



**ΤΕΙ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΩΝ ΑΣΚΗΣΕΩΝ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ
ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

Δρ.ΙΩΑΝΝΗΣ ΓΙΑΒΑΣΗΣ
Επίκουρος Καθηγητής

ΚΑΡΔΙΤΣΑ 2015

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΡΟΛΟΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΛΚΟΟΛΗΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΖΥΜΗ
SACCHAROMYCES CEREVISIAE

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ(SINGLE CELL
PROTEIN,SCP)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΙΤΡΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΑΠΟ ΤΟΝ ΜΥΚΗΤΑ
ASPERGILLUS NIGER

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΑΠΟ ΤΟΝ
LACTOBACILLUS CASEI

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΖΕΛΛΑΝΗΣ ΑΠΟ ΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ
SPHINGOMONAS RAUCIMOBILIS

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ Α-
ΑΜΥΛΑΣΗΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1:ΡΟΛΟΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

1. Εισαγωγή

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 (πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες, οργανικά οξέα, οργανικοί διαλύτες, βιταμίνες, χρωστικές, κλπ) χρειάζεται κάθε φορά να επιλέγεται ο καταλληλότερος μικροοργανισμός που μπορεί να παράγει την συγκεκριμένη ουσία εύκολα και γρήγορα (χρησιμοποιώντας κατά το δυνατόν φτηνά θρεπτικά υποστρώματα, ώστε να υπάρχει υψηλή απόδοση και παραγωγικότητα σε μια βιομηχανική ζύμωση και να είναι οικονομικά βιώσιμη η βιοδιεργασία αυτή).

Για τον ίδιο λόγο θέλουμε να χρησιμοποιούμε κάθε φορά και 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 (ή μπορεί μια επιμόλυνση να αναπτυχθεί αντί του επιθυμητού μικροοργανισμού). Συνεπώς είναι υψίστης σημασίας να καλλιεργούμε, να διατηρούμε και αν είναι δυνατόν να βελτιώνουμε (γενετικά ή με μεθόδους φυσικής επιλογής) καθαρές καλλιέργειες με υψηλή παραγωγικότητα.

Πριν την άνθιση της βιοτεχνολογίας, το εμβόλιο κυττάρων που χρησιμοποιούσαμε για το ξεκίνημα μιας ζύμωσης ήταν η φυσική χλωρίδα του ίδιου του προϊόντος, όπως στην περίπτωση παρασκευής του γιαουρτιού ή του ψωμιού. Τα τελευταία όμως χρόνια και με την ανάπτυξη της βιομηχανικής μικροβιολογίας απαιτούνται διαδικασίες τέτοιες ώστε τα διάφορα μεταβολικά προϊόντα που μας ενδιαφέρουν να λαμβάνονται κατά τρόπο συνεχή και υψηλές αποδόσεις. Χρειάστηκε λοιπόν να μελετήσουμε τα μέσα και τις τεχνικές για την απομόνωση την διατήρηση, καθώς και την βελτίωση των ιδιοτήτων μικροβιακών στελεχών, με τελικό σκοπό την αύξηση του δυναμικού τους και την παραγωγή μεταβολιτών (πρωτογενών και δευτερογενών) ή βιομάζας.

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.

2. Τρόποι απομόνωσης και επιλογής στελεχών

A. 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. Όμως ανεξάρτητα από την χρησιμοποιούμενη τεχνική σκοπός είναι η απομόνωση και επιλογή ενός μικροοργανισμού που θα είναι προικισμένος με μια ή περισσότερες ιδιότητες. Η διαδικασία απομόνωσης μικροβιακών στελεχών συνιστά μια μακρόχρονη διαδικασία.

Η μέθοδος του screening εφαρμόζεται σήμερα ευρέως για ένα μεγάλο σύνολο μικροβιακών αντιδράσεων. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή η απομόνωση και επιλογή γίνεται σε 3 φάσεις:

- Στην πρώτη φάση απομονώνονται από διάφορες φυσικές πηγές, όπως το χώμα, ο αέρας, τα τρόφιμα, τα απόβλητα κ.λπ. ένα σύνολο μικροβίων με ορισμένες γενικές ιδιότητες.
- Στην δεύτερη φάση και από τους παραπάνω μικροοργανισμούς απομονώνονται εκείνοι που έχουν την μεγαλύτερη δυνατότητα απόδοσης για το συγκεκριμένο βιομηχανικό προϊόν που μελετάται.
- Στην Τρίτη φάση και σε εργαστηριακό επίπεδο, γίνεται η αριστοποίηση της παραγωγής για το στέλεχος της φάσης 2 που παρουσίασε την μεγαλύτερη απόδοση.

Για παράδειγμα αν θέλουμε να απομονώσουμε ένα στέλεχος του γένους *Corynebacterium* που έχει την ικανότητα να παράγει το αμινοξύ Λυσίνη από σόγια, ακολουθείται η εξής διαδικασία:

Εμβολιάζεται αποστειρωμένο σογιάλευρο με χύμα, νερό αποβλήτων ή με κάποιο άλλο υλικό που περιέχει μεγάλο αριθμό μικροοργανισμών. Στη συνέχεια οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται σε αερόβιες συνθήκες και στην άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης των *Corynebacterium* π.χ. 26°C.

Η διαδικασία αυτή εφαρμόζεται σε μεγάλο αριθμό φιαλών που εμβολιάζονται με διαφορετικό αρχικό εμβολίασμα η κάθε μία. Από τις φιάλες εκείνες που θα παρουσιάσουν ταχεία ανάπτυξη, εμβολιάζονται νέες και στη συνέχεια απομονώνονται οι μικροοργανισμοί σε τρυβλία, στα οποία έχει ενσωματωθεί σόγια.

Κάθε καθαρή καλλιέργεια που απομονώνεται, ελέγχεται ως προς την ικανότητά της να παράγει Λυσίνη σε μικρούς ζυμωτές, όπου η σόγια θα αποτελεί το βασικό συστατικό του θρεπτικού υποστρώματος. Θα ακολουθήσει η σύγκριση των διαφόρων στελεχών. Η αριστοποίηση της παραγωγής θα γίνει με το στέλεχος εκείνο που παρουσίασε την μεγαλύτερη απόδοση.

β. Τράπεζες μικροβιακών στελεχών

Ταυτόχρονα με την ανάπτυξη της Βιομηχανικής Μικροβιολογίας άρχισε και η δημιουργία τραπεζών μικροοργανισμών σε πολλές χώρες. Οι τράπεζες αυτές διαφέρουν ως προς το μέγεθος των συλλογών και μερικές είναι αρκετά εξειδικευμένες ως προς το είδος των μικροοργανισμών που περιλαμβάνουν. Για παράδειγμα, τα βακτήρια και τα πρωτόζωα δεν υπάρχουν συνήθως στην ίδια συλλογή. Οι τράπεζες μικροοργανισμών αποτελούν έτσι, αυθεντικές πηγές καλλιέργειών για την έρευνα και παραγωγή προϊόντων με βιοτεχνολογική μεθοδολογία.

Οι τράπεζες μικροοργανισμών στέλνουν στους ενδιαφερόμενους καθαρές καλλιέργειες έναντι κάποιας αμοιβής για την ενίσχυση και λειτουργία της συλλογής καθώς και για το κόστος μεταφοράς. Για την παραγγελία κάποιου συγκεκριμένου στελέχους ενός μικροοργανισμού είναι απαραίτητο να γνωρίζουμε και τον κωδικό του αριθμό, που λαμβάνεται από τους καταλόγους των τραπεζών. Ο κωδικός αυτός, χαρακτηρίζει συνήθως διαφορετικές φυσιολογικές καταστάσεις μέσα στο ίδιο είδος. Για παράδειγμα, ο μικροοργανισμός *Aspergillus niger* ATC 13794 από την ικανότητα του να παράγει κίτρικό οξύ.

Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 1), αναφέρονται οι κυριότερες συλλογές μικροοργανισμών σε όλο τον κόσμο:

ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΧΩΡΑ	ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ
American Type Culture Collection (ATCC)	Η.Π.Α	Βακτήρια, Μύκητες, Άλγη, Φάγοι
Central Bureau voor Schimmelcultuur (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

3. Τρόποι συντήρησης μικροβιακών στελεχών

Η διατήρηση της σταθερής απόδοσης κατά την παραγωγή ενός προϊόντος αποτελεί μία απαραίτητη προϋπόθεση της βιοτεχνολογίας. Τα μικροβιακά στελέχη πρέπει λοιπόν να διατηρούνται σε αυστηρά καθορισμένες συνθήκες. Πράγματι, κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής τους οι μικροοργανισμοί χάνουν μερικές από τις μεταβολικές τους λειτουργίες. Για παράδειγμα αναφέρθηκε ότι κάποιο στέλεχος του μικροοργανισμού *Streptomyces griseus* που παράγει στρεπτομυκίνη, έχασε αυτή την ικανότητά του έπειτα από 58 συνεχείς ανακαλλιέργειες σε κάποιο συγκεκριμένο στερεό θρεπτικό υλικό.

Οι τεχνικές που επιτρέπουν τη διατήρηση των μεταβολικών ιδιοτήτων των μικροοργανισμών είναι πολλές. Η βασική αρχή αυτών των τεχνικών είναι η διατήρηση των μικροοργανισμών σε συνθήκες όπου η μεταβολική τους δραστηριότητα να είναι ελάχιστη. Σ' ένα τέτοιο σύστημα, η πιθανότητα μεταλλάξεων λόγω έντονου πολλαπλασιασμού είναι σχετικά περιορισμένη.

Οι σπουδαιότερες από τις τεχνικές 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 ζυμό.

Η φύλαξη γίνεται συνήθως στους 4°C έως 8°C. Για την αποφυγή αφυδάτωσης είναι σκόπιμο να καλύπτονται οι καλλιέργειες με αποστειρωμένο παραφινέλαιο ή να κλείνονται καλά με ελαστικό με ελαστικά πώματα, φελλούς ή με βαμβάκι.

Με τη ψύξη ελαττώνεται ο ρυθμός ανάπτυξης των μικροοργανισμών, ελαχιστοποιούνται οι αλλαγές στο pH και στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό (REDOX).

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. Για παράδειγμα, ένας μικροοργανισμός που έχει επιλεγεί να παράγει υψηλές ποσότητες ενός αμινοξέος μπορεί με τις συνεχείς μεταφορές να χάσει σταδιακά την ικανότητά του να παράγει το αμινοξύ παρ' όλο που συνεχίζεται η πολλαπλασιαστική του ικανότητα. Μπορεί μάλιστα και η πολλαπλασιαστική του ικανότητα να αυξηθεί την ίδια στιγμή που χάνει την ικανότητα του για παραγωγή αυτού του αμινοξέος.

Άλλο μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι απαιτεί μεγάλο αριθμό θρεπτικών υλικών για τις ανακαλλιέργειες ιδίως για μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται δύσκολα.

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 έως 10 °C. Σ' αυτές τις θερμοκρασίες, η ικανότητα ανάπτυξης παρατείνεται για ακόμα μεγαλύτερα διαστήματα. Έχει αποδειχθεί ότι λυοφυλιωμένες καλλιέργειες που διατηρήθηκαν επί 11 μήνες

στους 4°C έχασαν την ικανότητα ανάπτυξης τους κατά 50% περίπου, ενώ αυτές που διατηρήθηκαν στους 22°C έχασαν αυτήν την ικανότητα κατά 99%.

Στις συνθήκες λυοφυλίωσης οι μικροοργανισμοί αποκτούν μερικά από τα χαρακτηριστικά των βακτηριακών σπορίων, δηλαδή γίνονται περισσότερο ανθεκτικοί σε ακραία όρια θερμοκρασίας και ενεργότητας νερού (A_w) καθώς και στην επίδραση ακτινοβολιών.

Ενώ με τη μέθοδο λυοφυλίωσης διατηρούνται πολλά από τα φυσιολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των βακτηριακών σπορίων, δηλαδή γίνονται περισσότερο ανθεκτικοί σε ακραία όρια θερμοκρασίας και ενεργότητας νερού καθώς και στην επίδραση ακτινοβολιών.

Ενώ με τη μέθοδο της λυοφυλίωσης διατηρούνται πολλά από τα φυσιολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των μικροοργανισμών, δεν ισχύει το ίδιο και για την βιωσιμότητά τους. Το μεγαλύτερο μέρος των κυττάρων, μετά από κάποιο χρονικό διάστημα, χάνει την ικανότητά τους για διπλασιασμό.

Για τη βελτίωση της τεχνικής της λυοφυλίωσης έχει πραγματοποιηθεί ένας μεγάλος αριθμός ερευνητικών εργασιών με ενθαρρυντικά αποτελέσματα.

γ. Διατήρηση με ψύξη

Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, οι καλλιέργειες διατηρούνται σε ψυγεία που μπορούν να κατεβάσουν τη θερμοκρασία μέχρι και -75°C. Μια μέθοδος ψύξης που εφαρμόζεται και έχει ορισμένα πλεονεκτήματα σε σχέση με τη λυοφυλίωση είναι η διατήρηση με ψύξη 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 βιωσιμότητά τους για μεγάλο χρονικό διάστημα με ψύξη σε υγρό άζωτο. Για παράδειγμα, καλλιέργειες μυκήτων διατηρούνται στη ζωή και χωρίς καμία αλλαγή τουλάχιστον για 5 χρόνια σε υγρό άζωτο.

A) Απομόνωση καθαρών αποικιών και παραγωγή stock culture:

Τρόφιμο → αραίωση δείγματος και ενσωμάτωση/επίστρωση σε τρυβλία → καλλιέργεια 1 καθαρής αποικίας σε broth → ανακαλλιέργεια σε τρυβλία ή σε πλάγιο άγαρ (stock culture) → επιλογή 1 καθαρής αποικίας για εμβολιασμό σε κωνική φιάλη → ανάπτυξη εμβολίου → εμβολιασμός βιοαντιδραστήρα

B) Ενυδάτωση – αναζωογόνηση λυοφυλιωμένων καθαρών καλλιεργειών:

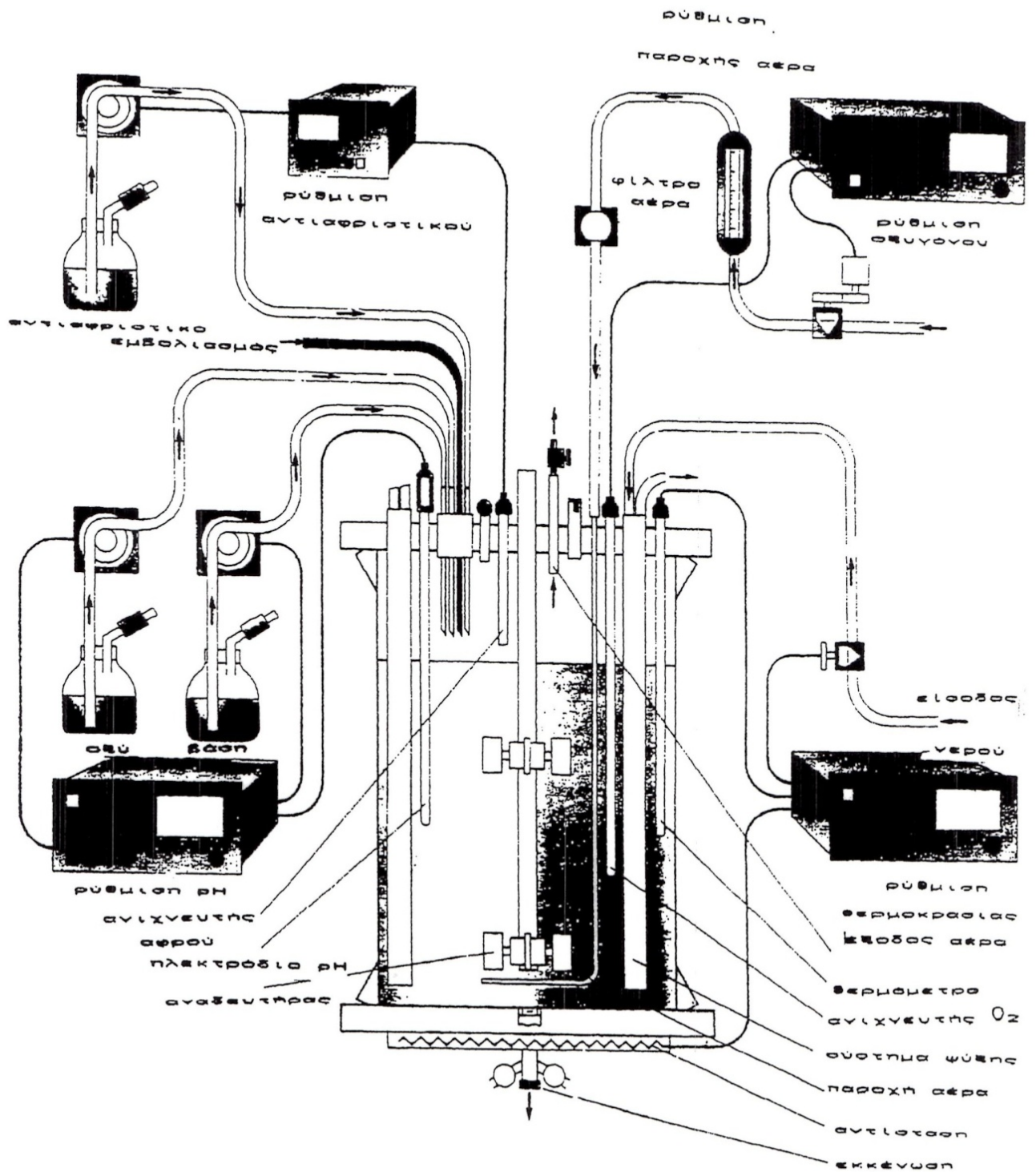
Λυοφυλιωμένη καλλιέργεια → προσθήκη υγρού θρεπτικού υλικού → επώαση λίγες ώρες → steak σε άγαρ και παραγωγή stock culture

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

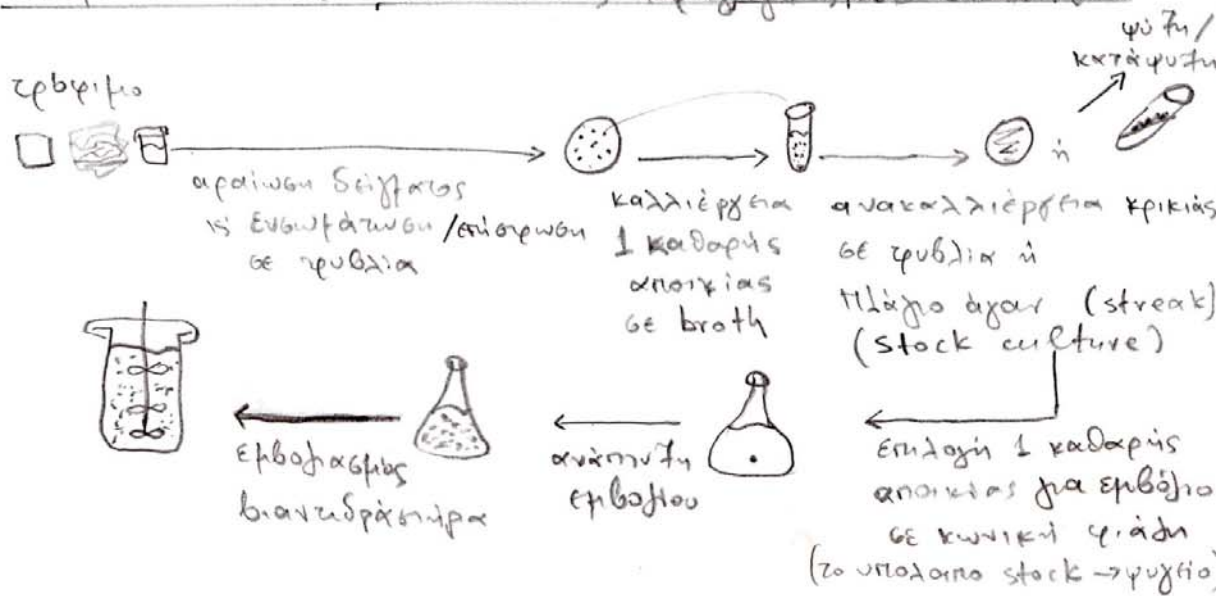
Τρυβλίο με καθαρή αποικία → εμβολιασμός υγρού υποστρώματος σε 10ml σε δοκιμαστικό σωλήνα → εμβολιασμός υγρού θρεπτικού υποστρώματος 100-500ml σε κωνική φιάλη εμβολίου → εμβολιασμός ενδιάμεσου Ζυμωτήρα εμβολιασμού 1-100 lt → εμβολιασμός Ζυμωτήρας παραγωγής 1-10 ton → Κυρίως ζύμωση (παραγωγή προϊόντος → Αποστείρωση υγρού ζύμωσης (και κυττάρων) → Απομάκρυνση κυττάρων με φυγοκέντρηση/διήθηση → καθαρισμός προϊόντος με μεθόδους χρωματογραφίας/απόσταξης/καθίζησης/διήθησης/κλπ (ανάλογα με το προϊόν) → ξήρανση καθαρού προϊόντος με εκνέφωση με ατμό ή λυοφιλίωση (Βλ. παρακάτω σχήματα).

ΣΧΗΜΑ 2

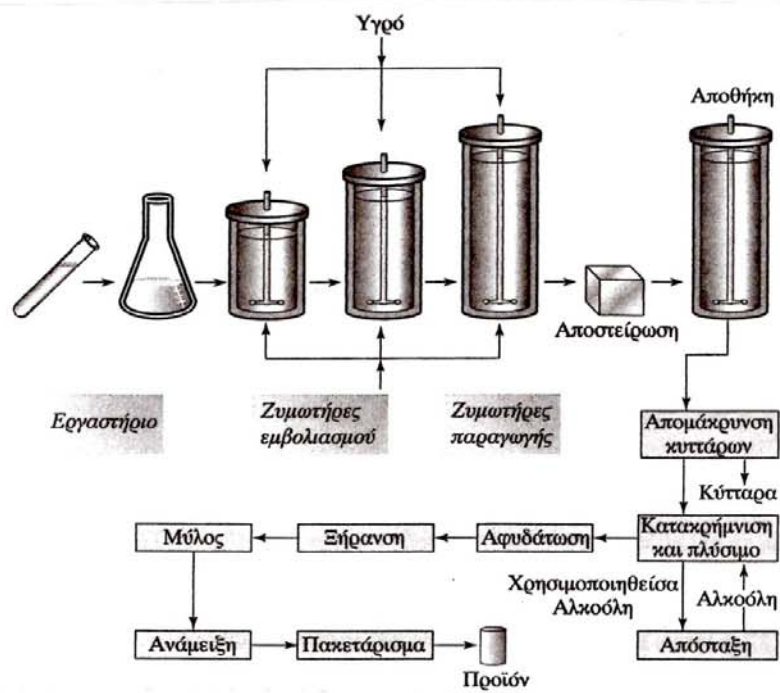
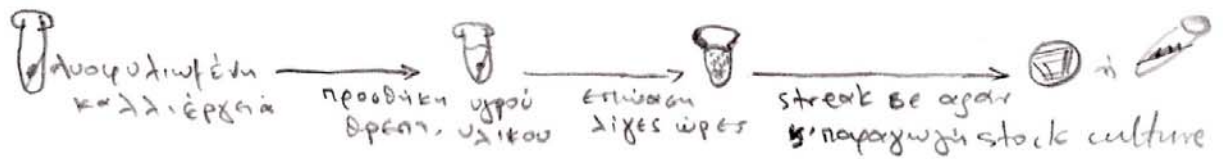
Λειτουργία του Βιοαντιδραστήρα



Α) Απομόνωση καθαρών αποικιών ή παραγωγή stock culture



Β) Ενυδάτωση - αναζωογόνηση λυοφυλιωμένων καθαρών καλλιεργειών



Σχ. 14.3. Σχεδιασμός μονάδας παραγωγής μικροβιακών πολυσακχαριτών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΛΚΟΟΛΗΣ

2.1. Εισαγωγή

Η αλκοόλη (αιθανόλη, αιθυλική αλκοόλη, οινόπνευμα, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), άρχισε να χρησιμοποιείται τον 7ο αιώνα. Μετά τη χρησιμοποίηση της μεθόδου της απόσταξης (μεταξύ 10ου και 11ου αιώνα) η αλκοόλη παρασκευάζεται σε καθαρή μορφή. Στη χώρα μας η παραγωγή της καθαρής αλκοόλης με απόσταξη άρχισε από το 1870. Η αλκοόλη παρασκευάζεται με χημικές ή βιοτεχνολογικές μεθόδους. Τα τελευταία χρόνια, η παραγωγή της αλκοόλης από μικροοργανισμούς μελετήθηκε σαν εναλλακτικό καύσιμο. Ήδη στη Βραζιλία, στην Αμερική και σε πολλές χώρες της Ευρώπης που η αλκοόλη παράγεται με τη χρησιμοποίηση των μικροοργανισμών προτιμάται σε μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με τη συνθετική.

Οι κυριότεροι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή της αλκοόλης είναι οι ζύμες *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces fragilis*, *K. marxianus* και το βακτήριο *Zymomonas mobilis*.

Τα υποστρώματα που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή της αλκοόλης είναι τα συνθετικά υποστρώματα (γλυκόζη ή σακχαρόζη και θρεπτικά συστατικά), 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, η κυτταρίνη του ξύλου, τα θειώδη απόβλητα των χαρτοποιιών, τα υποπροϊόντα των γεωργικών βιομηχανιών και τα απόβλητα των ζυθοποιιών. 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*) και η συνεχής ζύμωση (*continuous culture*). Η ζύμωση της σακχαρόζης σε αλκοόλη από τον *S. cerevisiae* γίνεται αναεροβίως με μια σειρά ενζύμων που παράγει η ζύμη όπου το ενζυμο ιμπερτάση μετατρέπει τη σακχαρόζη σε γλυκόζη και φρουκτόζη και στη συνέχεια η γλυκόζη μέσω της γλυκολιτικής οδού (EMP οδού) μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό οξύ που αποκαρβοξυλώνεται σε ακεταλδεύδη από το ένζυμο πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση που έχει σαν συνένζυμο την πυροφοσφορική θειαμίνη. Στη συνέχεια η ακεταλδεύδη

ανάγεται σε αλκοόλη από το ένζυμο αλκοολική δεϋδρογονάση με συνένζυμο το NADH₂.

Η αλκοόλη χρησιμοποιείται σαν διαλυτικό μέσο και σαν πρόσθετο για την παρασκευή διαφόρων οινοπνευματωδών ποτών, αρωμάτων κλπ. σήμερα η αλκοόλη σε πολλές χώρες (κυρίως στην Βραζιλία) χρησιμοποιείται σαν καύσιμο των αυτοκινήτων κι σαν πρόσθετα στα αμόλυβδα καύσιμα λόγω της σημαντικής αύξησης του αριθμού των οκτανίων. Στη χώρα μας η ετήσια παραγωγή αλκοόλης ανέρχεται στους 4.000 τόνους και χρησιμοποιείται για εσωτερική κατανάλωση.

2.2.Παραγωγή

Το υπόστρωμα που θα χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή της αλκοόλης είναι διάλυμα μελάσσας (χωρίς αποστείρωση) και ο μικροοργανισμός η ζύμη αρτοποιίας (*Saccharomyces cerevisiae*). Η μελάσσα αραιώνεται με αποσταγμένο νερό ώστε να περιέχει 15% (w/v) σάκχαρα (27g μελάσσα αναμιγνύονται με 85 ml αποσταγμένο νερό) και το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 4,5 με 1N H₂SO₄. Οι μέθοδοι που θα χρησιμοποιηθούν είναι η στατική ζύμωση σε κωνικές φιάλες των 500 ml με ελεύθερα και ακινητοποιημένα κύτταρα, η ζύμωση βυθού σε κωνικές φιάλες των 500 ml σε παλινδρομητή ανακίνησης με ελεύθερα και ακινητοποιημένα κύτταρα, η ζύμωση βυθού σε ζυμωτήρα αναδεύσεως με ελεύθερα κύτταρα, η ασυνεχής ζύμωση βυθού με συνεχή προσθήκη υποστρώματος σε ζυμωτήρα αναδεύσεως με ελεύθερα κύτταρα και η συνεχής ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα στήλης με ακινητοποιημένα κύτταρα.

Σχηματισμός ακινητοποιημένων κυττάρων

Ζυγίζονται 0.5 g ζύμης αρτοποιίας και αναμιγνύονται με 15 ml αποσταγμένο αποστειρωμένο νερό. Το αιώρημα των κυττάρων προστίθεται σε 10 ml αποστειρωμένου διαλύματος αλγινικού νατρίου 5% (w/v) (Sigma A-2033). 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 της ζύμης. Τα σφαιρίδια παραμένουν στο διάλυμα CaCl₂ για 2 ώρες και στη συνέχεια ξεπλένονται 2-3 φορές με φυσιολογικό ορό (0,7 NaCl). Τα σφαιρίδια

βάρους 25 g διατηρούνται σε φυσιολογικό ορό στο ψυγείο μέχρις ότου χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή της αλκοόλης. Στην περίπτωση της παραγωγής της αλκοόλης αποσταγμένο αποστειρωμένο νερό και το αιώρημα των κυττάρων προστίθεται σε 300 ml αποστειρωμένου διαλύματος αλγινικού νατρίου 5% (w/v). Το μείγμα προστίθεται υπό μορφή σταγόνων με μία περισταλτική αντλία (το λάστιχο σιλικόνης έχει εσωτερική διάμετρο 3 mm) σε 2 ml αποστειρωμένου διαλύματος CaCl_2 2 % όπου σχηματίζονται σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου διαμέτρου 2-3 mm. Στη συνέχεια τα σφαιρίδια κατεργάζονται όπως παραπάνω.

Παραγωγή αλκοόλης με στατική ζύμωση και ζύμωση βυθού σε κωνικές φιάλες

Σε 16 κωνικές φιάλες των 500 ml (αποστειρώνονται στους 121°C για 15 λεπτά) τοποθετούνται 100 ml διαλύματος μελάσσας (αρχικά σάκχαρο 15%, pH 4,5) και εμβολιάζονται οι 8 φιάλες με 0,3 g ζύμης αρτοποιίας, ενώ στις άλλες 8 τοποθετούνται 25 g σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου. Τέσσερις φιάλες με ελεύθερα κύτταρα και με 4 ακινητοποιημένα κύτταρα τοποθετούνται σε κλίβανο επώασης θερμοκρασίας 30°C , ενώ οι υπόλοιπες φιάλες επωάζονται σε παλινδρομητή ανακίνησης (200 rpm) στους 30°C . Κάθε 12, 24, 36 και 48 ώρες απομακρύνεται και μια φιάλη από κάθε περίπτωση και προσδιορίζονται η βιομάζα, η συγκέντρωση της αλκοόλης και η συγκέντρωση των σακχάρων που δεν ζυμώθηκαν.

Παραγωγή αλκοόλης με ασυνεχή ζύμωση βυθού σε ζυμωτήρα αναδεύσεως

Ο ζυμωτήρας αναδεύσεως είναι χωρητικότητας 9 l και αποστειρώνεται στους 121°C για 15 λεπτά. Στο ζυμωτήρα προστίθενται 6 l διάλυμα μελάσσας (15% σάκχαρο, pH 4,5) που εμβολιάζονται με 100 g ζύμη αρτοποιίας. Η ταχύτητα ανάδευσης του υποστρώματος είναι 500 rpm και η ζύμωση γίνεται χωρίς τη διοχέτευση αέρα στο ζυμωτήρα. Σε τακτικά χρονικά διαστήματα (6, 12, 18 και 24 ώρες) απομακρύνονται από το ζυμωτήρα 100 ml υγρό της ζύμωσης που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των κινητικών παραμέτρων.

Παραγωγή αλκοόλης με ασυνεχή ζύμωση βυθού με συνεχή προσθήκη υποστρώματος

Εκατό g ζύμης αρτοποιίας αναμιγνύονται με 2 l αποσταγμένο νερό και το αιώρημα των κυττάρων προστίθεται στο ζυμωτήρα. Η ταχύτητα του αναδευτήρα είναι 500 rpm και δεν διοχετεύεται αέρας στο ζυμωτήρα. Το διάλυμα της μελάσσας (20% σάκχαρα, pH 4,5) προστίθεται στο ζυμωτήρα με μια περισταλτική αντλία μέχρι 6 l με ρυθμό αραίωσης $D=0,027, 0,037, 0,055$ και $0,111 \text{ h}^{-1}$ (χρόνος πλήρωσης ζυμωτήρα 24, 18, 12 και 6 ώρες αντίστοιχα). Ο ρυθμός αραίωσης δίνεται από τη σχέση $D=F/V_0 + Ft$ η παροχή του υποστρώματος στο ζυμωτήρα σε ml/h, V_0 αρχικός όγκος του υποστρώματος σε ml και t ο χρόνος πλήρωσης του ζυμωτήρα. Ο προσδιορισμός της βιομάζας της αλκοόλης και των σακχάρων γίνεται όταν ο ζυμωτήρας πληρωθεί με υπόστρωμα.

Παραγωγή αλκοόλης με συνεχή ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα στήλης

Ο βιοαντιδραστήρας στήλης αποτελείται από γυάλινη στήλη με εσωτερική διάμετρο 4,5 cm και ύψος 40 cm. Η στήλη αποστειρώνεται στους 121°C για 15 min και πληρούται με 450 g από σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου. Η στήλη τοποθετείται σε θάλαμο ελεγχόμενης θερμοκρασίας (30°C) και το διάλυμα της μελάσσας (σάκχαρα 15%, pH 4,5) διοχετεύεται με μία περισταλτική αντλία από τη βάση της στήλης και το υγρό της ζύμωσης εξέρχεται από την κορυφή. Το υπόστρωμα διοχετεύεται στη στήλη με ρυθμό αραίωσης $D=0,1, 0,2, 0,3, 0,4$ και $0,5 \text{ h}^{-1}$. Ο ρυθμός αραίωσης δίνεται από τη σχέση $D=F/V$ όπου F η παροχή του υποστρώματος σε ml/h και V ο συνολικός της στήλης σε ml. Ο χρόνος συγκράτησης του υποστρώματος μέσα στο βιοαντιδραστήρα δίνεται από τη σχέση $RT=1/D$. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της αλκοόλης και των σακχάρων γίνεται μετά από τρεις χρόνους συγκράτησης του υποστρώματος στη στήλη για κάθε ρυθμό αραίωσης.

2.3.Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων

Προσδιορισμός βιομάζας

Στην περίπτωση των ελεύθερων κυττάρων, 1 ml δείγματος αραιώνεται σε διάλυμα πεπτόνης 0,1 % (w/v) ώστε να σχηματιστούν οι αραιώσεις 10^{-6} ,

10^{-7} και 10^{-8} κύτταρα/ml. Από τις παραπάνω αραιώσεις λαμβάνονται 0,1 ml υγρού και μεταφέρονται σε αποστειρωμένα τρυβλία που περιέχουν MYGP agar pH 5,0 (γλυκόζη 2%, εκχύλισμα βύνης 0,5%, εκχύλισμα ζύμης 0,5 %, πεπτόνη 0,55 και άγαρ 2%). Το υπόστρωμα εμβολιάζεται με τη μέθοδο της επιφανειακής επίστρωσης και τα τρυβλία επωάζονται στους 30° C για 48 ώρες. Ο αριθμός των αποικιών που σχηματίζεται πολλαπλασιάζεται επί το αντίστροφο της αραιώσης και το αποτέλεσμα εκφράζεται σε κύτταρα/ml υποστρώματος. Στην περίπτωση των ακινητοποιημένων κυττάρων, 5 σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου ζυγίζονται και διαλύονται σε 10 ml διαλύματος κιτρικού νατρίου 0,3M και pH 5,0(το pH ρυθμίζεται με την προσθήκη 1M κιτρικού οξέος). Τα σφαιρίδια διαλύονται με συνεχή ανάδευση του διαλύματος σε μαγνητικό αναδευτήρα για 20 λεπτά. Τα κύτταρα που ελευθερώνονται από το αλγινικό ασβέστιο προσδιορίζονται όπως περιγράφεται παραπάνω. Το αποτέλεσμα εκφράζεται σε κύτταρα/g σφαιριδίων αλγινικού ασβεστίου.

Προσδιορισμός αλκοόλης

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της αλκοόλης είναι η απόσταξη, η χημική μέθοδος και η ενζυμική μέθοδος.

Απόσταξη

Ενενήντα πέντε ml δείγματος τοποθετούνται σε σωλήνες φυγόκεντρου και το υγρό ζύμωσης φυγοκεντρείται στα 10.000 x g για 20 λεπτά. Το υπερκείμενο υγρό χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της αλκοόλης και των σακχάρων. (Στην περίπτωση των ακινητοποιημένων κυττάρων το υγρό της ζύμωσης δεν φυγοκεντρείται). Ενενήντα ml του υπερκείμενου υγρού αναμιγνύονται με 160 ml αποσταγμένο νερό και το υγρό αποστάζει στη συσκευή Salleron ώσπου να συγκεντρωθούν 170 ml απόσταγμα στην κωνική φιάλη των 200 ml. Στη συνέχεια η φιάλη συμπληρούται μέχρι τη χαραγή με αποσταγμένο νερό και τοποθετείται στο ψυγείο ώσπου το υγρό να ψυχθεί στους 15° C. Το υγρό μεταφέρεται σε ογκομετρικό κύλινδρο των 250 ml και η αλκοόλη προσδιορίζεται με το αλκοολόμετρο (Dujardin-Salleron, France) που δίνει την περιεκτικότητα της αλκοόλης (ml αλκοόλης /100 ml αποστάγματος). Η συγκέντρωση της αλκοόλης στο υπόστρωμα προσδιορίζεται από τη σχέση $P=17,3 \cdot \alpha$ όπου P η συγκέντρωση της αλκοόλης σε g/l και α η ένδειξη του αλκοολομέτρου.

Προσδιορισμός σακχάρων

Ο προσδιορισμός των σακχάρων γίνεται σύμφωνα με τη μέθοδο του Miller (1959).

Αντιδραστήρια

- (1) Διάλυμα 3,5 – δινιτροσαλικυλικού οξέως (3,5 – dinitrosalicylic acid, DNS).

Σε μία ογκομετρική φιάλη των 100 ml προστίθενται 1 g 3,5-δινιτροσαλικυλικό οξύ, 0,2 g φαινόλη, 0,05 g Na_2SO_3 και 1g NaOH . Η φιάλη πληρούται μέχρι τη χαραγή με αποσταγμένο νερό.

- (2) Διάλυμα τρυγικού καλιο-νατρίου ή άλας του Rochelle (potassium sodium tartrate ή Rochelle salt, PST) 40%. Σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml ζυγίζονται 40 g PST και η φιάλη συμπληρούται μέχρι τη χαραγή με αποσταγμένο νερό.

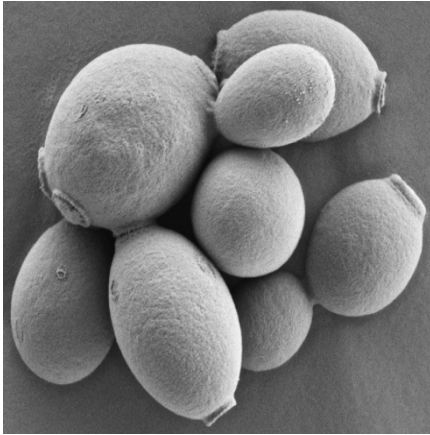
Προσδιορισμός

Σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται 3 ml κατάλληλου αραιωθέντος δείγματος και 3 ml αντιδραστηρίου DSN. Σε ένα άλλο δοκιμαστικό σωλήνα που χρησιμοποιείται σαν μάρτυρας προστίθενται 3 ml αποσταγμένο νερό και 3ml αντιδραστηρίου DSN. Οι σωλήνες τοποθετούνται σε βραστό νερό (100°C) για 5 λεπτά και αμέσως μετά προστίθενται στον κάθε σωλήνα 1 ml διαλύματος PST 40% και οι σωλήνες παραμένουν στο βραστό νερό για άλλα 10 λεπτά. Στη συνέχεια οι σωλήνες ψύχονται σε νερό της βρύσης για 1 λεπτό και μετρείται η απορρόφηση του δείγματος στα 575nm ρυθμίζοντας πρώτα το όργανο στο μηδέν της κλίμακας με τον μάρτυρα.

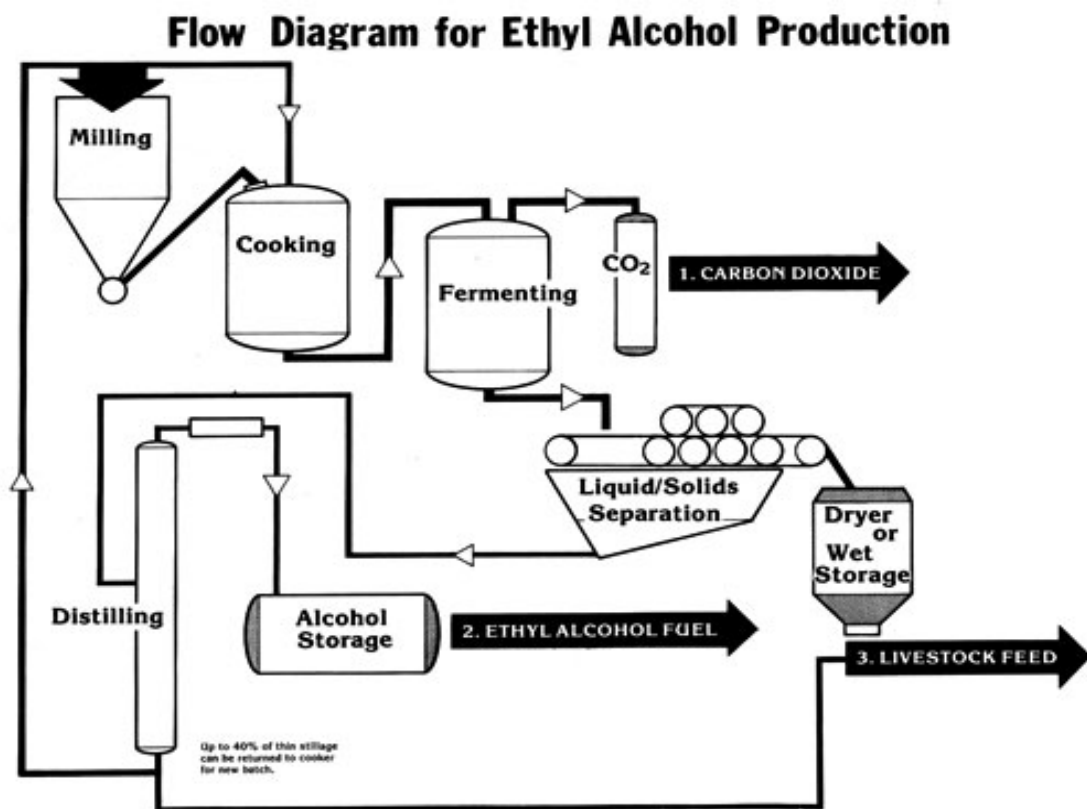
Κατασκευή πρότυπης καμπύλης

Προστίθεται 0,2 g άνυδρης γλυκόζης σε ογκομετρική φιάλη των 500 ml που συμπληρούται μέχρι τη χαραγή με αποσταγμένο νερό. Από το διάλυμα αυτό παίρνονται 7, 10, 25, 15, 35, 20 και 45 ml αναμιγνύονται με 21, 20, 35, 15, 25, 10 και 15 ml αποσταγμένο νερό αντίστοιχα. Έτσι, κάνουμε τις συγκεντρώσεις 300, 400, 500, 600, 700, 800 και 900 μg γλυκόζης / 3 ml διαλύματος. Από τις παραπάνω συγκεντρώσεις, παίρνονται 3 ml από κάθε συγκέντρωση και τοποθετούνται σε δοκιμαστικό σωλήνα. Στη συνέχεια ακολουθεί η μέθοδος όπως περιγράφεται παραπάνω. Η πρότυπη καμπύλη κατασκευάζεται σε σύστημα συντεταγμένων χ , ψ , όπου στον άξονα χ

τοποθετούνται οι γνώστες συγκεντρώσεις της γλυκόζης, ενώ στον άξονα ψ τοποθετούνται οι απορροφήσεις.



Εικόνα 2.1: *Saccharomyces cerevisiae* σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο



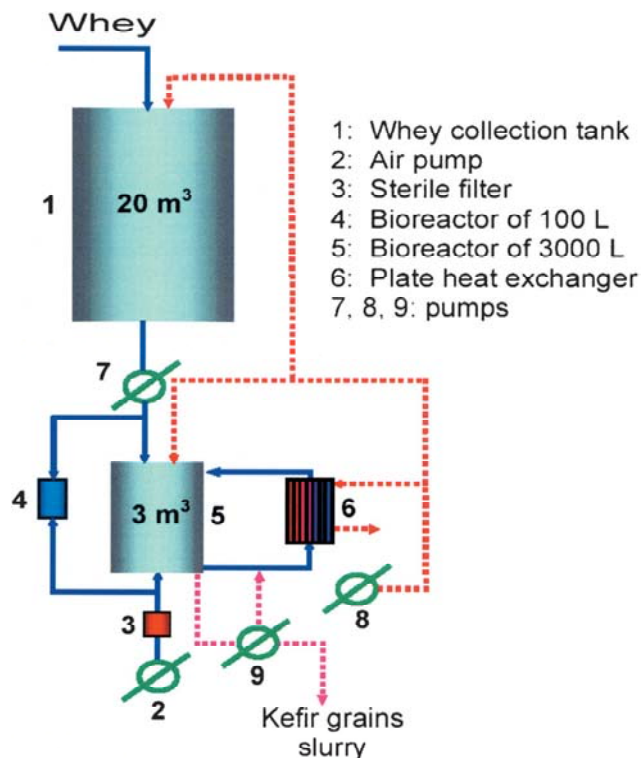
Εικόνα 2.2. Συνοπτική περιγραφή της διαδικασίας παραγωγής αλκοόλης με αλκοολική ζύμωση

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ (Single Cell Protein-SCP)

3.1. Εισαγωγή

Ο όρος «πρωτεΐνες μονο-κυττάρων» (SCP) επινοήθηκε από το Τεχνολογικό Ινστιτούτο της Μασαχουσέτης το 1966 και συνηθίζεται σήμερα να αναφέρεται ως μικροβιακή βιομάζα χρησιμοποιούμενη ως τρόφιμο και ως πρόσθετο τροφίμων. Ακόμα η απομονωμένη κυτταρική πρωτεΐνη ή τα ολικά κυτταρικά συστατικά μπορούν να καλούνται SCP. Επίσης ο όρος μονοκυτταρική πρωτεΐνη αναφέρεται σε αποξηραμένα κύτταρα μικροοργανισμών όπως πλαγκτόν-φωτοσυνθετικών βακτηρίων, βακτηρίων, ακτινομυκήτων, ζυμομυκήτων και μυκήτων που αναπτύσσονται σε μεγάλη κλίμακα για να χρησιμοποιηθούν ως πηγές πρωτεϊνών στην τροφή των ανθρώπων ή ζώων. Αν και οι μικροοργανισμοί αυτοί αναπτύσσονται για τις πρωτεΐνες τους, τα κύτταρά τους περιέχουν επίσης υδατάνθρακες, λιπίδια, βιταμίνες, ιχνοστοιχεία και νουκλεϊκά οξέα.

Δεν είναι παράξενο ότι οι μικροοργανισμοί έχουν χρησιμοποιηθεί ως συστατικά τροφών από τους αρχαίους χρόνους. Για παράδειγμα οι ζυμομύκητες χρησιμοποιούνται εδώ και πολλούς αιώνες για την παρασκευή του ψωμιού. Επίσης, τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος χρησιμοποιούνται για την παρασκευή τυριού και αλλαντικών. Γύρω από το 1900 στην Αμερική η φυγοκέντρηση χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό των κυττάρων της ζύμης από το μέσον καλλιέργειας. Η πρώτη παραγωγή πρωτεϊνών από μονοκύτταρους οργανισμούς έγινε στη Γερμανία κατά την διάρκεια του Α' παγκοσμίου πολέμου, όταν ο ζυμομύκητας *Saccharomyces cerevisiae* αναπτύχθηκε με μελάσα για πηγή άνθρακα και άλατα αμμωνίου για πηγή αζώτου. Κατά τη διάρκεια του Β' παγκοσμίου πολέμου, η τεχνολογία των βιοαντιδραστήρων είχε αρχίσει να αναπτύσσεται, με άμεση εφαρμογή στη μαζική παραγωγή μικροβιακών κυττάρων. Σήμερα με τις τεχνικές διήθησης του υγρού καλλιέργειας από ειδικά φίλτρα έχει ελαττωθεί κατά πολύ το κόστος μια και η φυγοκέντρηση δεν είναι πλέον αναγκαία. Πολλά ακατέργαστα υλικά θεωρήθηκαν ως πηγή τροφής των κυττάρων για την παραγωγή των πρωτεϊνών μονοκυττάρων. Στις περισσότερες περιπτώσεις τα ακατέργαστα υλικά πρέπει να τροποποιηθούν με φυσικούς, χημικούς ή ενζυμικούς τρόπους. Πηγή κυτταρίνης, όπως τα ξύλα και άχυρα, που αποτελούνται από το σύμπλοκο λιγνίνης-κυτταρίνης, δεν υδρολύονται εύκολα με ένζυμα ή οξέα για να απελευθερώσουν σάκχαρα. Στο παρακάτω σχήμα 5 περιγράφεται σχηματικά η διαδικασία παραγωγής μονοκυτταρικής πρωτεΐνης από κόκκους κεφίρ (μίγμα γαλακτικών βακτηρίων και ζυμών *Kluyveromyces*).



Σχήμα 1. Διάγραμμα παραγωγής SCP από κόκκους κεφίρ

Χρήσεις της Μονοκυτταρικής Πρωτεΐνης στην ανθρώπινη διατροφή και στις ζωοτροφές. Στη διατροφή των ζώων η μονοκυτταρική πρωτεΐνη χρησιμοποιείται για την πάχυνση των μόσχων, για την πάχυνση πουλερικών και χοίρων. Επίσης χρησιμοποιείται στις ζωοτροφές για όρνιθες ωοπαραγωγής καθώς και για την καλλιέργεια ψαριών. Τέλος, η μονοκυτταρική πρωτεΐνη χρησιμοποιείται ως τροφή κατοικίδιων ζώων. Στον τομέα των τροφίμων η μονοκυτταρική πρωτεΐνη χρησιμοποιείται ως φορέας αρωμάτων, βιταμινών και ως ενισχυτικό γαλακτωματοποιητών. Επίσης χρησιμοποιείται για την βελτίωση της θρεπτικής αξίας των ψημένων προϊόντων, σε σουπές, σε έτοιμα γεύματα για σερβίρισμα και σε συνταγές δίαιτας.

Σύσταση και διατροφική αξία της Μονοκυτταρικής πρωτεΐνης. Η θρεπτική αξία των τροφίμων από μονοκυτταρική πρωτεΐνη ποικίλει ανάλογα με την χρήση των μικροοργανισμών. Η μέθοδος της συγκομιδής, της αποξήρανσης και της επεξεργασίας έχει επίδραση στην θρεπτική αξία του τελικού προϊόντος. Η διατροφική αξία της μονοκυτταρικής πρωτεΐνης είναι η εξής:

- Το ξηρό βάρος των μικροοργανισμών περιέχει 60-70% πρωτεΐνη.
- Έχει υψηλή περιεκτικότητα στο σύμπλεγμα βιταμινών Β.
- Περιέχει θειαμίνη, ριβοφλαβίνη, γλουταθειόνη, φολικό οξύ, κλπ.

Η ενδεικτική σύσταση και διατροφική αξία της μονοκυτταρικής πρωτεΐνης περιγράφεται στους πίνακες 1-3.

Πίνακας 1: Σύσταση και διατροφική αξία της μονοκυτταρικής πρωτεΐνης σε διαφορετικά είδη μικροοργανισμών. (Israelidis J. Cleanthis, Food Technology Institute Professor of Biology at Southeastern College, Athens, Greece 1986).

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
Νουκλεϊκό οξύ	7-10	3-8	6-12	8-12

Πίνακας 2: Αμινοξέα της μονοκυτταρικής πρωτεΐνης από την *Candida utilis* (g αμινοξέων/100g πρωτεΐνης). (Israelidis J. Cleanthis, Food Technology Institute Professor of Biology at Southeastern College, Athens, Greece 1986).

Αμινοξέα	<i>Candida utilis</i>
Ασπαρτικό οξύ	1.32 ± 0.12
Θρεονίνη	0.60 ± 0.05
Σερίνη	0.64 ± 0.04
Γλουταμινικό οξύ	3.20 ± 0.2
Προλίνη	0.74 ± 0.045
Γλυκίνη	0.75 ± 0.06
Αλανίνη	1.18 ± 0.12
Βαλίνη	0.54 ± 0.04
Μεθειονίνη	0.44 ± 0.032
Ισολευκίνη	0.81 ± 0.045
Λευκίνη	1.44 ± 0.12
Τυροσίνη	0.86 ± 0.054
Φαινυλαλανίνη	0.98 ± 0.057
Λυσίνη	1.24 ± 0.11
Ιστιδίνη	0.19 ± 0.012
Αργινίνη	0.82 ± 0.045

Πίνακας 3: Περιεκτικότητα βιταμινών μονοκυτταρικής πρωτεΐνης από την *Candida utilis* (mg/100g ξηρού βάρους). (Israelidis J. Cleanthis, Food Technology Institute Professor of Biology at Southeastern College, Athens, Greece 1986).

Βιταμίνες	<i>Candida utilis</i>
Θειαμίνη	0,53
Ριβοφλαβίνη	4,50
Νιασίνη	41,73
Πυριδοξίνη	3,34
Παντοθενικό οξύ	3,72
Χολίνη	-

Φολικό οξύ	2,15
Ινοσιτόλη	-
Βιοτίνη	0,23
Βιταμίνη B ₁₂	0
P-αμινοβενζοϊκό οξύ	1,7

Πλεονεκτήματα – Μειονεκτήματα της Μονοκυτταρικής πρωτεΐνης. Τα πλεονεκτήματα της παραγωγής μονοκυτταρικής πρωτεΐνης είναι τα εξής:

- Οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται με μεγάλο ρυθμό και έχουν υψηλή απόδοση. Έχει υπολογιστεί ότι 100 λίβρες (περίπου 50 κιλά) της ζύμης παράγουν περίπου 250 τόνους της πρωτεΐνης μέσα σε 24 ώρες. Τα άλγη που αυξάνονται στις λίμνες παράγουν 20 τόνους (ξηρό βάρος) της πρωτεΐνης ανά στρέμμα/έτος. Η απόδοση της πρωτεΐνης είναι 10-15 φορές υψηλότερη από τη σόγια και 20-50 φορές υψηλότερη από το καλαμπόκι.
- Τα βιομηχανικά απόβλητα ή τα υποπροϊόντα (μελάσα, τυρόγαλο, κλπ) χρησιμοποιούνται ως πρώτες ύλες για τους μικροοργανισμούς που χρησιμοποιούνται ως SCP.
- Η περιεκτικότητα σε ξηρή πρωτεΐνη είναι αρκετά υψηλή, 43- 85%. Έχει υπολογιστεί ότι η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη στα κύτταρα των μικροοργανισμών είναι περίπου 60% στα ξηρά κύτταρα των *Pseudomonas ssp.* , 40-50% σε κύτταρα ζύμης και 20-40% σε φυκώδη κύτταρα.
- Οι ζύμες που αυξάνονται σε αυτήν την διαδικασία κατέχουν υψηλή περιεκτικότητα σε βιταμίνες.
- Όλα τα βασικά αμινοξέα περιλαμβάνονται στις μονοκύτταρες πρωτεΐνες.
- Μπορούν εύκολα γενετικά να τροποποιηθούν για την ποικιλία της σύνθεσης αμινοξέος.
- Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα ευρύ φάσμα των πρώτων υλών ως πηγή άνθρακα, οι οποίες περιλαμβάνουν ακόμη και τα προϊόντα αποβλήτων. Κατά συνέπεια βοηθούν στην αφαίρεση των ρύπων και είναι οικολογικά ευεργετικές.
- Μπορούν να παραχθούν σχετικά εύκολα, με υψηλή παραγωγικότητα.

Τα μειονεκτήματα της παραγωγής μονοκυτταρικής πρωτεΐνης είναι τα εξής:

- Οι ζύμες παρουσιάζουν το 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.
- Τα άλγη έχουν την κυτταρίνη στους κυψελοειδείς τοίχους τους που δεν είναι εύπεπτοι. Συσσωρεύουν επίσης τα βαρέα μέταλλα που μπορούν να αποδειχθούν επιβλαβή στα ζωντανά όντα.

- Δεδομένου ότι 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 επιζήμια για τον άνθρωπο με την αύξηση του επιπέδου του ουρικού οξέος στο αίμα. Τα πρόσθετα βήματα για να υπερνικήσουν αυτό το πρόβλημα καθιστούν την παραγωγή δαπανηρή.

Μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή SCP.

Οι βιομηχανίες τροφίμων αποσκοπώντας την καλύτερη αξιοποίηση των αποβλήτων και τη μείωση του ρυπαντικού φορτίου τα οποία καταλήγουν στο φυσικό περιβάλλον, χρησιμοποιούν διάφορους μικροοργανισμούς για την παραγωγή πρωτεΐνης. Οι λόγοι της χρήσης των μικροοργανισμών αυτών είναι γιατί πολλαπλασιάζονται ταχύτατα, έχουν μικρές απαιτήσεις σε θρεπτική ύλη για να αναπτυχθούν, επίσης η θρεπτική ύλη μπορεί να είναι οτιδήποτε ακόμη και απόβλητα, μπορούν να καλλιεργηθούν οπουδήποτε και τέλος το μεγαλύτερο ποσοστό του ξηρού βάρους είναι πρωτεΐνη. Οι πιο γνωστοί μικροοργανισμοί που έχουν μελετηθεί για την παραγωγή μονοκυτταρικής πρωτεΐνης από υγρά απόβλητα τυροκομείου είναι οι εξής:

Ζύμες

- ❖ *Candida utilis, boidinii, tropicalis, versatilis, holstii, halophila*
- ❖ *Saccharomyces cerevisiae, uvarum*
- ❖ *Rhodotorula glutinis*
- ❖ *Kluyveromyces marxianus, fragilis, lactis*
- ❖ *Saccharomycopsis lipolitica*
- ❖ *Torulopsis utilis*
- ❖ *Galactomyces geotrichum*
- ❖ *Trichosporon cutaneum*
- ❖ *Yarrowia lipolytica*

Μύκητες

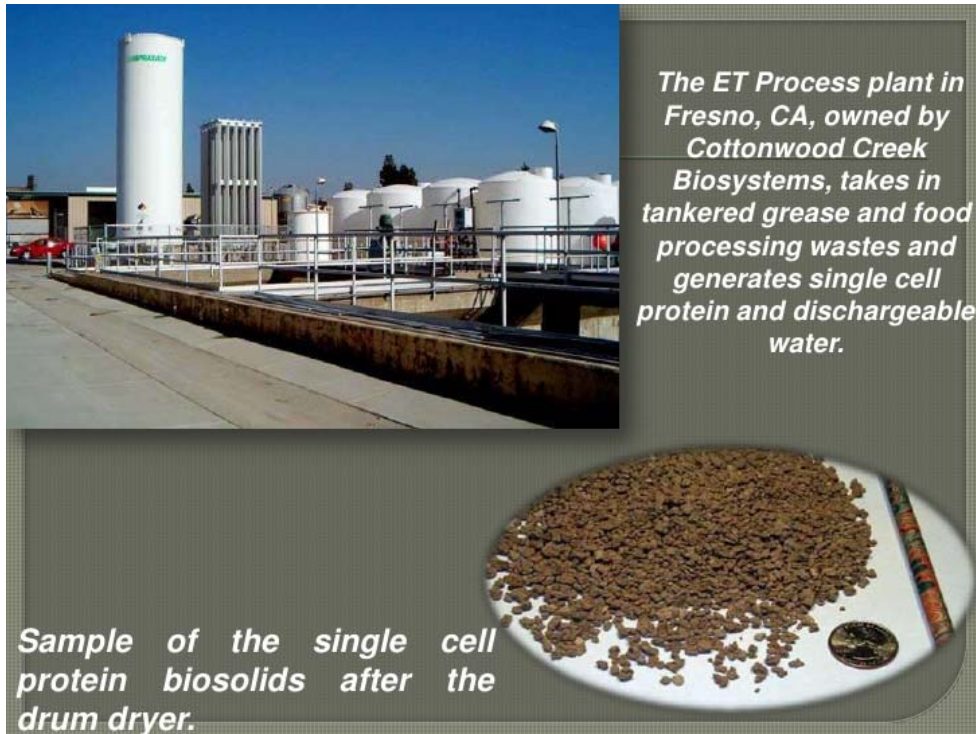
- ❖ *Lentinula edodes*
- ❖ *Pleurotus ostreatus, spp*
- ❖ *Phanerochaete chrysosporium, flavido – alba*
- ❖ *Chalara paradoxa*
- ❖ *Aspergillus niger, sp*
- ❖ *Fusarium graminearum* (χρησιμοποιείται για την παραγωγή Quorn ως υποκατάστατο κρέατος)

Βακτήρια

- ❖ *Ralstonia sp.*
- ❖ *Pseudomonas putida*
- ❖ *Azotobacter vinelandii*
- ❖ *Xanthomonas campestris*

- ❖ *Spirulina platensis* (φωτοσυνθετικό βακτήριο που χρησιμοποιείται για παραγωγή σπιρούλινας-τροφή πλούσια σε πρωτεΐνες, βιταμίνες, ιχνοστοιχεία, αντιοξειδωτικά)

Από τις παραπάνω ζύμες η καταλληλότερες για την παραγωγή μονοκυτταρικής πρωτεΐνης από τυρόγαλο είναι αυτές του γένους *Kluyveromyces*, που παράγει σε σημαντικές ποσότητες το ένζυμο β-γαλακτοσιδάση, το οποίο αποικοδομεί τη λακτόζη του αποβλήτου. Έτσι μπορεί να αναπτύσσεται εύκολα στο συγκεκριμένο υπόστρωμα.



α

The ET Process plant in Fresno, CA, owned by Cottonwood Creek Biosystems, takes in tankered grease and food processing wastes and generates single cell protein and dischargeable water.

Sample of the single cell protein biosolids after the drum dryer.



β

Εικόνα 3.1: (α) μονοκυτταρικής πρωτεΐνης από ζύμη που παράγεται σε βιομηχανική κλίμακα. (β) Σπιρουλίνα σε ξηρή μορφή

Yeast biomass

- Cultivated on **agro- industrial wastes** such as molasses, starchy materials, fruit pulp, wood pulp, etc.
- Requires a temperature of **30 -34 °C** & pH of **3.5- 4.5**.
- Also requires addition of **inorganic acids & sulphur supplements** in the form of salts.



Εικόνα 3.2: Απεικόνιση υγρού ζύμωσης για παραγωγή μονοκυτταρικής πρωτεΐνης.

3.2. Πειραματικό Μέρος

Εμβολιάζουμε κύτταρα *Saccharomyces cerevisiae* ή *Candida utilis* σε θρεπτικό υπόστρωμα με Malt extract agar + 10g/l γλυκόζη. Επωάζουμε στους 20, 30 °C ή σε διαφορετικά αρχικά pH (5,6,7) ή σε διαφορετικές ταχύτητες ανάδευσης ή με επιπλέον προσθήκη πηγών αζώτου όπως πεπτόνη, αμμωνιακά άλατα, κλπ. και μελετάμε την επίδραση αυτών των συνθηκών στην παραγωγή βιομάζας.

Η μέτρηση της βιομάζας γίνεται μετά από φυγοκέντρηση 10ml υγρού ζύμωσης σε προζυγισμένους σωλήνες φυγοκέντρησης, όπως περιγράφηκε στην προηγούμενη άσκηση. Αφού αδειάσουμε το υπερκείμενο υγρό σε άλλον δοκιμαστικό σωλήνα, το ίζημα βιομάζας ξηραίνεται στους 105°Cx24h και η διαφορά βάρους του (ξηρού σωλήνα+ξηρή βιομάζα) μείον το αρχικό βάρος του άδειου ξηρού σωλήνα μας δίνει τη βιομάζα στα 10ml υγρού ζύμωσης, από όπου με μέθοδο των τριών υπολογίζουμε τη συγκέντρωση βιομάζας εκφρασμένης σε 1000ml (g/l). Από το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης μπορούμε να μετρήσουμε τα υπολλειματικά σάκχαρα του υποστρώματος, σύμφωνα με τη μέθοδο DuBois, ή τη μέθοδο DNS (βλέπε και κεφάλαιο 6) ώστε να διαπιστωθεί η απόδοση της ζύμωσης και ο ρυθμός κατανάλωσης σακχάρων (γρήγορη και αποτελεσματική κατανάλωση σακχάρων είναι ένδειξη έντονου μεταβολισμού που συνοδεύεται από υψηλή παραγωγή μονοκυτταρικής πρωτεΐνης).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΙΤΡΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

4.1. Εισαγωγή

Το κιτρικό οξύ ($\text{CH}_2\text{COOHCOHCOOCH}_2\text{COOH}$) είναι ένα τρικαρβοξυλικό οξύ το οποίο απομονώθηκε από εσπεριδοειδή. Μέχρι τις αρχές του 20^{ου} αιώνα το κιτρικό οξύ παραγόταν από το χυμό των εσπεριδοειδών. Σήμερα, όλη σχεδόν η ποσότητα του κιτρικού οξέος που χρησιμοποιείται στη βιομηχανία τροφίμων και σ' άλλες τροφίμων και σε άλλες παράγεται από ορισμένα στελέχη του *Aspergillus niger* από τη μελάσσα. Μόνο το 10% της παγκόσμιας παραγωγής παράγεται από χυμούς εσπεριδοειδών στο Μεξικό και στη Ν. Αμερική. Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή του κιτρικού οξέος είναι μύκητες, ζύμες και βακτήρια. Από τους, μύκητες, ο μικροοργανισμός, που χρησιμοποιείται συνήθως για την παραγωγή είναι *Aspergillus niger*.

Τα κυριότερα πλεονεκτήματα που παρουσιάζουν τα διάφορα στελέχη του *A.niger* είναι: α) 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 και β) 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*, *Hansenula*, *Pichia*, *Torulopsis*, *Kloeckera*, *Torula*, *Endomyces* και *Saccharomyces*. Τα υποστρώματα που χρησιμοποιούν οι ζύμες για την παραγωγή κιτρικού οξέος είναι γλυκόζη, μελάσσα, αλκοόλη, λιπαρά οξέα και παραφίνες. Από τα βακτήρια, αυτά που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή κιτρικού οξέος ανήκουν στα είδη *Bacillus licheniformis*, *B. subtilis* και *Brevibacterium flavum*. Τα υποστρώματα που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή κιτρικού οξέος από βακτήρια είναι η γλυκόζη, ισοκιτρικό οξύ και μείγμα παραφινών. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή κιτρικού οξέος είναι η επιφανειακή ζύμωση όπου ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται στην επιφάνεια του υποστρώματος και η ζύμωση βυθού με ζυμωτήρα αναδεύσεως όπου ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται μέσα στο υγρό της ζύμωσης. Η ζύμωση της σακχαρόζης σε κιτρικό οξύ από *A. Niger* γίνεται αεροβίως από μία σειρά ενζύμων που παράγει ο μικροοργανισμός όπου η σακχαρόζη με το ένζυμο ιμπερτάση μετατρέπεται σε γλυκόζη και φρουκτόζη και στη συνέχεια η γλυκόζη μέσω της γλυκολιτικής οδού μετατρέπεται σε ακετυλό-συνένζυμο-Α και οξαλοξικό οξύ τα οποία με την παρουσία του ενζύμου κιτρική συνθετάση ή ένζυμο συμπυκνώσεως σχηματίζουν το κιτρικό οξύ.

Το κιτρικό οξύ μεταβολίζεται πολύ εύκολα στον οργανισμό του ανθρώπου και αποτελεί σημαντική πηγή ενέργειας. Το 70% της παραγόμενης ποσότητας κιτρικού οξέος χρησιμοποιείται στη βιομηχανία τροφίμων και

ποτών, το 12% στη φαρμακευτική βιομηχανία και το 18% σε άλλες βιομηχανικές εφαρμογές λόγω της μεγάλης διαλυτότητας, της χαμηλής τοξικότητας και της ευχάριστης όξινης γεύσης του. Επίσης το κιτρικό οξύ χρησιμοποιείται συνήθως σαν σταθεροποιητής σε διάφορα προϊόντα τροφίμων και σαν συστατικό για την παρασκευή απορρυπαντικών.

4.2 Παραγωγή

3.2.1 Ανάπτυξη του *Aspergillus niger*

Ο *A. niger* αναπτύσσεται σε potato dextrose agar (PDA) 4% (w/v) σε δοκιμαστικούς σωλήνες με κλίση στους 30° C για 5 μέρες. Στη συνέχεια προστίθενται 5ml αποστειρωμένο αποσταγμένο νερό στον κάθε σωλήνα και οι σωλήνες ανακινούνται στο vortex για 1 λεπτό για τον σχηματισμό σπορίων.

3.2.2 Προετοιμασία του υποστρώματος

Η παραγωγή κιτρικού οξέος θα γίνει από μελάσσα με τον *A. Niger*. Οι μέθοδοι που θα χρησιμοποιηθούν είναι η επιφανειακή ζύμωση και η ζύμωση βυθού με ανακινούμενες φιάλες και με ζυμωτήρα αναδεύσεως. Η μελάσσα αραιώνεται ,με αποσταγμένο νερό ώστε να περιέχει 15% (w/v) σάκχαρα (27 g μελάσσα αναμιγνύονται με 85 ml αποσταγμένο νερό (συνολικός όγκος 8 l). Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 6,0 με την προσθήκη 5N HCl και το διάλυμα διανέμεται σε 12 κωνικές φιάλες των 500 ml από 100 ml στην κάθε φιάλη. Οι φιάλες αποστειρώνονται στους 121° C για 15 λεπτά. Έξι λίτρα διαλύματος μελάσσας pH 6,0 μεταφέρονται σε δοχείο χωρητικότητας 10 l και αποστειρώνονται στους 121° C για 30 λεπτά. Μετά την αποστείρωση και ενώ το διάλυμα είναι ακόμα ζεστό προστίθεται σιδηροκυανιούχο κάλιο ($K_4[Fe(CN)_6]$) σε αναλογία 0,75 mg/g μελάσσα για την κατακρήμνιση βαρέων μετάλλων.

3.2.3 Ζύμωση

Μετά την ψύξη του διαλύματος το υπόστρωμα εμβολιάζεται με αιώρημα σπορίων *A. niger* σε αναλογία 1% (v/v). Από τις 12 κωνικές φιάλες , οι 6 φιάλες επωάζονται στατικά σε κλίβανο επώασης 30° C, ενώ οι άλλες 6 επωάζονται σε ανακινητή παλινδρόμησης στα 200 rpm στους 30° C. Ο ζυμωτήρας αναδεύσεως τοποθετείται σε θάλαμο ελεγχόμενης θερμοκρασίας (30° C), η παροχή του αέρα είναι 6 l/min και η ταχύτητα του αναδευτήρα 400 rpm. Στην επιφανειακή ζύμωση και στη ζύμωση βυθού, κάθε 4 μέρες και για 24 μέρες απομακρύνεται μια φιάλη για τη μέτρηση pH , βιομάζας, ολικής οξύτητας, κιτρικού οξέος και σακχάρων. Στο ζυμωτήρα αναδεύσεως κάθε μέρα και για 7 μέρες λαμβάνονται 50 ml δείγματος από τη βάση του ζυμωτήρα για τον προσδιορισμό των παραπάνω παραμέτρων.

4.3 Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων

Προσδιορισμός pH

Το pH του υποστρώματος προσδιορίζεται δια εμβάπτισης του ηλεκτροδίου πεχαμέτρου στο υγρό της ζύμωσης.

Προσδιορισμός βιομάζας

Στην περίπτωση της επιφανειακής ζύμωσης, το περιεχόμενο κάθε φιάλης (μυκήλιο και υγρό της ζύμωσης) διηθείται σε προζυγισμένο ηθμό Whatman No541. Το μυκήλιο ξεπλένεται δύο φορές με 50 ml αποσταγμένο νερό και ξηραίνεται στους 105° 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). Το διήθημα χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της ολικής οξύτητας, του κιτρικού οξέος και των σακχάρων. Στην περίπτωση των ανακινούμενων φιαλών και του ζυμωτήρα αναδεύσεως λαμβάνονται 10 ml υγρού της ζύμωσης και ο προσδιορισμός της βιομάζας γίνεται όπως περιγράφεται παραπάνω.

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 N NaOH και η ολική οξύτητα εκφρασμένη σε κιτρικό οξύ (g/l) προσδιορίζεται από τη σχέση $x=6,4 \cdot v$ όπου v τα ml NaOH 0,01N που καταναλώθηκαν.

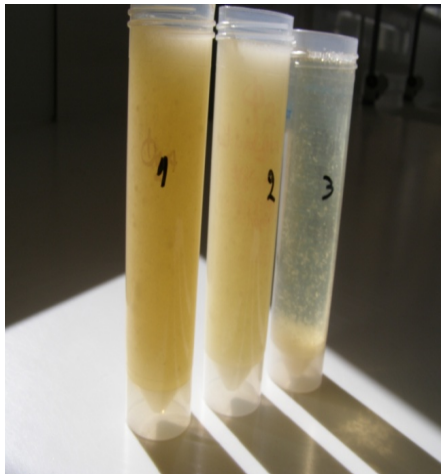
Προσδιορισμός σακχάρων

Ο προσδιορισμός των σακχάρων γίνεται σύμφωνα με τη μέθοδο των Dubois και συν. (1956).

Ένα g γλυκόζης μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml που συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με αποσταγμένο νερό. Πέντε ml (100 mg γλυκόζης) μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml που συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με αποσταγμένο νερό. Η συγκέντρωση των παραπάνω διαλυμάτων είναι 50, 100, 150, 200, και 250 μg γλυκόζης/ 2 ml. Δύο ml από κάθε διάλυμα τοποθετείται σε δοκιμαστικό σωλήνα με διαστάσεις 20 x 160 mm, ενώ σ' ένα άλλο δοκιμαστικό σωλήνα που χρησιμοποιείται σαν μάρτυρας προστίθενται 2 ml αποσταγμένο νερό. Σε κάθε σωλήνα προστίθενται 1 ml φαινόλη 1% και 5 ml πυκνόθειικό οξύ. Οι σωλήνες παραμένουν στη θερμοκρασία περιβάλλοντος για 10 λεπτά και στη συνέχεια ανακινούνται σε vortex. Οι σωλήνες παραμένουν στη θερμοκρασία περιβάλλοντος για 15 λεπτά και η ένταση του κίτρινου χρώματος προσδιορίζεται στα 490 nm με φασματοφωτόμετρο. Η πρότυπη καμπύλη κατασκευάζεται σε σύστημα αξόνων με τετμημένα τις γνωστές συγκεντρώσεις της γλυκόζης και τεταγμένα τις απορροφήσεις. Στη διάρκεια της ζύμωσης, τα σάκχαρα εκφρασμένα σε γλυκόζη προσδιορίζονται με την παραπάνω μέθοδο μετά από κατάλληλη αραίωση των δειγμάτων που περιέχουν 50-250 μg σάκχαρα/2 ml διαλύματος.



Εικόνα 4.1: Δημιουργία pellets μυκήτων σε διαφορετικές μέρες ζύμωσης.



Εικόνα 4.2: Υγρό ζύμωσης με *A.niger* την 2^η, 4^η, 6^η μέρα ζύμωσης (από δεξιά προς τα αριστερά)



Εικόνα 4.3: *Aspergillus niger* σε τρυβλίο

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

5.1. Εισαγωγή

Το γαλακτικό οξύ απομονώθηκε το 1780 από το ξινό γάλα και άρχισε να παράγεται σε βιομηχανική κλίμακα το 1881 με τη χρησιμοποίηση των μικροοργανισμών. Το γαλακτικό οξύ βρίσκεται στο γάλα και σε πολλά γαλακτοκομικά προϊόντα, στο κρασί, στα φρούτα και στα ξινά τρόφιμα. Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται για τη παραγωγή του γαλακτικού οξέος είναι κυρίως στελέχη των γαλακτικών βακτηρίων. Από τα στελέχη αυτά τα κυριότερα που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή γαλακτικού οξέος είναι οι γαλακτοβάκιλλοι *Lactobacillus delbrueckii*, *L.bulgaricus*, *L.leichmannii*, *L.pentosus* και *L.casei*. Επίσης χρησιμοποιείται ο *Lactococcus lactis* (*Streptococcus lactis*) και ο μύκητας *Rhizopus oryzae*. Σήμερα, η παραγωγή γαλακτικού οξέος σε βιομηχανική κλίμακα γίνεται κυρίως από τον *L. Delbrueckii* και τον *L. Bulgaricus*. Τα υποστρώματα που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή του γαλακτικού οξέος είναι συνθετικά, διάφορες αμυλούχες ουσίες (δημητριακά, πατάτες κλπ.), τυρόγαλα, μελάσσα και θειώδη απόβλητα επεξεργασίας ξύλου. Οι μέθοδοι ζυμώσεως που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή του γαλακτικού οξέος είναι η ασυνεχής ζύμωση βυθού και η συνεχής ζύμωση. Η ζύμωση γίνεται αναεροβίως με ελαφρύ ανάδευση του υποστρώματος ώστε να διατηρούνται σε αιώρημα τα κύτταρα του μικροοργανισμού και το ανθρακικό ασβέστιο σε όλη τη διάρκεια της ζύμωσης. Η συγκέντρωση των σακχάρων κυμαίνεται μεταξύ 5-20%, αλλά συνήθως δεν ξεπερνά το 12%. Το pH του υποστρώματος ρυθμίζεται στο 5,5 – 6,0 με την προσθήκη CaCO_3 ή Ca(OH)_2 σε όλη τη διάρκεια της ζύμωσης. Η θερμοκρασία ρυθμίζεται ανάλογα με το στέλεχος του μικροοργανισμού που χρησιμοποιείται, ενώ η ζύμωση διαρκεί 2-6 μέρες ανάλογα με το μικροοργανισμό, το υπόστρωμα και τις συνθήκες διεξαγωγής της ζύμωσης. 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.

5.2 Παραγωγή

*Ανάπτυξη του *Lactobacillus casei**

Ο μικροοργανισμός που θα χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή γαλακτικού οξέος είναι *Lactobacillus casei*, ενώ η μέθοδος ζυμώσεως είναι η στατική ζύμωση με ελεύθερα και ακινητοποιημένα κύτταρα *L. casei*. Ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται πρώτα σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει MRS broth στους 30° C για 48 ώρες. Στη συνέχεια ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται σε 5 κωνικές φιάλες των 250 ml που περιέχουν 100 ml MRS broth στους 30° C για 48 ώρες. (Οι κωνικές φιάλες εμβολιάζονται με 1% (v/v) αιώρημα κυττάρων *L. casei* από το δοκιμαστικό σωλήνα). Το περιεχόμενο της κάθε φιάλης φυγοκεντρείται στα 10.000 x g για 20 λεπτά. Τα κύτταρα της πρώτης φιάλης χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό του υποστρώματος. Τα κύτταρα της δεύτερης φιάλης αιωρούνται σε 15 ml αποστειρωμένο αποσταγμένο νερό, ενώ τα κύτταρα της τρίτης, τέταρτης και πέμπτης φιάλης αιωρούνται σε 5 ml αποστειρωμένου φυσιολογικού ορού (0,7 NaCl).

Ακινητοποίηση των κυττάρων

Ακινητοποίηση των 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) (Sigma, A-2033). Το μείγμα προστίθεται με μια πιπέτα των 10 ml υπό μορφή σταγόνων σε 100 ml αποστειρωμένου διαλύματος CaCl_2 2% (w/v) όπου σχηματίζονται σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου μέσα στα οποία παγιδεύονται τα κύτταρα του μικροοργανισμού. Τα σφαιρίδια παραμένουν στο διάλυμα CaCl_2 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.

Ζύμωση

Οι φιάλες τοποθετούνται σε κλίβανο επώασεως 30° C και κάθε 12, 24, 36 και 48 ώρες λαμβάνονται δείγματα από την κάθε φιάλη για τον

προσδιορισμό της βιομάζας, της ολικής οξύτητας, του DL- γαλακτικού οξέος, του D(-) γαλακτικού οξέος, του L(+) γαλακτικού οξέος και των σακχάρων.

5.3. Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων

Προσδιορισμός βιομάζας

Προσδιορισμός ελεύθερων κυττάρων

Ένα ml δείγματος αραιώνεται σε διάλυμα πεπτόνης 0,1% ώστε να σχηματιστούν οι αραιώσεις 10^{-8} και 10^{-9} κύτταρα/ml. Από τις παραπάνω αραιώσεις λαμβάνονται 0,1 ml υγρού και μεταφέρονται σε αποστειρωμένα τρυβλία που περιέχουν MRS agar. Το υπόστρωμα εμβολιάζεται με τη μέθοδο της επιφανειακής επίστρωσης και τα τρυβλία επωάζονται στους 30°C για 48 ώρες. Ο αριθμός των αποικιών που σχηματίζεται πολλαπλασιάζεται επί το αντίστροφο της αραιώσης και το αποτέλεσμα εκφράζεται σε κύτταρα/ml υποστρώματος.

Προσδιορισμός ακινητοποιημένων κυττάρων σε αλγινικό ασβέστιο

Πέντε σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου ζυγίζονται και διαλύονται σε 10 ml διαλύματος κιτρικού νατρίου 0,3M και pH 5,0. (Το pH ρυθμίζεται με την προσθήκη 1M κιτρικού οξέος). Τα κύτταρα που ελευθερώνονται από το αλγινικό ασβέστιο προσδιορίζονται όπως περιγράφεται παραπάνω. Το αποτέλεσμα εκφράζεται σε κύτταρα/g σφαιριδίων αλγινικού ασβεστίου.

Προσδιορισμός ολικής οξύτητας

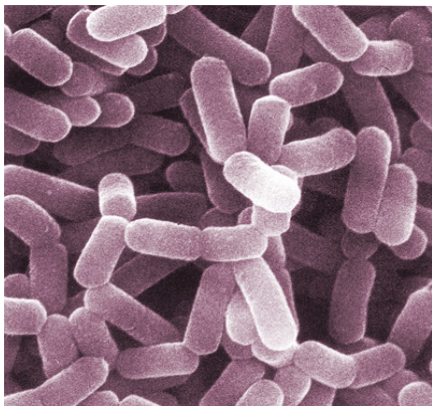
Όταν το αρχικό pH του υποστρώματος είναι 6,5 και στο υπόστρωμα δεν προστίθεται CaCO_3 , η ολική οξύτητα υπολογίζεται ως εξής: πέντε ml υποστρώματος διηθούνται και 2 ml διηθήματος μεταφέρονται σε κωνική φιάλη των 50 ml στην οποία προστίθενται 20 ml αποσταγμένο νερό και 2-3 σταγόνες δείκτη φαινολοφθαλεΐνη. 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 $x=0,45 \cdot v$ (g/l) όπου v τα ml NaOH 0, 01 N που καταναλώθηκαν για την εξουδετέρωση του γαλακτικού οξέος.

Όταν στο υπόστρωμα προστίθεται CaCO_3 , ο προσδιορισμός του γαλακτικού οξέος γίνεται ως εξής: δέκα g κατιονικής ρητίνης (Amberlite IR-118/H) αναμιγνύονται 20 ml υποστρώματος πριν τη ζύμωση και 20 ml

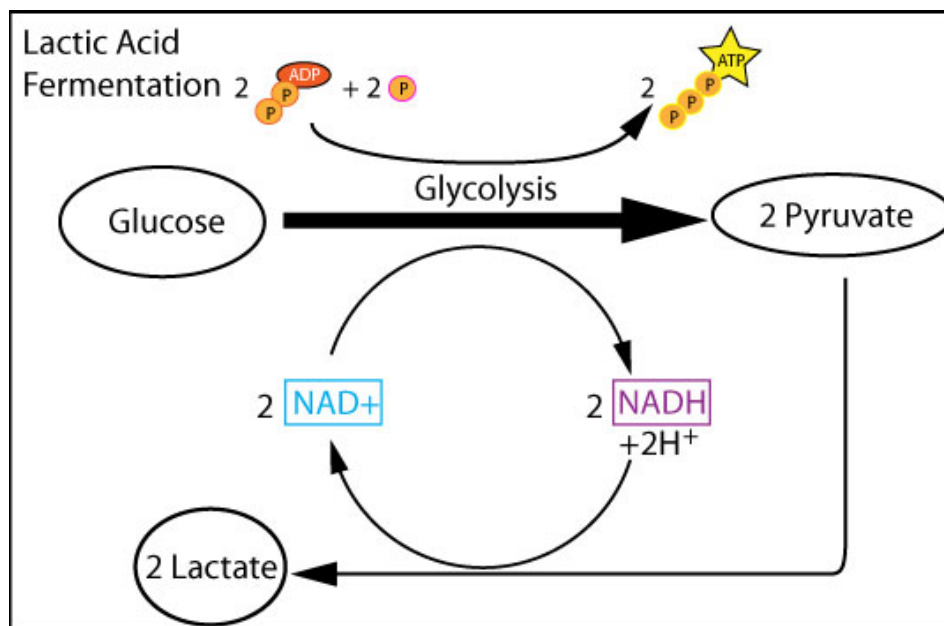
υποστρώματος μετά τη ζύμωση για τη συγκράτηση των ιόντων του ασβεστίου. Το μείγμα ανακινείται σε παλινδρομητή ανακίνησης στα 200 rpm στους 30° C για 30 λεπτά. Στη συνέχεια το υγρό διηθείται και λαμβάνονται 10 ml διηθήματος που ογκομετρούνται με NaOH 1N παρουσία δείκτη φαινολοφθαλεΐνης μέχρις ότου το διάλυμα γίνει ρόδινο. Το γαλακτικό οξύ προσδιορίζεται από τη σχέση:

$$x = (V_1 - V_2) \cdot 0,09 \cdot 100 \text{ (g/l)}$$

όπου V_1 και V_2 τα ml NaOH 1N που καταναλώθηκαν για την εξουδετέρωση του γαλακτικού οξέος στο υπόστρωμα μετά και πριν τη ζύμωση αντίστοιχα.



Εικόνα 5.1: Lactobacillus casei σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο



Εικόνα 5.2. Απεικόνιση των σταδίων της γαλακτικής ζύμωσης

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΖΕΛΛΑΝΗΣ ΑΠΟ ΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ SPHINGOMONAS RAUCIMOBILIS

1.1. Εισαγωγή

Η τζελλάνη (Gellan gum) είναι ένας μικροβιακός εξοπολυσασακχαρίτης που εκκρίνεται από τα κύτταρα του κινητού βακτηρίου *Sphingomonas raucimobilis*, πρώην μέλος τους γένους *Pseudomonas*, το οποίο παράγει σφιγγολιπίδια στην κυτταρική μεμβράνη. 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 ώστε να υδρολύει τον πολυσακχαρίτη όταν αυτό απαιτείται.

Η τζελλάνη έχει πολλές εφαρμογές ως πηκτική ουσία και σταθεροποιητής σε διάφορα τρόφιμα, χάρη στην υψηλή πηκτική της δύναμη (δυνατότητα δέσμευσης μορίων νερού), και τη δημιουργία θερμοαναστρέψιμων και διαυγών τζελ. Σε σχέση με την ξανθάνη που έχει παρόμοιες ιδιότητες και άλλους μικροβιακούς πολυσακχαρίτες (π.χ. σκλερογλουκάνη) έχει υψηλότερη πηκτική δύναμη, αλλά και υψηλότερη τιμή, λόγω σχετικά μικρής παραγωγικότητας. Επίσης χρησιμοποιείται ως υποκατάστατο της αγαρόζης σε τρυβλία με στερεά θρεπτικά υποστρώματα (ιδίως για την καλλιέργεια φυτικών ιστών), καθώς και ως εδώδιμο υλικό επικάλυψης και δημιουργίας φιλμ σε τρόφιμα και φάρμακα.

Για την παραγωγή τζελλάνης σημαντικό ρόλο παίζει η διαθεσιμότητα σακχάρων, από τα οποία θα συντεθεί ο πολυσακχαρίτης, η επαρκής ανάδευση που είναι απαραίτητη για την ομοιόμορφη μεταφορά μάζας-θερμότητας σε ένα ιξώδες υγρό ζυμώσης, και η χαμηλή συγκέντρωση πηγών αζώτου, που ευνοούν την ανάπτυξη των κυττάρων, αλλά όχι τη σύνθεση τζελλάνης. Επίσης, το ιξώδες της ζύμωσης είναι σημαντικό κριτήριο για την επιτυχή παραγωγή τζελλάνης και αυτό σχετίζεται με τη συγκέντρωση αλλά και το μοριακό βάρος (MB) του πολυσακχαρίτη (υψηλό MB οδηγεί σε υψηλότερο ιξώδες). Σε ορισμένες περιπτώσεις, παράγεται υψηλή συγκέντρωση τζελλάνης, αλλά με χαμηλό MB, με αποτέλεσμα το ιξώδες και η πηκτική δύναμη της τζελλάνης να παραμένει σχετικά χαμηλά. Το pH της ζύμωσης πρέπει να είναι ουδέτερο, και αερισμός επαρκής (αλλά όχι πολύ έντονος), καθώς ο μικροοργανισμός δεν είναι οξυάντοχος, και επίσης είναι αερόβιος, αλλά και ευαίσθητος στο οξειδωτικό στρες.

1.2. Συνθήκες ανάπτυξης του μικροοργανισμού

Για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού, παρασκευάστηκε υπόστρωμα Yeast Malt Gelrite [10 g/l yeast extract, 10 g/l malt extract, 12 g/l gelrite (εμπορική ονομασία της σκόνης τζελλάνης)] και μοιράστηκε σε τρυβλία. Εκεί επιστρώθηκε μια κρική (streak) από υγρό εναιώρημα κυττάρων *S. raucimobilis*, που είχαν προηγουμένως αναπτυχθεί σε Yeast Malt Extract Broth (10 g/l yeast extract, 10 g/l malt extract). Η επώαση έγινε στους 30C για 3 ημέρες. Μια μεμονωμένη αποικία από το στερεό υπόστρωμα μεταφέρθηκε εκ νέου σε υγρό ζωμό Yeast Malt Extract Broth για την παραγωγή των

εμβολίων του μικροοργανισμού, τα οποία επωάστηκαν στους 30C για 2 ημέρες. Το εμβόλιο αυτό προστίθεται στις κωνικές ζύμωσης σε αναλογία 5-10%. Οι κωνικές ζύμωσης επωάζονται σε επωαστικό αναδευτήρα για 3-4 ημέρες.

1.3. Επεξεργασία δειγμάτων υγρού ζύμωσης για μέτρηση τζελλάνης, κυτταρικής βιομάζας, σακχάρων και ιζώδους

Προεπεξεργασία για την αποακετυλίωση του δείγματος (προαιρετική, μόνο για την περίπτωση απομόνωσης καθαρής τζελλάνης, π.χ. με σκοπό τη μέτρηση του μοριακού βάρους)

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 H₂SO₄

Για τη 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

Για τη μέτρηση του βάρους βιομάζας: (B)

1. Δειγματοληψία 10 ml υγρού ζύμωσης
2. Αραίωση με διπλάσιο όγκο απεσταγμένου νερού θερμοκρασίας ~60 C, δηλαδή προσθήκη 20 ml H₂O 10 ml υγρού ζύμωσης, ή 6ml H₂O 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

Για μέτρηση τζελλάνης (G)

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

Προσδιορισμός Σακχάρων με τη μέθοδο Du Bois.

Παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα διαφόρων συγκεντρώσεων με διάλυμα φαινόλης 4%, πυκνό H_2SO_4 98% και άνυδρης γλυκόζης για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης.

Γίνονται οι απαραίτητες αραιώσεις του υπερκείμενου υγρού σε σωλήνες Falcon. Στη συνέχεια σε δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετείται 0,5 ml φαινόλη 4% καθώς επίσης 1 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%, 1 ml απεσταγμένο νερό και 2,5 ml θειϊκό οξύ, για τον μηδενισμό του φασματοφωτόμετρου. Έπειτα αναδεύονται στο vortex.

Ρυθμίζεται το φασματοφωτόμετρο στα 490 nm και μετρούνται οι απορροφήσεις του κάθε δείγματος μετά την ανάμιξη των αντιδρώντων και έπειτα από επώαση 10 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Τέλος, με βάση την πρότυπη καμπύλη και τις απορροφήσεις των γνωστών διαλυμάτων, οι απορροφήσεις των δειγμάτων μετατρέπονται σε g/L.

Προσδιορισμός Σακχάρων με τη μέθοδο DNS

Παρασκευάζουμε το πρότυπο αντιδραστήριο DNS και άνυδρης γλυκόζης για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης. Γίνονται οι απαραίτητες αραιώσεις του υπερκείμενου υγρού σε σωλήνες Falcon. Στη συνέχεια σε δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετείται 0,5 ml DNS καθώς επίσης 0,5 ml δείγμα από τις αντίστοιχες αραιώσεις. Επιπλέον σε ένα άλλο δοκιμαστικό σωλήνα (μάρτυρας) τοποθετείται ομοίως 0,5 ml αποσταγμένο νερό και 0,5 ml DNS. Έπειτα αναδεύονται σε vortex. Στη συνέχεια τοποθετούμε τους δοκιμαστικούς σωλήνες σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 100°C για 5 λεπτά. Στη συνέχεια ψύχουμε τους δοκιμαστικούς σωλήνες για 5 λεπτά και προσθέτουμε 5 ml αποσταγμένο νερό. Έπειτα ρυθμίζεται το φασματοφωτόμετρο στα 540 nm και μετρούνται οι απορροφήσεις του κάθε δείγματος. Τέλος, με βάση την πρότυπη καμπύλη και τις απορροφήσεις των γνωστών διαλυμάτων, οι απορροφήσεις των δειγμάτων μετατρέπονται σε g/L. Η εξίσωση είναι $y=ax+\beta$, όπου y =απορρόφηση στα 540nm, x = συγκέντρωση γλυκόζης (g/l), $a=0,3206$, $b= -0,0123$.

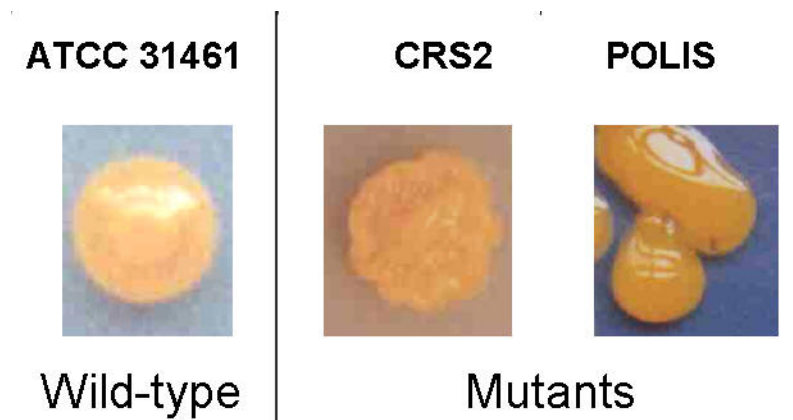
Οι συγκεντρώσεις εκφράζονται σε g/L ισοδυνάμων γλυκόζης. **Ακρίβεια Μεθόδου: 0-2g/l/**

Σημείωση: Για τη μέτρηση ολικών σακχάρων (αναγωγικών και μη αναγωγικών) ακολουθούμε την παρακάτω προκατεργασία των δειγμάτων:

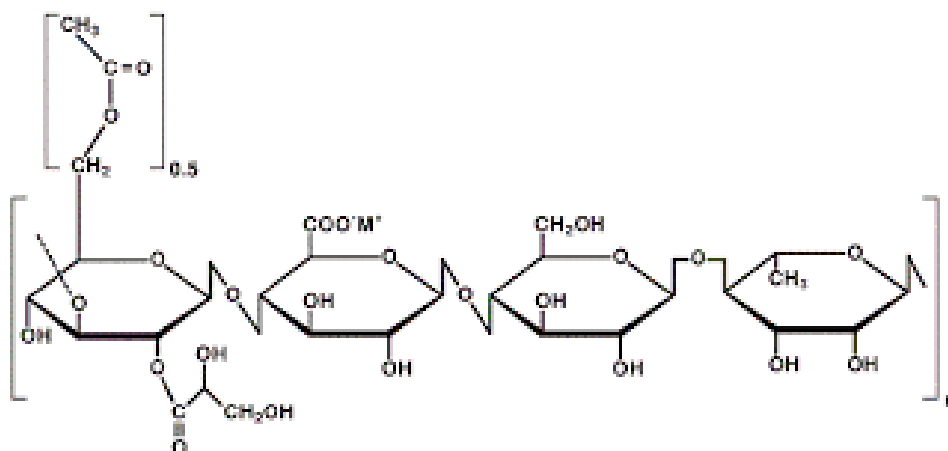
Παίρνουμε 10ml από το δείγμα και προσθέτουμε 5ml HCl 0,1N το βάζουμε να βράσει για 5 λεπτά και μετά κάνουμε εξουδετέρωση με ίδια ποσότητα (5 ml) NaOH 0,1N. Έτσι έχουμε αραιώσει το δείγμα σε αναλογία 1/2. Στη συνέχεια μετράμε τα σάκχαρα με τη μέθοδο DNS, μετά από κατάλληλες επιπλέον αραιώσεις (αν χρειάζεται).

Προσδιορισμός του ιξώδους και του pH

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). Για τη μέτρηση του pH χρησιμοποιούμε το επιτραπέζιο pH-μετρο, και αν χρειαστεί ρυθμίζουμε το pH στην τιμή 7 με προσθήκη 0,1N NaOH ή HCl, ανάλογα με το pH που έχει η κάθε κωνική.



Εικόνα 6.1 : Διάφορα στελέχη (αποικίες) του βακτηρίου *Sphingomonas raucimobilis*



Εικόνα 6.2. Το επαναλαμβανόμενο μόριο της τζελλάνης



Εικόνα 6.3. Διαλύματα με υγρών τροφίμων με τζελλάνη

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: Προσδιορισμός ενζυμικής ενεργότητας α-αμυλάσης

7.1. Εισαγωγή

- 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 β0αμυλάση, πουλουλανάση, κλπ), για τη διάσπαση αμυλούχων τροφών σε απορρυπαντικά κλπ.
- Για την εκτίμηση της δράσης των ενζύμων δεν είναι σημαντική μονο η συγκέντρωσή τους σε ένα δείγμα/τρόφιμα , αλλά ενεργότητα του ενζύμου. Γιατί αν τα ένζυμα (πρωτεΐνες) μετουσιωθούν παύουν να είναι δραστικά, ασχέτως τη συγκέντρωσή τους.
- Μετουσίωση ενζύμων μπορεί να γίνει με : Θέρμανση, οξίνιση (στο ισοηλεκτρικό σημείο), προσθήκη αλάτων.
- Επίσης τα ένζυμα μπορεί να αλλοιωθούν κατά τη συντήρηση υπο ψύξη(ή και κατάψυξη) από πρωτεάσες(άλλα πρωτεολυτικά ένζυμα) αν υπάρχει υγρασία.

7.2. Διαδικασία μέτρησης ενεργότητας α-αμυλάσης

1. Παρασκευάζουμε 3 δ/τα αμυλάσης (διαφορετικής συγκέντρωσης) και ένα μάρτυρα (δ/μα H₂O)
2. Παρασκευάζουμε δ/μα διαλυτού αμύλου 1%
3. Παρασκευάζουμε δ/μα 0,1M K₂HPO₄ (Ph 7)
4. Σε δοκιμαστικούς σωλήνες βάζουμε:
 - 0,5 ml δ/μα αμύλου 1%
 - 0,4 ml δ/μα 0,1M K₂HPO₄
 - 0,1 ml δείγμα (δ/μα αμυλάσης ή νερό)
5. Οι σωλήνες επωάζονται 85° C 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% I₂, 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** → ↓ **δράση 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.

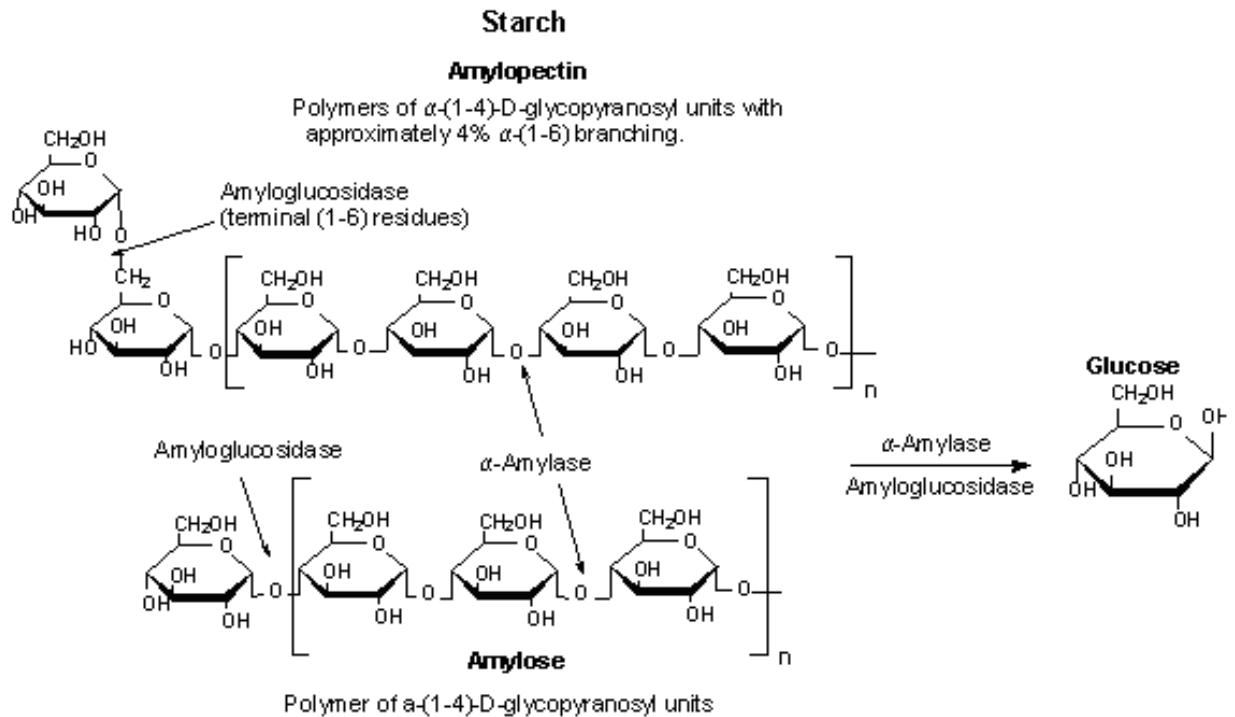
π.χ Α μάρτυρα: 0,800

1 unit= 10% μείωση = 0,080

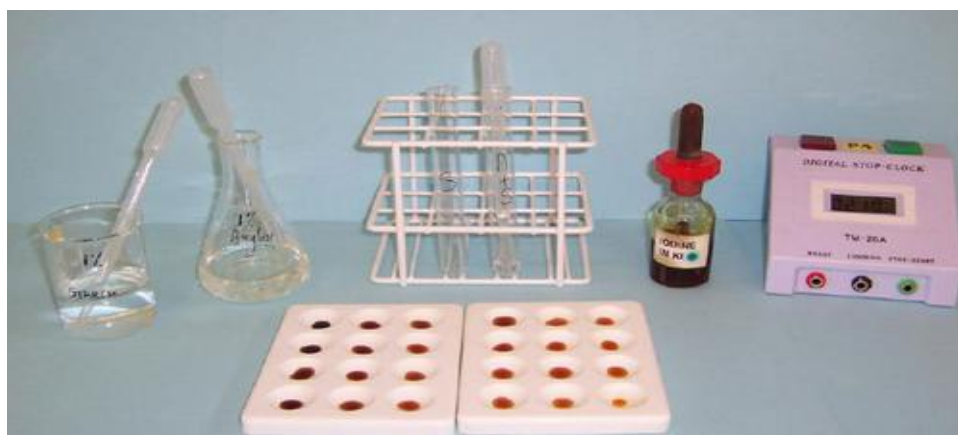
Α δείγματος(αμυλάση) : 0,560

Α δείγματος= 0,80-0,560=0,240 → μείωση απορρόφησης σε σχέση με το μάρτυρα.

$0,240/0,080= 3$, άρα έχουμε 3units/ 0,1ml δείγμα ή 30 units/ml.



Εικόνα 7.1. Μηχανισμός υδρόλυσης αμύλου από την α-αμυλάση



Εικόνα 7.2: Απαιτούμενα υλικά για τον προσδιορισμό της α-αμυλάσης

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Dubois, M, K. A Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers and F.Smith (1956) Anal. Chem. 28:350
2. Gawehn, K. and H. U. Bergmeyer (1974), D(-)- Lactate. In Methods of enzymatic analysis.2nd ed. Vol. 3, pp 1492-1495. H. V. Bergmeyer (ed) Verlag chemic GmbH, Weinheim. Academic Press, New York
3. Roukas, T (1986). Production of citric acid from by-products of agricultural Industries. M.Sc. Thesis of Strathclyde, UK
4. Ρούκας Τ. (1995) Εργαστηριακές Ασκήσεις Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, Εκδόσεις ΑΠΘ
5. Νεραντζής Ηλίας (2010), Βιοτεχνολογία και Βιομηχανικές Ζυμώσεις Εκδόσεις Έμβρυο