

Παραγωγή χρήσιμων προϊόντων με τη Βιοτεχνολογία

- Ζωντανοί οργανισμοί χρησιμοποιούνται χιλιάδες χρόνια τώρα για την παραγωγή ψωμιού, κρασιού ή μπύρας. Σήμερα η εξέλιξη της Επιστήμης και της Τεχνολογίας οδηγεί στην ευρεία παραγωγή τροφίμων, αντιβιοτικών και εμβολίων.
- Ο όρος Βιοτεχνολογία περιγράφει τη διαδικασία παραγωγής προϊόντων (π.χ. αλκοόλη με ζύμωση, ινσουλίνη από γενετικά τροποποιημένα βακτήρια) από ακατέργαστα υλικά με τη βοήθεια ζωντανών οργανισμών, κατόπιν εφαρμογής των γνώσεων που αποκτήθηκαν από τη μελέτη των οργανισμών, δηλαδή ουσιαστικά χρήση ζωντανών οργανισμών προς όφελος του ανθρώπου. Η Βιοτεχνολογία συνεισφέρει στην Ιατρική, τη Γεωργία, την Κτηνοτροφία, τη Βιομηχανία και την Προστασία του Περιβάλλοντος.
- Η Βιοτεχνολογία στηρίζεται σε τεχνικές καλλιέργειας και ανάπτυξης μικροοργανισμών και τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA επειδή οι τελευταίες δίνουν δυνατότητα εισαγωγής επιθυμητών ιδιοτήτων στους οργανισμούς.

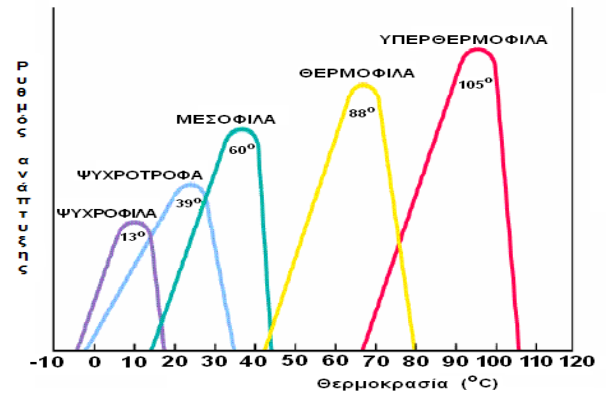
Οι μικροβιακές καλλιέργειες

➤ Οι μικροοργανισμοί όταν βρεθούν σε κατάλληλες συνθήκες, αυξάνονται σε μέγεθος και διαιρούνται οπότε αυξάνεται ο αριθμός τους. Τα κύτταρα που προκύπτουν από κάθε διαίρεση έχουν πρακτικά το ίδιο μέγεθος με το αρχικό κύτταρο. Ο ρυθμός ανάπτυξης του πληθυσμού, δηλαδή ο ρυθμός διαίρεσης των κυττάρων του πληθυσμού καθορίζεται από τον **χρόνο διπλασιασμού**, χαρακτηριστικό για κάθε είδος μικροοργανισμού.

ΧΡΟΝΟΣ ΔΙΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ	
ΕΙΔΟΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ	ΧΡΟΝΟΣ ΔΙΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΣΕ ΙΔΑΝΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ
Escherichia coli	20 min
Mycobacterium tuberculosis	18h
Amoeba proteus	24h
Saccharomyces cerevisiae	2h

- Οι παράγοντες που επηρεάζουν το χρόνο διπλασιασμού και άρα το ρυθμό ανάπτυξης των μικροοργανισμών είναι η διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών, το pH, το O₂ και η θερμοκρασία.
- Για να αναπτυχθεί ένας μικροοργανισμός πρέπει να προμηθεύεται από το περιβάλλον **θρεπτικά συστατικά**, όπως άνθρακα, άζωτο, μεταλλικά ιόντα και νερό. Για τους αυτότροφους οργανισμούς πηγή άνθρακα είναι το CO₂ της ατμόσφαιρας, ενώ για τους ετερότροφους οι υδατάνθρακες. Πηγή αζώτου για τους πιο πολλούς μικροοργανισμούς είναι τα αμμωνιακά και τα νιτρικά ιόντα (NH₄⁺ και NO₃⁻). Τα μεταλλικά ιόντα είναι απαραίτητα για την πραγματοποίηση χημικών αντιδράσεων και σαν συστατικά διαφόρων μορίων.
- Το **pH** επηρεάζει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Οι περισσότεροι αναπτύσσονται σε pH 6-9, υπάρχουν όμως και άλλοι (π.χ. βακτήρια του γένους Lactobacillus) που αναπτύσσονται σε pH 4-5.
- Η **παρουσία ή απουσία O₂** βοηθά ή αναστέλλει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Υπάρχουν μικροοργανισμοί που για την ανάπτυξή τους απαιτούν υψηλή συγκέντρωση O₂ (**υποχρεωτικά αερόβιοι**), όπως βακτήρια του γένους Mycobacterium. Άλλοι, όπως οι μύκητες στην αρτοποιητική βιομηχανία, αναπτύσσονται ταχύτερα παρουσία O₂ απ' ό,τι απουσία O₂ (**προαιρετικά αερόβιοι**). Τέλος μικροοργανισμοί όπως βακτήρια του γένους Clostridium για τους οποίους το O₂ είναι τοξικό (**υποχρεωτικά αναερόβιοι**).

➤ Η θερμοκρασία είναι από τους πιο σημαντικούς παράγοντες που καθορίζουν την ανάπτυξη μικροοργανισμών. Οι περισσότεροι από αυτούς αναπτύσσονται άριστα σε θερμοκρασία 20-45 °C (*Escherichia coli* στους 37 °C). Ορισμένοι απαιτούν θερμοκρασία >45 °C όπως αυτοί που αναπτύσσονται κοντά σε θερμοπηγές, ενώ άλλοι αναπτύσσονται σε θερμοκρασία <20 °C.



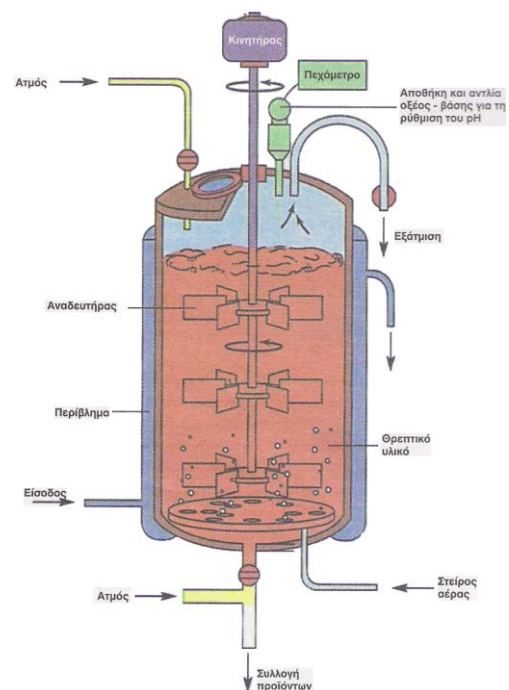
Ανάπτυξη στο εργαστήριο & σε βιομηχανική κλίμακα

➤ Ο Louis Pasteur υπήρξε πρωτοπόρος στην προσπάθεια καλλιέργειας βακτηρίων και μυκήτων. Απαραίτητη είναι γι' αυτό η απομόνωση διαφόρων ειδών βακτηρίων και μυκήτων, η Παρασκευή κατάλληλων θρεπτικών υλικών και η διαμόρφωση κατάλληλων συνθηκών ανάπτυξης. Σήμερα οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ενζύμων ή αντιβιοτικών, αναπτύσσονται στο εργαστήριο ή σε μεγάλη κλίμακα σε βιομηχανικές μονάδες κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες καλλιέργειας.

➤ Για την ανάπτυξή τους χρησιμοποιούνται τεχνητά θρεπτικά υλικά που περιέχουν πηγή άνθρακα, πηγή αζώτου και ιόντα. Στην περίπτωση των αερόβιων μικροοργανισμών είναι απαραίτητη η παρουσία οξυγόνου. Τα **θρεπτικά υλικά** μπορεί να είναι υγρά ή στερεά. Τα υγρά θρεπτικά υλικά περιέχουν όλα τα παραπάνω θρεπτικά συστατικά διαλυμένα σε νερό. Τα στερεά θρεπτικά υλικά παρασκευάζονται με ανάμιξη του υγρού θρεπτικού υλικού με έναν πολυσακχαρίτη που προέρχεται από τα φύκη, το **άγαρ**, που είναι ρευστό σε θερμοκρασίες πάνω από 45 °C αλλά στερεοποιείται σε χαμηλότερες.

➤ Μια καλλιέργεια ξεκινά με προσθήκη μικρής ποσότητας κυττάρων στο θρεπτικό υλικό (**εμβολιασμός**). Κατόπιν οι μικροοργανισμοί παραμένουν σε κλίβανο για σταθερή θερμοκρασία κατάλληλη για την ανάπτυξή τους. Έτσι σε 12-76 ώρες παράγεται μεγάλος αριθμός μικροοργανισμών. Οι καλλιέργειες αυτές διατηρούνται για μεγάλο χρονικό διάστημα σε αδρανή μορφή σε θερμοκρασία -80 °C. Για να αποφεύγεται η ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών εκτός από εκείνους που πρόκειται να καλλιεργηθούν, τα θρεπτικά υλικά και οι συσκευές αποστειρώνονται πριν την έναρξη της καλλιέργειας.

➤ Όταν γίνει καλλιέργεια σε μεγάλη κλίμακα (βιομηχανική καλλιέργεια) χρησιμοποιούμε κατάλληλες συσκευές, τους **ζυμοτήρες ή βιοαντιδραστήρες**. Αυτοί επιτρέπουν τον έλεγχο και τη ρύθμιση των συνθηκών (θερμοκρασία, pH, συγκέντρωση O₂). Στο θρεπτικό υλικό χρησιμοποιούνται φτηνές πηγές άνθρακα, όπως η μελάσα (παραπροϊόν της βιομηχανίας ζαχαροκάλαμου ή σακχαρότευτλων). Η καλλιέργεια στο βιοαντιδραστήρα ξεκινά με τον εμβολιασμό από μια αρχική καλλιέργεια που έχει γίνει



στο εργαστήριο. Μέσα στο βιοαντιδραστήρα οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται χρησιμοποιώντας τα συστατικά του θρεπτικού υλικού. Όλες οι διεργασίες γίνονται κάτω από στείρες συνθήκες- βιοαντιδραστήρας και θρεπτικό υλικό αποστειρώνονται πριν τη χρήση.

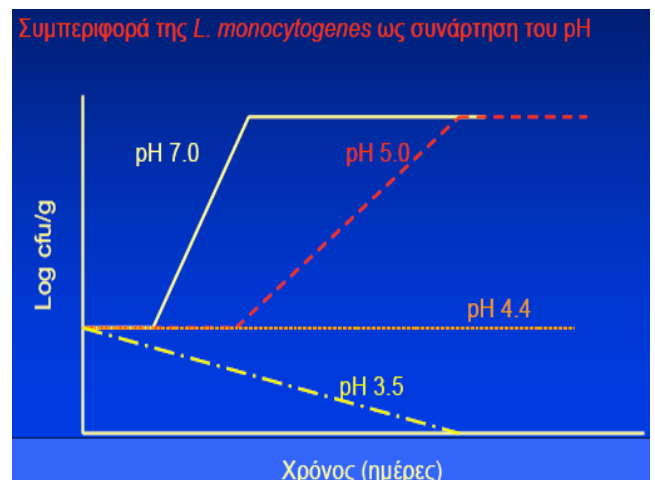
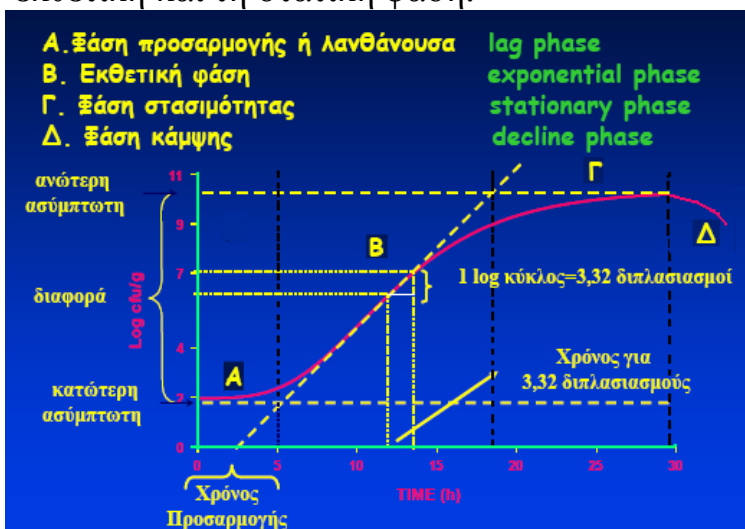
➤ Με τον όρο **ζύμωση** εννοούμε τη διαδικασία ανάπτυξης μικροοργανισμών σε υγρό θρεπτικό υλικό κάτω από οποιοσδήποτε συνθήκες. Παλιότερα ο όρος χρησιμοποιούνταν μόνο για αναερόβιες διεργασίες, όμως σήμερα περιλαμβάνει τόσο αερόβιες όσο και αναερόβιες. Τα προϊόντα της ζύμωσης είναι είτε τα ίδια τα κύτταρα (η **βιομάζα**), είτε προϊόντα των κυττάρων όπως οι πρωτεΐνες και τα αντιβιοτικά.

Τρόποι καλλιέργειών

➤ **Κλειστή καλλιέργεια:** Σ' αυτή τη ζύμωση τοποθετείται στο βιοαντιδραστήρα ορισμένη ποσότητα αποστειρωμένου θρεπτικού υλικού που εμβολιάστηκε με αρχική καλλιέργεια μικροοργανισμών και η καλλιέργεια συνεχίζεται μέχρι την παραγωγή του επιθυμητού προϊόντος. Στην κλειστή καλλιέργεια οι φάσεις ανάπτυξης είναι η λανθάνουσα, η εκθετική, η στατική και η φάση θανάτου.

- Κατά την **λανθάνουσα φάση** ο πληθυσμός των μικροοργανισμών είναι σχεδόν σταθερός διότι οι μικροοργανισμοί χρειάζονται κάποιο χρονικό διάστημα για να προσαρμοστούν στις καινούργιες συνθήκες και να αρχίσουν να αναπτύσσονται
- Κατόπιν οι μικροοργανισμοί διαιρούνται με ταχύ ρυθμό, επειδή η καλλιέργεια γίνεται κάτω από άριστες συνθήκες (θερμοκρασίας, pH, συγκέντρωσης O₂) και άφθονα θρεπτικά συστατικά. Η φάση αυτή ονομάζεται **εκθετική** γιατί ο αριθμός των μικροοργανισμών αυξάνεται εκθετικά.
- Ακολουθεί η στατική φάση κατά την οποία ο πληθυσμός των βακτηρίων δεν αυξάνεται λόγω εξάντλησης κάποιου θρεπτικού συστατικού ή λόγω συσσώρευσης τοξικών προϊόντων του μεταβολισμού τους.
- Κατά τη φάση θανάτου ο αριθμός των μικροοργανισμών μειώνεται.

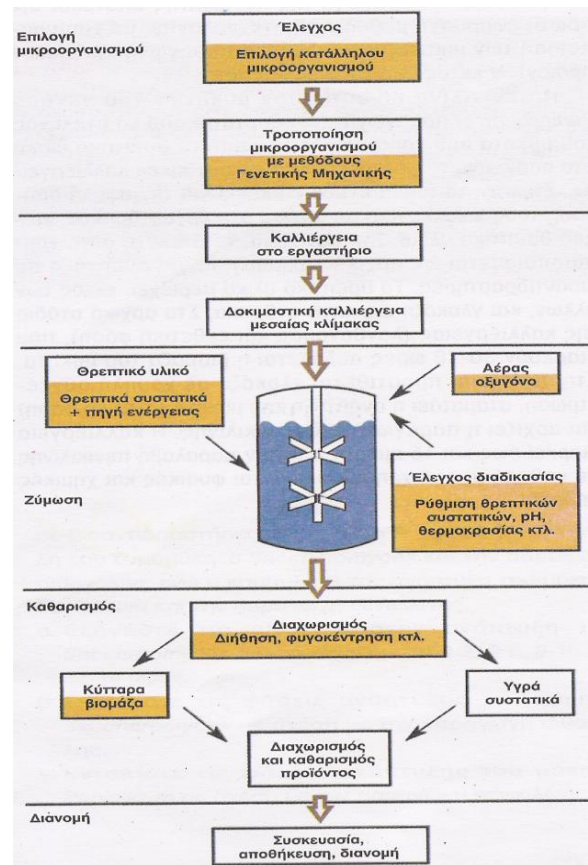
Η διαδοχή των φάσεων είναι συγκεκριμένη όμως η διάρκεια κάθε φάσης διαφέρει ανάλογα με το είδος του μικροοργανισμού. Τα χρήσιμα προϊόντα παράγονται κατά την εκθετική και τη στατική φάση.



➤ **Συνεχής καλλιέργεια:** Σ' αυτόν τον τύπο οι μικροοργανισμοί τροφοδοτούνται συνεχώς με θρεπτικά συστατικά και ταυτόχρονα απομακρύνονται από την καλλιέργεια κύτταρα και άχρηστα προϊόντα.

Τεχνικές καθαρισμού των προϊόντων της ζύμωσης

➤ **Τελική κατεργασία** είναι η διεργασία καθαρισμού του προϊόντος του βιοαντιδραστήρα. Αρχικά διαχωρίζονται τα υγρά από τα στερεά συστατικά (και τα κύτταρα) συνήθως με διήθηση ή φυγοκέντρηση. Το επιθυμητό προϊόν παραλαμβάνεται με κατάλληλες μεθόδους από τα στερεά ή τα υγρά συστατικά όπου βρίσκεται. Τα προϊόντα της ζύμωσης αξιοποιούνται μόνο όταν είναι απόλυτα καθαρά (χωρίς προσμειξίσεις).



Ο *Thermus aquaticus* είναι θερμοφιλό βακτήριο που αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες 80 °C. Χρησιμοποιείται για παραγωγή της DNA πολυμεράσης (Taq), ένζυμο ενεργό μέχρι 95 °C, κατάλληλο για χρήση σε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)