Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Πρόγραμμα Σπουδών Τεχνολογίας Τροφίμων

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ

ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΚΑΙ
ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΕΣ ΖΥΜΩΣΕΙΣ

ΙΩΑΝΝΗΣ ΓΙΑΒΑΣΗΣ
Αναπληρωτής Καθηγητής
ΚΑΡΔΙΤΣΑ 2020

ΡΟΛΟΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

Η Βιοτεχνολογία είναι η επιστήμη της καλλιέργειας και αξιοποίησης κυττάρων μικροοργανισμών, ή φυτικών/ζωικών κυττάρων για την παραγωγή ωφέλιμων μεταβολιτών τους που έχουν εφαρμογή σε τρόφιμα, φάρμακα, περιβάλλον, ενέργεια.

Για την παραγωγή κάθε βιοτεχνολογικής ουσίας χρειάζεται κάθε φορά να επιλέγεται ο καταλληλότερος μικροοργανισμός που μπορεί να παράγει την συγκεκριμένη ουσία εύκολα και γρήγορα.

Για τον ίδιο λόγο θέλουμε να χρησιμοποιούμε κάθε φορά καθαρές καλλιέργειες συγκεκριμένου μικροοργανισμού, γιατί η συνύπαρξή του με άλλους μικροοργανισμούς θα δυσκολεύει την ανάπτυξη του επιθυμητού μικροοργανισμού και θα μειώνει την αποτελεσματικότητα της ζύμωσης.

Τα επιθυμητά χαρακτηριστικά που θα πρέπει να έχουν τα βιομηχανικά στελέχη μικροοργανισμών για χρήση σε ζυμώσεις είναι:

- Η ικανότητα τους να αναπτύσσονται γρήγορα και εύκολα πάνω σε υπόστρωμα χαμηλού σχετικά κόστους.
- Τα μικροβιακά στελέχη πρέπει να είναι γενετικώς σταθερά, να παρουσιάζουν δηλαδή ένα μικρό μόνο αριθμό μεταλλακτικών στελεχών.
- Να παράγουν το επιθυμητό προϊόν σε μικρό χρόνο.
- Να μη παράγουν ταυτόχρονα με το προϊόν, τοξικές ουσίες.
- Να μπορούν να υπόκεινται σε γενετική τροποποίηση των ιδιοτήτων τους.
- Να παρουσιάζουν σταθερή παραγωγικότητα μέσα στο χρόνο.

Οι μικροοργανισμοί με τα παραπάνω επιθυμητά χαρακτηριστικά μπορούν να παραλειφθούν με δύο τρόπους:

- Να απομονωθούν από την φύση (δηλ. από τον αέρα, το νερό, τα τρόφιμα, το χώμα κ.λπ.)
- Να παραλειφθούν από τις ονομαζόμενες “ Τράπεζες Μικροοργανισμών ” που είναι επιστημονικοί οργανισμοί που εξειδικεύονται στην απομόνωση, την ταυτοποίηση και τη διατήρηση καθαρών καλλιεργειών μικροβιακών ή άλλων κυττάρων.

Τρόποι απομόνωσης και επιλογής στελεχών

Α. Από την φύση: Όλες οι τεχνικές που εφαρμόζονται για την εύρεση νέων μικροοργανισμών με βιομηχανικό ενδιαφέρον αναπτύχθηκαν κυρίως κατά τη διάρκεια της έρευνας παραγωγής νέων αντιβιοτικών.

Απομονώνονται από διάφορες φυσικές πηγές, όπως το χώμα, ο αέρας, τα τρόφιμα, τα απόβλητα κ.λπ. ένα σύνολο μικροβίων με ορισμένες γενικές ιδιότητες.

Β. Τράπεζες μικροβιακών στελεχών

Οι τράπεζες αυτές διαφέρουν ως προς το μέγεθος των συλλογών και μερικές είναι αρκετά εξειδικευμένες ως προς το είδος των μικροοργανισμών που περιλαμβάνουν.

Οι τράπεζες μικροοργανισμών στέλνουν στους ενδιαφερόμενους καθαρές καλλιέργειες έναντι κάποιας αμοιβής για την ενίσχυση και λειτουργία της συλλογής καθώς και για το κόστος μεταφοράς.

ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΧΩΡΑ	ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ
American Type Culture Collection (ATCC)	Η.Π.Α	Βακτήρια, Μύκητες, Άλγη, Φάγοι
Central Bureau voor Schimmelculture (CBS)	Ολλανδία	Μύκητες και Ακτινομύκητες
Commonwealth Mycol. Institute (CMI)	Αγγλία	Μύκητες
Agriculture Res. Serv. Cult. Collection (NRRL)	Η.Π.Α	Βακτήρια, Μύκητες, Ακτινομύκητες
National Coll. of Ind. Bacteria (NCIB)	Σκωτία	Βακτήρια
Institute Pasteur	Γαλλία	Βακτήρια, Μύκητες
National Coll. of Type Culture (NCTC)	Αγγλία	Βακτήρια, Μύκητες, Ακτινομύκητες
Culture Collection	Αγγλία	Άλγη και Πρωτόζωα
Chr. Hansen Labor.	Δανία	Βακτήρια, Μύκητες

Τρόποι συντήρησης μικροβιακών στελεχών

Οι σπουδαιότερες τεχνικές συντήρησης είναι οι εξής:

α. Συνεχής ανακαλλιέργεια: Η μέθοδος αυτή συνίσταται στη διαδοχική μεταφορά μιας ήδη αναπτυγμένης καλλιέργειας από βλαστητικές μορφές, σπόρια ή μυκήλιο σε φρέσκο θρεπτικό υλικό, σε τακτά χρονικά διαστήματα.

Ο χρόνος της κάθε μεταφοράς εξαρτάται από τη φύση του στελέχους και ποικίλει από μερικές μέρες σε μερικούς μήνες ή ακόμη και χρόνια. Οι καλλιέργειες μπορεί να μεταφέρονται σε κεκλιμένο άγαρ, τρυβλία πετρί ή θρεπτικό ζωμό. Η φύλαξη γίνεται συνήθως στους 4^oC έως 8^oC.

Επίσης ελαττώνεται η πιθανότητα να υποστούν μεταλλάξεις τα κύτταρα. Παρ’ όλα αυτά η μέθοδος αυτή δεν εξασφαλίζει γενετική σταθερότητα και σε ορισμένο χρόνο μπορεί να χαθούν ή να αλλοιωθούν σημαντικά βιοχημικά χαρακτηριστικά

Καλλιέργεια σε στερεό θρεπτικό

β. Λυοφυλίωση (Freeze – Drying)

- Η ανάπτυξη της λυοφυλίωσης τα τελευταία χρόνια υπήρξε ένα σημαντικό βήμα για τη διατήρηση των καλλιεργειών. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, μικροβιακά κύτταρα, σπόρια ή μερικές φορές τμήματα μυκηλίων αιωρούνται σ’ ένα προστατευτικό κολλοειδές όπως αποβουτυρωμένο γάλα ή ορό αίματος και ψύχονται γρήγορα με τη βοήθεια ξηρού πάγου και αλκοόλης.
- Στη συνέχεια, η καλλιέργεια αφυδατώνεται με εξάχνωση υπό κενό. Το παρασκεύασμα, σ’ αυτή τη μορφή του, σφραγίζεται αεροστεγώς και φυλάσσεται σε θερμοκρασία 5 εώς 10 °C.

Λυοφυλιωμένη καλλιέργεια

γ. Διατήρηση με κατάψυξη

- Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, οι καλλιέργειες διατηρούνται σε ψυγεία που μπορούν να κατεβάσουν τη θερμοκρασία μέχρι και -75°C. Μια μέθοδος κατάψυξης που εφαρμόζεται και έχει ορισμένα πλεονεκτήματα σε σχέση με τη λυοφυλίωση είναι η διατήρηση με κατάψυξης και αποθήκευση σε υγρό άζωτο (-165 μέχρι -196°C). Η μέθοδος είναι άριστη για τη διατήρηση των περισσότερων μικροοργανισμών καθώς και μικροφυκών, πρωτόζωων ή και ιστών θηλαστικών.
- Έχει αναφερθεί πως ορισμένοι τύποι μικροοργανισμών που δεν επιζούν με τη μέθοδο της λυοφυλίωσης διατηρούν τη βιωσιμότητα τους για μεγάλο χρονικό διάστημα με ψύξη σε υγρό άζωτο.

Καλλιέργεια σε υγρό άζωτο

ΣΥΝΟΠΤΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΧΡΗΣΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ, ΤΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΕΜΒΟΛΙΟΥ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑ

1. Τρυβλίο με καθαρή αποικία
2. Εμβολιασμός υγρού υποστρώματος σε 10ml σε δοκιμαστικό σωλήνα
3. Εμβολιασμός υγρού θρεπτικού υποστρώματος 100-500ml σε κωνική φιάλη εμβολίου
4. Εμβολιασμός ενδιάμεσου Ζυμωτήρα εμβολιασμού 1-100 lt
5. Εμβολιασμός Ζυμωτήρας παραγωγής 1-10 ton
6. Κυρίως ζύμωση (παραγωγή προϊόντος)
7. Αποστείρωση υγρού ζύμωσης (και κυττάρων)
8. Απομάκρυνση κυττάρων με φυγοκέντρηση/διήθιση
9. Καθαρισμός προϊόντος με μεθόδους χρωματογραφίας/απόσταξης/καθίζησης/διήθισης/κλπ (ανάλογα με το προϊόν)
10. Ξήρανση καθαρού προϊόντος με εκνέφωση με ατμό ή λυοφιλίωση

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑΣ ΕΜΒΟΛΙΟΥ ΚΑΙ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑ

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

2. ανάπτυξη σε κωνική φιάλη

3. εμβολιασμός σε βιοαντιδραστήρα








Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Πρόγραμμα Σπουδών Τεχνολογίας Τροφίμων

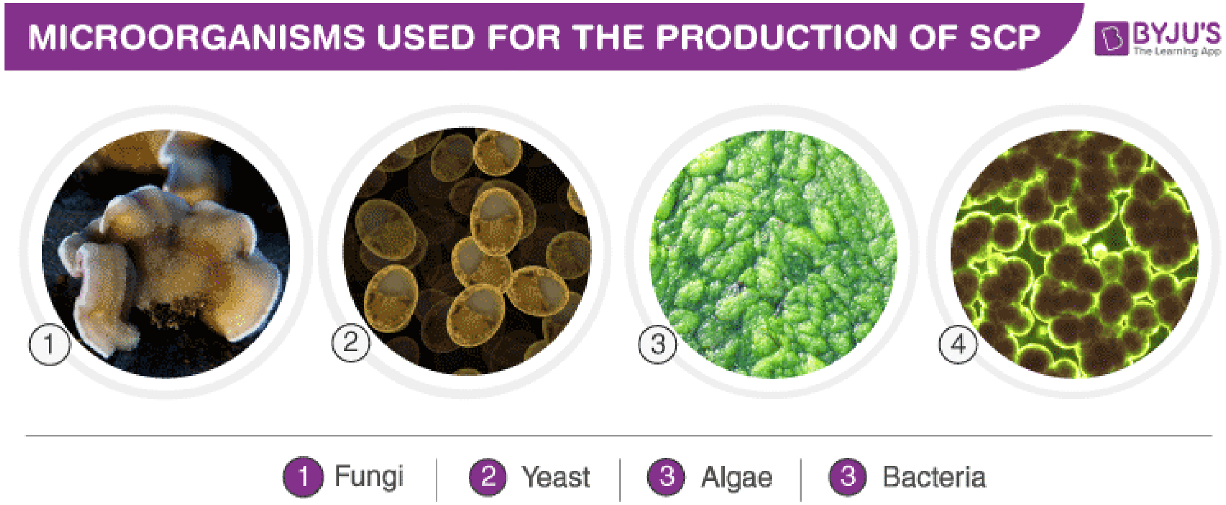
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ

Βιοτεχνολογία Τροφίμων και Μικροβιακές Ζυμώσεις

ΙΩΑΝΝΗΣ ΓΙΑΒΑΣΗΣ
Αναπληρωτής Καθηγητής
ΚΑΡΔΙΤΣΑ 2020

Παραγωγή μονοκυτταρικής πρωτεΐνης (Single cell protein) και μυκοπρωτεΐνης

- Μονοκυτταρική πρωτεΐνη (SCP): αποξηραμένα κύτταρα μικροοργανισμών όπως φωτοσυνθετικών βακτηρίων, βακτηρίων, ζυμών και μυκήτων, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγές πρωτεϊνών στην τροφή των ανθρώπων ή ζώων.



- Μυκοπρωτεΐνη: Στην περίπτωση παραγωγής της πρωτεΐνης από μύκητες ονομάζεται μυκοπρωτεΐνη. Στην δεξιά εικόνα έχουμε την παραγωγή μυκοπρωτεΐνης σε πάστα από τον μύκητα F. venenatum

Χαρακτηριστικά των Μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή SCP ή μυκοπρωτεΐνη

Οι μικροοργανισμοί που επιλέγουμε για την παραγωγή της μονοκυτταρικής πρωτεΐνης πρέπει να έχουν τα εξής χαρακτηριστικά:

- ✓ Να πολλαπλασιάζονται ταχύτατα
- ✓ Να έχουν μικρές απαιτήσεις σε θρεπτικά συστατικά
- ✓ Να μπορούν να καλλιεργηθούν οπουδήποτε
- ✓ Να μπορούν να χρησιμοποιούν ως θρεπτικό υπόστρωμα ακόμα και απόβλητα
- ✓ Το μεγαλύτερο ποσοστό του ξηρού βάρους να είναι πρωτεΐνη

Μικροοργανισμοί που έχουν μελετηθεί για την παραγωγή μονοκυτταρικής πρωτεΐνης από υγρά απόβλητα τυροκομείου

Ζύμες	Μύκητες	Βακτήρια
Candida utilis, boidinii, tropicalis, versatilis, holstii, halophila Saccharomyces cerevisiae, uvarum Rhodotorula glutinis Kluveromyces marxianus, fragilis, lactis Saccharomycopsis lipolitica Torulopsis utilis Galactomyces geotrichum Trichosporon cutaneum Yarrowia lipolytica	Lentinula edodes Pleurotus ostreatus, spp Phanerochaete chrysosporium, flavido – alba Chalara paradoxa Aspergillus niger, sp Fusarium graminaerum **(χρησιμοποιείται για την παραγωγή Quorn ως υποκατάστατο κρέατος)**	Ralstonia sp. Pseudomonas putida Azotobacter vinelandii Xanthomonas campestris Spirulina platensis **(φωτοσυνθετικό βακτήριο που χρησιμοποιείται για παραγωγή σπιρούλινας-τροφή πλούσια σε πρωτεΐνες, βιταμίνες, ιχνοστοιχεία, αντιοξειδωτικά)**

Υποστρώματα ζύμωσης που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή πρωτεΐνης

- Αμυλοσιρόπια
- Μελάσσα
- Αποπρωτεϊνωμένο τυρόγαλο
- Πούλπες φρούτων
- Λιπαρά υποπροϊόντα πετρελαίου,
- Γλυκερόλη
- Παραφίνη
- Αιθανόλη

Σύσταση της μονοκυτταρικής πρωτεΐνης σε διαφορετικά είδη μικροοργανισμών

Συστατικά	Μύκητες	Άλγη	Ζύμες	Βακτήρια
Πρωτεΐνες	30-45	40-60	45-55	50-65
Λιπίδια	2-8	7-20	2-6	1,5-3
Τέφρα	9-14	8-10	5-9,5	3-7
Νουκλεΐκό οξύ	7-10	3-8	6-12	8-12

Πλεονεκτήματα μονοκυτταρικής πρωτεΐνης

- Οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται σχετικά εύκολα, με μεγάλο ρυθμό, έχουν υψηλή απόδοση και παραγωγικότητα.
- Τα βιομηχανικά απόβλητα ή τα υποπροϊόντα (μελάσα, τυρόγαλο, κλπ) χρησιμοποιούνται ως πρώτες ύλες.
- Η περιεκτικότητα σε ξηρή πρωτεΐνη είναι αρκετά υψηλή.
- Οι ζύμες που χρησιμοποιούνται κατέχουν υψηλή περιεκτικότητα σε βιταμίνες.

Πλεονεκτήματα μονοκυτταρικής πρωτεΐνης

- Όλα τα βασικά αμινοξέα περιλαμβάνονται στις μονοκύτταρες πρωτεΐνες.
- Μπορούν εύκολα γενετικά να τροποποιηθούν για την ποικιλία της σύνθεσης αμινοξέων.
- Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα ευρύ φάσμα πρώτων υλών ως πηγή άνθρακα, όπως τα απόβλητα. Κατά συνέπεια βοηθούν στην αφαίρεση των ρύπων και είναι οικολογικά ευεργετικές.

Μειονεκτήματα μονοκυτταρικής πρωτεΐνης

- Οι ζύμες παρουσιάζουν χαμηλότερο ρυθμό ανάπτυξης-αύξησης, χαμηλότερη πρωτεϊνική περιεκτικότητα και χαμηλότερη περιεκτικότητα σε μεθειονίνη σε σχέση με τα βακτήρια.
- Οι μύκητες έχουν επίσης τους περιορισμούς τους λόγω των χαμηλότερων ρυθμών αύξησης και της χαμηλότερης περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη σε σχέση με ζύμες και βακτήρια. Ωστόσο, οι μύκητες έχουν συνήθως πιο ευχάριστη γεύση που θυμίζει μανιτάρι, ξηρούς καρπούς ή και κρέας.
- Τα άλγη έχουν κυτταρίνη στο κυτταρικό τοίχωμα, που δεν είναι εύπεπτη (λειτουργεί ωστόσο ως φυτική ίνα).

Μειονεκτήματα μονοκυτταρικής πρωτεΐνης

- Τα βακτηριακά κύτταρα είναι μικρά στο μέγεθος και έχουν χαμηλή πυκνότητα, η συγκομιδή τους από το ζυμούμενο μέσο γίνεται δύσκολη και δαπανηρή.
- Τα βακτηριακά κύτταρα κατέχουν υψηλή περιεκτικότητα σε νουκλεϊνικό οξύ που μπορεί να αποδειχθεί επιζήμιο για τον άνθρωπο.

* Τρόποι αντιμετώπισης: α) χρήση νουκλεασών στο τέλος της ζύμωσης, β) πρόκληση αυτόλυσης των κυττάρων στο τέλος της ζύμωσης στους 50-60°C

Χρήσεις της μονοκυτταρικής πρωτεΐνης στην ανθρώπινη διατροφή και στις ζωοτροφές

Για τη διατροφή των ζώων:

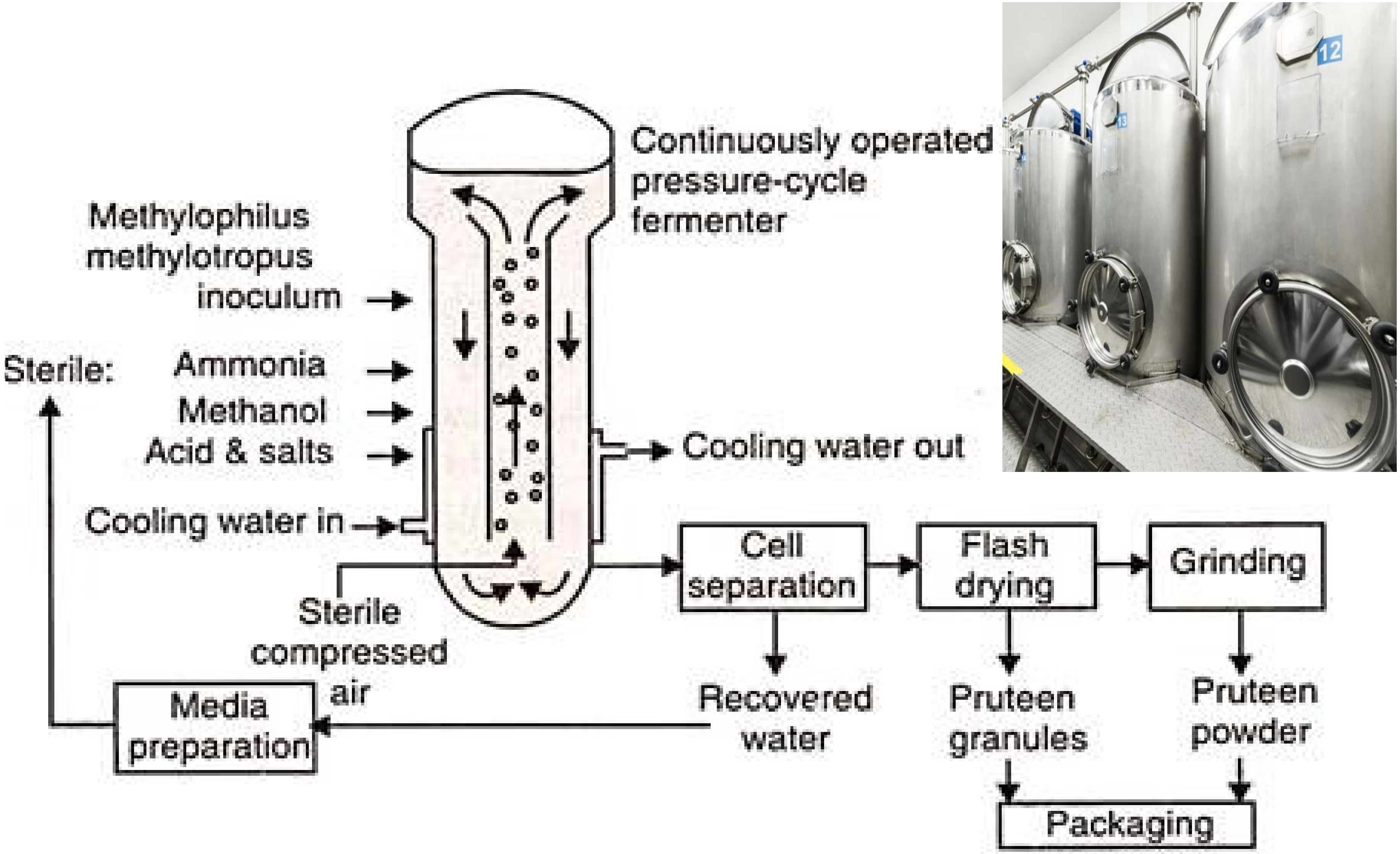
- πάχυνση μόσχων, πουλερικών και χοίρων
- χρησιμοποιείται στις ζωοτροφές για όρνιθες κρεατοπαραγωγής
- για την καλλιέργεια ψαριών
- χρησιμοποιείται ως τροφή κατοικίδιων ζώων

Χρήσεις της μονοκυτταρικής πρωτεΐνης στην ανθρώπινη διατροφή και στις ζωοτροφές

Στον τομέα των τροφίμων:

- χρησιμοποιείται ως φορέας αρωμάτων, βιταμινών και ως ενισχυτικό γαλακτωματοποιητών
- χρησιμοποιείται για την βελτίωση της θρεπτικής αξίας των ψημένων προϊόντων, σε σούπες, σε έτοιμα γεύματα για σερβίρισμα και σε συνταγές δίαιτας

Στάδια ζύμωσης και απομόνωσης SCP



Συνθήκες ζύμωσης

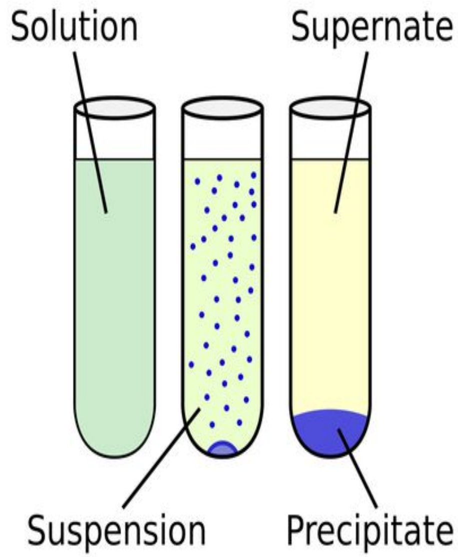
Οι βέλτιστες συνθήκες για την παραγωγή μονοκυτταρικής πρωτεΐνης είναι:

- Να έχουμε ένα υπόστρωμα πλούσιο σε άνθρακα και άζωτο
- Να έχουμε έντονη ανάδευση 300-500 rpm (για βακτήρια και ζύμες) και πιο ήπια ανάδευση 150-300 rpm για μύκητες
- Καλό και έντονο αερισμό 1-2vvm (καθώς ζύμες-μύκητες είναι αερόβιοι)
- Θερμοκρασία ζύμωσης ~ 25-30°C

Μέθοδος μέτρησης της συγκέντρωση (g/l) ξηρής βιομάζας

- Ξήρανση άδειων καθαρών σωλήνων φυγοκέντρισης (στους 105°C για ~24h)
- Παραμονή των σωλήνων σε γυάλινο ξηραντήρα για ~20΄
- Ζύγιση των άδειων σωλήνων φυγοκέντρισης σε αναλυτικό ζυγό (ξηρό βάρος σωλήνα)
- Δειγματοληψία 10 ml (ή 5ml) καλά ομογενοποιημένου-αναδευμένου υγρού ζύμωσης
- Φυγοκέντρηση (4.500 rpm x 30’) για καταβύθιση της βιομάζας

- Απόρριψη ή συλλογή σε άλλο περιέκτη του υπερκείμενου υγρού, το οποίο περιέχει σάκχαρα και άλλες υδατοδιαλυτές ουσίες. Από το υπερκείμενο μπορούμε να μετρήσουμε σάκχαρα με την μέθοδο DNS ή με την χρήση του διαθλασίμετρου
- Ξήρανση ιζήματος βιομάζας στους 105°C για ~24h
- Παραμονή των σωλήνων σε γυάλινο ξηραντήρα για ~20΄
- Ζύγιση του ξηρού ιζήματος βιομάζας (ΞΒ) στον σωλήνα φυγοκέντρισης (ΞΒ + ΞΣ)



- Η συγκέντρωση βιομάζας (g/l) υπολογίζεται ως εξής: στο δείγμα των 10ml έχουμε ξηρή βιομάζα

ΞΒ=(ΞΒ+ΞΣ)-(ΞΣ)

Με τη μέθοδο των τριών υπολογίζουμε πόση είναι η ξηρή βιομάζα (ΞΒ) σε 1000ml.

Πχ. Ξηρό βάρος σωλήνα: 5,0002g

Ξηρό βάρος σωλήνα + Ξηρή βιομάζα: 8,1254g

Δείγμα: 10ml

Η βιομάζα είναι: 8,1254 - 5,0002 = 3,1252g /10ml δείγματος

Για τα 1000ml: 3,1252 x 1000 /10=312,52g/l ή 31,25%

Μέθοδος μέτρησης της συγκέντρωσης βιομάζας με φασματοφωτόμετρο

- Αναδεύουμε καλά το υγρό ζύμωσης καθώς τα κύτταρα έχουν την τάση να καθιζάνουν.
- Παίρνουμε 1ml από το δείγμα μας και το τοποθετούμε σε δοκιμαστικό σωλήνα μαζί με 9ml απιονισμένο νερό δημιουργώντας την αραίωση 1/10.
- Αναδεύουμε καλά τους σωλήνες στο vortex και τους φωτομετρούμε στα 620nm αφού προηγουμένως έχουμε μηδενίσει το φασματοφωτόμετρο με απιονισμένο νερό.
- Όσο μεγαλύτερο μήκος κύματος έχουμε στο δείγμα μας τόσο μεγαλύτερη ανάπτυξη έχουμε.

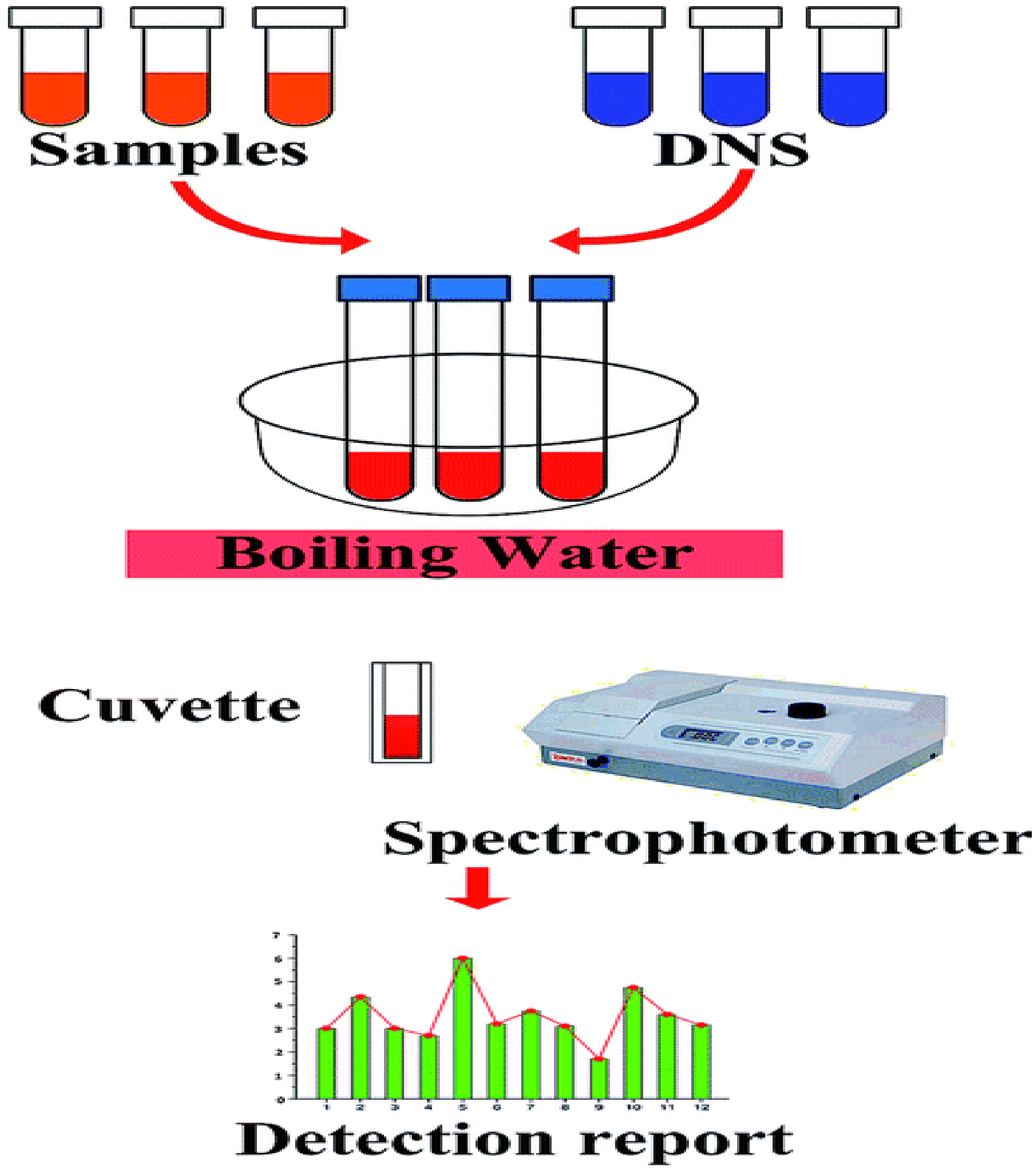
Μέτρηση συγκέντρωσης σακχάρων (g/l) με την μέθοδο DNS

- Παίρνουμε 0,5ml από υπερκείμενο της φυγοκέντρισης (αν είναι απαραίτητο κάνουμε αραίωση στο δείγμα μας) και το τοποθετούμε σε δοκιμαστικούς σωλήνες με πώμα, για να μην εξατμιστεί το δείγμα μας κατά τον βρασμό
- Προσθέτουμε στον δοκιμαστικό σωλήνα 0,5ml από το αντιδραστήριο DNS
- Για τον μηδενισμό του φασματοφωτόμετρου φτιάχνουμε και έναν σωλήνα με 0,5ml απιονισμένο νερό και 0,5ml από το αντιδραστήριο DNS (μάρτυρας)
- Καλή ανάδευση στο vortex
- Βρασμός για 5min x 100°C, παραμονή σε ~25°C x 5min και προσθήκη 5ml απιονισμένου νερού

- Τα δείγματα φασματοφωτο- μετρούνται στο μήκος κύματος **540nm** αφού προηγουμένως έχουμε καλιμπράρει το φασματοφωτόμετρο με τον μάρτυρα
- Καταγράφουμε τις τιμές και στην συνέχεια για τον υπολογισμό των σακχάρων χρησιμοποιούμε την εξής εξίσωση:

$$y = 0{,}551x - 0{,}0251$$

Όπου **y** είναι η απορρόφηση και **x** είναι η συγκέντρωση των σακχάρων σε μονάδες μέτρησης ανάλογες της συγκέντρωσης των προτύπων διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή της καμπύλης.

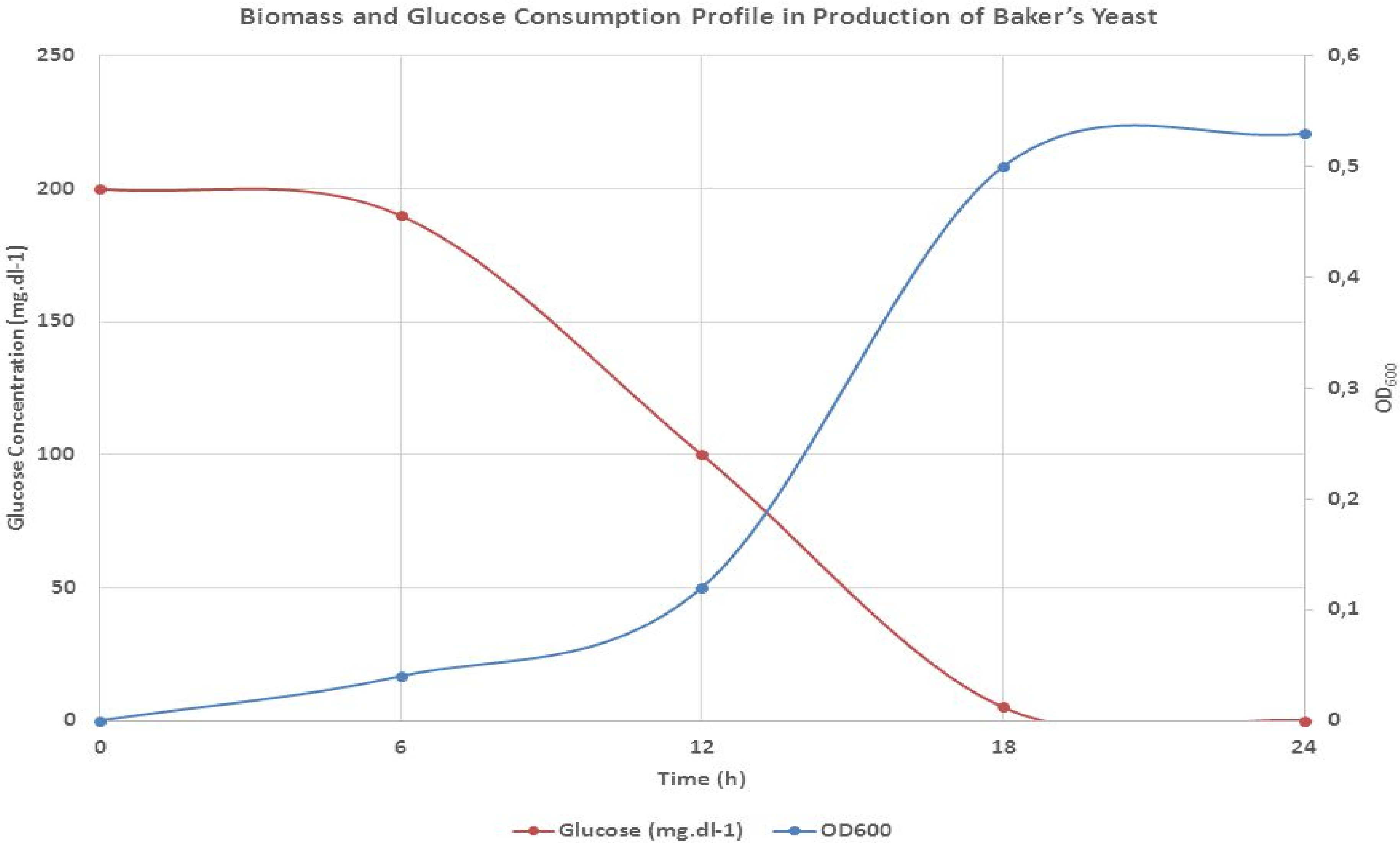


Σχηματική απεικόνιση της μέτρησης σακχάρων με την μέθοδο DNS (3,5-dinitrosalicylic acid)

- Γενικά στα σάκχαρα θέλουμε όσο περνάνε οι μέρες της ζύμωσης, να μειώνονται. Αυτό σημαίνει ότι μικροοργανισμός κατανάλωσε τα διαθέσιμα σάκχαρα του υποστρώματος και με αυτό τον τρόπο καταλαβαίνουμε αν πήγε καλά η ζύμωση μας.

Στην παραπάνω εικόνα από αριστερά προς τα δεξιά έχουμε την μείωση της συγκέντρωσης των σακχάρων με την μέθοδο DNS.

Διάγραμμα παραγωγής SCP από S. cerevisiae



Στο τέλος της ζύμωσης θέλουμε με βάση τις παραμέτρους που ελέγξαμε, να έχουμε τη μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας στον ελάχιστο δυνατό χρόνο, και ταυτόχρονα γρήγορη μείωση και πλήρη κατανάλωση (έντονο ρυθμό μεταβολισμού) των σακχάρων του υποστρώματος

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Πρόγραμμα Σπουδών Τεχνολογίας Τροφίμων

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ

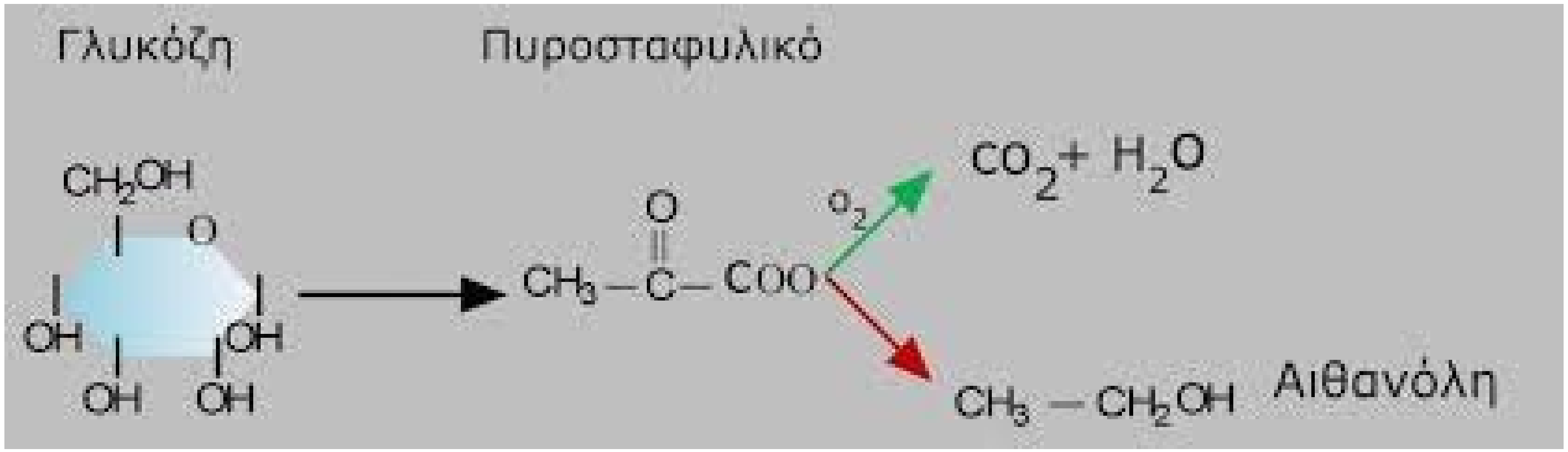
Βιοτεχνολογία Τροφίμων και Μικροβιακές Ζυμώσεις

ΙΩΑΝΝΗΣ ΓΙΑΒΑΣΗΣ
Αναπληρωτής Καθηγητής
ΚΑΡΔΙΤΣΑ 2020

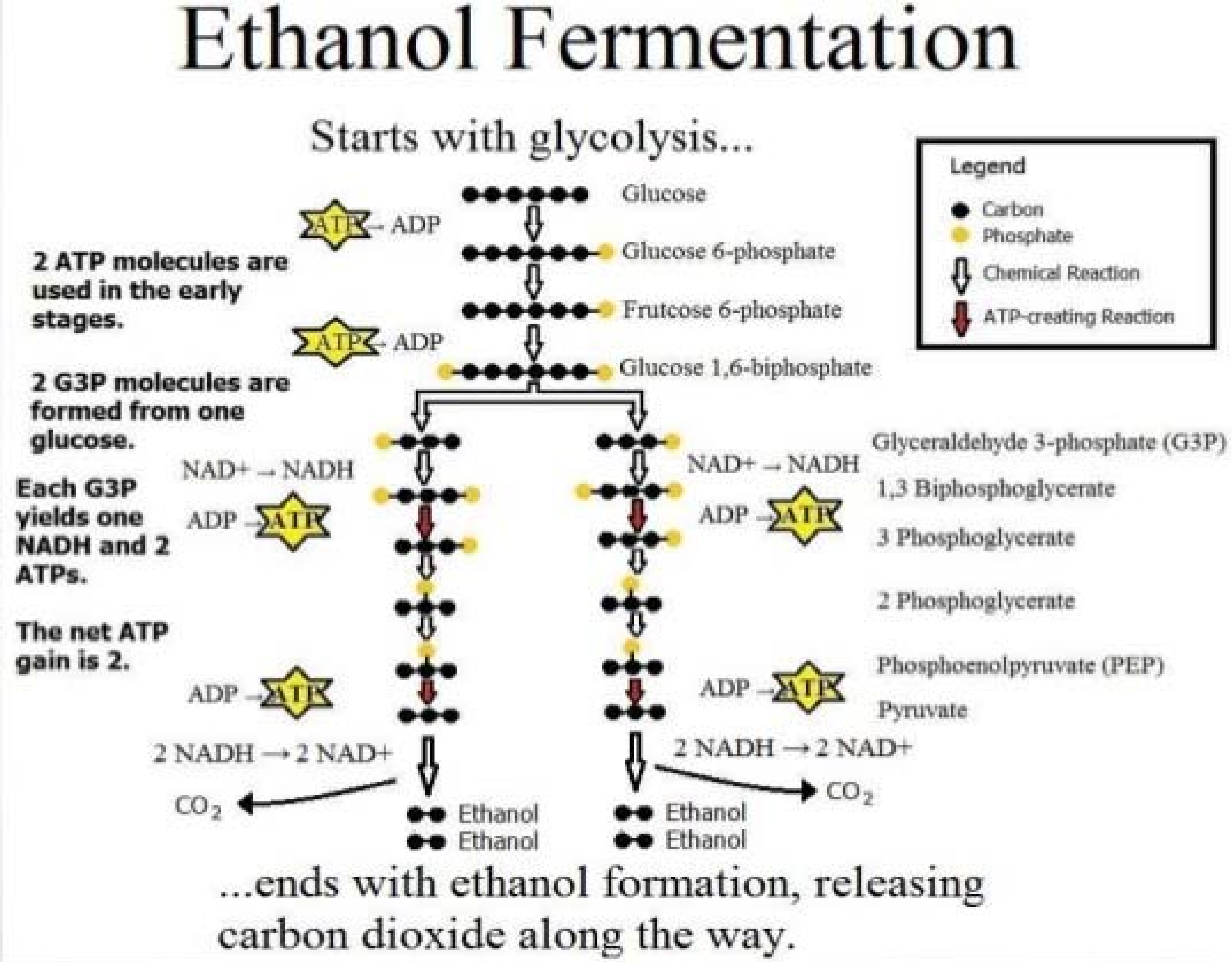
ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΛΚΟΟΛΗΣ (ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ)

Η αλκοολική ζύμωση είναι μια από τις πιο παλιές και σημαντικές διαδικασίες ζύμωσης. Η αλκοόλη (αιθανόλη, αιθυλική αλκοόλη, οινόπνευμα,CH_3CH_2OH), άρχισε να χρησιμοποιείται τον 7ο αιώνα. Μετά τη χρησιμοποίηση της μεθόδου της απόσταξης, η αλκοόλη παρασκευάζεται σε καθαρή μορφή.

Η αλκοόλη παρασκευάζεται με χημικές ή βιοτεχνολογικές μεθόδους.



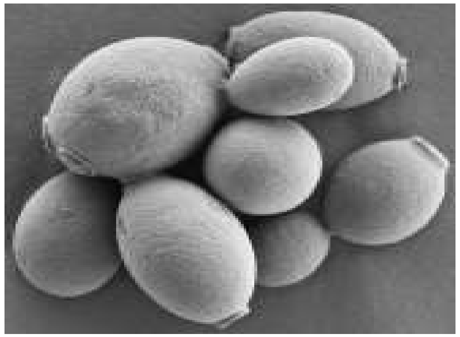
Σχηματική απεικόνιση της αλκοολικής ζύμωσης



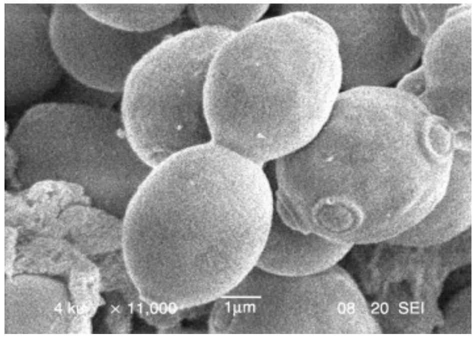
Μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή της αιθανόλης

Οι κυριότεροι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή της αλκοόλης είναι:

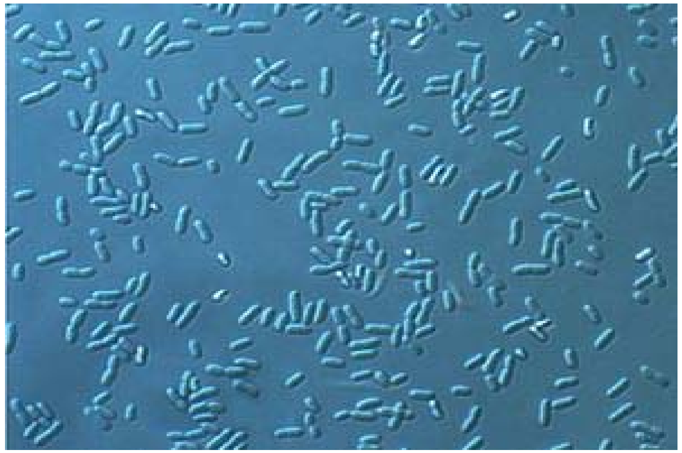
- Ζύμες: Saccharomyces cerevisiae, Kluyeveromyces fragilis, Kluyeveromyces marxianus
- Βακτήρια: Zymomonas mobilis



Κύτταρα S.cerevisiae σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο



Κύτταρα K.marxianus σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

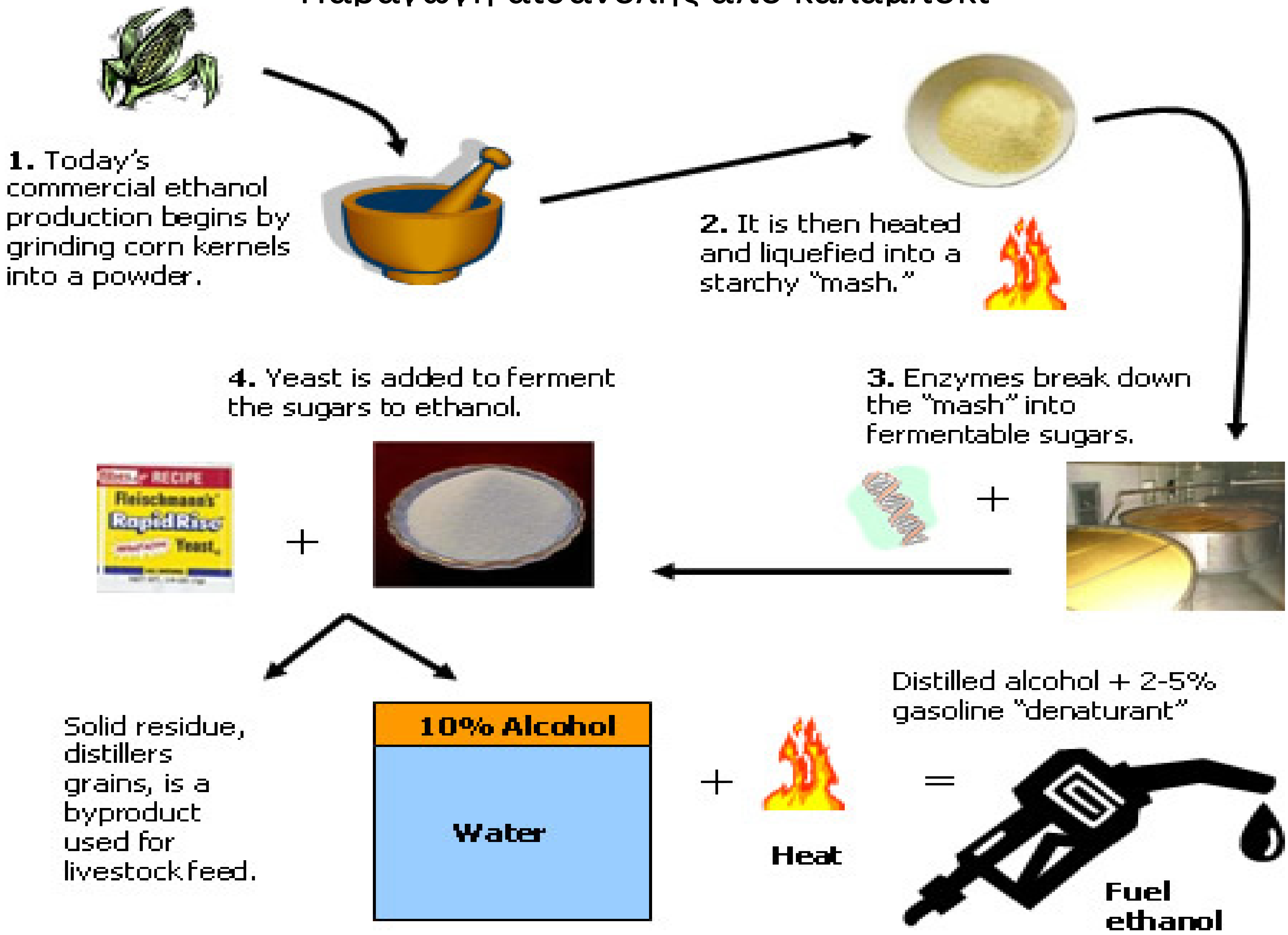


Κύτταρα Z.mobilis σε οπτικό μικροσκόπιο

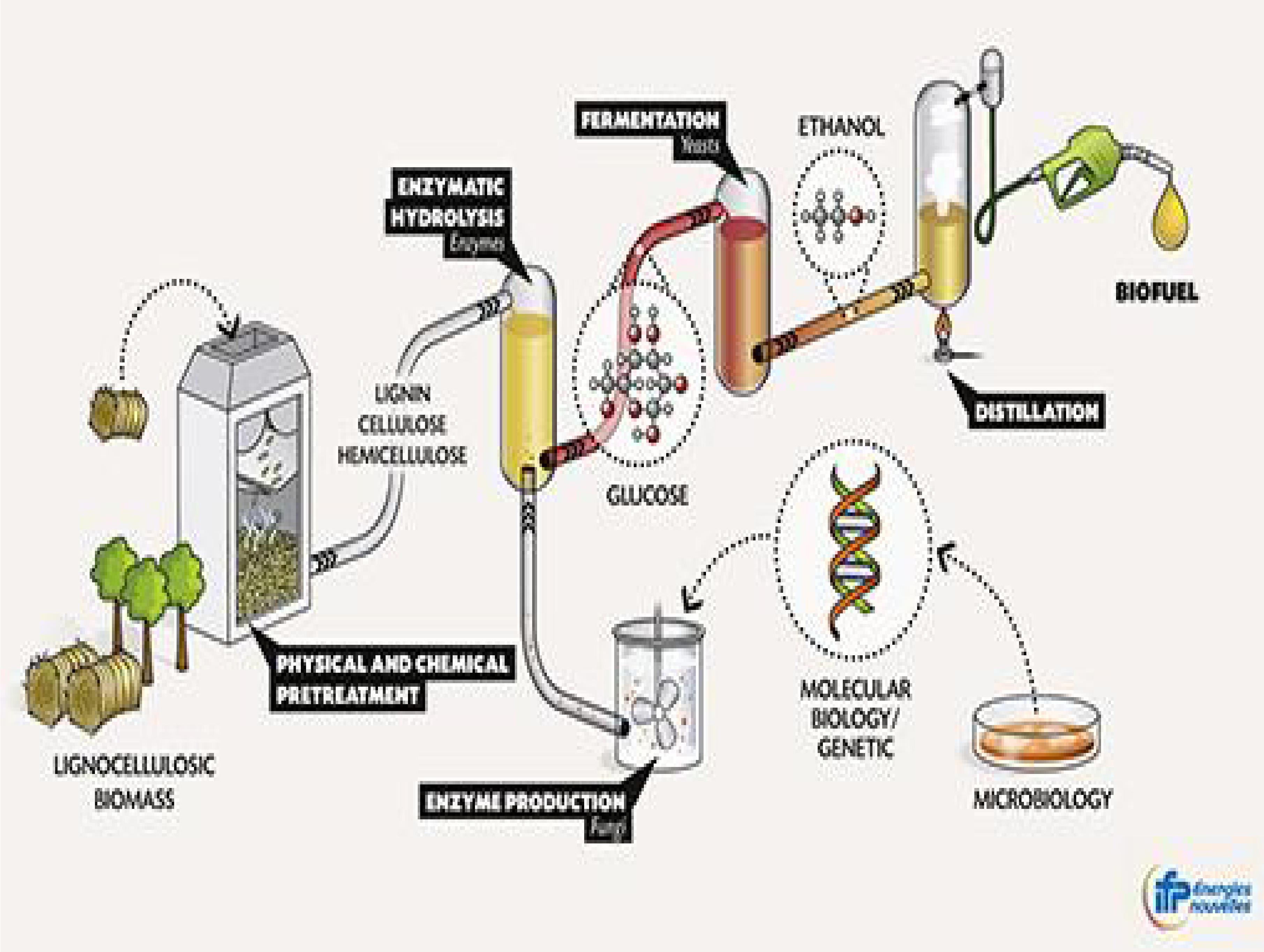
Τα **υποστρώματα ζύμωσης** που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή της αλκοόλης είναι:

- τα συνθετικά υποστρώματα όπως η γλυκόζη και η σακχαρόζη
- η μελάσσα
- οι καρποί των δημητριακών (καλαμπόκι, κριθάρι, σιτάρι, ρύζι)
- διάφορες αμυλούχες ουσίες (πατάτες, βολβοί cassava, κλπ.)
- τα σακχαρότευτλα και το σακχαροκάλαμο
- οι σταφίδες και τα χαρούπια
- το τυρόγαλα (όταν χρησιμοποιείται ζύμη Kluyveromyces)
- η κυτταρίνη του ξύλου (αφού πρώτα διασπαστεί σε απλούστερα σάκχαρα με κυτταρινάσες)
- τα υποπροϊόντα των γεωργικών βιομηχανιών
- τα απόβλητα των ζυθοποιίων

Παραγωγή αιθανόλης από καλαμπόκι

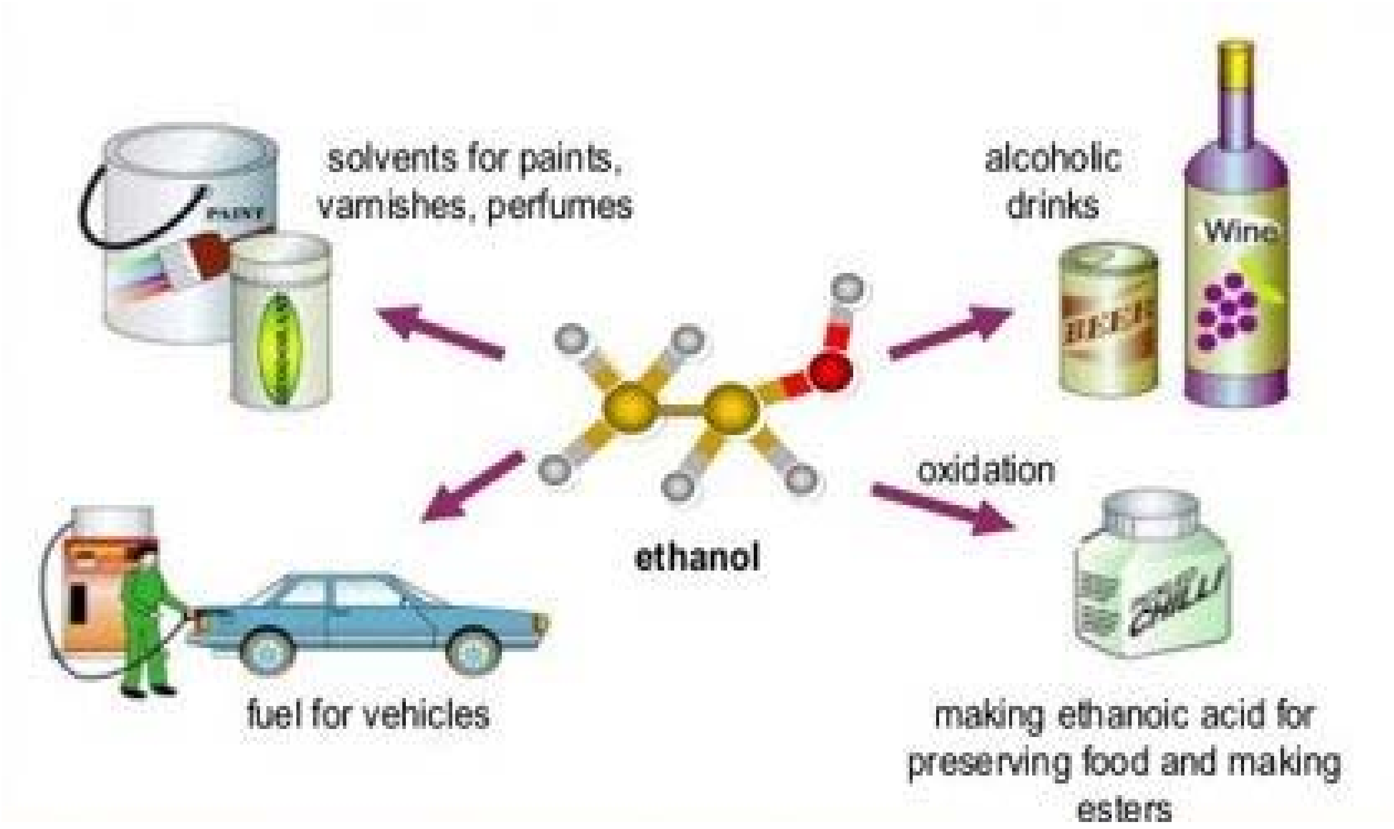


Παραγωγή αιθανόλης από κυτταρίνη



Χρήσεις της αλκοόλης

- ως διαλυτικό μέσο
- σαν πρόσθετο για την παρασκευή διαφόρων οινοπνευματωδών ποτών
- σαν καύσιμο αυτοκινήτων
- στα αρώματα
- στα τρόφιμα

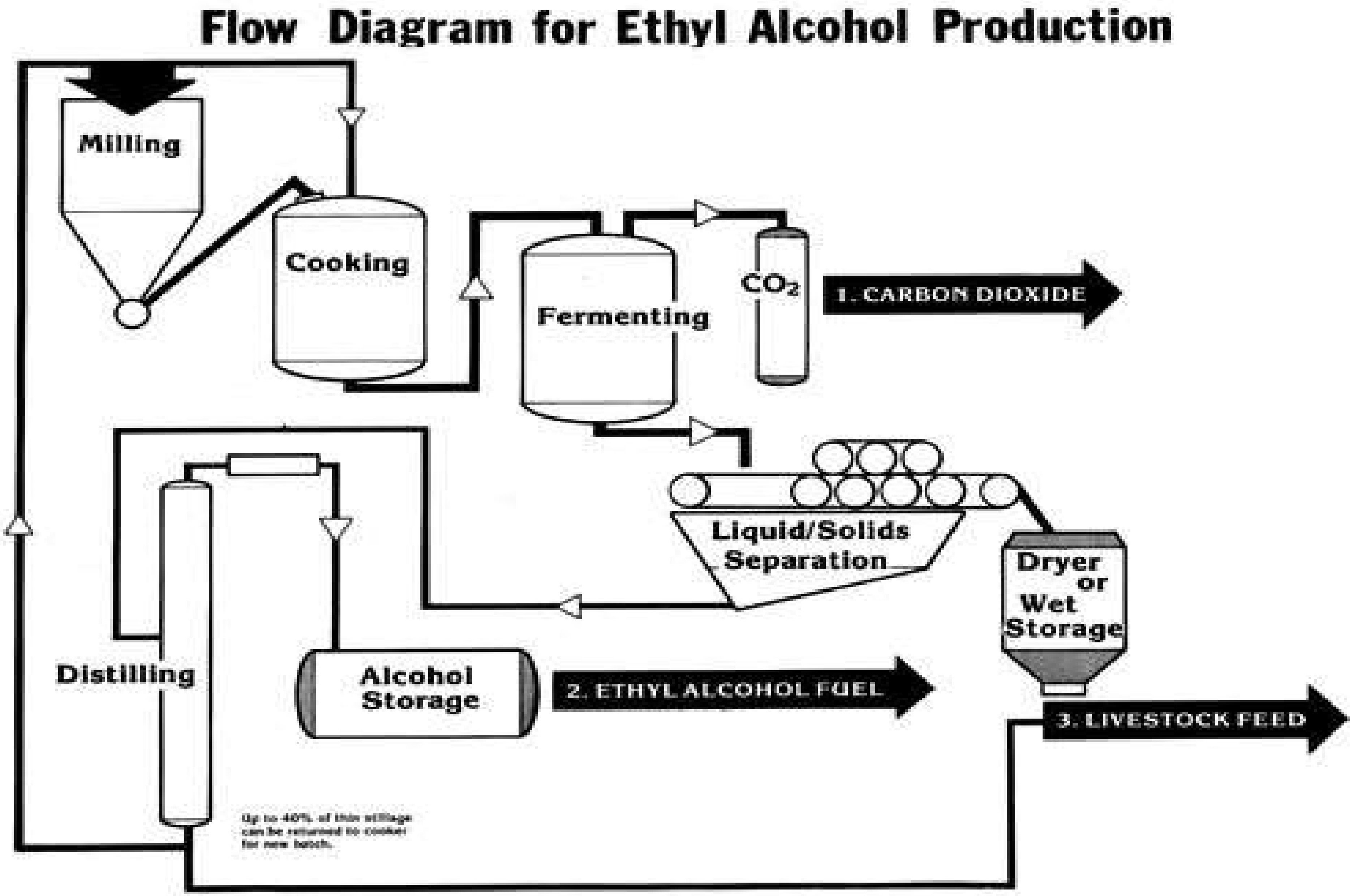


Είδη ζύμωσης για παραγωγή αλκοόλης

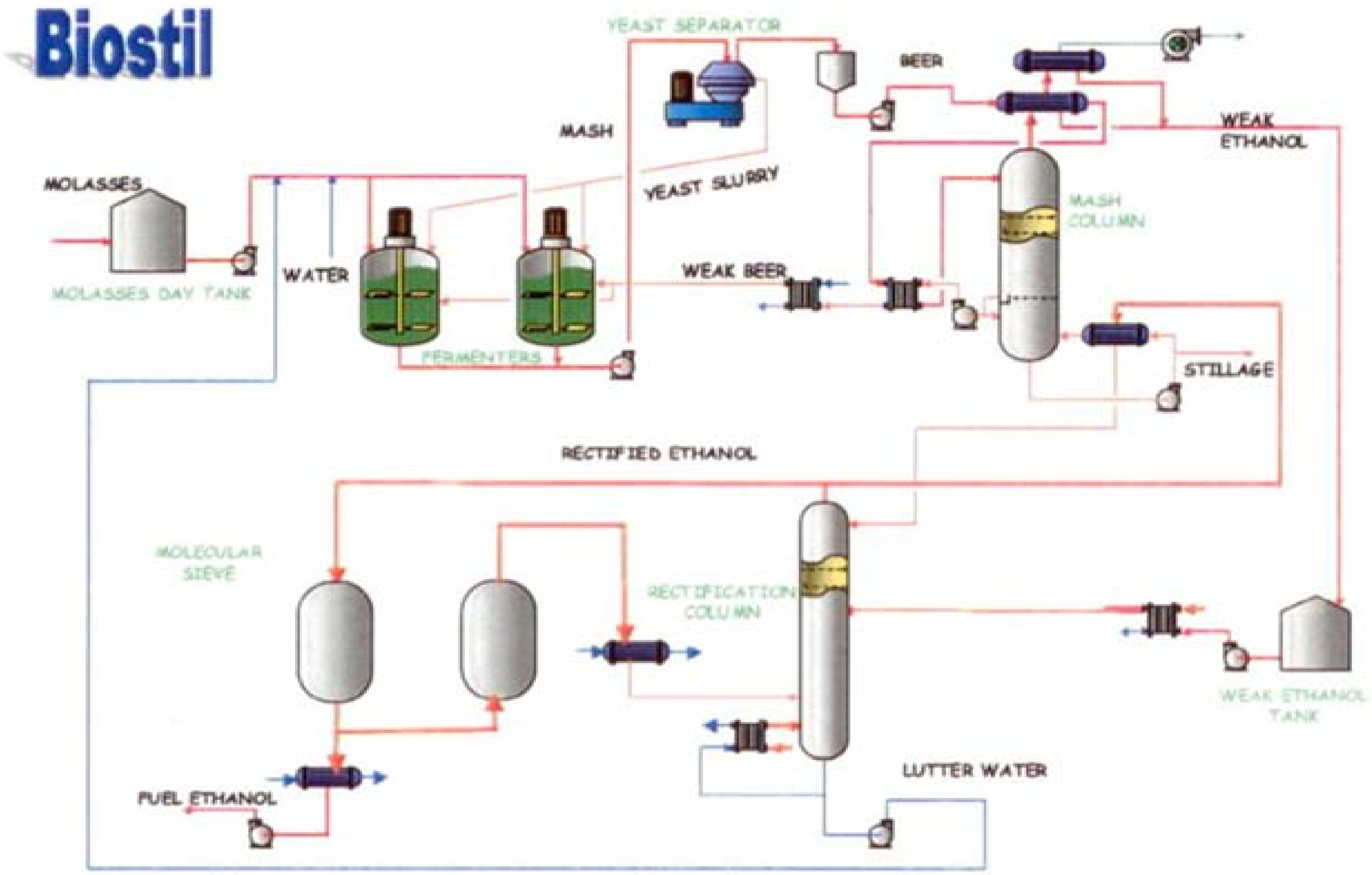
Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή της αλκοόλης είναι:

- ✓ η ασυνεχής ζύμωση (batch culture)
- ✓ η ασυνεχής ζύμωση βυθού με συνεχή προσθήκη υποστρώματος (fed-batch culture)
- ✓ η συνεχής ζύμωση (continuous culture)

Ασυνεχής ζύμωση για την παραγωγή αιθανόλης



Συνεχής ζύμωση για την παραγωγή αιθανόλης



Εργαστηριακή παραγωγή Αλκοόλης

Η παραγωγή αλκοόλης εργαστηριακά γίνεται σε κωνικές φιάλες με διάφορα υποστρώματα όπως έχουν προαναφερθεί παραπάνω στα οποία εμβολιάζουμε συνήθως την ζύμη S.cerevisiae.

Οι συνθήκες της ζύμωσης είναι:

- ✓ στατική ζύμωση / ή με περιστροφικό αναδευτήρα
- ✓ η θερμοκρασία ζύμωσης κυμαίνεται από 25- 37°C
- ✓ Έχουμε αναερόβιες συνθήκες

Οι παράμετροι που ελέγχονται κατά την διάρκεια της ζύμωσης είναι:

- ✓ Η μέτρηση της παραγωγής CO_2
- ✓ Η μέτρηση της παραγωγής αιθανόλης με απόσταξη

Μέτρηση διοξειδίου του άνθρακα (CO_2) κατά την διάρκεια της ζύμωσης

Κατά την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης με έναν μετρητή διοξειδίου του άνθρακα (όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα) μετράμε την παραγωγή CO_2. Αφού κάψουμε καλά στην φλόγα το έμβολο του μετρητή ή το απολυμάνουμε με καθαρή αλκοόλη, το τοποθετούμε στις κωνικές φιάλες μας και παίρνουμε την μέτρηση του CO_2.

Στάδια απόσταξης

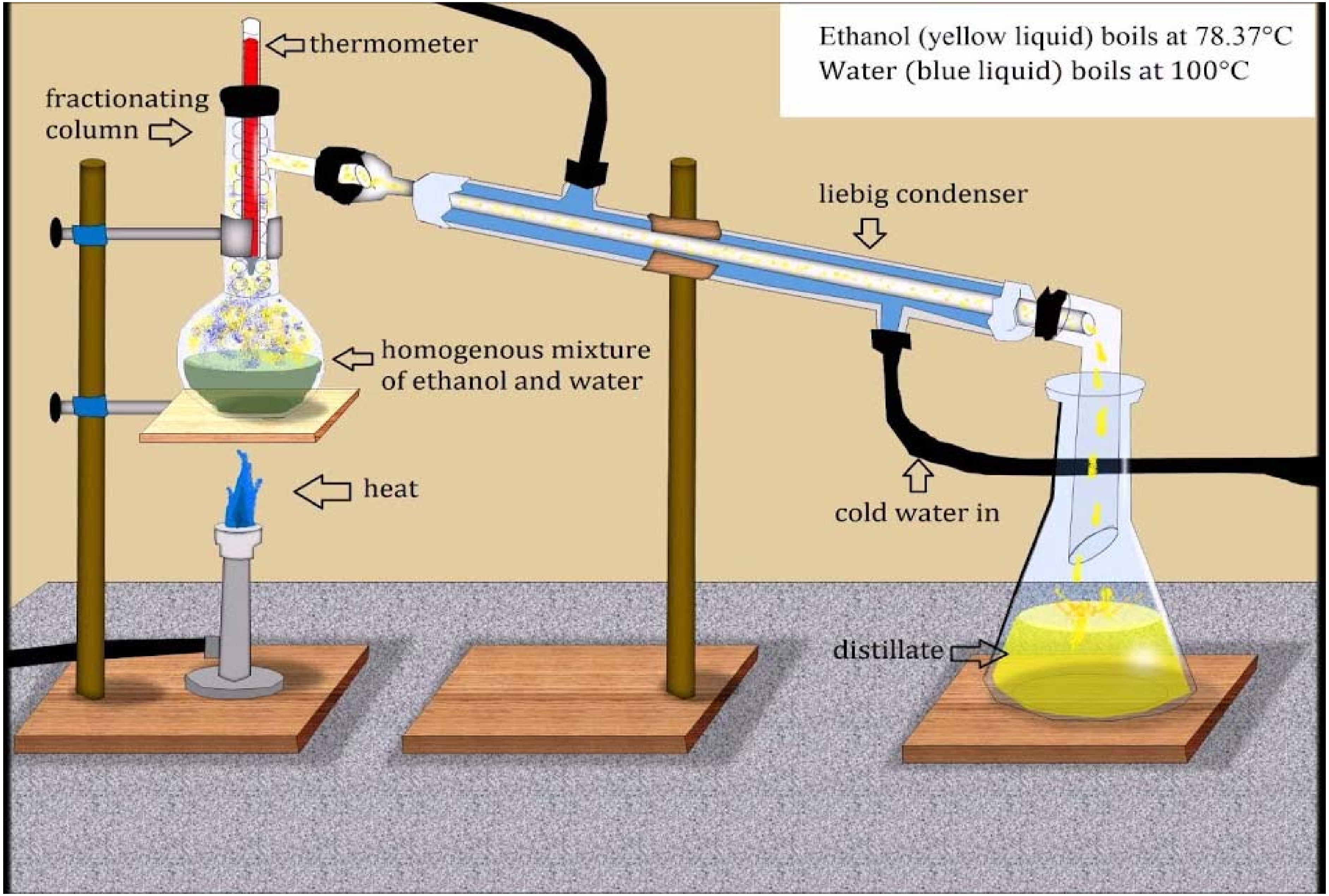
- Ενενήντα πέντε ml δείγματος τοποθετούνται σε σωλήνες φυγόκεντρου και το υγρό ζύμωσης φυγοκεντρείται στα 5000 x g για 20 λεπτά.
- Το υπερκείμενο υγρό χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της αλκοόλης και των σακχάρων.
- Ενενήντα ml του υπερκείμενου υγρού αναμιγνύονται με 160 ml αποσταγμένο νερό.
- Το υγρό αποστάζει στη συσκευή απόσταξης ώσπου να

συγκεντρωθούν 170 ml απόσταγμα στην κωνική φιάλη των 200 ml.

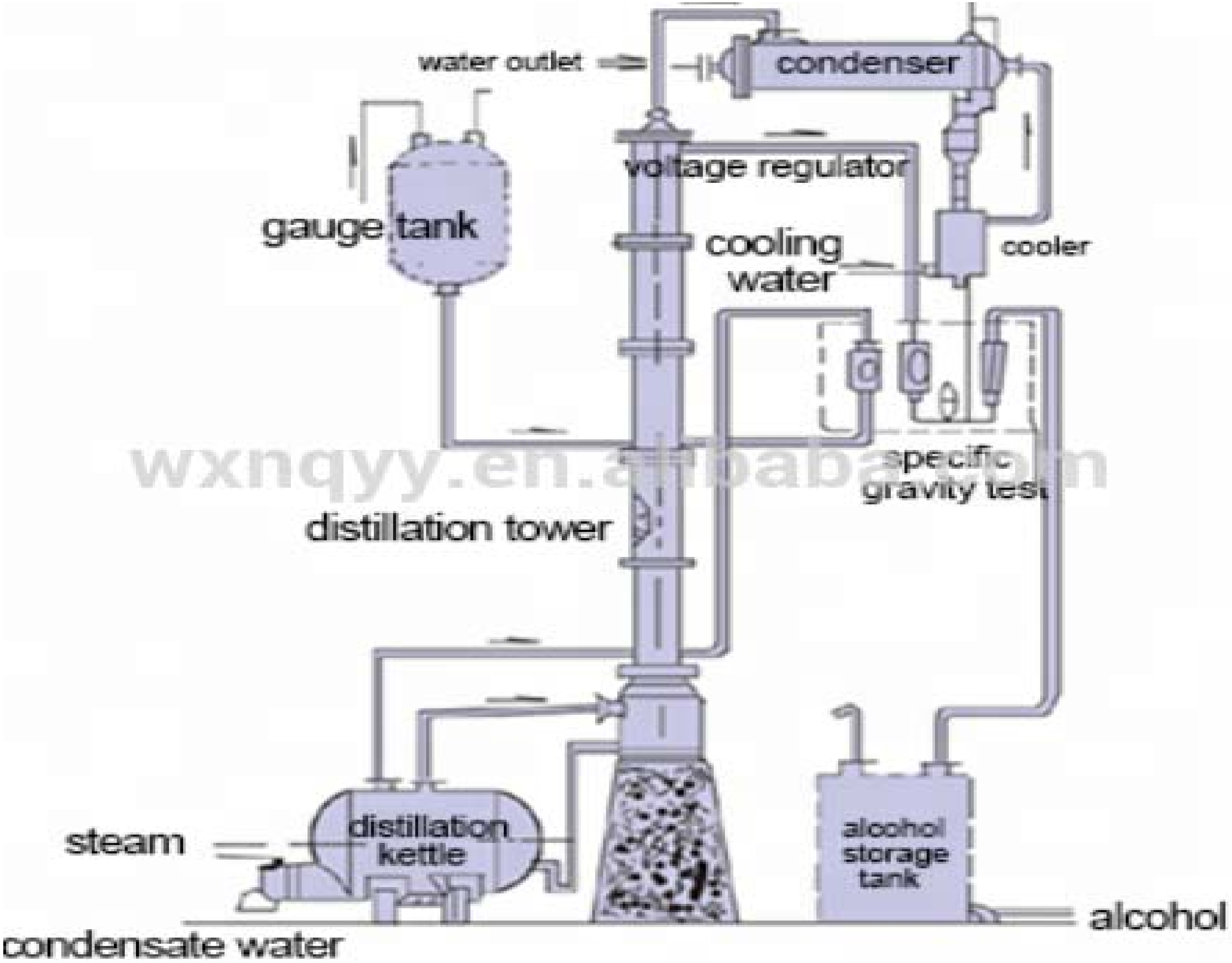
- Η φιάλη συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με αποσταγμένο νερό.
- Το υγρό μεταφέρεται σε ογκομετρικό κύλινδρο των 250 ml και η αλκοόλη προσδιορίζεται με το αλκοολόμετρο.
- Η συγκέντρωση της αλκοόλης στο υπόστρωμα προσδιορίζεται από τη σχέση P=17,3 **x α**

όπου P η συγκέντρωση της αλκοόλης σε g/l και α η ένδειξη του αλκοολομέτρου.

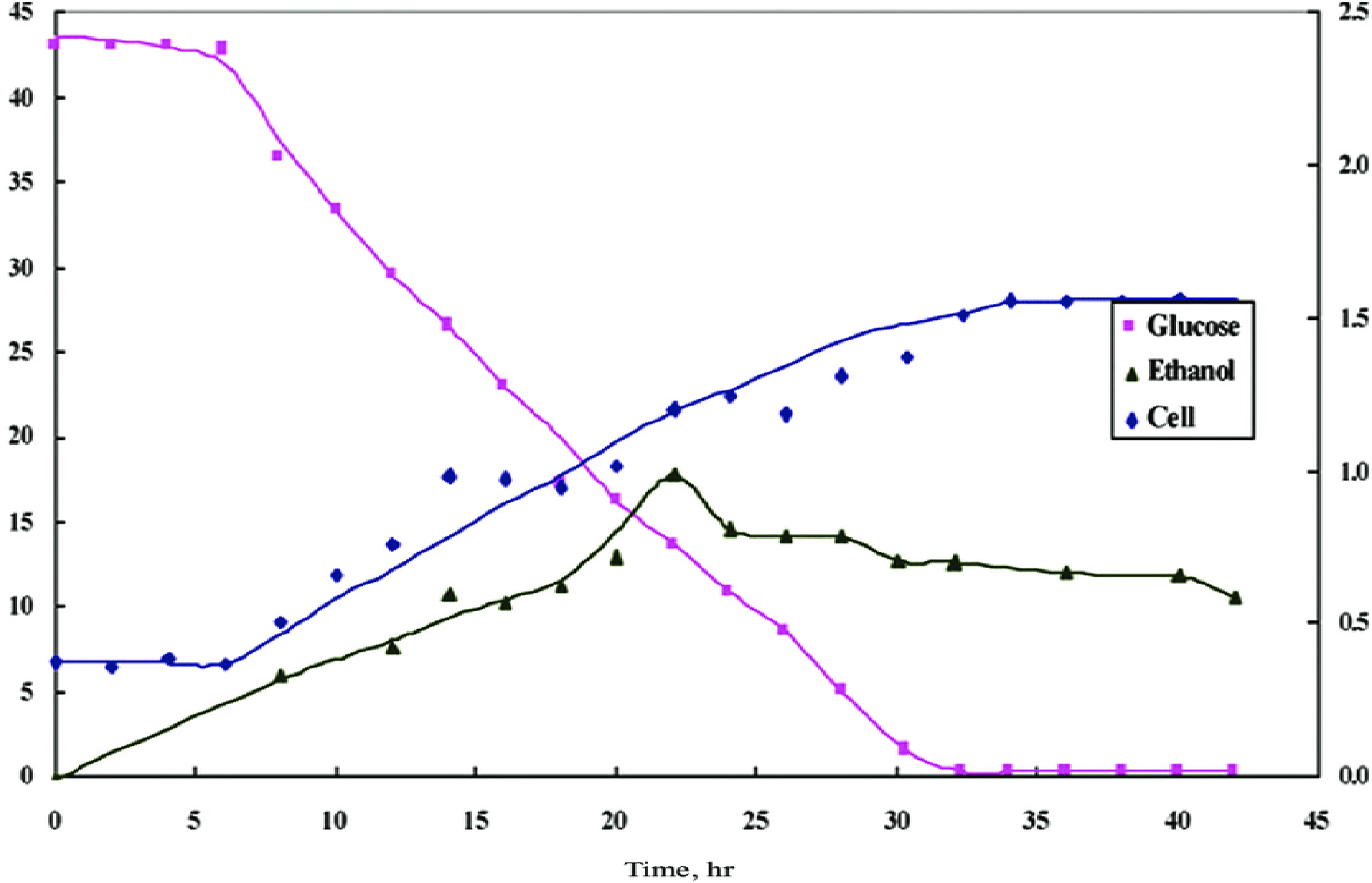
Απόσταξη αιθανόλης σε εργαστηριακή κλίμακα



Απόσταξη αιθανόλης σε βιομηχανική κλίμακα



Η πορεία της αλκοολικής ζύμωσης σε ασυνεχή ζύμωση



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Πρόγραμμα Σπουδών Τεχνολογίας Τροφίμων

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ

Βιοτεχνολογία Τροφίμων και Μικροβιακές Ζυμώσεις

ΙΩΑΝΝΗΣ ΓΙΑΒΑΣΗΣ
Αναπληρωτής Καθηγητής
ΚΑΡΔΙΤΣΑ 2020

Παραγωγή κιτρικού οξέος

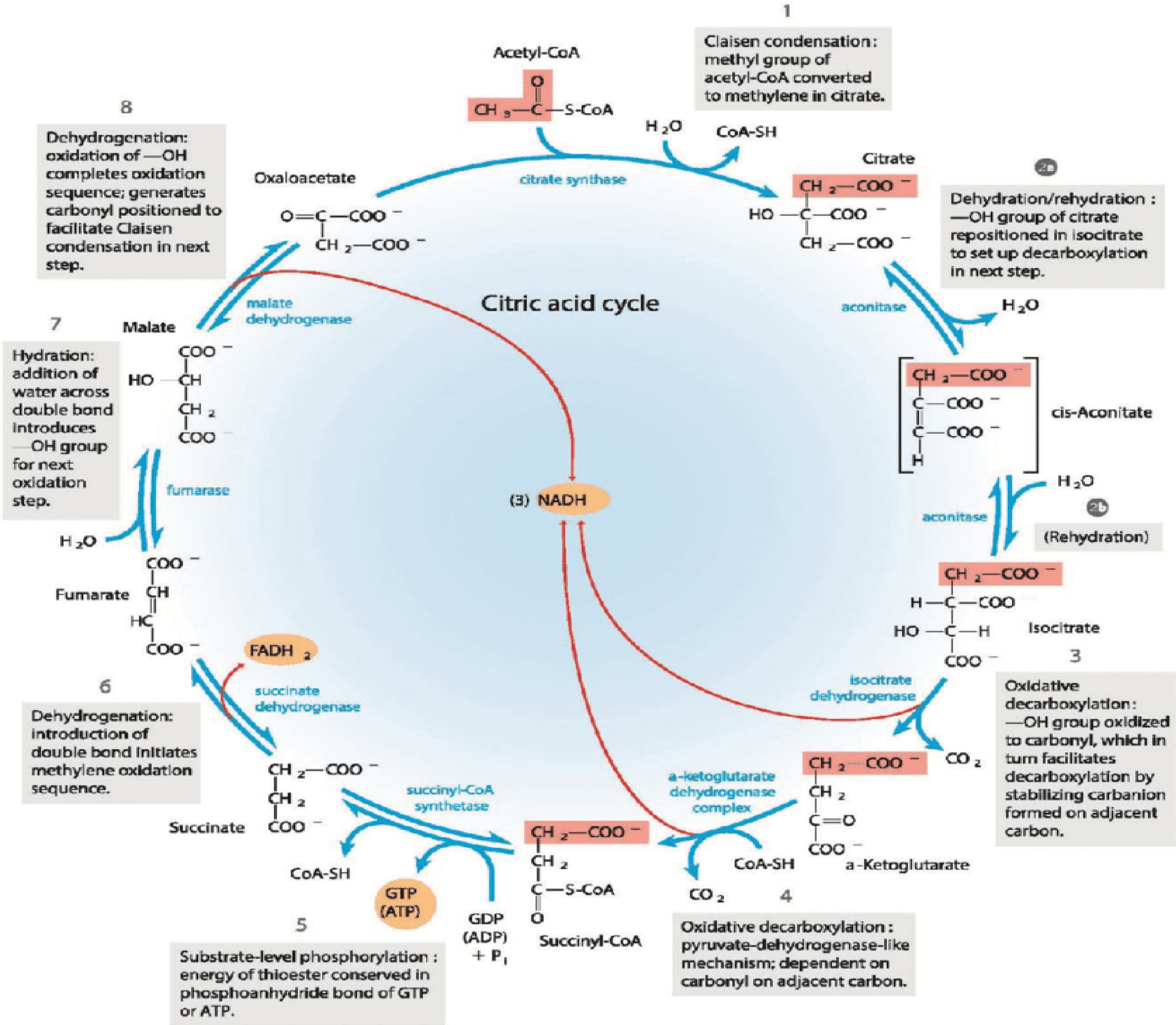
Το κιτρικό οξύ ($CH_2COOHCOHCOOCH_2COOH$) είναι ένα τρικαρβοξυλικό οξύ το οποίο απομονώθηκε από εσπεριδοειδή.

Σήμερα, όλη σχεδόν η ποσότητα του κιτρικού οξέος που χρησιμοποιείται στη βιομηχανία τροφίμων παράγεται από ορισμένα στελέχη του Aspergillus niger από τη μελάσσα.

Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή του κιτρικού οξέος είναι μύκητες, ζύμες και βακτήρια.

Ο κυριότερος μικροοργανισμός που χρησιμοποιείται για την παραγωγή κιτρικού οξέος είναι ο μύκητας **Aspergillus niger**.

Κύκλο του κιτρικού οξέος



Τα κυριότερα πλεονεκτήματα που παρουσιάζουν τα διάφορα στελέχη του **μύκητα A.niger** είναι:

- η ικανότητα των στελεχών να δίνουν μεγάλες ποσότητες κιτρικού οξέος λόγω του μεγάλου αριθμού ενζύμων που παράγουν τα οποία είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση του κιτρικού οξέος
- πολλά από τα στελέχη αυτά χρησιμοποιούν φτηνά υποστρώματα για την παραγωγή του κιτρικού οξέος

Τα υποστρώματα που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή του κιτρικού οξέος από μύκητες είναι συνθετικά υποστρώματα και η μελάσσα.

Από τις **ζύμες** τα στελέχη που χρησιμοποιούνται για την

- παραγωγή του κιτρικού οξέος ανήκουν στα γένη:
- Candida
- Yarrowia
- Hansenula
- Pichia
- Torulopsis
- Kloeckera
- Torula
- Endomyces
- Saccharomyces

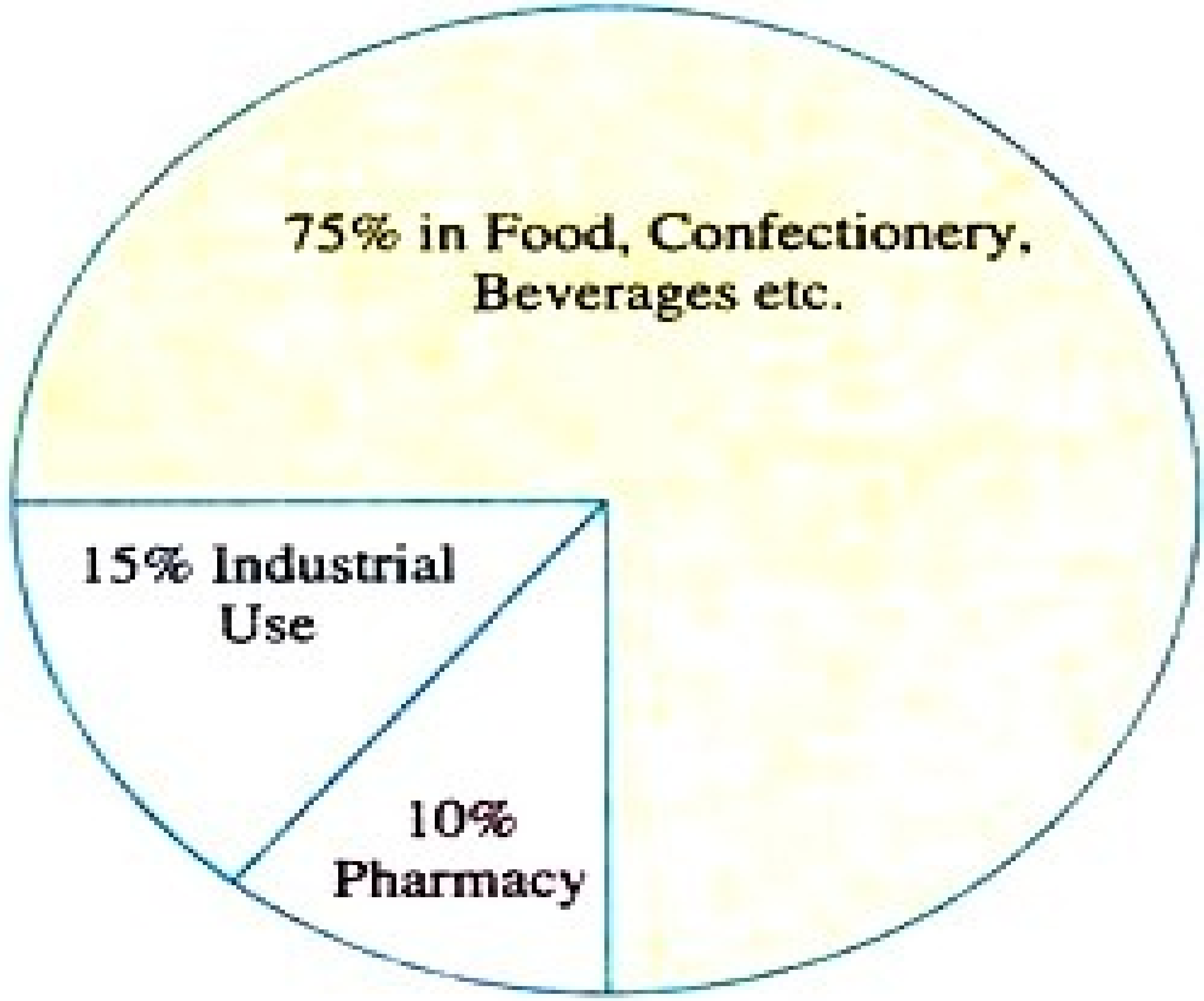
Ενώ τα υποστρώματα που χρησιμοποιούν οι ζύμες για την παραγωγή κιτρικού οξέος είναι γλυκόζη, μελάσσα, αλκοόλη, λιπαρά οξέα, γλυκερόλη και παραφίνες.

Από τα **βακτήρια**, αυτά που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή κιτρικού οξέος ανήκουν στα είδη:

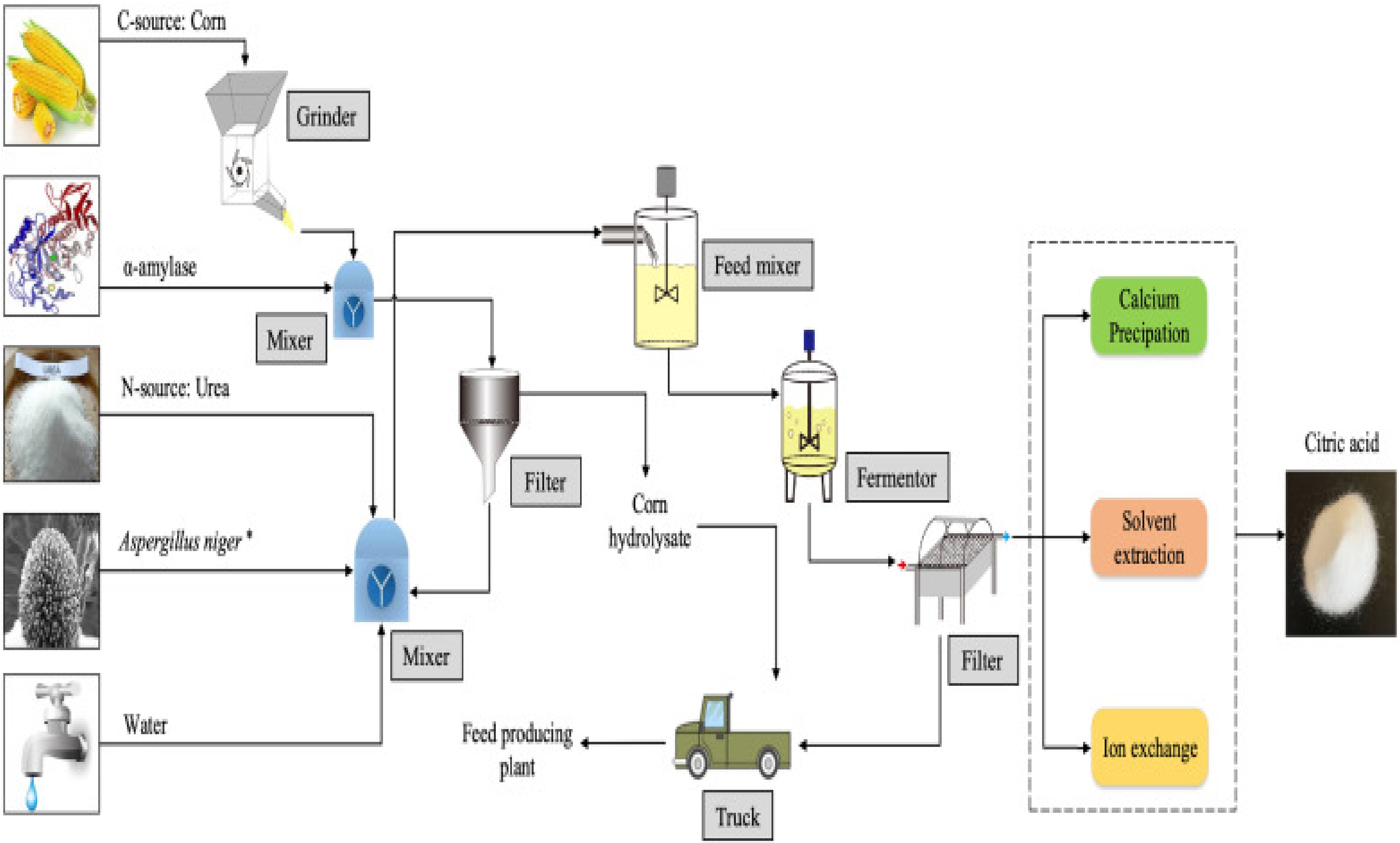
- Bacillus licheniformis
- B. subtilis
- Brevibacterium flavum

Τα υποστρώματα που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή κιτρικού οξέος από βακτήρια είναι η γλυκόζη, ισοκιτρικό οξύ και μείγμα παραφινών.

Βιομηχανική χρήση του κιτρικού οξέος



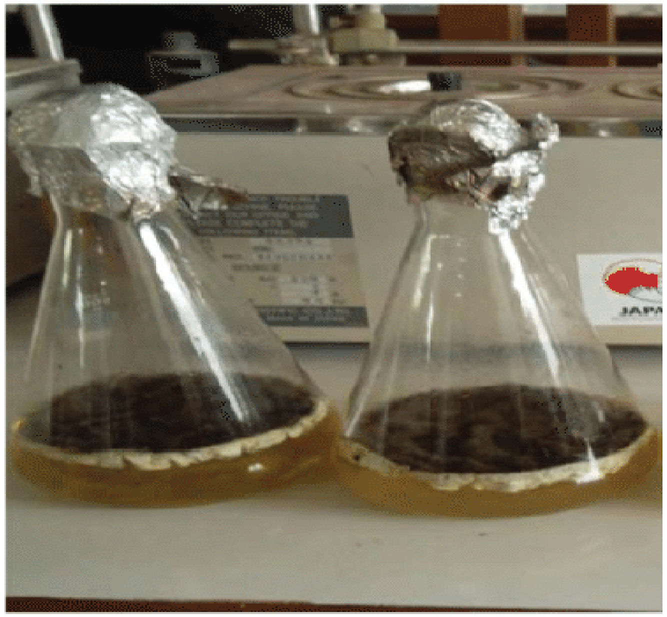
Στάδια βιομηχανικής παραγωγής κιτρικού οξέος



Τρόποι παραγωγής κιτρικού οξέος σε εργαστηριακή κλίμακα

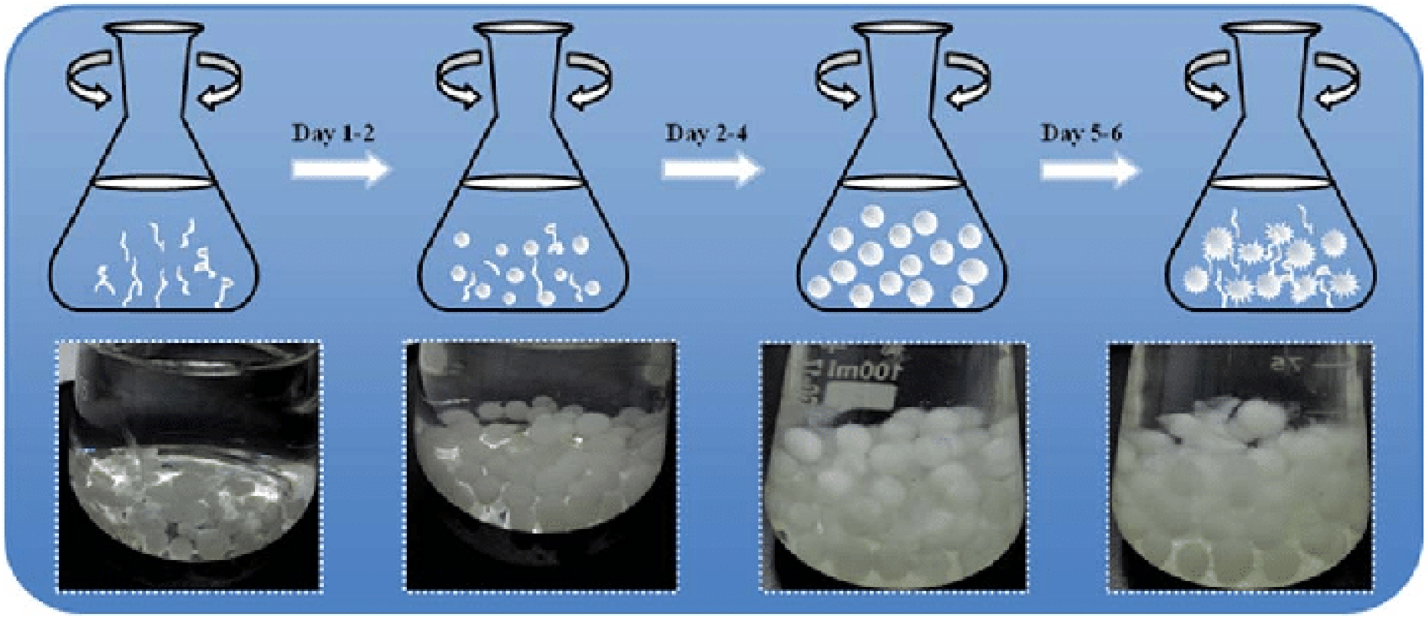
Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή κιτρικού οξέος είναι:

- ✓ η επιφανειακή ζύμωση όπου ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται στην επιφάνεια του υποστρώματος όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα



Ανάπτυξη A.niger σε στατική ζύμωση

- ✓ με ζύμωση βυθού σε ζυμωτήρα αναδεύσεως όπου ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται μέσα στο υγρό της ζύμωσης όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.



Σχηματική απεικόνιση της δημιουργίας των pellet του μύκητα A.niger κατά την διάρκεια της ζύμωσης με ανάδευση

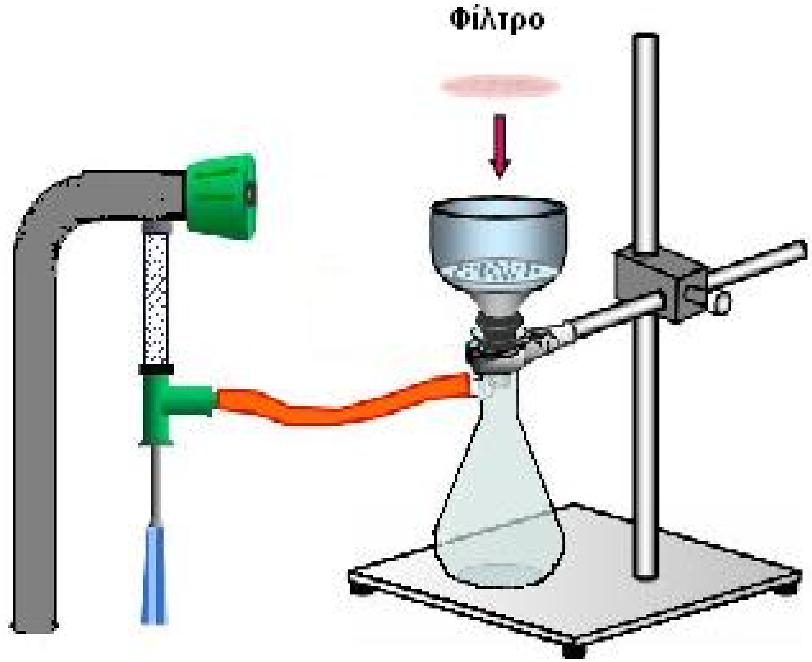
Πειραματικό μέρος

Για την παραγωγή του κιτρικού οξέος είτε με στατική ζύμωση είτε είτε με ζύμωση υπό ανάδευση ελέγχουμε τις εξής παραμέτρους:

- ✓ **pH:** Για την μέτρηση του pH απλά εμβαπτίζουμε το ηλεκτρόδιο στο υγρό ζύμωσης.

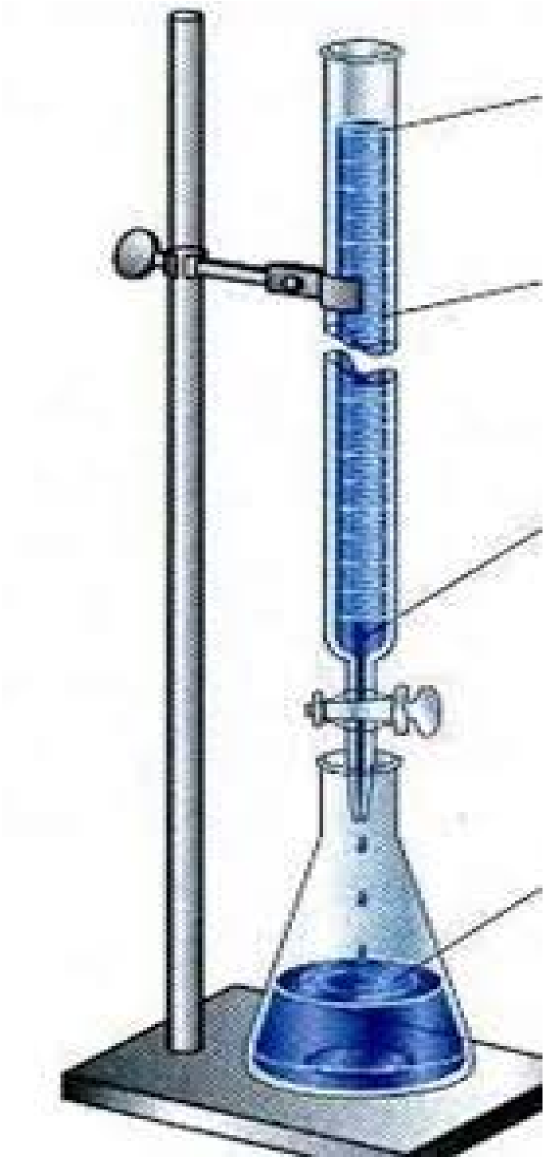
- ✓ **Προσδιορισμός βιομάζας:** το περιεχόμενο κάθε φιάλης (μυκήλιο και υγρό της ζύμωσης) διηθείται σε ηθμό με προζυγισμένο φίλτρο Whatman No541. Το μυκήλιο ξεπλένεται δύο φορές με 50 ml αποσταγμένο νερό και ξηραίνεται στους 105^{o} C για 18 ώρες. Στη συνέχεια τοποθετείται στον ξηραντήρα για 40 λεπτά και ζυγίζεται.

Η διαφορά βάρους πριν και μετά την ξήρανση δίνει το ξηρό βάρος της βιομάζας (g/100ml).



Μυκήλια του A.niger (και υγρό ζύμωσης) έπειτα από διήθηση και πως αυτά επηρεάζονται από την σταδιακή αύξηση της ταχύτητας ανάδευσης σε σχέση με την στατική ζύμωση (εικόνα A)

- ✓ **Προσδιορισμός ολικής οξύτητας:** Πέντε ml διηθήματος προστίθενται σε μια ογκομετρική φιάλη των 50 ml που συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με αποσταγμένο νερό. Ένα ml του παραπάνω διαλύματος αναμιγνύεται με 20 ml αποσταγμένο νερό σε μια κωνική φιάλη των 50 ml στην οποία προστίθενται και 2-3 σταγόνες δείκτη φαινολοφθαλεΐνης 1%. Η ογκομέτρηση του διαλύματος γίνεται με 0,01 Ν NaOH και η ολική οξύτητα εκφρασμένη σε κιτρικό οξύ (g/l) προσδιορίζεται από τη σχέση x=6,4 **. ν όπου ν τα ml NaOH 0,01N** που καταναλώθηκαν.



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Πρόγραμμα Σπουδών Τεχνολογίας Τροφίμων

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ

Βιοτεχνολογία Τροφίμων και Μικροβιακές Ζυμώσεις

ΙΩΑΝΝΗΣ ΓΙΑΒΑΣΗΣ
Αναπληρωτής Καθηγητής
ΚΑΡΔΙΤΣΑ 2020

Παραγωγή γαλακτικού οξέος

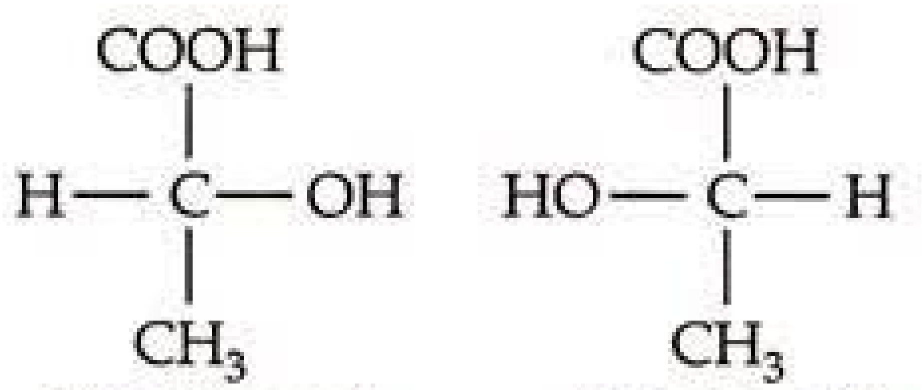
Το γαλακτικό οξύ είναι ένα **οργανικό οξύ**, το οποίο απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1780 από το ξινόγαλα ενώ άρχισε να παράγεται σε βιομηχανική κλίμακα το 1881 με τη χρησιμοποίηση των μικροοργανισμών.

Είναι ένα προϊόν **αναερόβιας διάσπασης** των σακχάρων και πιο συγκεκριμένα της λακτόζης και της γλυκόζης.

Το γαλακτικό οξύ βρίσκεται:

- στο γάλα και σε πολλά γαλακτοκομικά προϊόντα
- στο κρασί
- στα φρούτα
- στα ξινά ζυμούμενα τρόφιμα

(τουρσί, ελιές, σαλάμι αέρος, κλπ)

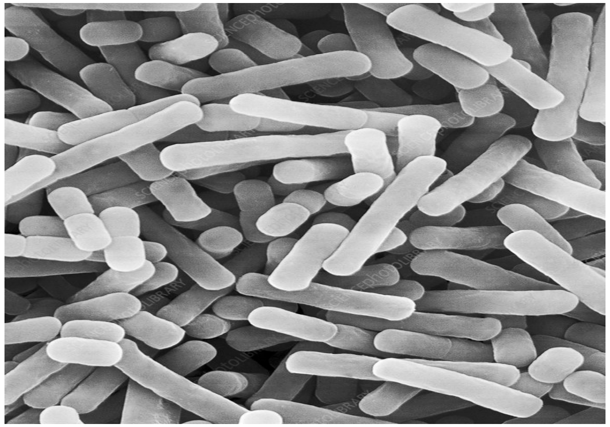


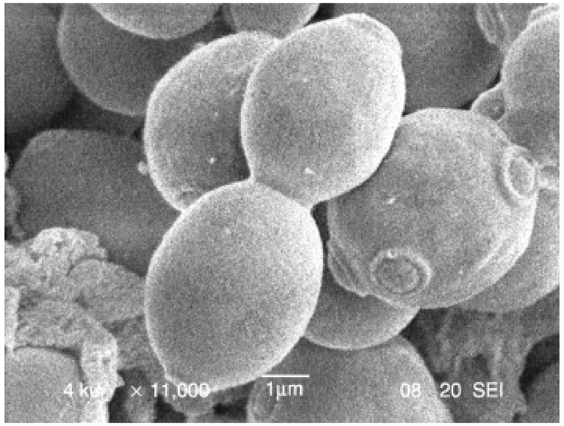
D-lactic acid L-lactic acid

Structure of lactic acid asymmetric carbon

Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται για τη παραγωγή του γαλακτικού οξέος είναι:

- ✓ Γαλακτικά βακτήρια: Lactobacillus delbrueckii, L. bulgaricus, L. leichmannii, L. pentosus, L. casei και Lactococcus lactis.
- ✓ Μύκητες: Rhizopus oryzae
- ✓ Ζύμες: K. lactis, K.marxianus





L.bulgaricus σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (αριστερά), R.oryzae σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (κέντρο), K.marxianus σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (δεξιά)

Τα υποστρώματα που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή του γαλακτικού οξέος:

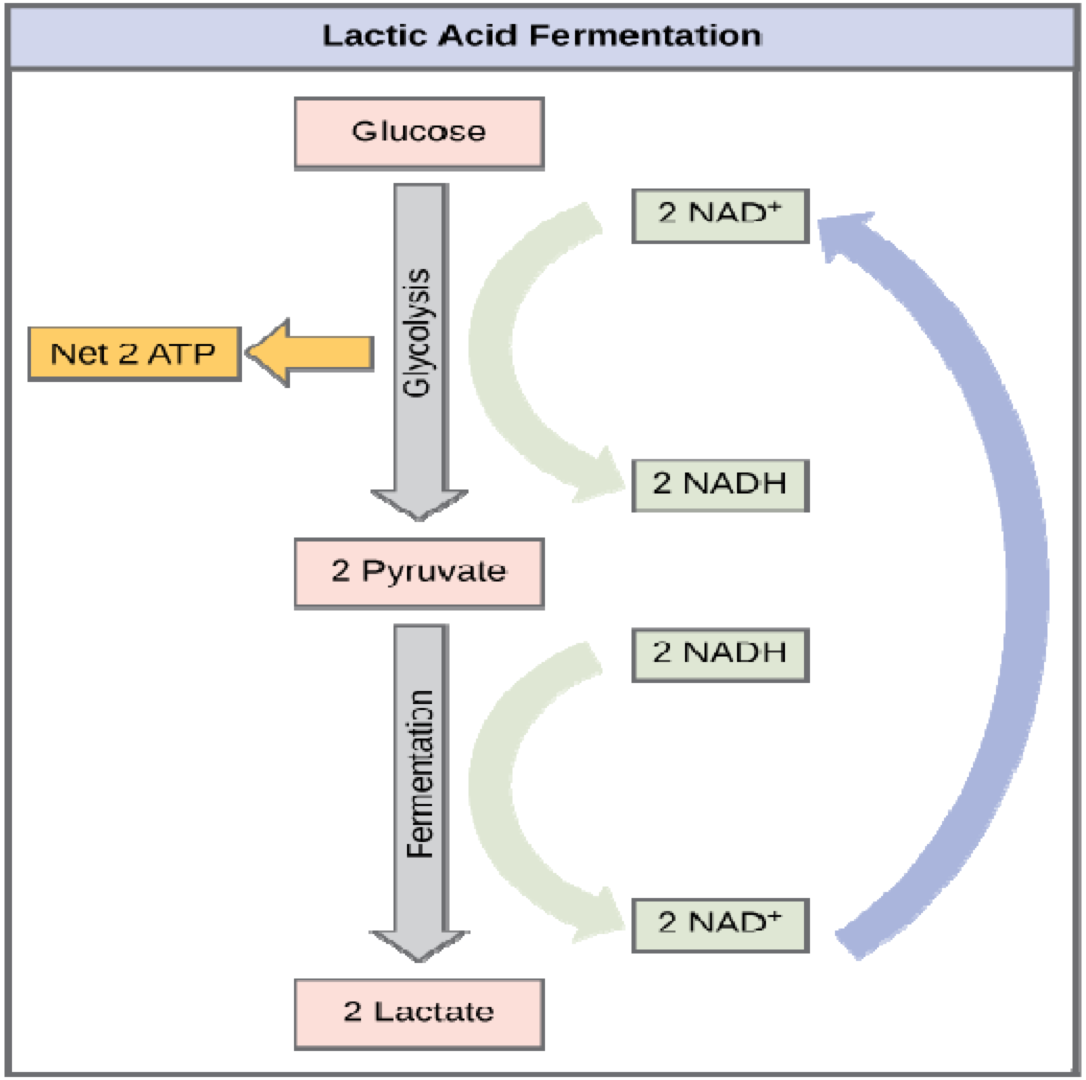
- ✓ Συνθετικά (MRS Broth)
- ✓ διάφορες αμυλούχες ουσίες (δημητριακά, πατάτες κλπ.)
- ✓ Τυρόγαλα
- ✓ Μελάσσα
- ✓ θειώδη απόβλητα επεξεργασίας ξύλου

Βιοχημικό μονοπάτι της ζύμωσης του γαλακτικού οξέος

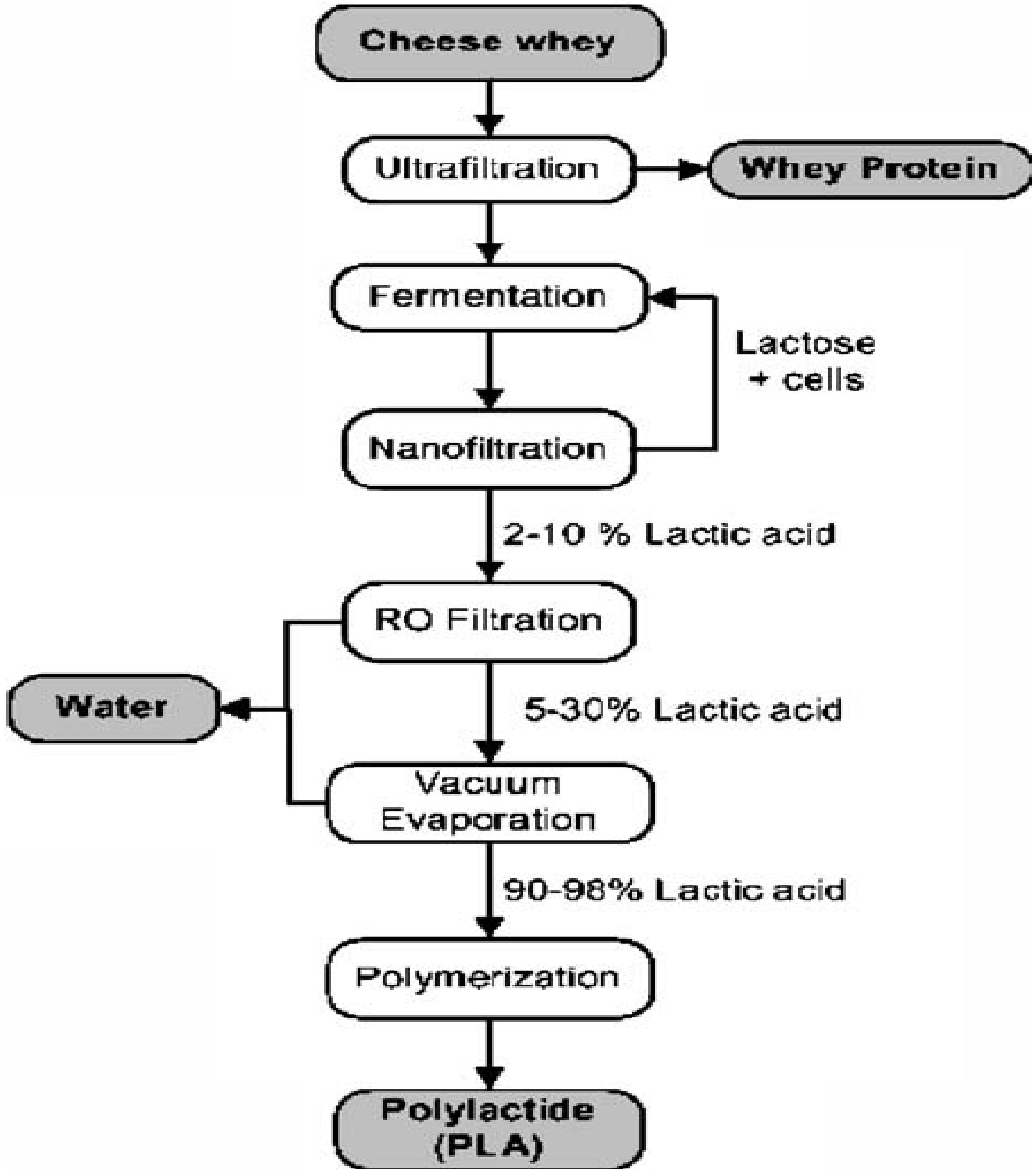
Το γαλακτικό οξύ παράγεται από τους μονοσακχαρίτες ή τους δισακχαρίτες μέσω της οδού της **γλυκόλυσης** όπου η γλυκόζη μετατρέπεται σε δύο μόρια πυροσταφυλικού οξέος.

Στη συνέχεια το πυροσταφυλικό οξύ παρουσία του ενζύμου της **γαλακτικής δεϋδρογονάσης** ανάγεται σε δύο μόρια γαλακτικού οξέος.

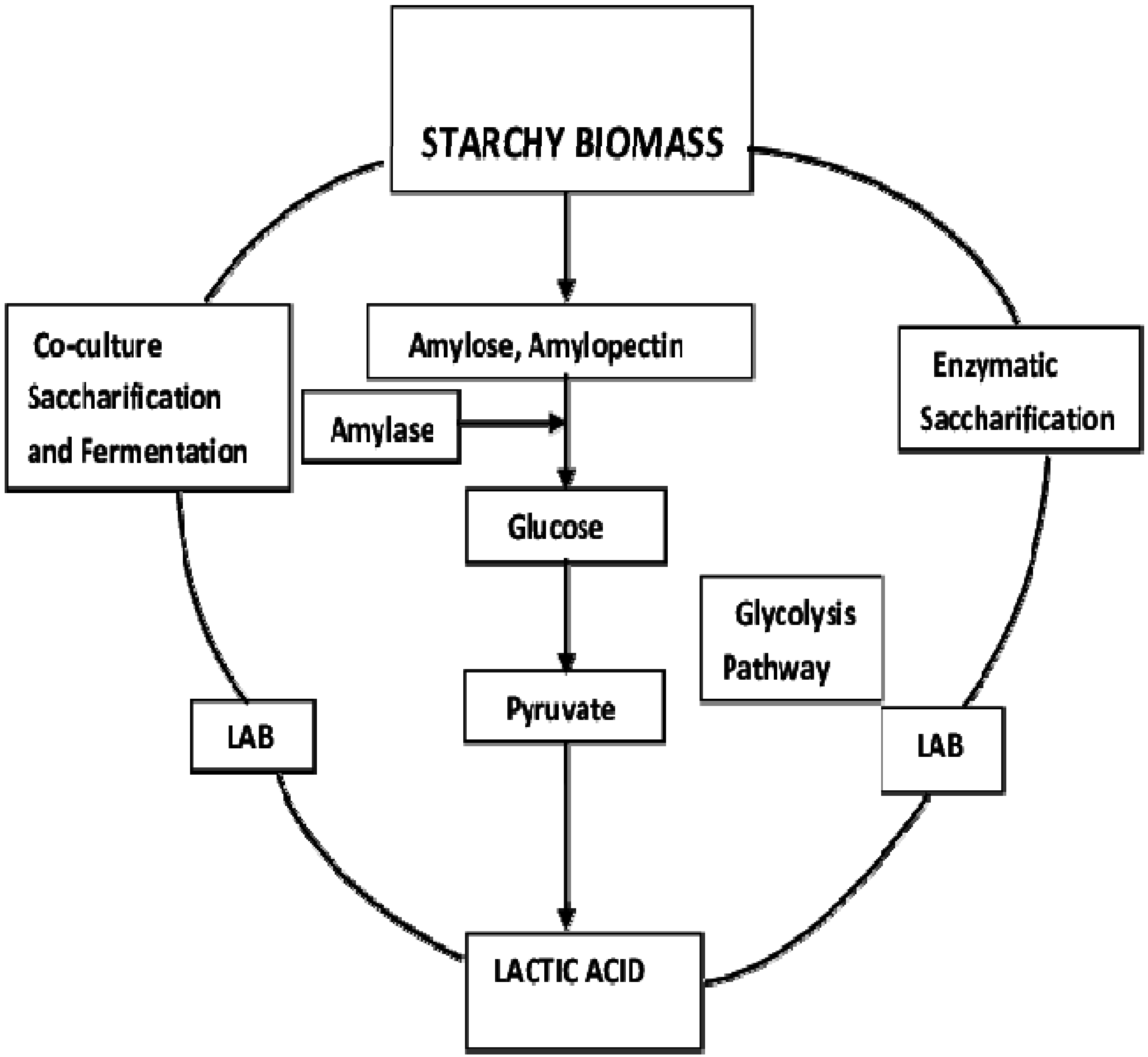
Τα **ομοζυμωτικά LAB** παράγουν μόνο γαλακτικό οξύ από τη ζύμωση λακτόζης ή γλυκόζης, ενώ στην περίπτωση **ετεροζυμωτικών LAB** παράγονται και μικρότερες ποσότητες οξικού οξέος, αιθανόλης και CO_2 (υποπροϊόντα)



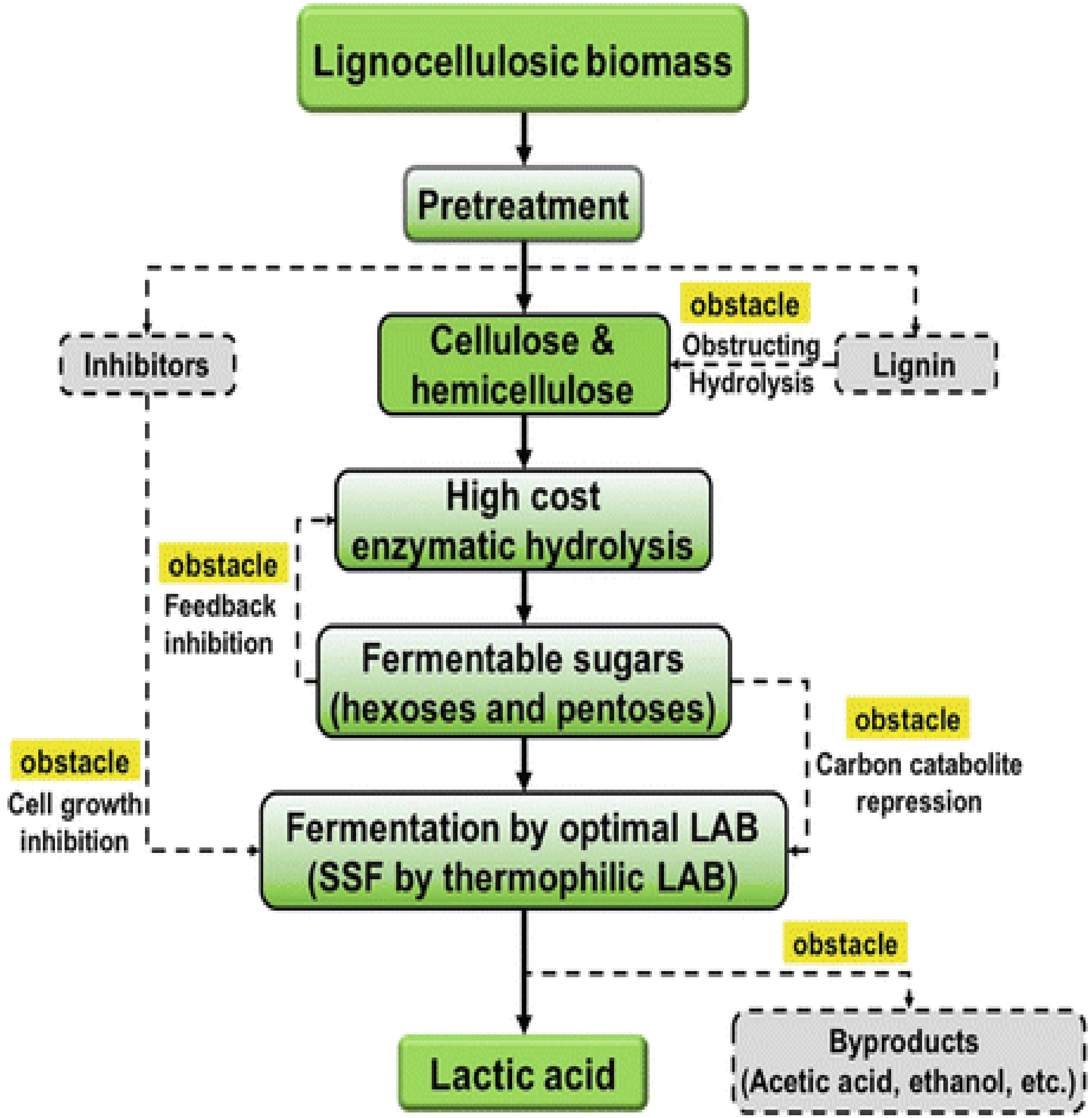
Παραγωγή γαλακτικού οξέος από τυρόγαλο και σύνθεση πολυγαλακτικού (πολυμερές-βιοαποικοδομίσιμο πλαστικό)



Παραγωγή γαλακτικού οξέος από βιομάζα αμύλου



Παραγωγή γαλακτικού οξέος από λιγνοκυτταρινική βιομάζα



Χρήσεις του γαλακτικού οξέος

Lactic acid

Food industry
- -acidulates
- -preservatives
- -flavoring agent
- -pH regulators
- -improving microbial quality
- -mineral fortification

Cosmetic industry
- -moisturizers
- -skin-lightening agents
- -skin-rejuvenating agents
- -pH regulators
- -anti-acne agents
- -humectants
- -anti-tartar agents

Chemical industry
- -descaling agents
- -pH regulators
- -neutralizers
- -chiral intermediates
- -green solvents
- -cleaning agents
- -slow acid releasing agents

Chemical feedstock
- -propylene oxide
- -acetaldehyde
- -acrylic acid
- -propionic acid
- -2,3-pentanedione
- -ethyl lactate
- -poly(lactic acid)

Pharmaceutical industry
- -parenteral/I.V. solution
- -dialysis solution
- -mineral preparations
- -tablet tings
- -prostheses
- -surgical sutures
- -controlled drug delivery system

Πειραματικό μέρος

- ✓ Οι μέθοδοι ζυμώσεως που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή του γαλακτικού οξέος είναι η ασυνεχής ζύμωση βυθού και η συνεχής ζύμωση.
- ✓ Το υπόστρωμα της ζύμωσης μπορεί να είναι συνθετικό (όπως το MRS Broth) ή τυρόγαλο κλπ.
- ✓ Η ζύμωση γίνεται αναεροβίως με ελαφριά ανάδευση του υποστρώματος ή στατικά (χωρίς ανάδευση).
- ✓ Η συγκέντρωση των σακχάρων κυμαίνεται μεταξύ 5-20%, αλλά συνήθως δεν ξεπερνά το 12%.

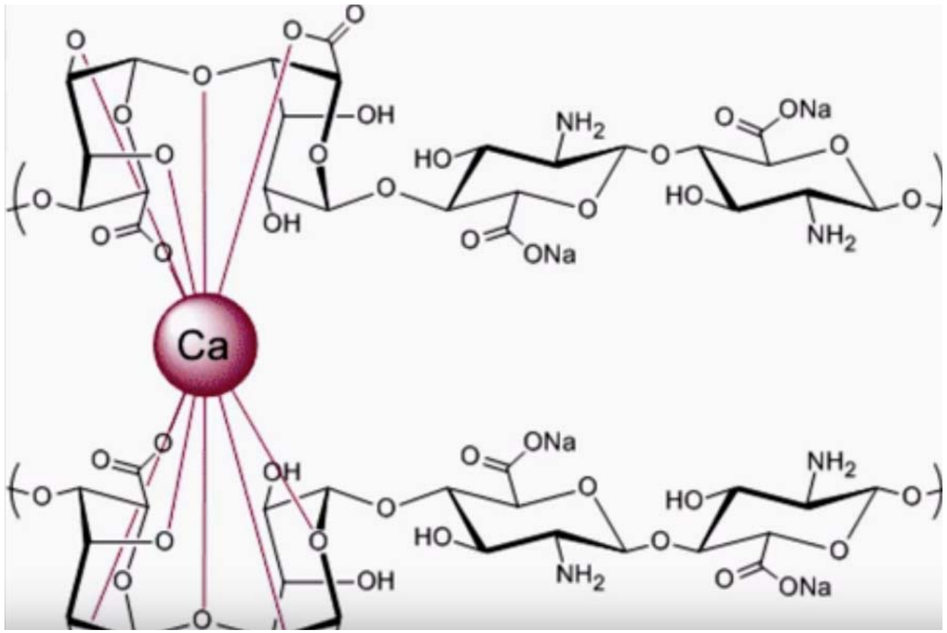
Πειραματικό μέρος

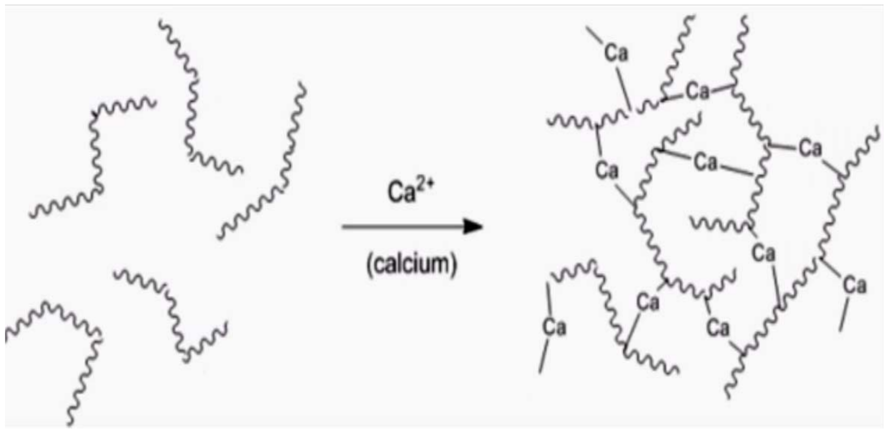
- ✓ Ο εμβολιασμός του υποστρώματος γίνεται με ελεύθερα ή ακινητοποιημένα κύτταρα (προστατεύουν τον μικροοργανισμό από το χαμηλό pH).
- ✓ Το αρχικό pH του υποστρώματος κυμαίνεται από 6.5- 7 ενώ στο τέλος της ζύμωσης το pH είναι ~ 3.8.
- ✓ Η θερμοκρασία ρυθμίζεται ανάλογα με το στέλεχος του μικροοργανισμού που χρησιμοποιείται (συνήθως είναι μεταξύ 30-37°C).
- ✓ Η ζύμωση διαρκεί 2-6 μέρες ανάλογα με το μικροοργανισμό, το υπόστρωμα και τις συνθήκες διεξαγωγής της ζύμωσης.

Στάδια παραγωγής ακινητοποιημένων κυττάρων σε αλγινικό ασβέστιο

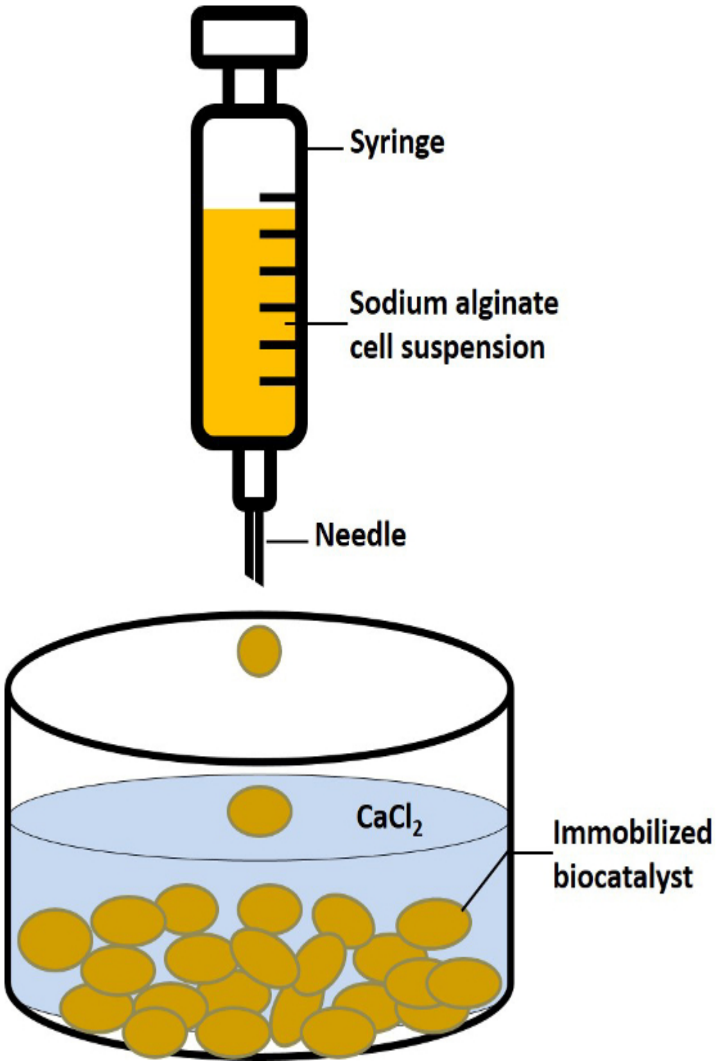
Τα **κύτταρα** του L. casei που βρίσκονται σε αιώρημα σε 15ml αποστειρωμένο νερό αναμιγνύονται με 10 ml αποστειρωμένο διάλυμα **αλγινικού νατρίου** 5% (w/v). Το μείγμα προστίθεται με μια πιπέτα των 10 ml υπό μορφή σταγόνων σε 100 ml αποστειρωμένου διαλύματος **CaCl2 2%** (w/v) όπου σχηματίζονται σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου μέσα στα οποία παγιδεύονται τα κύτταρα του μικροοργανισμού.

Τα σφαιρίδια παραμένουν στο διάλυμα CaCl2 για 2 ώρες και στη συνέχεια ξεπλένονται 2-3 φορές με φυσιολογικό ορό για την απομάκρυνση των κυττάρων που δεν παγιδεύτηκαν στην **πηκτή του αλγινικού ασβεστίου**. Τα σφαιρίδια διατηρούνται σε φυσιολογικό ορό στο ψυγείο μέχρις ότου χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή του γαλακτικού οξέος.





Ακινητοποίηση κυττάρων σε αλγινικό ασβέστιο



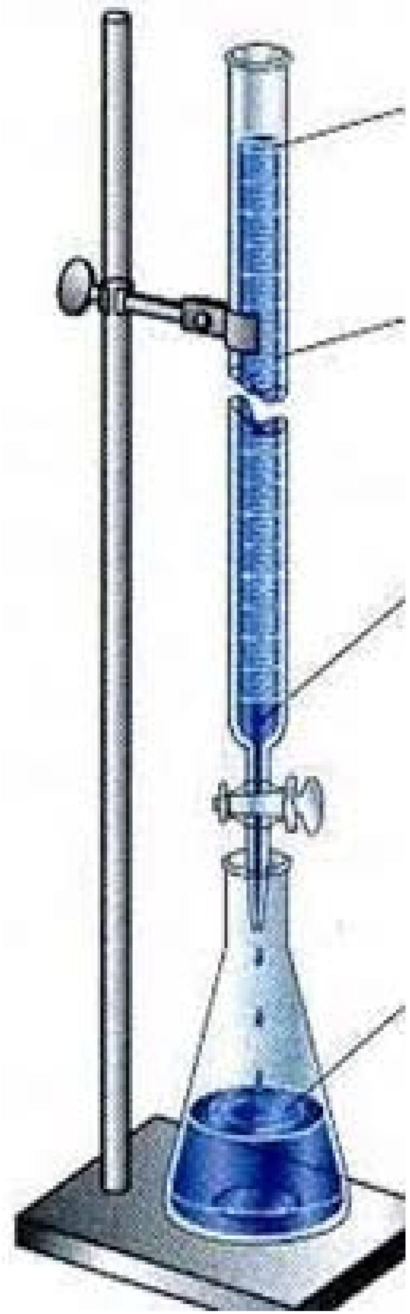
Για την παραγωγή του γαλακτικού οξέος είτε με στατική ζύμωση είτε με ζύμωση υπό ανάδευση ελέγχουμε τις εξής παραμέτρους:

- ✓ **pH:** Για την μέτρηση του pH απλά εμβαπτίζουμε το ηλεκτρόδιο στο υγρό ζύμωσης.

- **Μέτρηση ολικής οξύτητας:** 5 ml υποστρώματος διηθούνται και 2 ml διηθήματος μεταφέρονται σε κωνική φιάλη των 50 ml στην οποία προστίθενται 20 ml αποσταγμένο νερό και 2-3 σταγόνες δείκτη φαινολοφθαλεΐνη. Το διάλυμα ογκομετρείται με NaOH 0,01N μέχρις ότου το χρώμα του διαλύματος γίνει ρόδινο. Η ολική οξύτητα εκφρασμένη σε γαλακτικό οξύ δίνεται από τη σχέση

x=0,45 x v (g/l)

όπου v τα ml NaOH 0, 01 N που καταναλώθηκαν για την εξουδετέρωση του γαλακτικού οξέος.



- ✓ **Μέτρηση σακχάρων με διαθλασίμετρο:** παίρνουμε μια σταγόνα από το διήθημα και την τοποθετούμε στο διαθλασίμετρο όπου πατάμε την ένδειξη READ για να μας δώσει την μέτρηση των σακχάρων στο δείγμα μας.

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Πρόγραμμα Σπουδών Τεχνολογίας Τροφίμων

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ

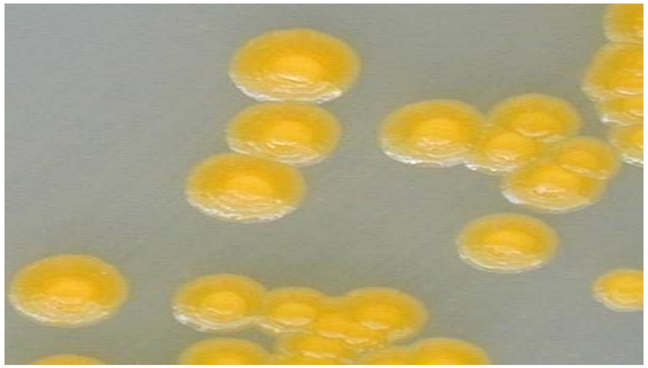
Βιοτεχνολογία Τροφίμων και Μικροβιακές Ζυμώσεις

ΙΩΑΝΝΗΣ ΓΙΑΒΑΣΗΣ
Αναπληρωτής Καθηγητής
ΚΑΡΔΙΤΣΑ 2020

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΖΕΛΛΑΝΗΣ ΑΠΟ ΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ SPHINGOMONAS PAUCIMOBILIS

Η τζελλάνη (Gellan gum) είναι ένας μικροβιακός εξωπολυσακχαρίτης που εκκρίνεται από τα κύτταρα του κινητού βακτηρίου Sphingomonas paucimobilis, το οποίο παράγει σφιγγολιπίδια στην κυτταρική μεμβράνη.

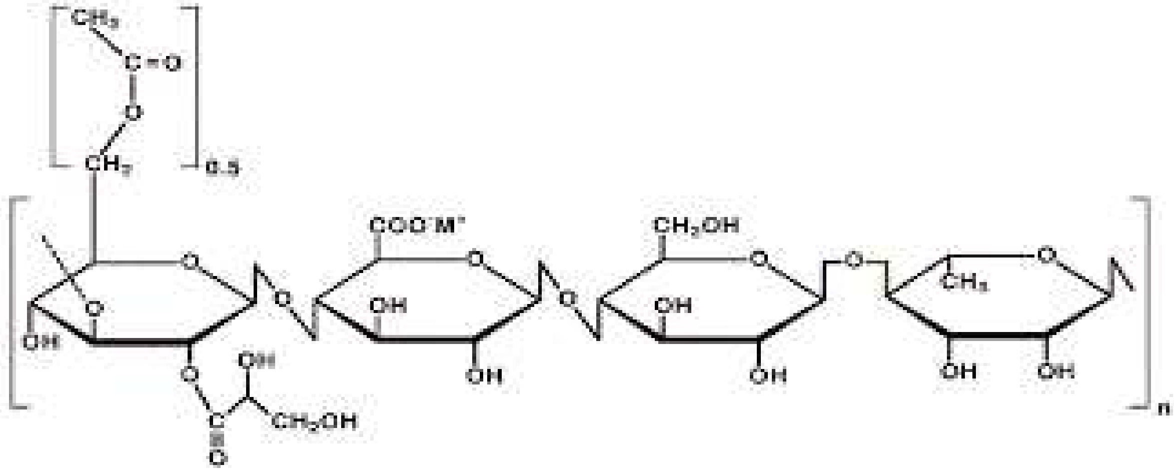
Αποτελείται από μόρια γλυκόζης, ραμνόζης, γλυκουρονικού οξέος, που όταν διαλυθεί στο νερό σχηματίζει διπλή έλικα και συγκρατεί μόρια νερού.



Αποικίες S.paucimobilis

Είναι ένα Gram^{-} φυτοπαθογόνο βακτήριο που εκκρίνει κίτρινες χρωστικές και πολυσακχαρίτες, οι οποίοι βοηθούν την πρόσθεση των κυττάρων σε επιφάνειες, αλλά και την επιβίωση του κυττάρου σε συνθήκες έλλειψης σακχάρων.

Παράγει επίσης λυάσες της τζελλάνης (τζελλανάσες) ώστε να υδρολύει τον πολυσακχαρίτη όταν αυτό απαιτείται.



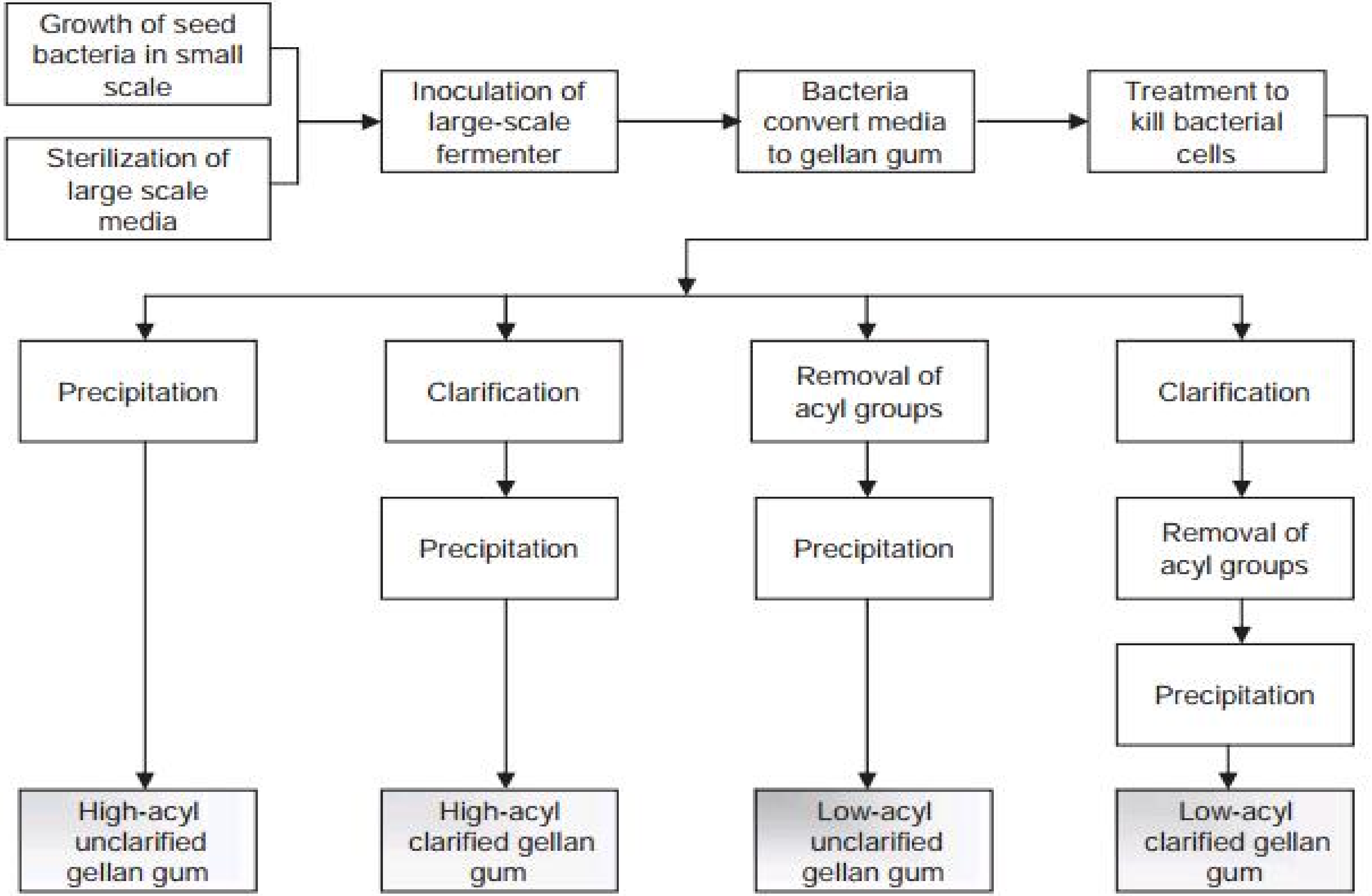
Επαναλαμβανόμενο μόριο τζελλάνης

Εφαρμογές τζελλάνης

Η τζελλάνη έχει πολλές εφαρμογές ως πηκτική ουσία και σταθεροποιητής σε διάφορα τρόφιμα, χάρη στην υψηλή πηκτική της δύναμη (δυνατότητα δέσμευσης μορίων νερού). Μερικές από της εφαρμογές:

- αύξηση ιξώδους διαλυμάτων
- δημιουργία θερμοαναστρέψιμων gel
- σταθεροποίηση δομής τροφίμων – γαλακτωμάτων
- δημιουργία εδώδιμων φίλμ και υλικών
- επικάλυψη τροφίμων και φαρμάκων
- υποκατάστατο της αγαρόζης στα τρυβλία

Βιομηχανική παραγωγή τζελλάνης



Σημαντικοί παράγοντες για τη ζύμωση

Για την παραγωγή τζελλάνης σημαντικό ρόλο παίζει η **διαθεσιμότητα σακχάρων**, από τα οποία θα συντεθεί ο πολυσακχαρίτης

Η **επαρκής ανάδευση (~500rpm)** που είναι απαραίτητη για την ομοιόμορφη μεταφορά μάζας-θερμότητας σε ένα ιξώδες υγρό ζυμώσης

Η **χαμηλή συγκέντρωση πηγών αζώτου**, που ευνοούν την ανάπτυξη των κυττάρων, αλλά όχι τη σύνθεση τζελλάνης

Σημαντικοί παράγοντες για τη ζύμωση

Το **ιξώδες** της ζύμωσης είναι σημαντικό κριτήριο για την επιτυχή παραγωγή τζελλάνης και αυτό σχετίζεται με τη συγκέντρωση αλλά και το μοριακό βάρος (ΜΒ) του πολυσακχαρίτη (υψηλό ΜΒ οδηγεί σε υψηλότερο ιξώδες)

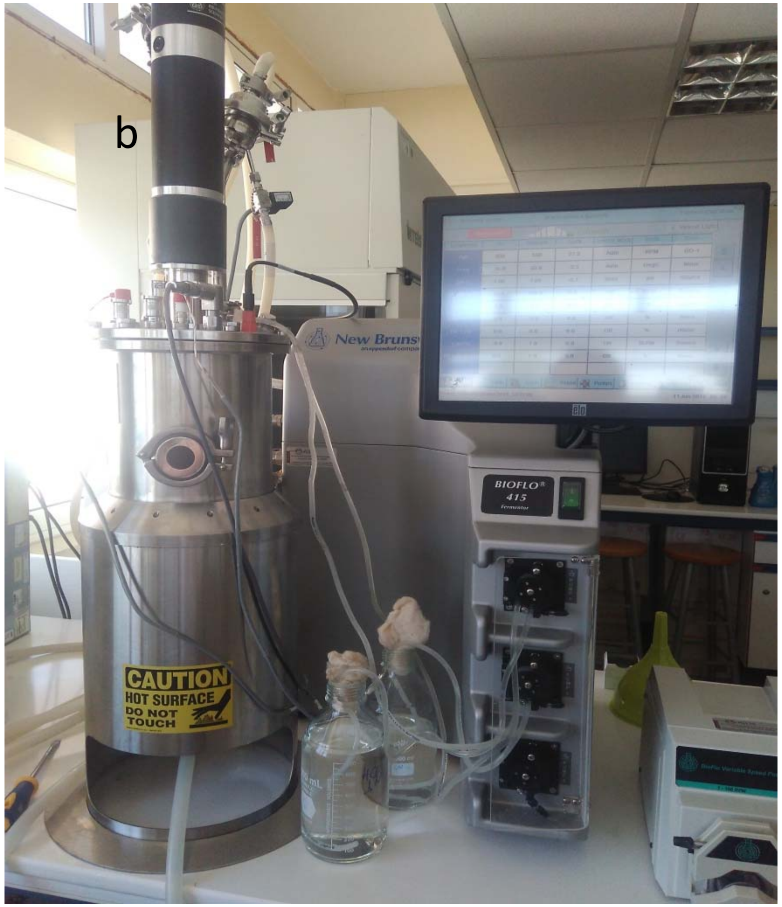
Το **pH** της ζύμωσης πρέπει να είναι ουδέτερο, και αερισμός επαρκής (αλλά όχι πολύ έντονος), καθώς μικροοργανισμός δεν είναι οξυάντοχος, και επίσης είναι αερόβιος, αλλά και ευαίσθητος στο οξειδωτικό στρες.

Πειραματικό μέρος

Για την ανάπτυξη του S. paucimobilis σε τρυβλία χρησιμοποιούμε το συνθετικό υπόστρωμα **Yeast Malt Gelzan** (εμπορική ονομασία της τζελλάνης) (10g/L Yeast extract, 10g/L Malt extract και 12g/L gelzan).

Μόλις αναπτυχθεί ο μικροοργανισμός εμβολιάζουμε μια μεμονωμένη αποικία σε κωνικές φιάλες ή σε βιοαντιδραστήρα με συνθετικό υπόστρωμα **Yeast Malt Extract Broth** ή συνθετικό υπόστρωμα λακτόζης ή αποπρωτεϊνωμένου τυρογάλακτος στις οποίες έχουμε ρυθμίσει το pH στο 7 και επώαζουμε στους 30°C x 3d.

Πειραματικό μέρος



Παραγωγή τζελλάνης σε κωνικές (Εικ. a)

Παραγωγή τζελλάνης σε βιοαντιδραστήρα (Εικ. b)

Μετρήσεις που πραγματοποιούνται κατά την διάρκεια της ζύμωσης:

- ✓ μέτρηση pH
- ✓ μέτρηση ιξώδους
- ✓ μέτρηση μικτού βάρους βιομάζας – τζελλάνης
- ✓ μέτρηση βιομάζας
- ✓ μέτρηση σακχάρων
- ✓ αποακετυλίωση δείγματος

Μέτρηση pH

Για τη μέτρηση του pH χρησιμοποιούμε το επιτραπέζιο pH-μετρο, όπου τοποθετούμε απευθείας το έμβολο στο δείγμα μας και καταγράφουμε την τιμή μας.

Μέτρηση ιξώδους

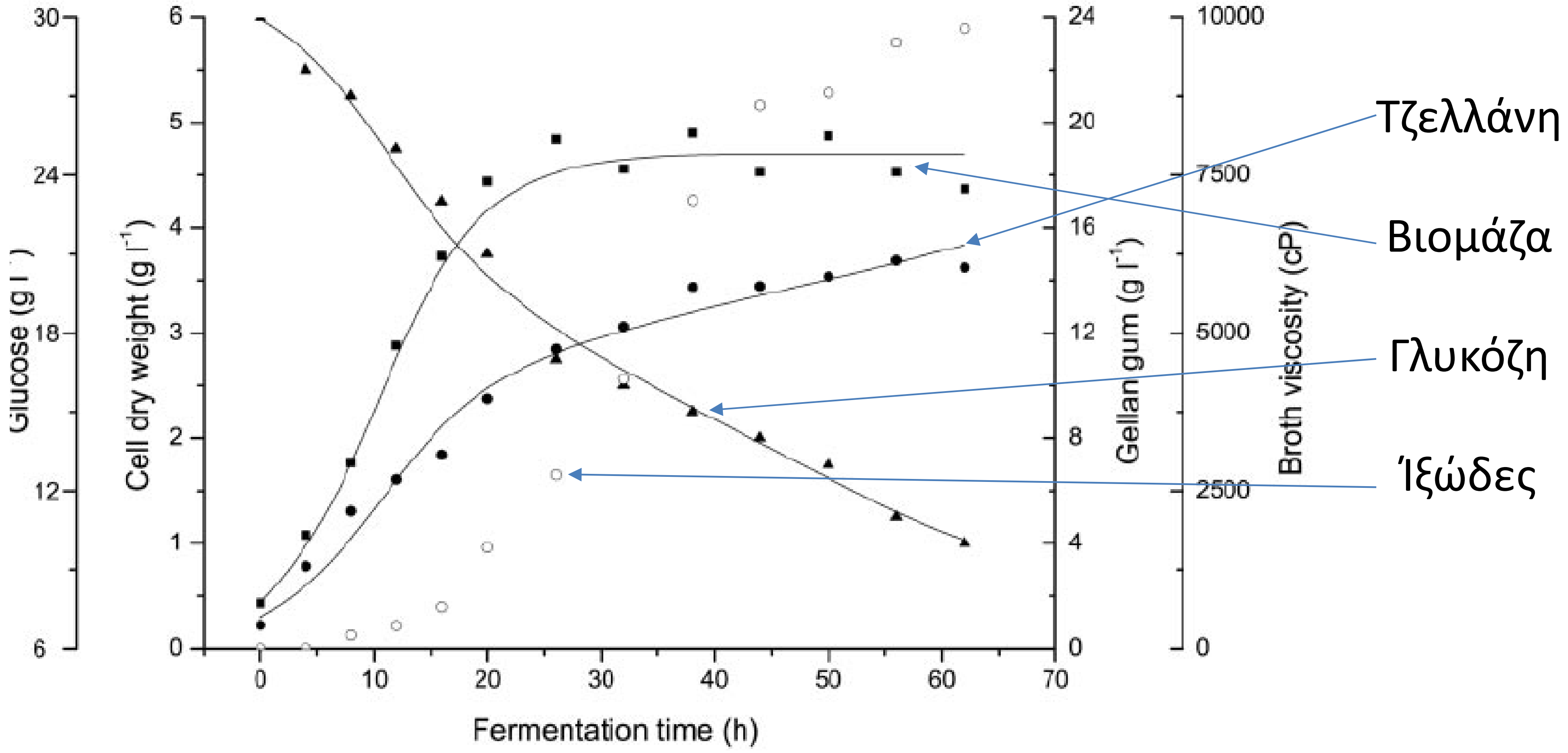
Η μέτρηση του ιξώδους γίνεται με περιστροφικό ιξωδόμετρο στα 200rpm (ρυθμός διάτμησης – shear rate), όπου σε συγκεκριμένη θερμοκρασία και με συγκεκριμένο περιστρεφόμενο ρότορα καταμετρούμε τα mPas.sec (μονάδες μέτρησης φαινομενικού ιξώδους).

Το δείγμα τοποθετείται σε σωλήνα falcon όπου πρέπει να υπερκαλύπτει τον ρότορα (τουλάχιστον 25ml δείγμα).

Όσο μεγαλύτερη είναι η ταχύτητα περιστροφής (ρυθμός διάτμησης) και η θερμοκρασία, τόσο χαμηλότερη τιμή ιξώδους θα έχουμε, άρα αυτές οι δύο παράμετορι πρέπει να είναι σταθεροί προκειμένου να κάνουμε σύγκριση του ιξώδους μεταξύ δειγμάτων.

Όσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση της τζελλάνης αλλά και το μοριακό της βάρος, τόσο μεγαλύτερη είναι το ιξώδες του υγρού ζύμωσης

Διάγραμμα παραγωγής τζελλάνης



Αποακετυλίωση δείγματος (προαιρετικά)

1. Θέρμανση του υγρού ζύμωσης στους 100 C x 15’ (π.χ. >20ml αρχικού δείγματος, ώστε να επαρκεί στη συνέχεια για την επεξεργασία δείγματα των 10ml εις διπλούν)
2. Πτώση θερμοκρασίας δείγματος στους 80-85°C
3. Προσθήκη 2M NaOH στο υγρό ζύμωσης μέχρι τιμής pH 10 και ανάδευση και παραμονή για 5 ‘ .
4. Ρύθμιση του pH στο 7 (εξουδετέρωση) με 2M HCl ή H_2SO4

Μέτρηση του συνολικού μικτού βάρους βιομάζας και τζελλάνης: (B-G)

1. Δειγματοληψία 10 ml αποακετυλιωμένου και θερμού υγρού ζύμωσης εις διπλούν (2x10ml)
2. Προσθήκη **διπλάσιου όγκου απόλυτης αιθανόλης** (100%), δηλαδή 20 ml αιθανόλης σε 10 ml δείγμα (ή 6ml αιθανόλης σε 3ml δείγμα)
3. Φυγοκέντρηση (4.500 rpm x 30’) και καταβύθιση βιομάζας και τζελλάνης
4. Συλλογή του υπερκείμενου διαλύματος για ανάλυση σακχάρων και άλλων διαλυτών συστατικών του υγρού ζύμωσης (προσοχή: σε αυτό το διάλυμα τα διαλυτά στερεά είναι αραιωμένα 1/3)
5. Ξήρανση του ιζήματος βιομάζας και τζελλάνης στους 105 C για >10h

Μέτρηση του βάρους βιομάζας: (Β)

1. Δειγματοληψία 10 ml υγρού ζύμωσης
2. Αραίωση με διπλάσιο όγκο απεσταγμένου νερού θερμοκρασίας ~60 C, δηλαδή προσθήκη 20 ml H_2O 10 ml υγρού ζύμωσης, ή 6ml H_20 σε 3ml υγρού ζύμωσης.
3. Φυγοκέντρηση (4.500 rpm x 30’) και καταβύθιση βιομάζας
4. Απόρριψη του υπερκείμενου υγρού (που περιέχει μεταξύ άλλων και το κύριο μέρος της τζελλάνης)
5. Εκ νέου προσθήκη (έκπλυση) 10 ή 30ml απεσταγμένου νερού στο ίζημα βιομάζας και φυγοκέντρηση (4.500 rpm x 30’)
6. Απόρριψη υπερκείμενου και ξήρανση ιζήματος στους 105°C για >10h

Παράδειγμα: Σε 20 ml δείγμα υγρού ζύμωσης έχουμε 0,3g ξηρή βιομάζα (Β). Άρα με τη μέθοδο των τριών, σε 1000ml έχουμε 15g (15g/l), ή 1,5% w/v συγκέντρωση βιομάζας.

Μέτρηση τζελλάνης (G)

Η τζελλάνη υπολογίζεται αν από το βάρος ή τη συγκέντρωση του μικτού βάρους βιομάζας- τζελλάνης (B-G) αφαιρέσουμε το βάρος (ή τη συγκέντρωση αντίστοιχα) της βιομάζας (B).

$$\mathbf{G = (B + G) - B}$$

Προσοχή: το βάρος βιομάζας και τζελλάνης του δείγματος των 10 ή 3ml που χρησιμοποιούμε πρέπει να αναχθεί σε συγκέντρωση (g/l) του αρχικού υποστρώματος ζύμωσης.

Ομοίως η συγκέντρωση σακχάρων στο υπερκείμενο υγρό που περιέχει αιθανόλη είναι αραιωμένη 1/3, και πρέπει να τριπλασιαστεί για να δώσει την πραγματική συγκέντρωση σακχάρων στο υγρό ζύμωσης.

Παράδειγμα: Σε 20 ml δείγμα υγρού ζύμωσης έχουμε 0,3g ξηρή βιομάζα (B) και 1,3 g ξηρό ίζημα βιομάζα+τζελλάνη (B+G). Άρα G= (1,3)-(0,3) = 1g σε 20ml, ή σε 1000ml 50g (50g/l), ή 5% w/v συγκέντρωση τζελλάνης.

Προσδιορισμός Σακχάρων με τη μέθοδο **Du Bois**

Γίνονται οι απαραίτητες αραιώσεις του υπερκείμενου υγρού σε σωλήνες Falcon. Στη συνέχεια σε δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετείται 0,5 ml φαινόλη 4% καθώς επίσης 0,5 ml δείγμα από τις αντίστοιχες αραιώσεις και 2,5 ml θειϊκό οξύ πυκνότητας 95%. Επιπλέον σε ένα άλλο δοκιμαστικό σωλήνα (μάρτυρας) τοποθετείται ομοίως 0,5 ml διαλύματος φαινόλης 4%, 0,5 ml απεσταγμένο νερό και 2,5 ml θειϊκό οξύ, για τον μηδενισμό του φασματοφωτόμετρου.

Έπειτα αναδεύονται στο vortex. Καθ' όλη την διάρκεια της παρασκευής των δοκιμαστικών σωλήνων ψύχονται με κρύο νερό. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες φασματοφωτομετρούνται στα 490nm. Τέλος, με βάση την πρότυπη καμπύλη και τις απορροφήσεις των γνωστών διαλυμάτων ,οι απορροφήσεις των δειγμάτων μετατρέπονται σε g/L.

Διάγραμμα πρότυπης καμπύλης γλυκόζης – μέθοδος Dubois

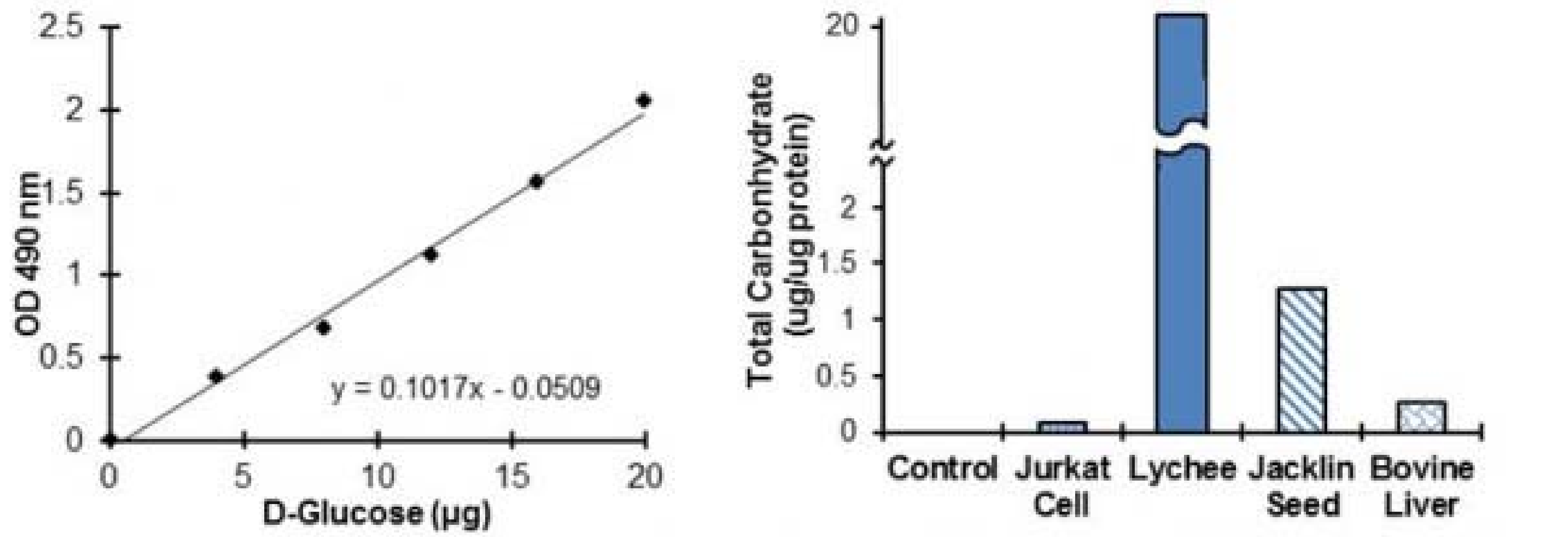


Figure. D-Glucose Standard Curve (a). Total carbohydrate concentration in jurkat cell lysate, lychee, jacklin seed & bovine liver respectively (b). Assays were performed following kit protocol.

Μετά την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης γλυκόζης και της δημιουργίας της εξίσωσης (y=ax+b), εφαρμόζουμε στην εξίσωση τις τιμές απορρόφησεις (y) που μετρούμε για κάθε άγνωστο δείγμα και λύνουμε ως προς τη συγκέντρωση γλυκόζης (x)

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Πρόγραμμα Σπουδών Τεχνολογίας Τροφίμων

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ

Βιοτεχνολογία Τροφίμων και Μικροβιακές Ζυμώσεις

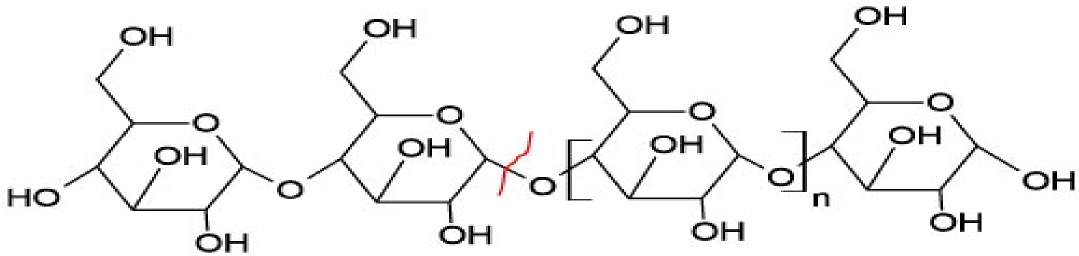
ΙΩΑΝΝΗΣ ΓΙΑΒΑΣΗΣ
Αναπληρωτής Καθηγητής
ΚΑΡΔΙΤΣΑ 2020

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ α-ΑΜΥΛΑΣΗΣ

α-αμυλάση: Ένζυμο που διασπά τους α(1-4) δεσμούς του αμύλου σε διάφορα σημεία και παράγει δεξτρίνες (ολιγομερή της γλυκόζης , πηκτικές ουσίες, φορείς ενθυλάκωσης)

Υπάρχει στο σάλιο μας και παράγεται από αρκετούς μικροοργανισμούς: Aspergillus oryzae, Bacillus amyloliquefaciens, B. licheniformis κλπ.

Χρησιμοποιείται για την παραγωγή δεξτρινών, γλυκόζης (σε συνδυασμό με β-αμυλάση, πουλουλανάση, κλπ), για τη διάσπαση αμυλούχων τροφών σε απορρυπαντικά κλπ.

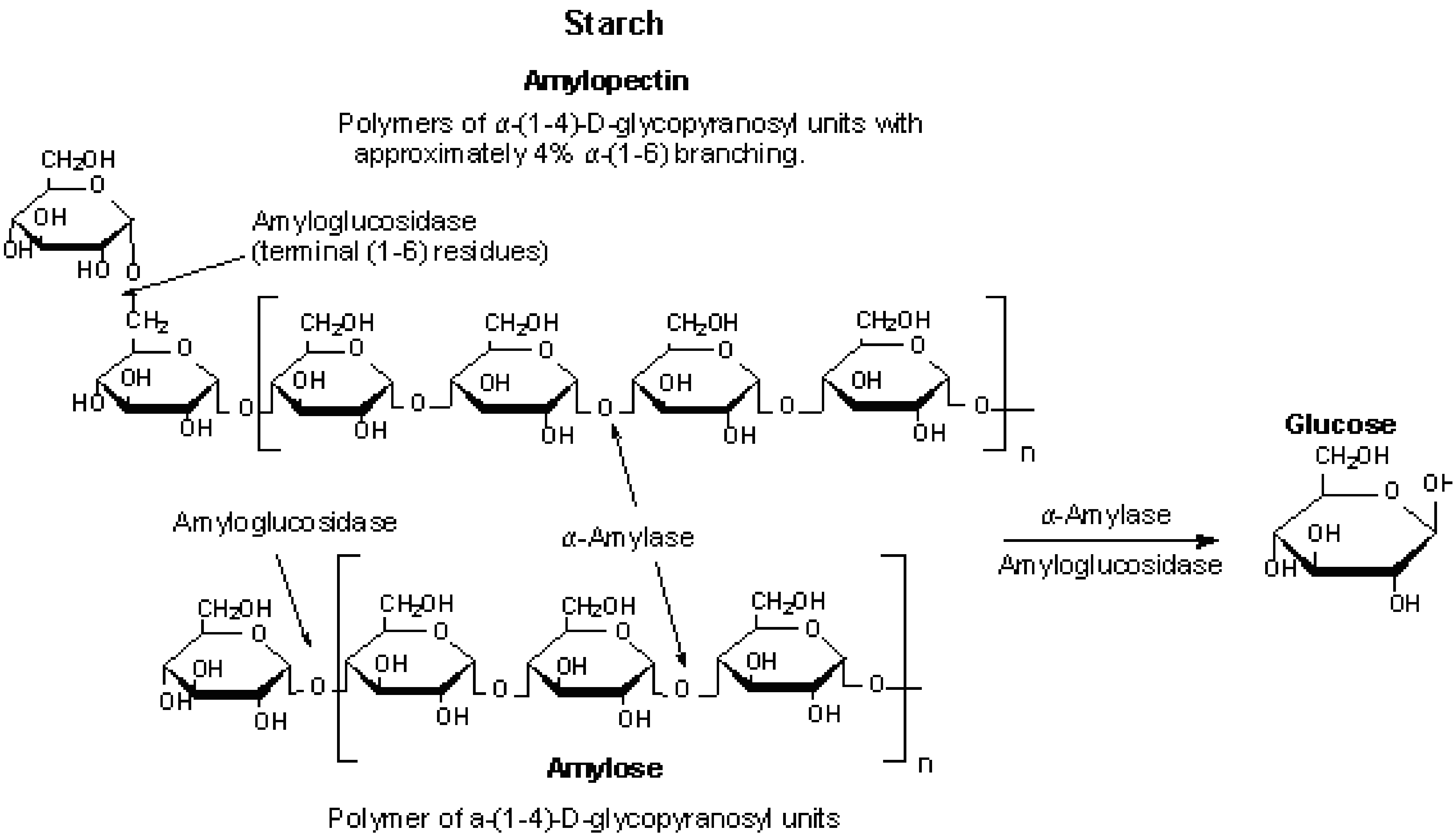


Δομή α- αμυλάσης

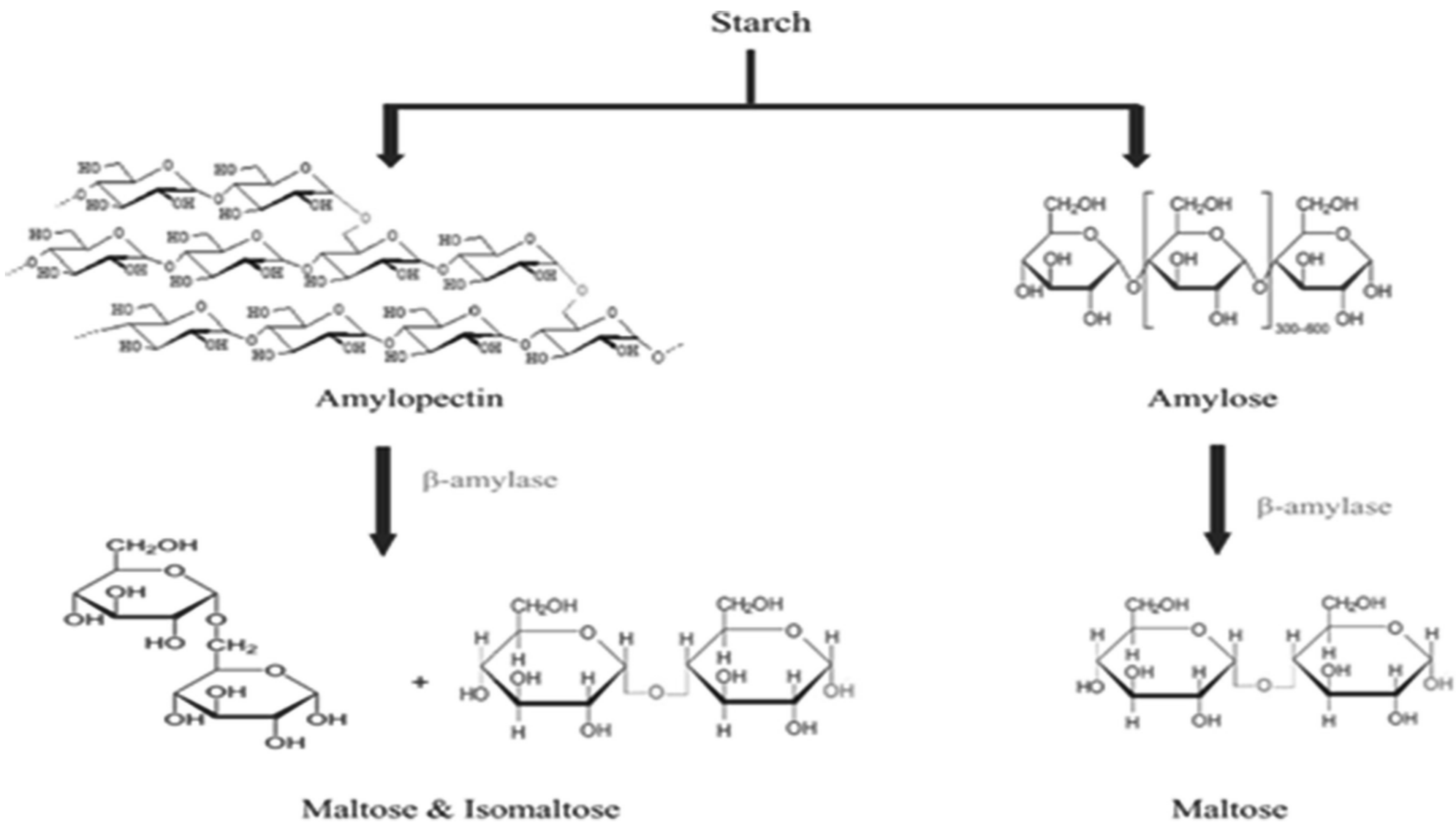
Για την εκτίμηση της δράσης των ενζύμων δεν είναι σημαντική μόνο η συγκέντρωσή τους σε ένα δείγμα/τρόφιμα, αλλά η ενεργότητα του ενζύμου. Γιατί αν τα ένζυμα (πρωτεΐνες) μετουσιωθούν παύουν να είναι δραστικά ασχέτως τη συγκέντρωσή τους.

Μετουσίωση ενζύμων μπορεί να γίνει με : Θέρμανση, οξίνηση (στο ισοηλεκτρικό σημείο), προσθήκη αλάτων.

Επίσης τα ένζυμα μπορεί να αλλοιωθούν κατά τη συντήρηση υπό ψύξη (ή και κατάψυξη) από πρωτεάσες (άλλα πρωτεολυτικά ένζυμα) αν υπάρχει υγρασία.



Μηχανισμός υδρόλυσης αμύλου από την α-αμυλάση



Μηχανισμός υδρόλυσης αμύλου από την β-αμυλάση

Διαδικασία μέτρησης ενεργότητας α-αμυλάσης

1. Παρασκευάζουμε 3 δ/τα αμυλάσης (διαφορετικής συγκέντρωσης) και ένα μάρτυρα (H_2O)
2. Παρασκευάζουμε δ/μα διαλυτού αμύλου 1%
3. Παρασκευάζουμε δ/μα 0,1M K_2HPO_4 (pH 7)
4. Σε δοκιμαστικούς σωλήνες βάζουμε: 0,5 ml δ/μα αμύλου 1%, 0,4 ml δ/μα 0,1M K_2HPO_4, 0,1 ml δείγμα (δ/μα αμυλάσης ή νερό)
5. Οι σωλήνες επωάζονται 85^oC για να δράσει η αμυλάση

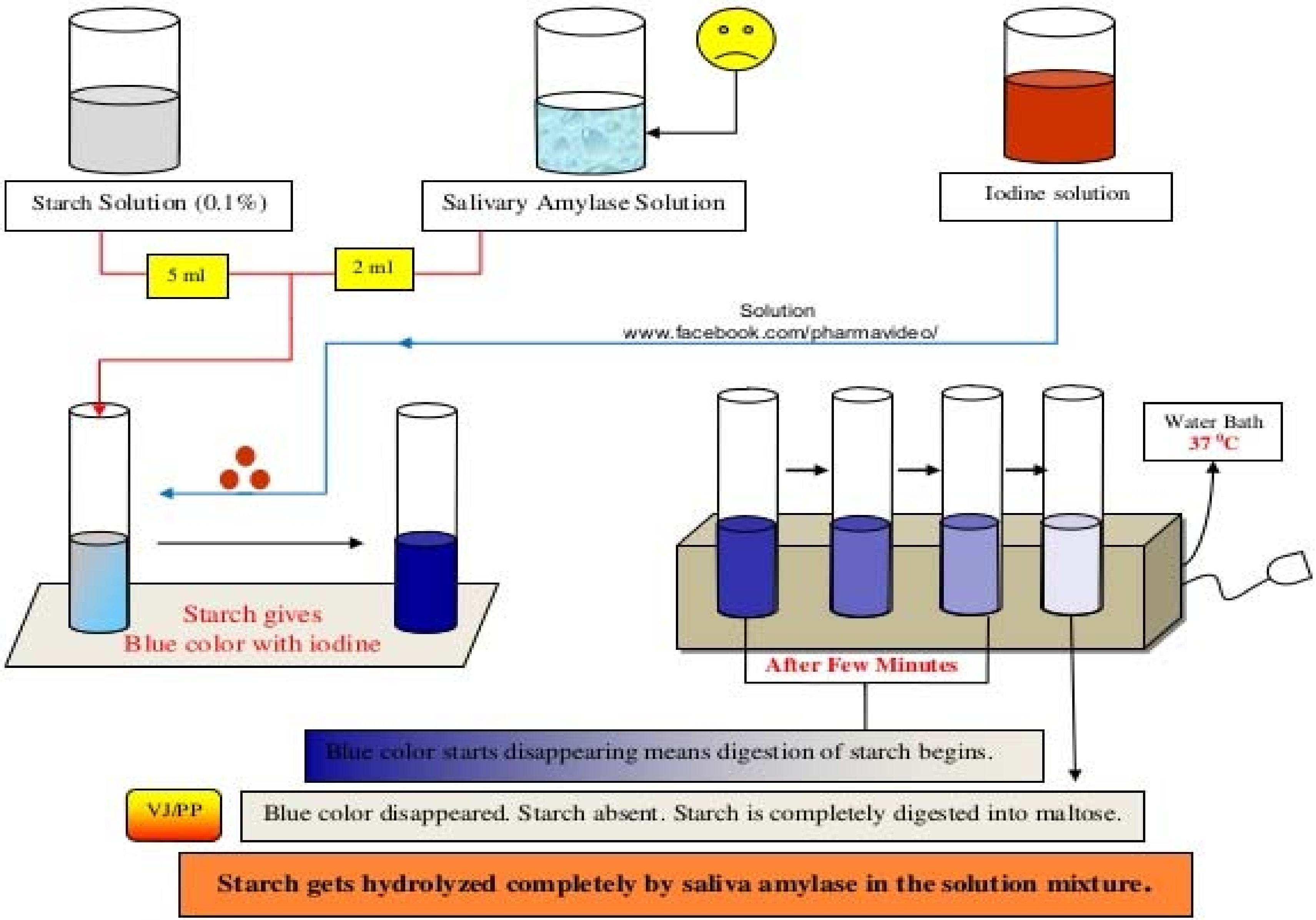
6. Εμβαπτίζονται σε νερό (ή ψυγείο) και προστίθενται 1ml HCL 1N (Σταματά η ενζυμική αντίδραση)
7. Προστίθενται 0,1 ml δ/τος ιωδίου (0,3% I_2, 3% KI)και συμπληρώνουμε με νερό ως τα 25 ml. (μπλέ χρωματισμός)
8. Μετράμε την απορρόφηση στα 620 nm εντός 1 ώρας.

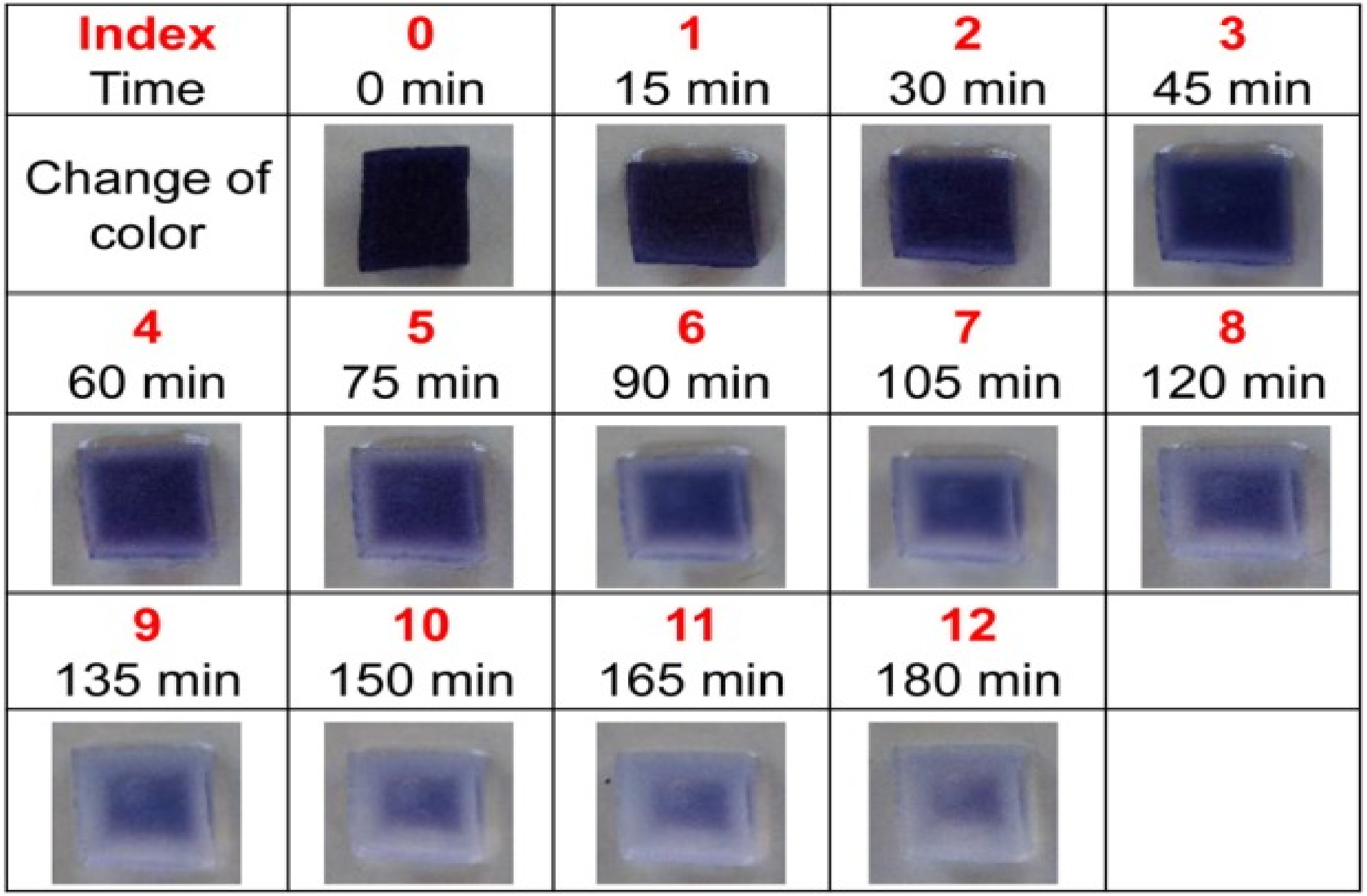
↑ ***απορρόφηση =*** ↑ ***συγκέντρωση αμύλου*** → ↓ ***ενζυμική ενεργότητα αμυλάσης***

9. Η ενζυμική ενεργότητα μετριέται σε units/ml όπου:

1 unit = *η ποσότητα ενζύμου που προκαλεί 10% μείωση στην απορρόφηση σε σχέση με την απορρόφηση του μάρτυρα.*

Activity of Salivary Amylase on Starch





Σταδιακή υδρόλυση του αμύλου από την α- αμυλάση

<u>Παράδειγμα 1.</u>

<u>Δεδομένα:</u> Έστω Απορρόφηση μάρτυρα: 0,800 και

Απορρόφηση **σε 0,1ml** άγνωστου δείγματος (αμυλάσης): A= 0,560

<u>Βήματα Υπολογισμού:</u>

- 1 unit= 10% μείωση = 0,080

- Μείωση Απορρόφηση δείγματος ΔΑ=0,800-0,560=0,240 → μείωση απορρόφησης σε σχέση με το μάρτυρα.

- Υπολογισμός ενεργότητας: 0,240/0,080= 3, άρα έχουμε **3 units/0,1ml ή 30 units/ml δείγματος**

<u>Παράδειγμα 2.</u>

<u>Δεδομένα:</u> Απορρόφηση μάρτυρα: 0,500 και

Απορρόφηση **σε 1ml** άγνωστου δείγματος (αμυλάσης): A= 0,200

<u>Βήματα Υπολογισμού:</u>

- 1 unit= 10% μείωση = 0,050

- Μείωση Απορρόφηση δείγματος ΔΑ=0,500-0,200=0,300 → μείωση απορρόφησης σε σχέση με το μάρτυρα.

- Υπολογισμός ενεργότητας: 0,300/0,050= 6, άρα έχουμε **6 units/ml δείγματος**.

<u>Παράδειγμα 3.</u>

<u>Δεδομένα:</u> Απορρόφηση μάρτυρα: 0,400 και

Απορρόφηση **σε 10 ml** άγνωστου δείγματος (αμυλάσης): A= 0,160

<u>Βήματα Υπολογισμού:</u>

- 1 unit= 10% μείωση =0,040

- Μείωση Απορρόφηση δείγματος ΔΑ= 0,400-0,160= 0,240 → μείωση απορρόφησης σε σχέση με το μάρτυρα.

- Υπολογισμός ενεργότητας: 0,240/0,040= 6 άρα έχουμε **6 units/10 ml δείγματος ή 0,6 units/ml**