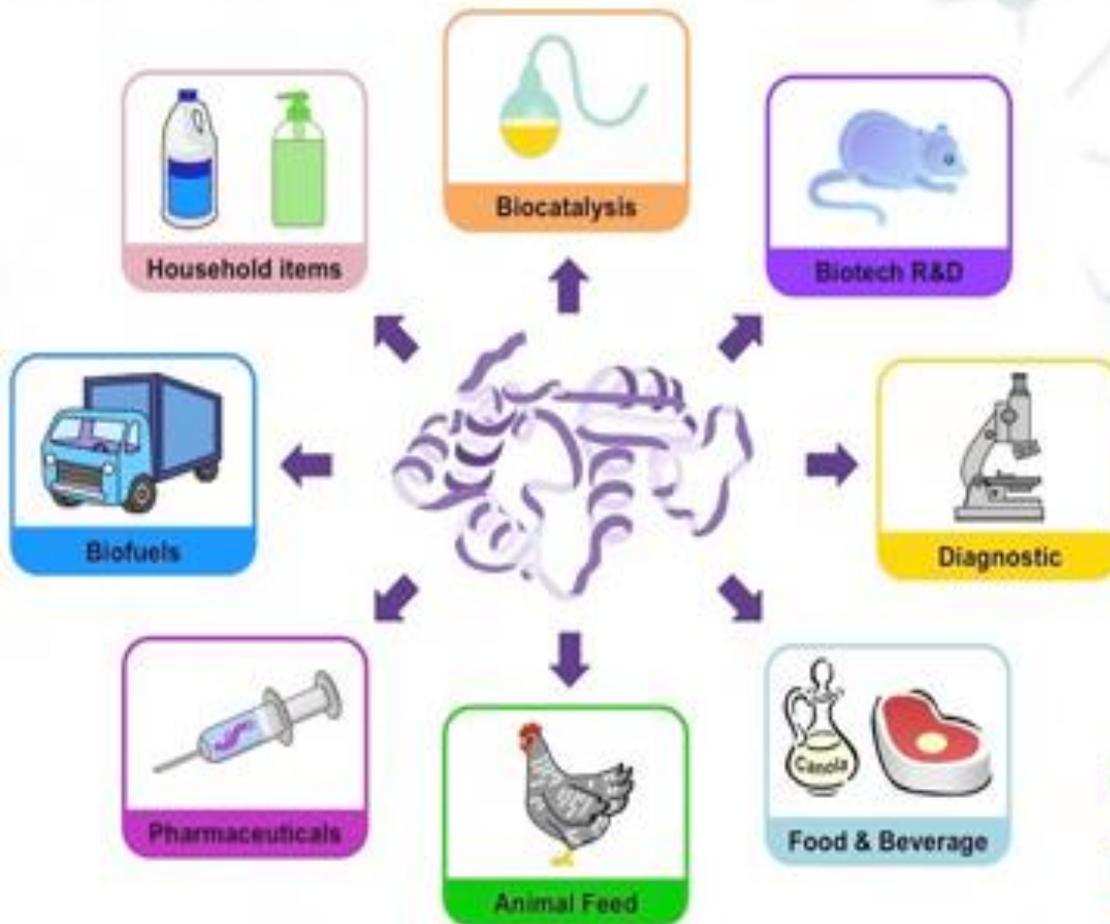
# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## Η διεθνής αγορά των ενζύμων

### Industrial Enzymes Market Revenue

By Region, 2017 (US\$ Mn)

Transparency  
Market Research  
Depth Analysis. Accurate Results.



■ North America

■ Asia Pacific

■ Latin America

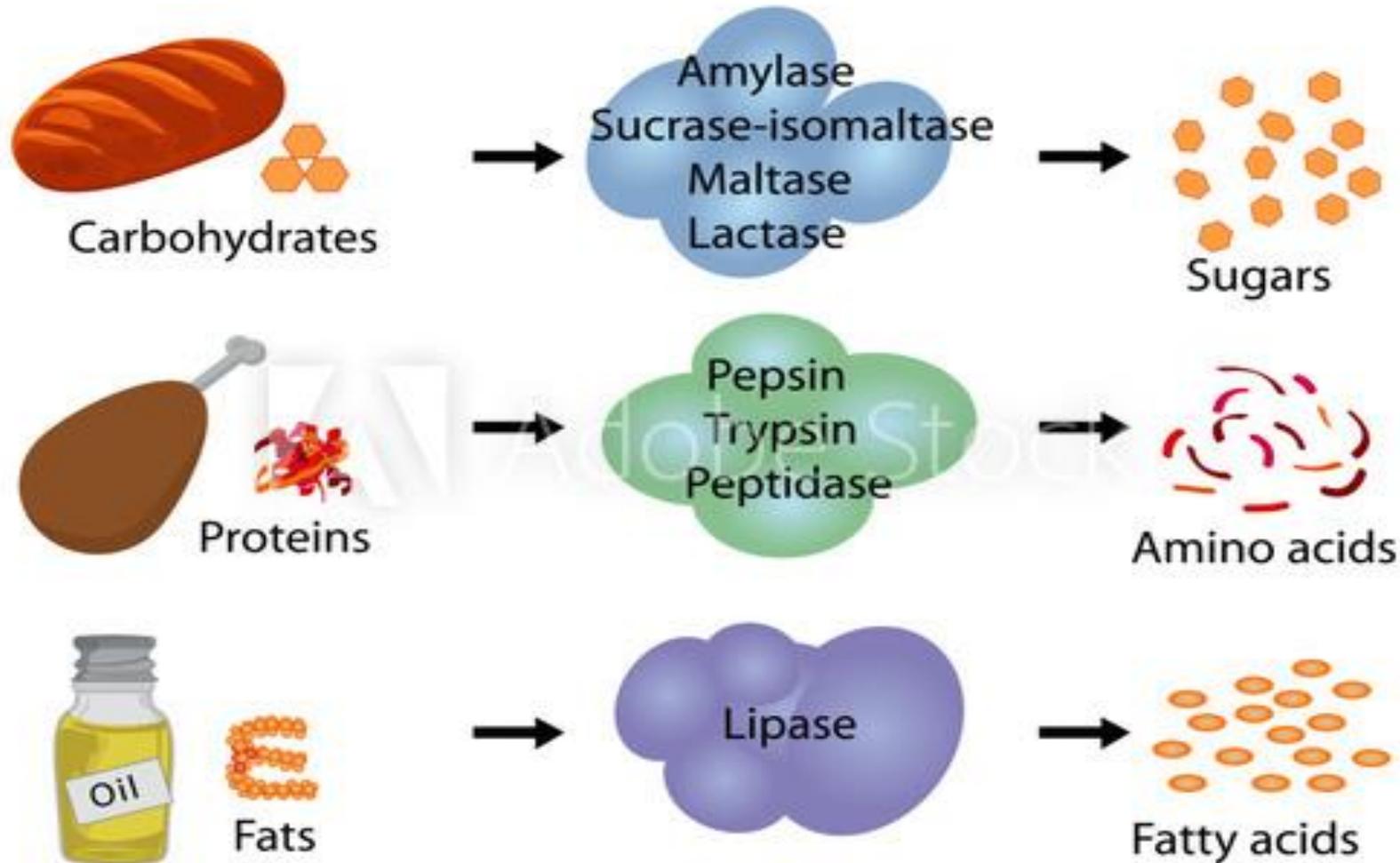
■ Europe

■ Middle East and Africa

Source: Transparency Market Research, 2017

# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΧΡΗΣΗΣ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΣΤΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ



# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## ΧΡΗΣΗ ENZYΜΩΝ – Παραδείγματα

- Πίνακας: μερικά σημαντικά ένζυμα που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία

Ένζυμα	Χρήση
Βακτηριακή α-αμυλάση	άμυλο → γλυκόζη
Μυκητιακή αμυλογλυκοσιδάση	άμυλο → γλυκόζη
Μυκητιακή α-αμυλάση	Μερική υδρόλυση αμύλου για παρασκευή ψωμιού
Πουλλουανάση	Άμυλο → γλυκόζη
Μικροβιακές ρεννίνες	K-καζεΐνη → P- καζεΐνη για πήξη γάλακτος κατά την τυροκόμιση
Βακτηριακές πρωτεάσες	Απομάκρυνση πρωτεϊνών σε βιολογικά απορρυπαντικά
Παπαΐνη	Μαλάκωμα κρέατος και διαύγαση μπύρας
Λιπάση	Ουδέτερα λίπη → γλυκερίνη + ελεύθερα λιπαρά, βιολογικά απορρυπαντικά
Λακτάση	Λακτόζη → γλυκόζη και γαλακτόζη
Κυτταρινάσες	Κυτταρίνη → γλυκόζη (και περαιτέρω ζύμωση π.χ. σε αιθανόλη)
Πηκτινάσες - Πηκτινεστεράσες	Υδρόλυση της πηκτίνης, διαύγαση χυμών
Βακτηριακή ισομεράση της γλυκόζης	Βιοηλεκτρόδιο (μέτρηση γλυκόζης στο αίμα)
Αμινοακυλάση	Μετατροπή D,L αμινοξέων σε L αμινοξέα που χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα τροφών (π.χ. γλουταμινικό)
Ακυλάση της πενικιλίνης	G-πενικιλίνη → 6-αμινοπενικιλικό οξύ

# Χρήση ενζύμων στην Κλινική Χημεία – προσδιορισμός μεταβολιτών με βιοχημικές ενζυμικές αναλύσεις ή/και χρήση βιοαισθητήρων

## Ένζυμα που χρησιμοποιούνται από την Κλινική Χημεία

Ουσίες προς Ανάλυση	Κύρια ένζυμα που χρησιμοποιούνται	Δευτερεύοντα ένζυμα
Ακετοακετικό	Υδροξυβουτυρική αφυδρογονάση	
Αμμωνία	Γλουταμική αφυδρογονάση	
Χοληστερόλη	Χοληστερόλη-οξειδάση	Χοληστερο εστεράση Περοξειδάση
Αιθανόλη	Αλκοολική αφυδρογονάση	
Γλυκόζη	Γλυκόζη οξειδάση Εξοκινάση Γλυκόζη αφυδρογονάση	Περοξειδάση Γλυ 6-φωσφ.αφυδρογονάση
Υδροξυβουτυρικό	Υδροξυβουτυρική αφυδρογονάση	
Γαλακτικό οξύ	Γαλακτική αφυδρογονάση	
Πυροσταφυλικό	Γαλακτική αφυδρογονάση	
Τριγλυκερίδια	Γλυκερόλη κινάση Γλυκερόλη αφυδρογονάση	Λιπάση, πυροσταφυλική κινάση, γαλ. Αφυδρογονάση λιπάση
Ουρία	Ουρεάση	

# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

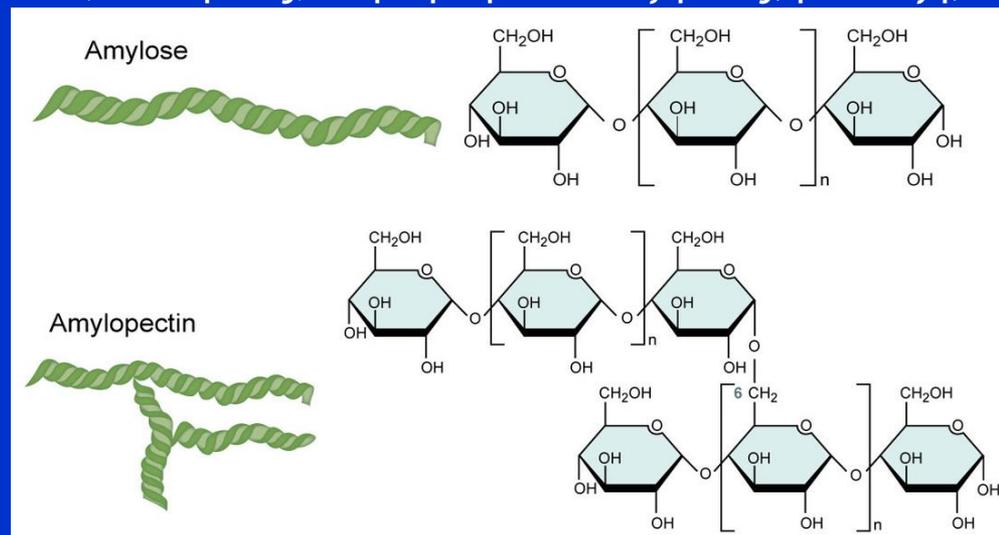
## ΧΡΗΣΗ ΕΝΖΥΜΩΝ (ΒΙΟΚΑΤΑΛΥΣΗ)- Παραδείγματα

### A) ΑΜΥΛΑΣΕΣ: Παραγωγή αμυλοσιροπίων, μαλτόζης και γλυκόζης

- Υδρολυτικά ένζυμα (μικροοργανισμών) χρησιμοποιούνται για τη διάσπαση αμυλόζης και αμυλοπηκτίνης του αμύλου
- Παραγωγή αμυλασών από *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *Aspergillus oryzae*, κλπ.  
**Προϊόντα ενζυμικής υδρόλυσης** (ή και όξινης υδρόλυσης με  $H_2SO_4$ ) του αμύλου από αμυλάσες: γλυκόζη, μαλτόζη, μαλτοδεξτρίνες
- **Χρήσεις τελικών προϊόντων:** γλυκαντικές ύλες (γλυκόζη, μαλτόζη), πηκτικές ουσίες. υλικά ενθυλάκωσης, υποκατάστατα λίπους (μαλτοδεξτρίνες)

#### Κατηγορίες αμυλασών:

- α-αμυλάση (ενδοαμυλάση): διασπάει α-1,4 δεσμούς σε τυχαία σημεία, παράγει γλυκόζη, μαλτόζη, μαλτοτριόζες. Άριστο pH δράσης 6-6,5.
- β-αμυλάση (εξοαμυλάση): διασπάει α-1,4 δεσμούς στα μη αναγωγικά άκρα, παράγει γλυκόζη
- Γλυκοαμυλάση: διασπάει α-1,4 δεσμούς + α-1,6 δεσμούς, παράγει μαλτοδεξτρίνες, μαλτόζη, γλυκόζη. Άριστο pH 4-5.
- Πουλλουανάση : διασπάει α-1,6 δεσμούς: παράγει μαλτοδεξτρίνες διαφόρων MB Υψηλό MB μαλτοδεξτρινών →
  - υψηλό ιξώδες,
  - υψηλή ικανότητα ενθυλάκωσης



# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## ΧΡΗΣΗ ENZYΜΩΝ (ΒΙΟΚΑΤΑΛΥΣΗ) - ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ

Β) β-γαλακτοσιδάση (λακτάση) από *Lactobacillus*, *Aspergillus oryzae*, *Kluyveromyces lactis*  
διάσπαση λακτόζης → γλυκόζη + γαλακτόζη

- παραγωγή γάλακτος χωρίς λακτόζη
- επιτάχυνση γαλακτικής ζύμωσης
- Παραγωγή γλυκόζης από το αποπρωτεϊνωμένο τυρόγαλο (υποπροϊόν τυροκομίας)

Γ) Πρωτεάσες από *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. licheniformis*)

- υδρόλυση λεκέδων – αλκαλική Πρωτεάση (σερίνη, σαμππιλίνη)
- πρωτεόλυση-πήξη καζεΐνης με μικροβιακή ρεννίνη (μικροβιακή πτυιά) πρωτεάση ασπαραγινικού.
- Τρυφεροποίηση κρέατος (παπαΐνη)
- Παραγωγή αμινοξέων (π.χ. συμπληρώματα διατροφής) και ενισχυτικών γεύσης (γλουταμινικό)
- Παραγωγή ανοσοδιεγερτικών πεπτιδίων

Δ) Λιπάσες από βακτήρια, ζύμες-μύκητες (π.χ. *Pseudomonas*, *Candida*, *Yarrowia*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium*) για παραγωγή λιπαρών οξέων και χρήση

- Ως Αρωματικές ενώσεις, π.χ. στην παραγωγή τυριών
- Στον καθαρισμό λεκέδων (απορρυπαντικά)
- Αποικοδόμηση αποβλήτων
- Διάσπαση πετρελαίου και πετρελαιοκηλίδων
- Εστεροποίηση λιπαρών οξέων (π.χ. για παραγωγή βιοντήζελ)

# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## ΧΡΗΣΗ ΕΝΖΥΜΩΝ (ΒΙΟΚΑΤΑΛΥΣΗ) – ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ

### Ε) (βιο)διαγνωστικά kits

- π.χ γρήγορος προσδιορισμός γλυκόζης στο αίμα(ισομεράση) ή αλκοόλης(αλκοολ. Αφυδρογονάση) ή παρουσίας αντιβιοτικών (β-λακταμάση) (ανίχνευση μεταβολής χρώματος δηλώνει παρουσία/απουσία της ουσίας που προσδιορίζουμε)

### ΣΤ) Βιοηλεκτρόδια (Biosensors)

- ενσωματωμένο ένζυμο σε ειδικό ανιχνευτή (ηλεκτρονίων-ιόντων, αερίων) που μετράει την διαφορά ηλεκτρονιακού δυναμικού πριν και μετά την ενζυμική αντίδραση.
- Μετατρέπουν το ηλεκτρικό σήμα σε συγκεκριμένη συγκέντρωση της ουσίας που μετράμε
- Παράδειγμα: ανίχνευση και προσδιορισμός γλυκόζης στο αίμα με συσκευή μέτρησης γλυκόζης για διαβητικούς, ή ανίχνευση αλκοόλης στην εκπνοή ή στο αίμα.

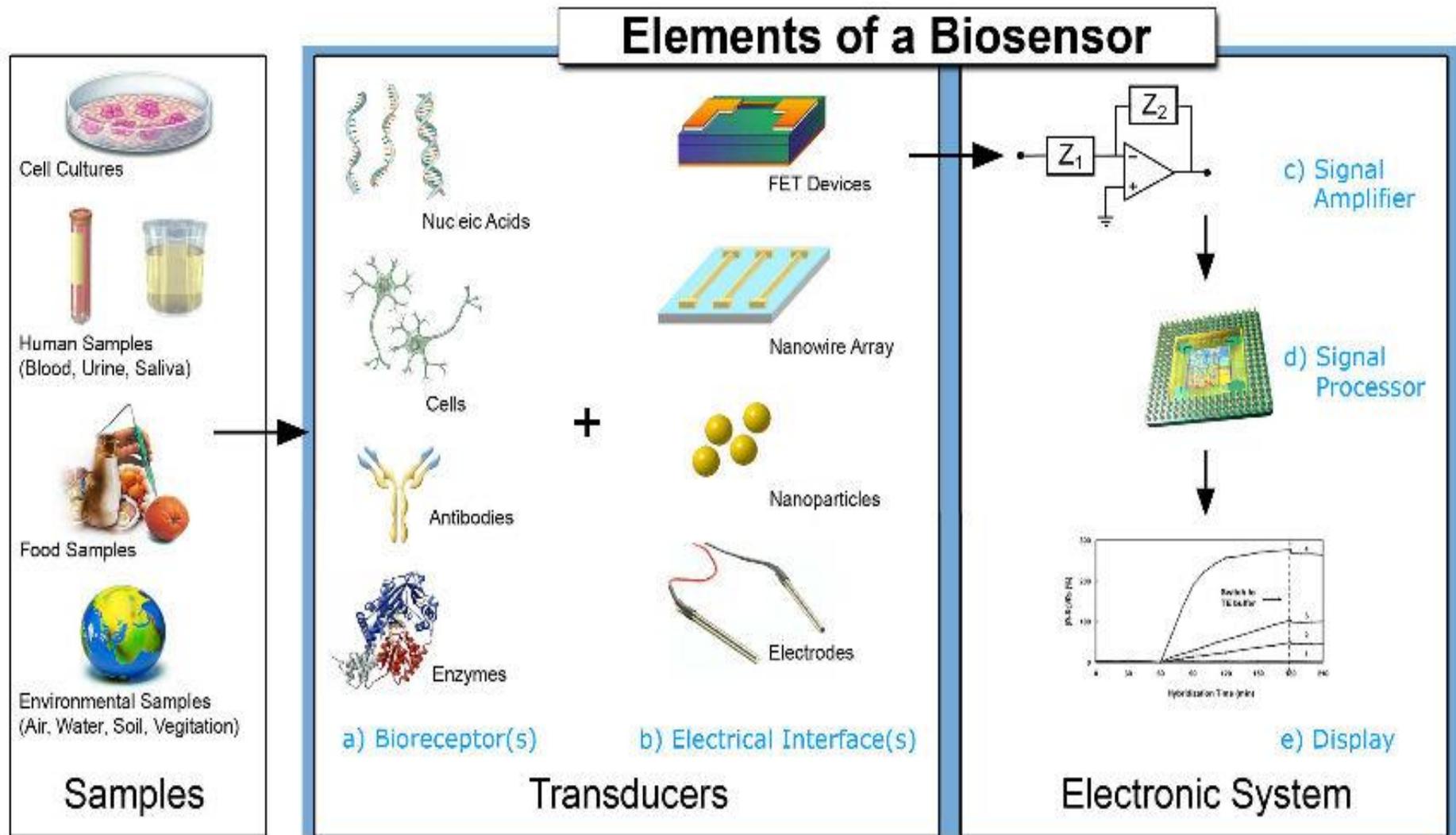
# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## ΧΡΗΣΗ ΕΝΖΥΜΩΝ (ΒΙΟΚΑΤΑΛΥΣΗ) - ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ

### Βιοισθητήρες – Τρόπος Λειτουργίας

#### Παράδειγμα μετρητή γλυκόζης από το σάλιο

<https://www.medgadget.com/2019/02/new-biosensor-accurately-measures-glucose-in-saliva.html>



## ΚΑΘΗΛΩΣΗ / ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΝΖΥΜΩΝ

Η σταθεροποίηση βιομηχανικών ενζύμων είναι απαραίτητη για την επαναλαμβανόμενη και αποτελεσματική χρήση των ενζύμων.

Γίνεται με :

- Φυσική επιλογή, επιλογή π.χ θερμοάντοχων πρωτεασών για απορρυπαντικά
- Ενζυμομηχανική (αλλαγή βιοσύνθεσης, μεταβολική μηχανική)
- Γενετική μηχανική επιλεγμένων μικροοργανισμών (εισαγωγή νέων γονιδίων)
- Αύξηση ημιπεριόδου ζωής με χημική τροποποίηση (π.χ ακυλίωση)
- Κατάλληλο περιβάλλον αντίδρασης π.χ προσθήκη  $Ca^{++}$  ή πολυμερών, π.χ. για ενίσχυση - σταθεροποίηση αμυλάσης
- Διαμοριακή-ομοιοπολική σύνδεση ενζύμων με υψηλή δομική σταθερότητα
- Αποδιάταξη και επαναδίπλωση ενζύμου με θέρμανση (50°C - 80°C)
- Καθήλωση- ακινητοποίηση σε αδιάλυτους φορείς, π.χ. αύξηση θερμοαντοχής μετά από εγκλωβισμό σε πολυακρυλαμίδιο, ή αλγινικό ασβέστιο ή λιποσώματα.

# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

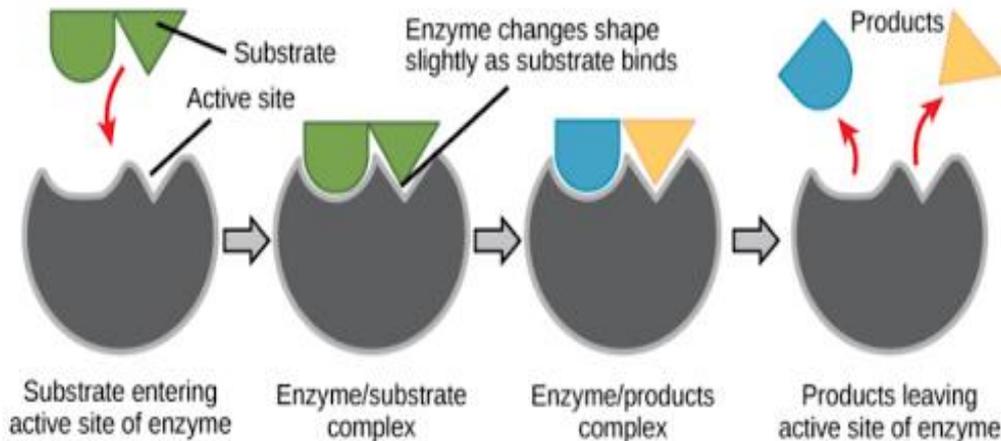
## ΚΑΘΗΛΩΣΗ / ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΝΖΥΜΩΝ

- Πρόσδεση/εγκλωβισμός ενζύμου σε κατάλληλο αδιάλυτο φορέα/υπόστρωμα, με σκοπό την
- (α) αύξηση της ανθεκτικότητας (θερμοαντοχής, αντοχής σε οξέα, αλκάλια, κλπ) και
- (β) επαναχρησιμοποίηση του ενζύμου

- Προϋπόθεση: καθήλωση με ήπιες συνθήκες για διατήρηση φυσικής δομής και λειτουργικότητας του ενεργού κέντρου του ενζύμου. Π.χ. Όχι έκθεση σε υψηλές  $\theta^{\circ}\text{C}$ , ισχυρά οξέα/αλκάλια, πυκνά διαλύματα αλάτων που προκαλούν μετουσίωση!

- Μπορεί να υπάρξουν περιορισμοί διάχυσης υποστρώματος στον φορέα και το ένζυμο, εξ αιτίας της καθήλωσης (ακίνητοποίησης), ανάλογα με τη μέθοδο, π.χ. Στερεοχημική παρεμπόδιση (σε φορείς πολυμερών) μετά από εγκλωβισμό σε αγαρόζη, αλγινικό

- Δεν πρέπει να συμμετέχουν λειτουργικές ομάδες του ενεργού κέντρου του ενζύμου στην καθήλωση/ακίνητοποίηση του ενζύμου



### PROTEIN STRUCTURE

Scaffold to support and position active site

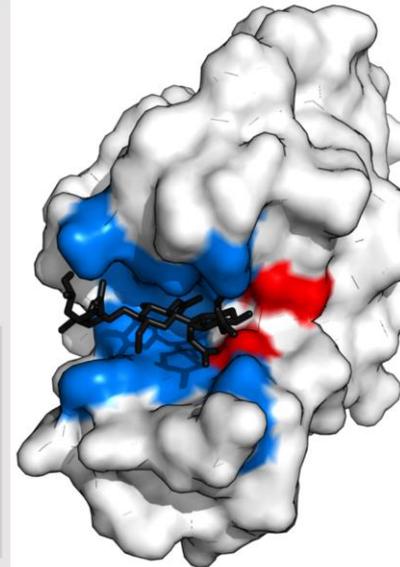
### ACTIVE SITE

#### BINDING SITES

Bind and orient substrate(s)

#### CATALYTIC SITE

Reduce chemical activation energy



# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΕΝΖΥΜΩΝ

<https://www.youtube.com/watch?v=oiTVJ91-YxQ>

### A. Σύνδεση σε αδιάλυτους φορείς με φυσική προσρόφηση

- (+) Φυσική προσρόφηση με ελάχιστη δομική αλλαγή ενζύμου
- (-) Ασθενής προσρόφηση και εύκολη αποκόλληση

#### Παραδείγματα φορέων:

#### Παραδείγματα ακινητοποιημένων ενζύμων

Άμυλο

α-αμυλάση

Γλουτένη

β-αμυλάση

κονκαναβαλίνη-σεφαρόζη

φωσφοδιεστεράση

ενεργός άνθρακας

ιμβερτάση

αλουμίνα

οξειδάση γλυκόζης

μπετονίτης

οξειδάση γλυκόζης

$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$

ασπαρτάση

πηκτή πυρόλιθου

λυσοζύμη, φωσφολιπάση

### B. ΣΥΝΔΕΣΗ ΣΕ ΦΟΡΕΙΣ ΜΕ ΟΜΟΙΟΠΟΛΙΚΟΥΣ ΔΕΣΜΟΥΣ

- Βελτιωμένη κινητικότητα και δραστικότητα ενζύμου αν συνδεθεί στο φορέα μέσω βραχίονα (συνδετ. μορίου)  
Σύνδεση μέσω ομάδων  $-\text{OH}$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{SH}$ ,  $-\text{NH}_2$
- Φορείς: αμινοκυτταρίνες, πορώδες γυαλί με  $-\text{OH}$ , ενεργοποιημένη κυτταρίνη, ενεργοποιημένο agar με BrCN

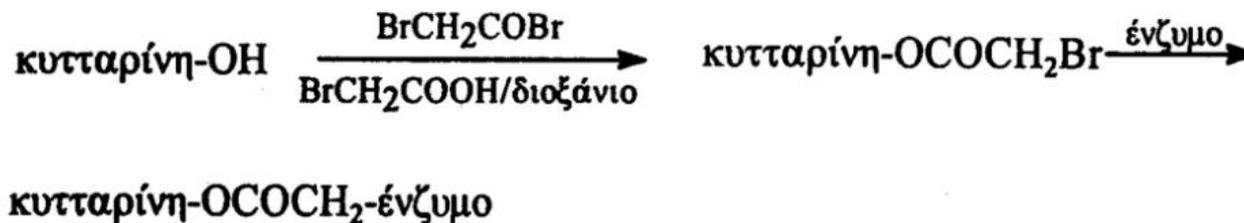
# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΕΝΖΥΜΩΝ

### Γ. ΣΥΝΔΕΣΗ ΣΕ ΦΟΡΕΙΣ ΜΕ ΙΟΝΤΙΚΟΥΣ ΔΕΣΜΟΥΣ

- Ηλεκτροστατική (ιοντική) σύνδεση ενζύμων με φορείς αντιθέτου φορτίου (ιονισμένη κυτταρίνη-DEAE πολυμερή, sephadex)
- Ήπιες συνθήκες σύνδεσης, αποκόλληση με αλλαγή pH ή με διαλύματα υψηλής ιοντικής ισχύος

Ακυλίωση (ενεργοποιημένη κυτταρίνη)

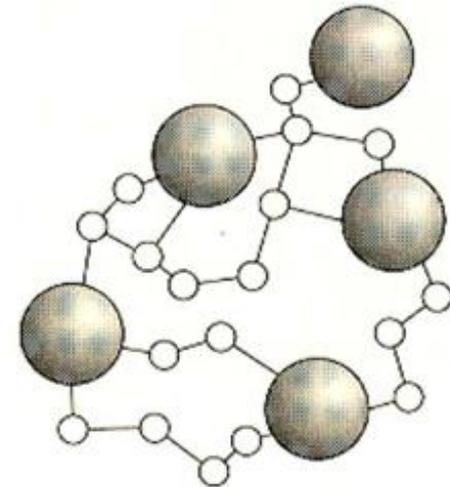
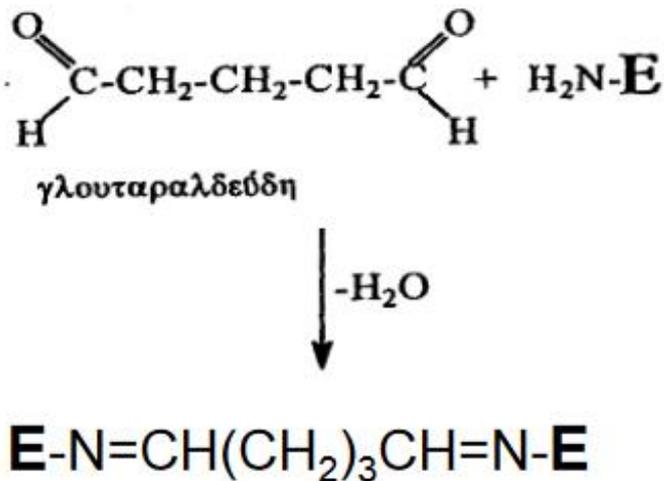


# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΕΝΖΥΜΩΝ

### Δ. ΔΙΑΜΟΡΙΑΚΗ ΣΥΝΔΕΣΗ ΕΝΖΥΜΩΝ

- Ομοιοπολική σύνδεση ενζύμων, χωρίς ενδιάμεσο αδιάλυτο φορέα
- Ήπιες συνθήκες καθήλωσης, αλλά απώλεια δραστηριότητας λόγω της διαμοριακής σύνδεσης (και της αντίδρασης με γλουταραλδεΐδη)
- Απαιτεί πυκνό διάλυμα ενζύμου (50-200 mg/ml)
- Χρησιμοποιείται και για τη σύνδεση και ακινητοποίηση κυττάρων



Διαμοριακή σύνδεση ενζύμων.

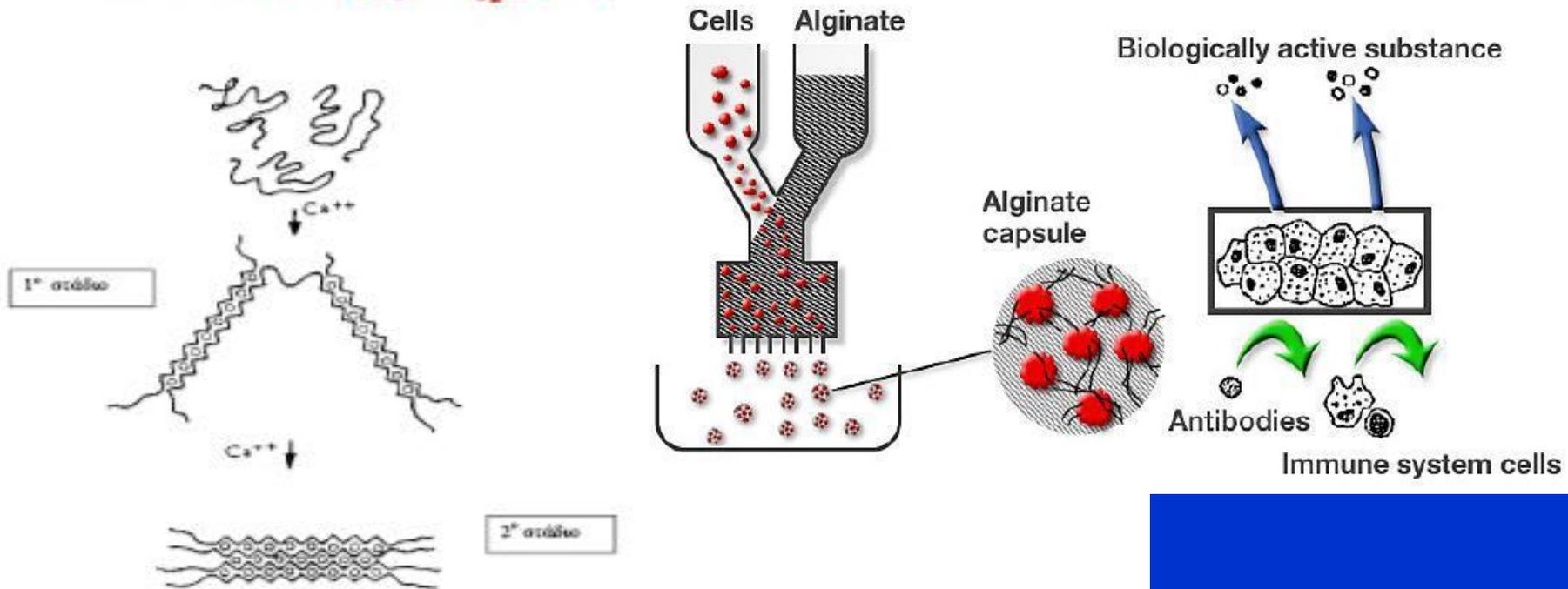
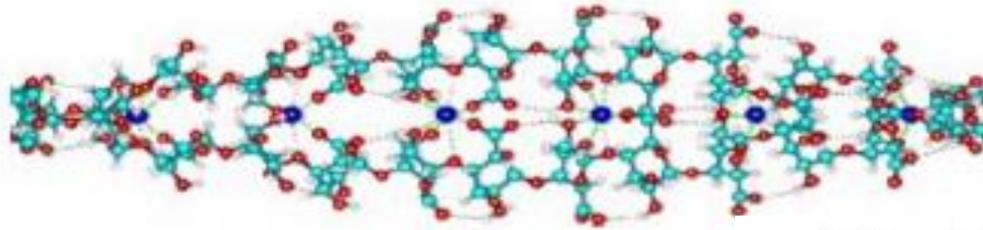
Διαμοριακό πλέγμα.

# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΕΝΖΥΜΩΝ

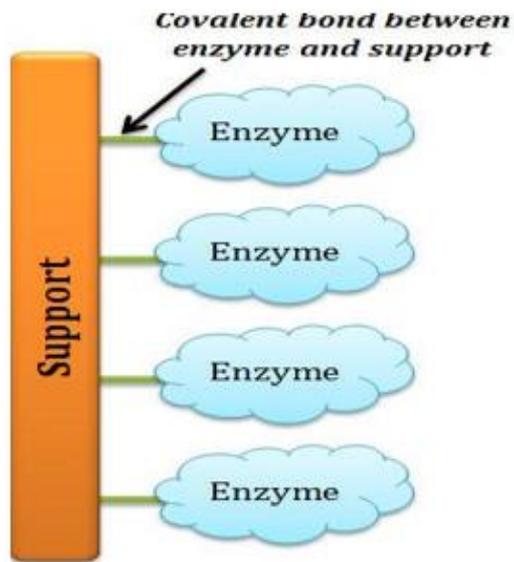
### Ε. ΕΓΚΛΩΒΙΣΜΟΣ ΣΕ ΠΛΕΓΜΑ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ (πολυσακχαριτών)

- Φορείς: πολυακρυλαμίδιο, πολυβινυλοαλκοόλη, αλγινικό-Ca, silica gel, κλπ
- Υψηλή προστασία από ουσίες και συνθήκες που μπορεί να μετουσιώσουν το ένζυμο, αλλά και μειωμένη διάχυση του υποστρώματος εντός του φορέα (μειωμένη επαφή ενζύμου-υποστρώματος)

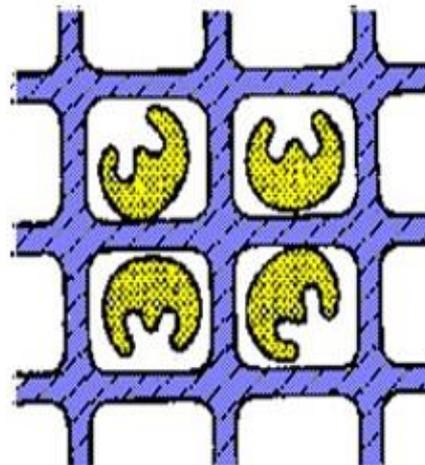


# Σύνοψη μεθόδων ακινητοποίησης ενζύμων

immobilization by Covalent binding



Enzyme Entrapment

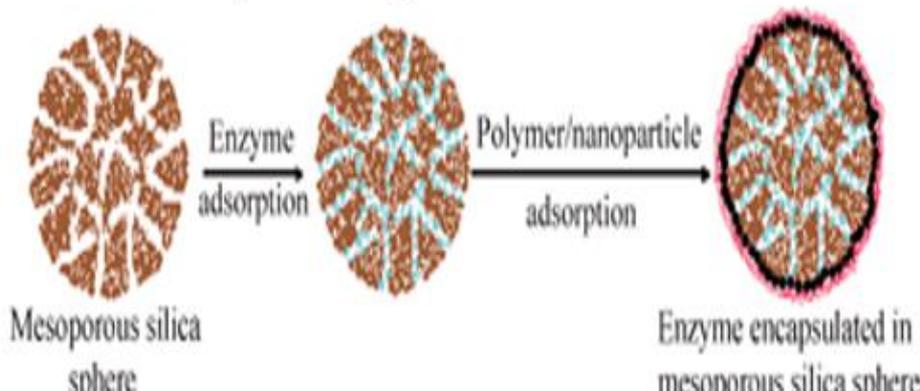


entrapped in a matrix

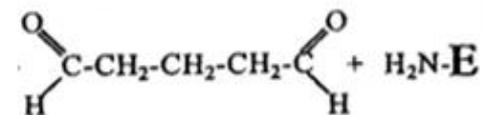


entrapped in droplets

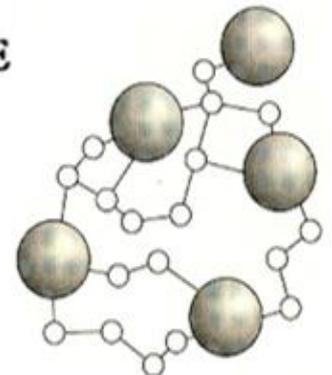
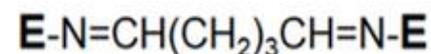
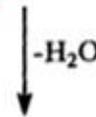
Enzyme encapsulation



Cross linking of Enzyme (E) by glutaraldehyde



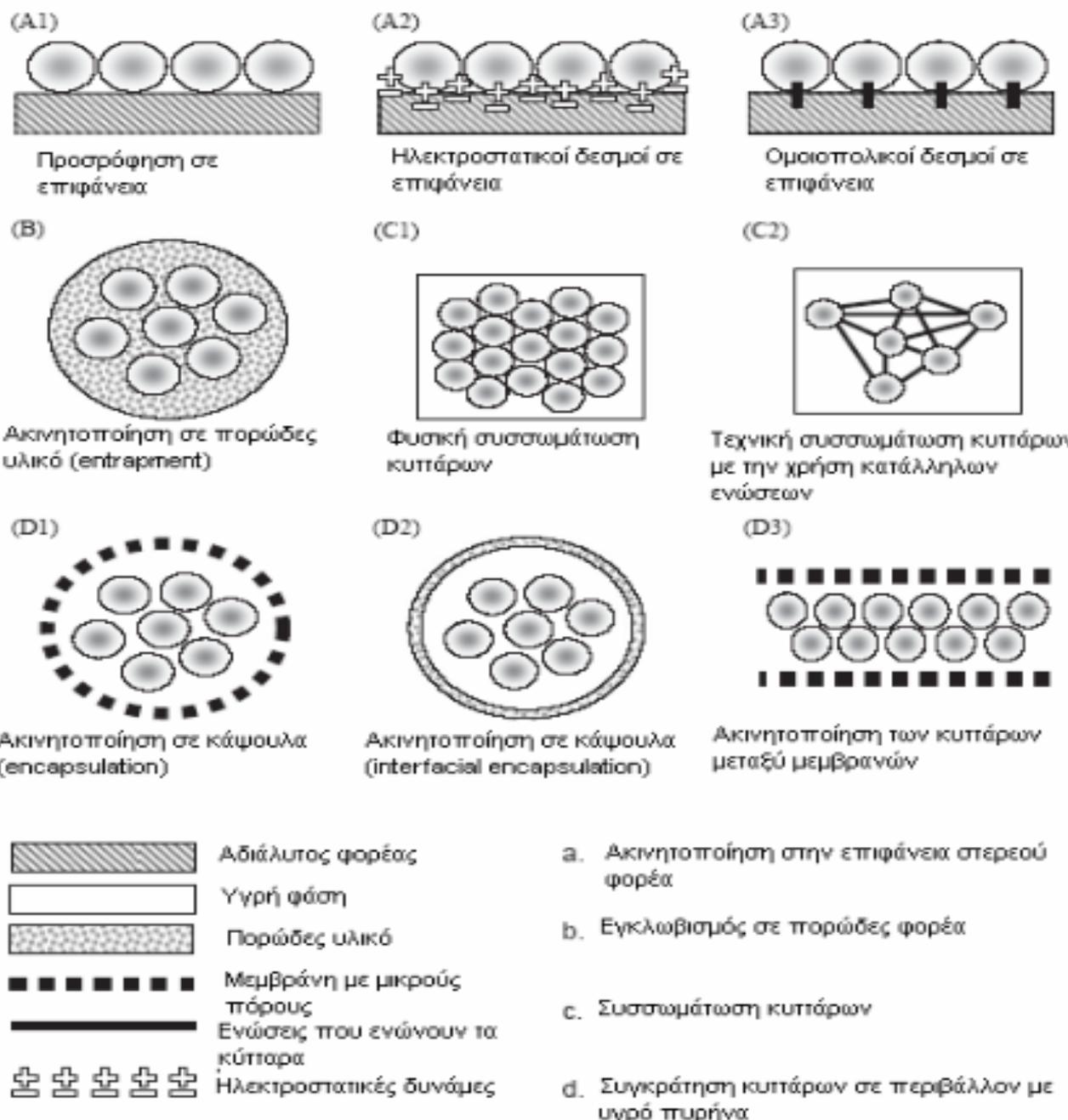
glutaraldehyde



# Σύνοψη μεθόδων ακινητοποίησης κυττάρων (για χρήση ως βιοκαταλύτες)

- Τα μικροβιακά κύτταρα μπορούν να ακινητοποιηθούν και να (επανα)χρησιμοποιηθούν σε αντιδράσεις βιοκατάλυσης, αντί των ενζύμων
- **Στόχος** είναι να μην έχουμε πολλαπλασιασμό των κυττάρων, αλλά να αξιοποιούμε το ενζυμικό τους σύστημα για την κατάλυση βιοχημικών αντιδράσεων
- Τα κύτταρα **μπορεί να προτιμηθούν** έναντι των ενζύμων όταν απαιτούνται πολύπλοκες βιοχημικές αντιδράσεις που δεν είναι εφικτές με ένα μόνο ένζυμο, ή όταν παρουσιάζουν υψηλότερη καλύτερη αντοχή (σε υψηλή θερμοκρασία, ουσίες που προκαλούν μετουσίωση, κλπ) σε σχέση με τα ένζυμα
- **Μειονέκτημα** χρήσης κυττάρων αντί ενζύμων: παραγωγή και άλλων υποπροϊόντων (λόγω του σύνθετου μεταβολισμού τους) και μικρότερη απόδοση στο επιθυμητό προϊόν.
- **4 βασικές μέθοδοι ακινητοποίησης κυττάρων:**
  - - ακινητοποίηση σε επιφάνεια στερεού φορέα π.χ. μέταλλο, πλαστικό, κλπ (cell attachment)
  - - ακινητοποίηση σε πορώδες υλικό π.χ. πορώδες γυαλί, πορώδης κυτταρίνη, δέρμα (cell absorption)
  - - ακινητοποίηση σε συσσωματώματα κυττάρων (cell flocculation)
  - - εγκλωβισμός στο εσωτερικό ενός φορέα, π.χ. γέλη αλγινικού Ca (cell encapsulation)

# Σύνοψη μεθόδων ακινητοποίησης κυττάρων (για χρήση ως βιοκαταλύτες)

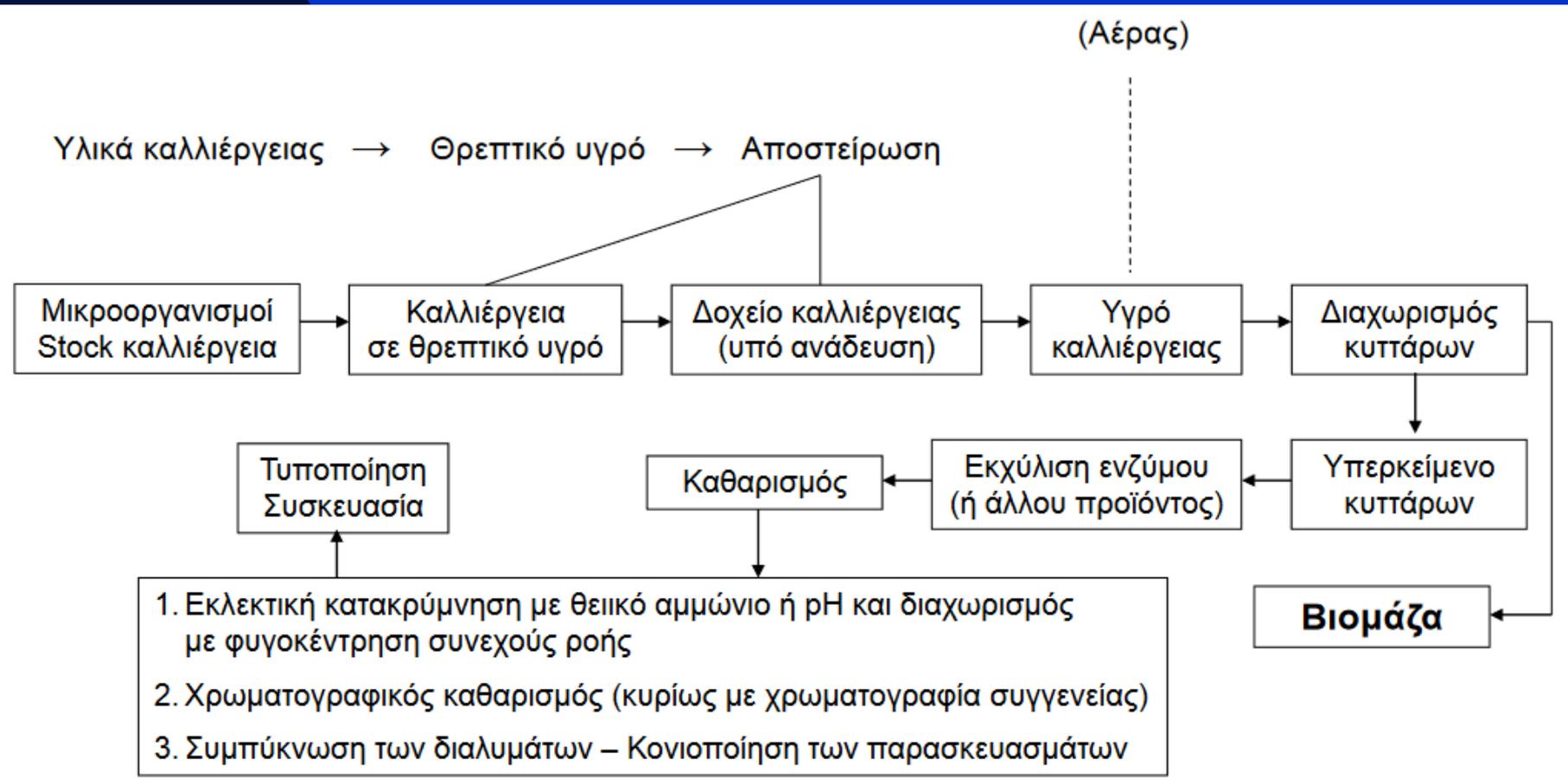


# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΝΖΥΜΩΝ

ΠΗΓΕΣ ΕΝΖΥΜΩΝ: κύτταρα μικροοργανισμών που καλλιεργούνται για αυτόν το σκοπό ή φυτική ή ζωικά κύτταρα

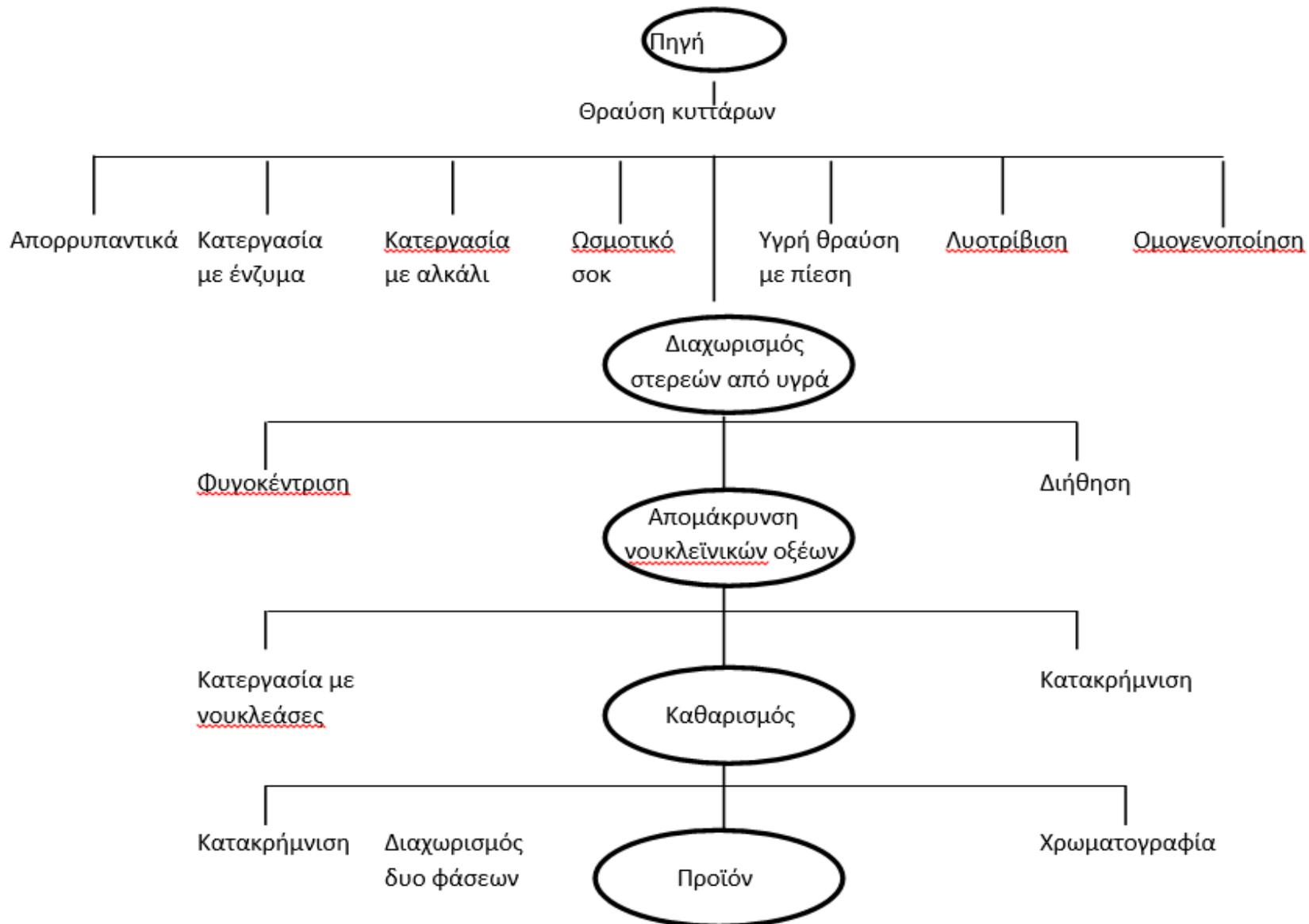
Στάδια απομόνωσης και καθαρισμού εξωκυττάριων ενζύμων



# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΝΖΥΜΩΝ

Στάδια απομόνωσης και καθαρισμού ενδοκυττάρων ενζύμων



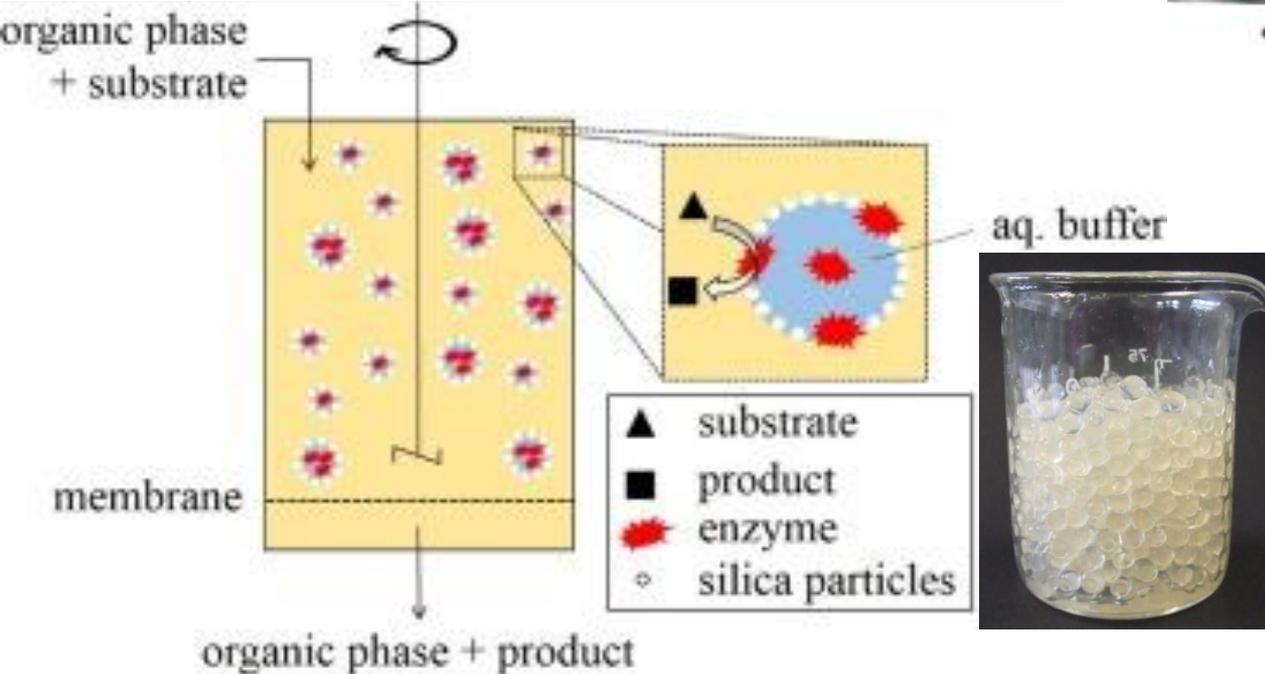
# Βιοτεχνολογία Τροφίμων-Βιομηχανική Μικροβιολογία

## ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΒΙΟΚΑΤΑΛΥΣΗΣ

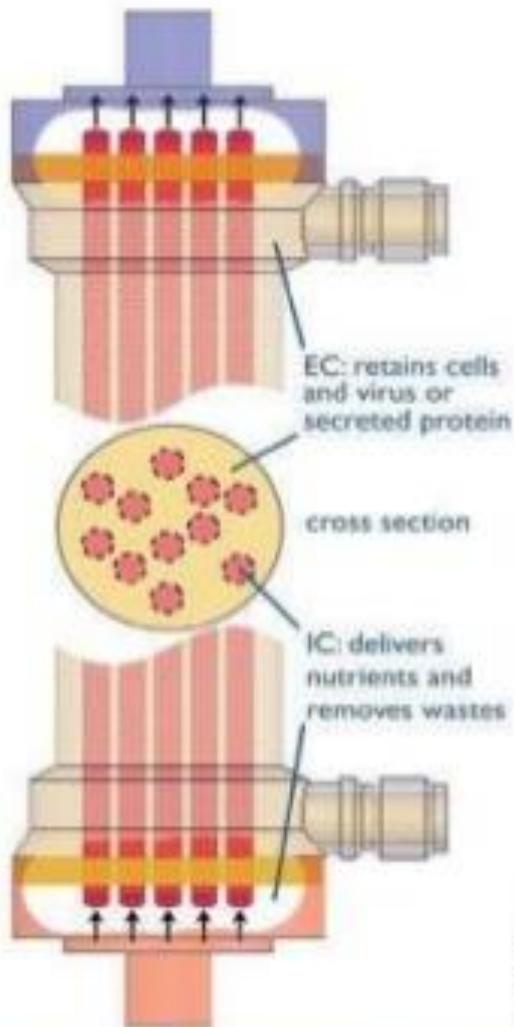
### ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΑΝΑΔΕΥΟΜΕΝΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΩΝ

#### ΚΑΤΑΛΥΣΗΣ (με ή χωρίς ακινητοποιημένα ένζυμα)

- Παρόμοιοι με τους βιοαντιδραστήρες STR.
- Το υπόστρωμα αναδεύεται σε ελεγχόμενη θερμοκρασία μαζί με το (ακινητοποιημένο) ένζυμο
- Για εφαρμογές βιοκατάλυσης χρησιμοποιούνται και οι βιοαντιδραστήρες μεμβρανών και ρευστοστερεάς κλίνης με πορώδες υλικό και εγκλωβισμένα ένζυμα
- Μετά την επαφή ενζύμου-υποστρώματος για κατάλληλο χρόνο το προϊόν εξέρχεται από τον αντιδραστήρα, ενώ το ένζυμο επαναχρησιμοποιείται.



# Ενζυμικός Αντιδραστήρας με ακινητοποιημένα ένζυμα



## Hollow Fibers...

- are semi-permeable, 10KDa MWCO membranes
- are encased in a clear, polycarbonate housing
- define inner (IC) and outer (EC) volumes

# Παράδειγμα Παραγωγής Βιοντήζελ με βιοκαταλύτες (λιπάσες-εστεράσες) + έλαια

