



**ΤΜΗΜΑ ΟΙΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΠΟΤΩΝ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ & ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ**  
**ΖΥΜΩΣΕΩΝ**

**ΤΙΤΛΟΣ:** Τεχνικές ακινητοποίησης Μικροοργανισμών

**ΣΚΟΠΟΣ:**

Η θεματική ενότητα αυτή αποσκοπεί να καταστήσει το σπουδαστή ικανό να κατανοεί τη διαδικασία ακινητοποίησης μικροοργανισμών.

**ΣΤΟΧΟΙ:**

Με την ολοκλήρωση της θεματικής ενότητας ο σπουδαστής θα είναι σε θέση να :

1. γνωρίζει τις κατηγορίες και τους φορείς και τις μεθόδους ακινητοποίησης
2. κατανοεί τα πλεονεκτήματα, τα μειονεκτήματα και τις χρήσεις της ακινητοποίησης

**ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΘΕΜΑΤΙΚΗΣ ΕΝΟΤΗΤΑΣ**

Η ακινητοποίηση έγκειται στον εγκλωβισμό μιας βιολογικά ενεργής οντότητας εντός κατάλληλου υλικού με στόχο την βελτίωση της αποδοτικότητάς του, αύξηση του χρόνου ζωής του και την παραγωγή προϊόντων υψηλού επιπέδου, προσαρμοσμένων στις απαιτήσεις του καταναλωτικού κοινού. Η ακινητοποίηση έχει βρει εφαρμογή σε πολλά πεδία. Γενικά η ακινητοποίηση αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο και προσφέρει λύσεις σε πολλά προβλήματα σε τομείς και βιομηχανίες όπως για παράδειγμα της επιστήμης και τεχνολογίας τροφίμων, της διατροφής, της γεωργίας, κοσμετολογία, επεξεργασίας του νερού, στην φαρμακευτική και τέλος την ιατρική.

Η ακινητοποίηση μπορεί να γίνει με δύο τρόπους, παθητικά ή ενεργητικά.

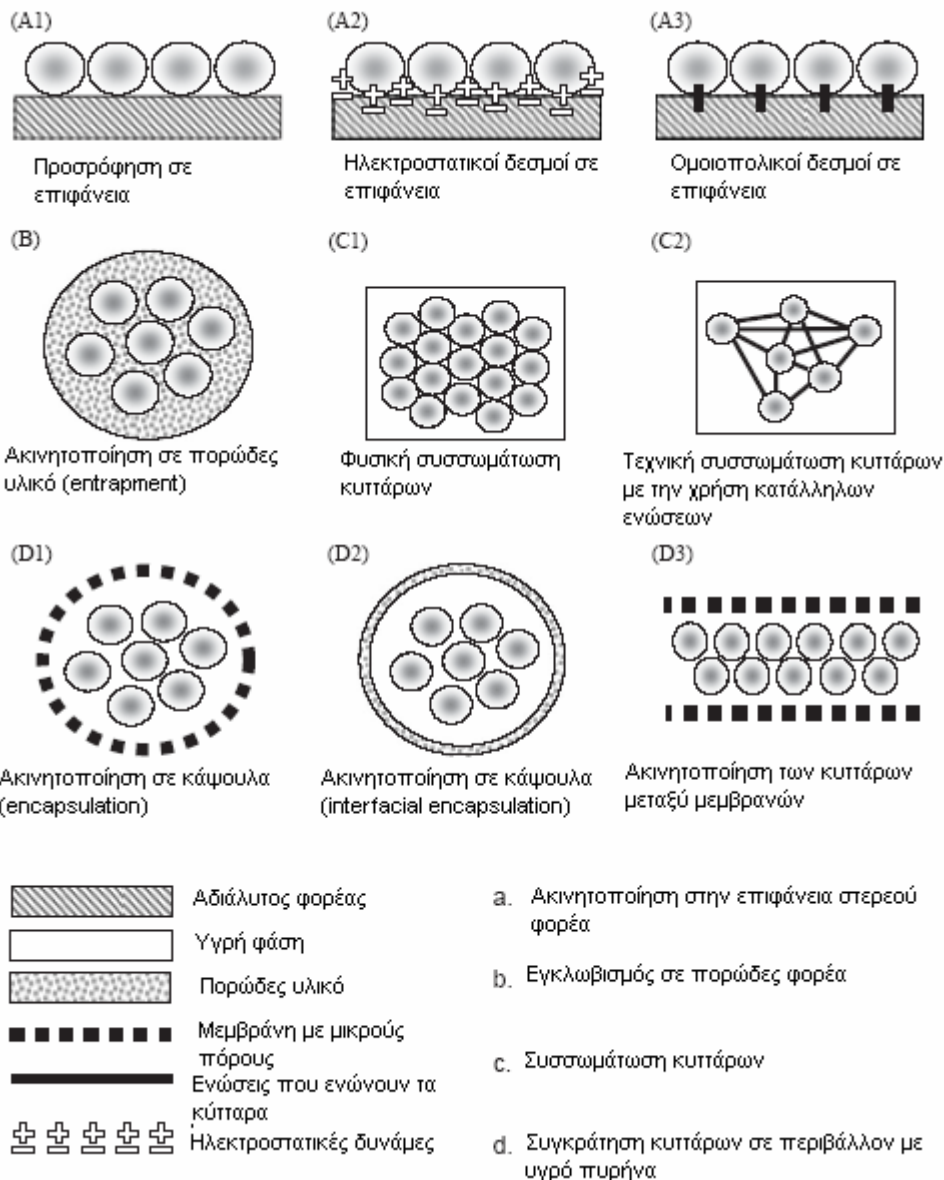
Η παθητική ακινητοποίηση είναι εκείνη που επιτρέπει την προσκόληση του μικροοργανισμού χωρίς την προεπεξεργασία του υποστρώματος ή του μικροοργανισμού ή του θρεπτικού μέσου. Γίνεται σε επιφάνειες αδρανών υλικών, όπως : γυαλί, νάιλον, πλαστικά, ενεργός άνθρακας, περλίτης, κλπ.

Η ενεργητική ακινητοποίηση γίνεται κατόπιν επεξεργασίας του υποστρώματος ή του μικροοργανισμού. Η μέθοδος αναγκάζει το μικροοργανισμό να ακινητοποιηθεί σε υλικά όπως αλγινικό άλας, καραγεννάνες, άγαρ, κ.α.

Υπάρχουν 4 βασικές κατηγορίες ακινητοποίησης κυττάρων και ενζύμων :

- α) Ακινητοποίηση σε επιφάνεια στερεού φορέα
- β) Ακινητοποίηση σε πορώδες υλικό (entrapment)
- γ) Ακινητοποίηση σε συμπλέγματα κυττάρων (cell flocculation)
- δ) Ακινητοποίηση σε περιβάλλον με υγρό πυρήνα (encapsulation)

## Περίληπτικές σημειώσεις



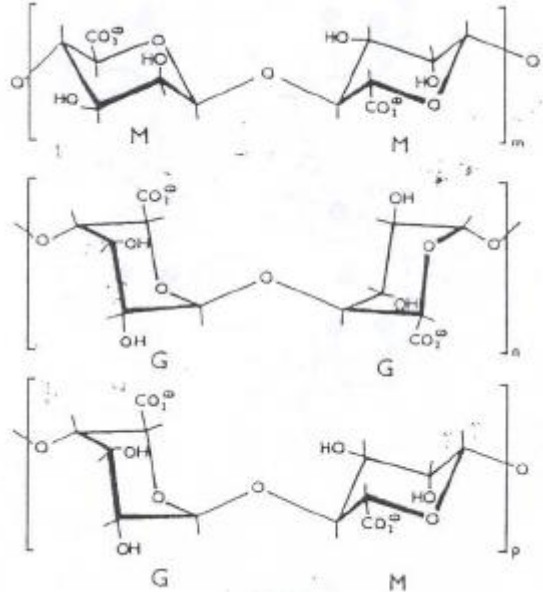
### Ακίνητοποίηση με αλγινικό άλας

Το αλγινικό οξύ και τα άλατα του χρησιμοποιούνται ευρέως στην βιομηχανία λόγω της ιδιαίτερης κολλοειδούς της συμπεριφοράς. Για παράδειγμα χρησιμοποιείται ως γαλακτωματοποιητής, σταθεροποιητής και παράγοντας πήξης στη βιομηχανία των τροφίμων.

Το αλγινικό νάτριο είναι μια ουσία που κατατάσσεται ως GRAS (Generally Recognized as Safe ) από τον FDA (US Food and Drug Administration) με αποτέλεσμα το αλγινικό νάτριο (όχι όμως άλλα άλατα του αλγινικού όπως για παράδειγμα αυτό του μαγνησίου) να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή τροφίμων. Τα αλγινικά άλατα προέρχονται από το αλγινικό οξύ που λαμβάνεται από τις καφέ άλγες όπου βρίσκεται στα κυτταρικά τοιχώματα και ως ενδοκυτταρικό συστατικό. Το αλγινικό είναι το πολυμερές που βρίσκεται σε μεγαλύτερη ποσότητα στο θαλάσσιο περιβάλλον, ενώ μετά την κυτταρίνη είναι το πιο συχνά ευρισκόμενο βιοπολυμερές στον κόσμο.

Το αλγινικό οξύ είναι γραμμικό, μη διακλαδιζόμενο πολυμερές που συντίθεται από δύο μονοσακχαρίτες τους 1,4-(β-D)-μανουρονικό οξύ (M) και 1,4-(α-L)-γουλουρονικό οξύ (G). Οι μονοσακχαρίτες αυτοί βρίσκονται σε διαφορετικές αναλογίες στο αλγινικό οξύ, ανάλογα με την πηγή προέλευσής του (θαλάσσια φύκη, φυτικό πλαγκτόν κ.α). Το αλγινικό οξύ και τα άλατά του είναι πολυσακχαρίτες που περιέχουν ομοπολυμερικά 'block' MM... και GG... αλλά και ανάμικτα 'block' που περιέχουν ακανόνιστες σειρές μονάδων μανουρονικού και γουλουρονικού οξέος.

Παράδειγμα 'block' μανουρονικού – μανουρονικού οξέος, γουλουρονικού – γουλουρονικού οξέος και γουλουρονικού - μανουρονικού οξέος φαίνεται στο παρακάτω σχήμα α.

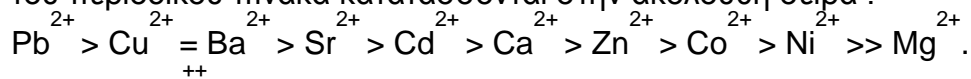


α. Δομή μανουρονικών, γουλουρονικών και ανάμικτων Block αλάτων αλγινικού (Clark & Ross-Murphy, 1987; Kennedy & Cabral, 1987)

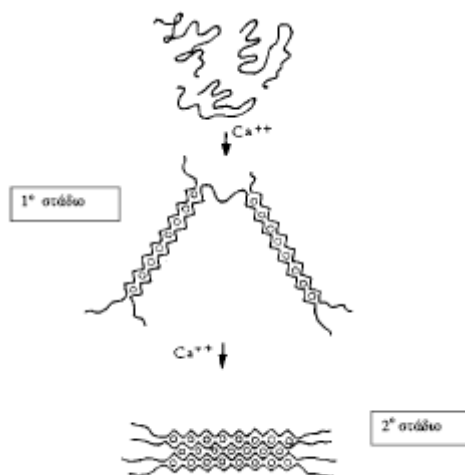
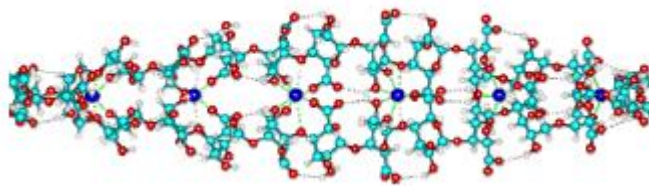
Πρέπει να τονιστεί ότι η αναλογία γουλουρονικού/μανουρονικού διαφέρει από πηγή σε πηγή, από την εποχή παραλαβής και διαφέρει ακόμα σε μια μεμονωμένη άλγα.

Ο σχηματισμός του gel πραγματοποιείται όταν σε διάλυμα αλγινικού νατρίου εισαχθούν δισθενή κατιόντα όπως για παράδειγμα ιόντα ασβεστίου. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι κάθε μονάδα γουλουρονικού ή μανουρονικού οξέος περιέχει μια καρβοξυλομάδα η οποία σε ουδέτερο και όξινο pH είναι αρνητικά φορτισμένη καθιστώντας το αλγινικό ένα αρνητικά φορτισμένο πολυηλεκτρολύτη. Με την προσθήκη λοιπόν ενός δισθενούς κατιόντος για παράδειγμα  $Ca^{++}$  πραγματοποιείται αντικατάσταση των ιόντων  $Na^+$  από ιόντα  $Ca^{++}$  που οδηγεί στο σχηματισμό του gel του οποίου τα ρεολογικά χαρακτηριστικά, το πορώδες και γενικά η μορφολογία του (για παράδειγμα οι εσωτερικές κοιλότητες που παρουσιάζει) εξαρτώνται από τον τύπο του αλγινικού άλατος δηλαδή την αναλογία M/G και το μοριακό του βάρος, την συγκέντρωση του αλγινικού άλατος, την συγκέντρωση του κατιόντος και τον τρόπο εισαγωγής του, την θερμοκρασία κατά την οποία σχηματίζεται το gel, πιθανές προσμίξεις άλλων ουσιών που μπορούν να επηρεάσουν την διαδικασία. Επίσης το είδος του κατιόντος που χρησιμοποιείται οδηγεί και σε διαφορετική δομή του δικτύου του παραγόμενου gel. Πρέπει να τονιστεί ότι τα

διάφορα κατιόντα δημιουργούν gel με διαφορετική αντοχή. Σύμφωνα με την ικανότητα τους να σχηματίζουν ισχυρά gel τα κατιόντα της δεύτερης ομάδας του περιοδικού πίνακα κατατάσσονται στην ακόλουθη σειρά :



Τα ιόντα  $\text{Ca}^{++}$  ενώνονται μόνο με τα block του γουλουρονικού οξέος. Τα block του μανουρονικού οξέος δεν συνδέονται με τα ιόντα του ασβεστίου. Ο σχηματισμός του gel του αλγινικού ασβεστίου πραγματοποιείται σε δύο στάδια. Κατά το πρώτο στάδιο έχουμε ένα διμερισμό κατά μήκος των αλυσίδων του πολυμερούς και εν συνεχεία έχουμε συσσωμάτωση των πολυμερικών αλυσίδων σε μορφή δίπτυχης κορδέλας (σχήμα.β.). Δηλαδή τα ιόντα  $\text{Ca}^{++}$  που δεσμεύονται σ' αυτή τη διαδικασία τοποθετούνται μέσα στις ηλεκτραρνητικές κοιλότητες (λόγω των ατόμων οξυγόνου των καρβυλικών ομάδων, που συμμετέχουν σ' αυτή τη χημική ένωση) σαν αυγά μέσα σε κουτί αυγών. Αρχικά έχουμε δηλαδή ένωση δύο αλυσίδων η μια απέναντι στην άλλη, αλυσίδων αλάτων του γουλουρονικού οξέος που προνομιακά συνδέονται με τα δισθενή κατιόντα, συνήθως  $\text{Ca}^{++}$ , σε σχέση με τα blocks του μανουρονικού οξέος που παρουσιάζουν μια σταθερή πολυηλεκτρολυτική συμπεριφορά. Στη συνέχεια, υψηλότερες συσσωματώσεις, φαίνεται ότι συμβαίνουν κάτω από την επίδραση υψηλών συγκεντρώσεων  $\text{Ca}^{++}$ . Έτσι έχουμε ένα τρισδιάστατο αδρανές πολυμερές δίκτυο με σχετικά πλατιά διασυνδεδεμένα εμβόλιμα διαστήματα, το gel του αλγινικού ασβεστίου.

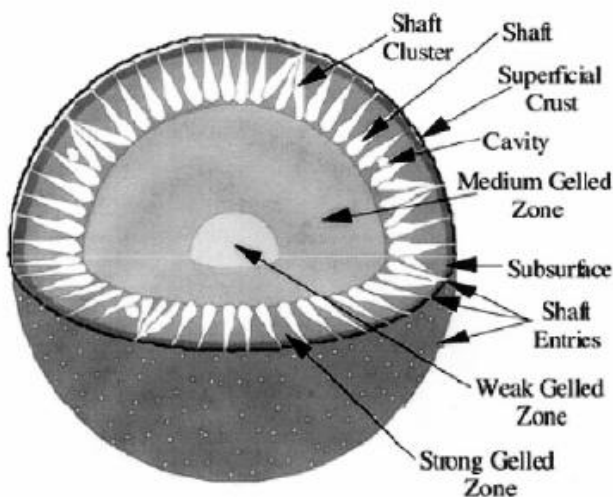


β. Σχηματισμός αλγινικού τζελ σε δύο στάδια (Πηγη Clark & Ross-Murphy 1987).

## Σκλήρυνση του gel (Hardening ή Curing)

Τα gel αλγινικού ασβεστίου μετά την παρασκευή τους συνήθως εμβαπτίζονται ξανά σε διάλυμα  $\text{CaCl}_2$ . Η διαδικασία αυτή έχει ως στόχο την δέσμευση των εναπομεινάντων block του γουλουρονικού οξέος με αποτέλεσμα τη μείωση του όγκου των παραγόμενων σφαιριδίων, την αύξηση της μηχανικής και χημικής τους αντοχής. Παρατηρείται μείωση του όγκου των σφαιριδίων μετά από 24 ώρες curing που φθάνει το 35%. Η μείωση του όγκου των σφαιριδίων κατά την εμβάπτισή τους σε διάλυμα χλωριούχου ασβεστίου λαμβάνει χώρα κυρίως κατά τα 5 πρώτα λεπτά της παραμονής των σφαιριδίων στο διάλυμα. Μετά από λίγες μέρες παραμονής στο ίδιο διάλυμα  $\text{CaCl}_2$  παρατήρησαν ότι υπάρχει επιπλέον συρρίκνωση των σφαιριδίων η οποία όμως αντιπροσωπεύει μόνο το 1-2% της διαμέτρου που λήφθηκε μετά από 5 λεπτά παραμονής στο διάλυμα  $\text{CaCl}_2$ . Επίσης έχει βρεθεί ότι η ταχύτητα 'κορεσμού' των σφαιριδίων του αλγινικού νατρίου σε ασβέστιο αυξάνει με την μείωση της συγκέντρωσης του αλγινικού νατρίου και την αύξηση της συγκέντρωσης των κατιόντων ασβεστίου, αντίθετα μικρότερη ταχύτητα επιτυγχάνεται με αύξηση της συγκέντρωσης του αλγινικού νατρίου και μείωση της συγκέντρωσης των κατιόντων ασβεστίου. Σύμφωνα με τα παραπάνω γίνεται κατανοητό ότι ο χρόνος που απαιτείται για τον αρχικό σχηματισμό του gel (gelation time) όσο και ο χρόνος που απαιτείται για την αύξηση της αντοχής μέσω της δέσμευσης των εναπομεινάντων block του γουλουρονικού οξέος (hardening) εξαρτώνται από πλήθος παραγόντων οι κυριότερες των οποίων είναι :

- α) Η συγκέντρωση του αλγινικού νατρίου
- β) Η συγκέντρωση του χλωριούχου ασβεστίου
- γ) Η αναλογία γουλουρονικού/μανουρονικό οξέος του αλγινικού άλατος και το μοριακό του βάρος
- δ) Η διάμετρος των σφαιριδίων



Δομή σφαιριδίου αλγινικού ασβεστίου (Πηγή Bienaime et al.,2003)

## ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΜΕΡΟΣ

### Ενυδάτωση ζυμών

Οι ζύμες που χρησιμοποιούμε περιέχουν  $2 \cdot 10^{10}$  ζώντα κύτταρα ανά 1g (ο συνολικός πληθυσμός είναι  $2,5 \cdot 10^{10}$  κύτταρα ανά g). Η ενυδάτωση και η ανάμιξη για κάθε μέθοδο γίνεται με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε ο πληθυσμός των κυττάρων που βρίσκεται στο διάλυμα που θα σχηματίσει το gel να ανέρχεται σε  $2 \cdot 10^8$  κύτταρα ανά 1ml φορέα ακινητοποίησης. Για τον σχηματισμό του gel χρησιμοποιείται βελόνα (πλαστική) της οποίας μετράται ο όγκος κάθε σταγόνας που σχηματίζει. Βρίσκουμε ότι οι 100 σταγόνες διαλύματος αλγινικού νατρίου 1,92%(w/v) έχουν όγκο 1,35ml. θεωρούμε ότι και τα διαλύματα του αλγινικού νατρίου 2,5%(w/v), πολύ-αιθυλενο-γλυκόλης 20% , καραγενάνης 2%(w/v) και xanthan gum 0,3% έχουν παρόμοια συμπεριφορά. Χρησιμοποιούμε δοκιμαστικούς σωλήνες στους οποίους τοποθετούμε 10ml θρεπτικό υπόστρωμα με 25, 50 και 100g/l γλυκόζη. Σε κάθε σωλήνα τοποθετούνται 10 σφαιρίδια άρα:

100 σφαιρίδια 1,35ml

10 σφαιρίδια 0,135ml

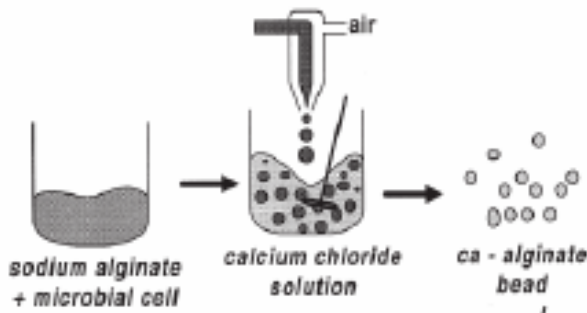
Επομένως τα 100ml  $2 \cdot 10^{10}$  κύτταρα  
0,135ml X;

$X = 2 \cdot 10^7$  κύτταρα ζυμών / 10ml υποστρώματος

Χρειαζόμαστε επομένως για κάθε μέθοδο να προσθέσουμε  $2 \cdot 10^7$  κύτταρα ζυμών / 10ml υποστρώματος

### Μονή ακινητοποίηση

Σε διάλυμα αλγινικού νατρίου 2,5%(w/v) αναμιγνύονται ενυδατωμένες ζύμες. Η ενυδάτωση πραγματοποιείται με προσθήκη 1g ζυμών σε 10ml νερού βρύσης. Μετά γίνεται ανάμιξη 10ml νερού με 90ml αλγινικού νατρίου. Οι ζύμες που χρησιμοποιούμε περιέχουν  $2 \cdot 10^{10}$  ζώντα κύτταρα ανά 1g. Επομένως ο πληθυσμός των κυττάρων που βρίσκεται στο αλγινικό ανέρχεται σε  $2 \cdot 10^8$ . Στην συνέχεια με την βοήθεια της σύριγγας προστίθενται σταγόνες σε διάλυμα  $\text{CaCl}_2$  2%(w/v) το οποίο βρίσκεται υπό ανάδευση. Τα σχηματισθέντα σφαιρίδια αφήνονται κατά προσέγγιση στο διάλυμα αυτό για περίπου 15 λεπτά και μετά μεταφέρονται σε διάλυμα  $\text{CaCl}_2$  0,2%(w/v).



## ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ – ΑΠΑΝΤΗΣΕΙΣ

1. Ποια είναι τα πλεονεκτήματα και ποια τα μειονεκτήματα της χρήσης ακινητοποιημένων ζυμών για την παραγωγή οίνου ? (σε βιομηχανική κλίμακα)

Πλεονεκτήματα

Ευκολία χρήσης

Καλύτερος έλεγχος της ζύμωσης (μεγαλύτερες ταχύτητες και αποδόσεις ζύμωσης)

Προστασία των μικροοργανισμών από αντίξοους παράγοντες

Δυνατότητα Επαναχρησιμοποίηση

Εύκολη απομάκρυνση των μικροοργανισμών - απολάσπωση

Μειονεκτήματα

Ειδικευμένο προσωπικό

Κόστος αγοράς

2. Ποιες είναι οι χρήσεις των ακινητοποιημένων μικροοργανισμών στην οινολογία ?

Χρήση *Saccharomyces cerevisiae* για την επανεκκίνηση της ζύμωσης αν έχει σταματήσει

Δεύτερη ζύμωση των αφρωδών οίνων

Χρήση *Schizosaccharomyces pombe* για την μείωση της οξύτητας

Χρήση Γαλακτικών βακτηρίων για την μείωση της οξύτητας (μηλικογαλακτική ζύμωση)

Παραγωγή ξυδιού με οξικά βακτήρια

3. Τι είναι παθητική και τι ενεργητική ακινητοποίηση αναφέρατε παραδείγματα φορέων ακινητοποίησης για κάθε τύπο ?

Παθητική ακινητοποίηση είναι εκείνη που επιτρέπει την προσκόλληση του μικροοργανισμού χωρίς επεξεργασία του υποστρώματος ή του μικροοργανισμού, ή του θρεπτικού μέσου.

Γίνεται σε επιφάνειες αδρανών υλικών όπως: γυαλί, νάυλον, πλαστικά, ενεργός άνθρακας, περλίτης.

Ενεργητική ακινητοποίηση γίνεται κατόπιν επεξεργασίας του υποστρώματος ή του οργανισμού. Η μέθοδος αναγκάζει τον μικροοργανισμό να ακινητοποιηθεί σε υλικά όπως: αλγινικό άλας, कारागुननननन, άγαρ, κλπ.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Νεραντζής Η. Σημειώσεις εργαστηρίου Γενικής Μικροβιολογίας. 1997. ΤΕΙ Αθήνας, ΣΤΕΤΡΟΔ, Τμήμα Οινολογίας και Τεχνολογίας Ποτών.
2. Νεραντζής Ηλίας (2002) « Μικροβιακή Τεχνολογία » Σημειώσεις ΤΕΙ Αθήνας
3. Veliky, I. 1994. Introduction. In I. Veliky and R. McLean (ed.), Immobilized Biosystems theory and practical applications. Blackie Academic & Professional, Glasgow.
4. Fleet G.H. The microorganismes of winemaking - Isolation, enumeration and identification. In Wine Microbiology and Biotechnology. Ed. by G.H. Fleet. 1992, 1-26, Harwood Academic Pub., Switzerland.
5. BAILLEY J.E., OLLIS D.F. Biochemical engineering fundamentals. 1986, 2<sup>nd</sup> edition, McGraw-Hill, Singapore.