



# Μικροβιακές καλλιέργειες

Ο ρυθμός ανάπτυξης ενός πληθυσμού μικροοργανισμών καθορίζεται από το χρόνο διπλασιασμού. Οι παράγοντες που επηρεάζουν το χρόνο διπλασιασμού είναι η διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών, το pH, το O<sub>2</sub> και η θερμοκρασία.

# Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη μιας καλλιέργειας

- **Θρεπτικά συστατικά:** άνθρακας ( $\text{CO}_2$ ), άζωτο (αμμωνιακά, νιτρικά ιόντα), μεταλλικά ιόντα, νερό.
- **pH:** συνήθως 6-9, με εξαιρέσεις, όπως το *Lactobacillus* 4-5.
- **Παρουσία ή απουσία  $\text{O}_2$ :** υποχρεωτικά αερόβιοι (*Mycobacterium*), προαιρετικά αερόβιοι (μύκητες), υποχρεωτικά αναερόβιοι (*Clostridium*).
- **Θερμοκρασία:** Ψυχρόφιλα (-5 έως 20 °C με άριστη 13°C), μεσόφιλα (18-48 °C με άριστη 39 °C), θερμόφιλα (40- 68 °C με άριστη 60 °C), υπερθερμόφιλα (66-98 °C και 80 -110 °C με άριστη 88 °C και 105 °C). Οι περισσότεροι οργανισμοί αναπτύσσονται σε θερμοκρασία 20 – 45 °C, ενώ οι παθογόνοι σε θερμοκρασία 37 °C.

## Ελάχιστοι χρόνοι γενιάς σε σύμπλοκα θρεπτικά μέσα

	<b>T °C</b>	<b>Χρόνος γενιάς (h)</b>
<i>Vibrio natriegens</i>	<b>37</b>	<b>0,16</b>
<i>B. stearothermophilus</i>	<b>60</b>	<b>0,14</b>
<i>E. coli</i>	<b>40</b>	<b>0,38</b>
<i>B. subtilis</i>	<b>40</b>	<b>0,43</b>
<i>Pseudomonas putida</i>	<b>30</b>	<b>0,75</b>
<i>Vibrio marinus</i>	<b>15</b>	<b>1,35</b>
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	<b>30</b>	<b>2,2</b>
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<b>37</b>	<b>18</b>
<i>Nitrobacter agilis</i>	<b>27</b>	<b>~20</b>

# Διαδικασία καλλιέργειας μικροοργανισμών (1)

Για την καλλιέργεια βακτηρίων και μυκήτων ήταν πρωτοπόρος ο Louis Pasteur.

- Οι μικροοργανισμοί μπορούν να αναπτυχθούν στο εργαστήριο και σε μεγάλη κλίμακα στις βιομηχανικές μονάδες κάτω από αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες καλλιέργειας.
- Τα τεχνητά θρεπτικά μέσα πρέπει να περιέχουν πηγή άνθρακα, αζώτου και ιόντα.
- Τα θρεπτικά μέσα μπορεί να είναι υγρά ή στερεά.

# Διαδικασία καλλιέργειας μικροοργανισμών (2)

- ✓ Τα στερεά θρεπτικά μέσα παρασκευάζονται με ανάμιξη του υγρού θρεπτικού υλικού με ένα πολυσακχαρίτη που προέρχεται από τα φύκη, το **άγαρ**. Το άγαρ είναι ρευστό σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από 45 °C και στερεοποιείται σε μικρότερες θερμοκρασίες.
- ✓ Μια καλλιέργεια ξεκινάει με την προσθήκη μικρής ποσότητας κυττάρων στο θρεπτικό υλικό, μια διαδικασία που ονομάζεται **εμβολιασμός**.

# Χρήση μικροοργανισμών για την παραγωγή προϊόντων (1)

Προϊόν	Οργανισμός	Χρήση
Αιθανόλη	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Βιομηχανικοί διαλύτες, ποτά
Γλυκερόλη	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Παραγωγή εκρηκτικών
Γαλακτικό οξύ	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Τρόφιμα και φαρμακευτικά
Ακετόνη και Βουτανόλη	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Διαλύτες
α-αμυλάση	<i>Bacillus subtilis</i>	Υδρόλυση αμύλου

# Χρήση μικροοργανισμών για την παραγωγή προϊόντων (2)

- ✓ Βιομηχανίες τροφίμων και ποτών που περιλαμβάνουν ζύμωση (π.χ. τυρί, ξύδι, γιαούρτι, αλκοολούχα ποτά)
- ✓ Βιομηχανίες παραγωγής ενζύμων, αιθυλικής αλκοόλης και άλλων διαλυτών, κιτρικού οξέος, βιταμινών, μονοκυτταρικής πρωτεΐνης για ζωοτροφές, αντιβιοτικών και άλλων φαρμάκων
- ✓ Βιομηχανίες παραγωγής ενέργειας από ανακυκλώσιμες ύλες (παραγωγή αιθανόλης ή/και βιοαερίου από κυτταρινούχες πρώτες ύλες)
- ✓ Βιολογικοί καθαρισμοί υγρών και στερεών αποβλήτων
- ✓ Βιομηχανίες εξόρυξης πετρελαίου και δέσμευσης αζώτου

# Μικροοργανισμοί και παραγωγή οίνου

## Ουσίες, ουσίες...

### Μεταμπισουλφίτ

- ⊕ Αντιοξειδωτικό, καλή προστασία απέναντι σε μικροοργανισμούς
- ➔ Η ουσία διαλύεται σε ζεστό νερό

### Τρυγικό/Κιτρικό οξύ

- ⊕ Αύξηση οξύτητας
- ➔ Διάλυση σε ζεστό νερό

### Ανθρακικό κάλιο /Ασβέστιο

- ⊕ Μείωση Οξύτητας
- ➔ Διάλυση σε ζεστό νερό

### Μπεντονίτης

- ⊕ Διαύγαση και απομάκρυνση πρωτεϊνών
- ➔ Προστίθεται βαθμιαία με συνεχή ανάδευση

### Ουσία

- ⊕ Χρησιμότητα
- ➔ Τρόπος Εισαγωγής

### Καζεΐνη

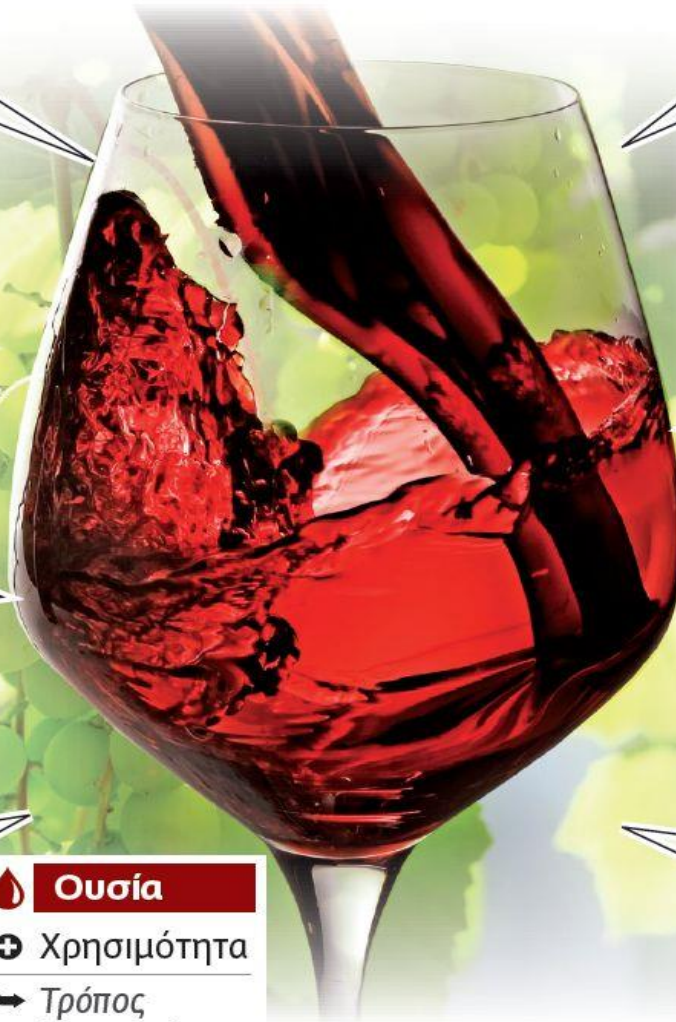
- ⊕ Απομάκρυνση φαινολών και προστασία από οξειδώσεις
- ➔ Διάλυση σε δεκαπλάσιο χλιαρό νερό

### PVPP(Poly-vinyl-polyglycolidone)

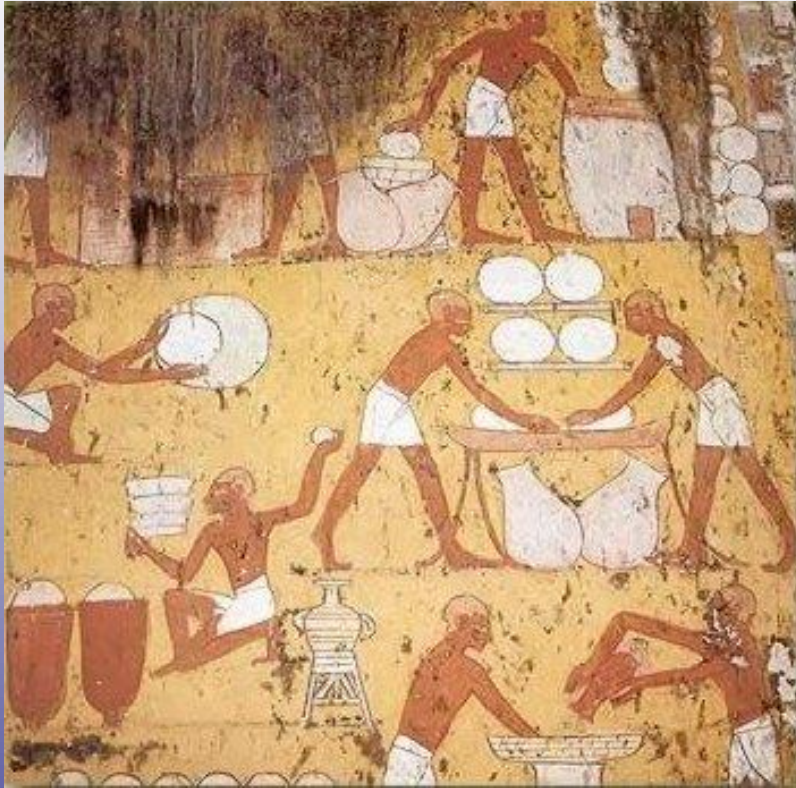
- ⊕ Δεσμεύει τις κατεχίνες και κυρίως στα λευκά κρασιά αφαιρεί την πικράδα
- ➔ Διαλύεται σε νερό αλλά πρέπει να γίνεται προσεκτική και περιορισμένη χρήση

### Ενεργός άνθρακας

- ⊕ Δίνει καλό χρώμα στο κρασί αλλά φιλτράρει τα πάντα. Είναι χρήσιμος σε κρασί που υπήρχαν πολλά μουχλιασμένα ή και σάπια σταφύλια



# Μικροοργανισμοί και παραγωγή ψωμιού



# Μικροοργανισμοί και παραγωγή τυριού

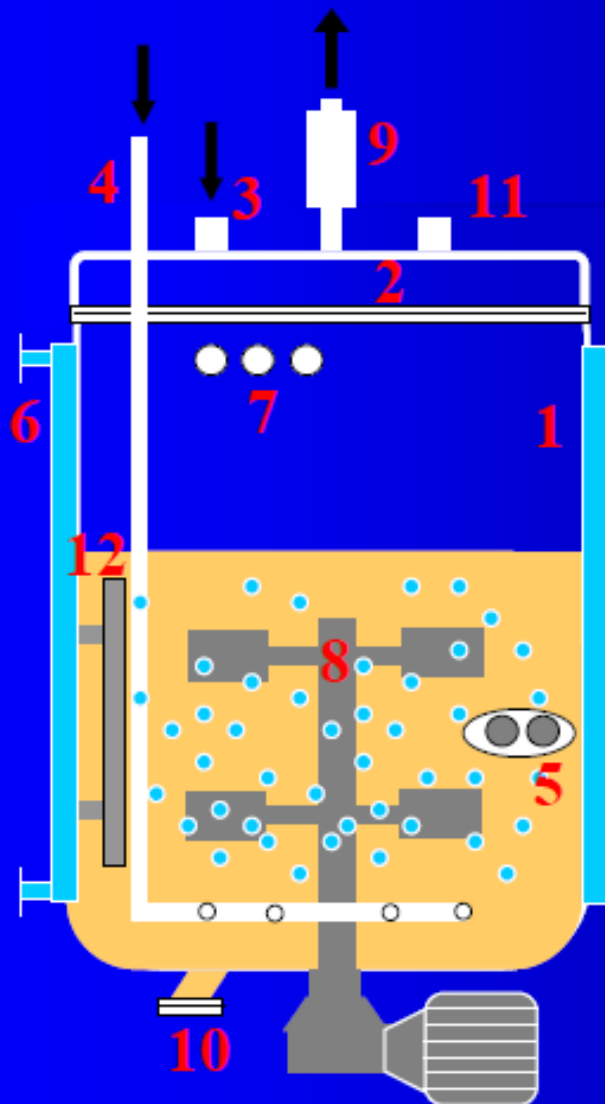


# Βιοαντιδραστήρες

## Ταξινόμηση με βάση τον τρόπο λειτουργίας

- ✓ Διαλείποντος έργου
- ✓ Συνεχούς έργου
- ✓ Ημιδιαλείποντος έργου

# Ένας τυπικός ζυμωτήρας (πλήρους αναμίξεως)



1. Δοχείο ζύμωσης
2. Μετακινούμενο σκέπασμα
3. Είσοδος υποστρώματος-εμβολίου
4. Σύστημα εισόδου αέρα
5. Θυρίδες αισθητηρίων
6. Μανδύας ελέγχου T
7. Θυρίδες εισόδου (οξύ, βάση)
8. Αναδευτήρας
9. Έξοδος αέρα
10. Θυρίδα εξόδου
11. Βαλβίδα εκτόνωσης πίεσης
12. Πτερύγια εκτροπής ροής (baffles)

**Βιοαντιδραστήρες είναι μεγάλες συσκευές στις οποίες επιτελούνται βιομηχανικές διεργασίες υλικών με τη δράση ζωντανών κυττάρων (π.χ. μικροοργανισμών) ή ενζύμων.**

**Οι βιοαντιδραστήρες διακρίνονται σε:**

- ✓ σε εκείνους όπου γίνονται ζυμώσεις με ζωντανά κύτταρα**
- ✓ και σε αυτούς που επιτελούνται διεργασίες με χρήση βιολογικών συστημάτων, π.χ. Ένζυμα.**

# Τυπικές λειτουργίες ζυμωτήρα

## Βασικές λειτουργίες

Εμποδίζει την ανταλλαγή μικροοργανισμών ανάμεσα στο χώρο της ζύμωσης και το περιβάλλον (μολύνσεις)

Διασφαλίζει την τροφοδότηση των κυττάρων με τα απαραίτητα για την επιβίωσή τους συστατικά

Διατηρεί τις κρίσιμες μεταβλητές του περιβάλλοντος των κυττάρων στο επιθυμητό επίπεδο (T, pH)

## Άλλες λειτουργίες

Επιτρέπει την παρακολούθηση ενδεικτικών για την πορεία της διεργασίας παραμέτρων

Εγγυάται την ασφάλεια των χειριστών κατά τη διάρκεια λειτουργίας της συσκευής

## Κρίσιμες παράμετροι

- Αποστείρωση
- Μεταφορά O<sub>2</sub>
- Μεταφορά θερμότητας
- Ανάδευση
- Ρύθμιση pH
- Αντιμετώπιση αφρισμού

# Διαδικασία αποστείρωσης

Αποστείρωση: Καταστροφή ή απομάκρυνση όλων των μικροοργανισμών που είναι δυνατό να έρθουν σε επαφή με τα θρεπτικά συστατικά ή τον εξοπλισμό μιας διεργασίας.

- ✓ Παρεμπόδιση ανάπτυξης του παραγωγού στελέχους από τοξίνες
- ✓ Μείωση της απόδοσης της διεργασίας λόγω κατανάλωσης υποστρωμάτων ή αποικοδόμησης του προϊόντος από ένζυμα
- ✓ Αρνητική επίδραση στη διαδικασία ανάκτησης των προϊόντων

Προβλήματα από την παρουσία ανεπιθύμητων μικροοργανισμών

Αντιμετώπιση αφρισμού

Ανάδευση

Ρύθμιση pH

# Τύποι καλλιέργειών

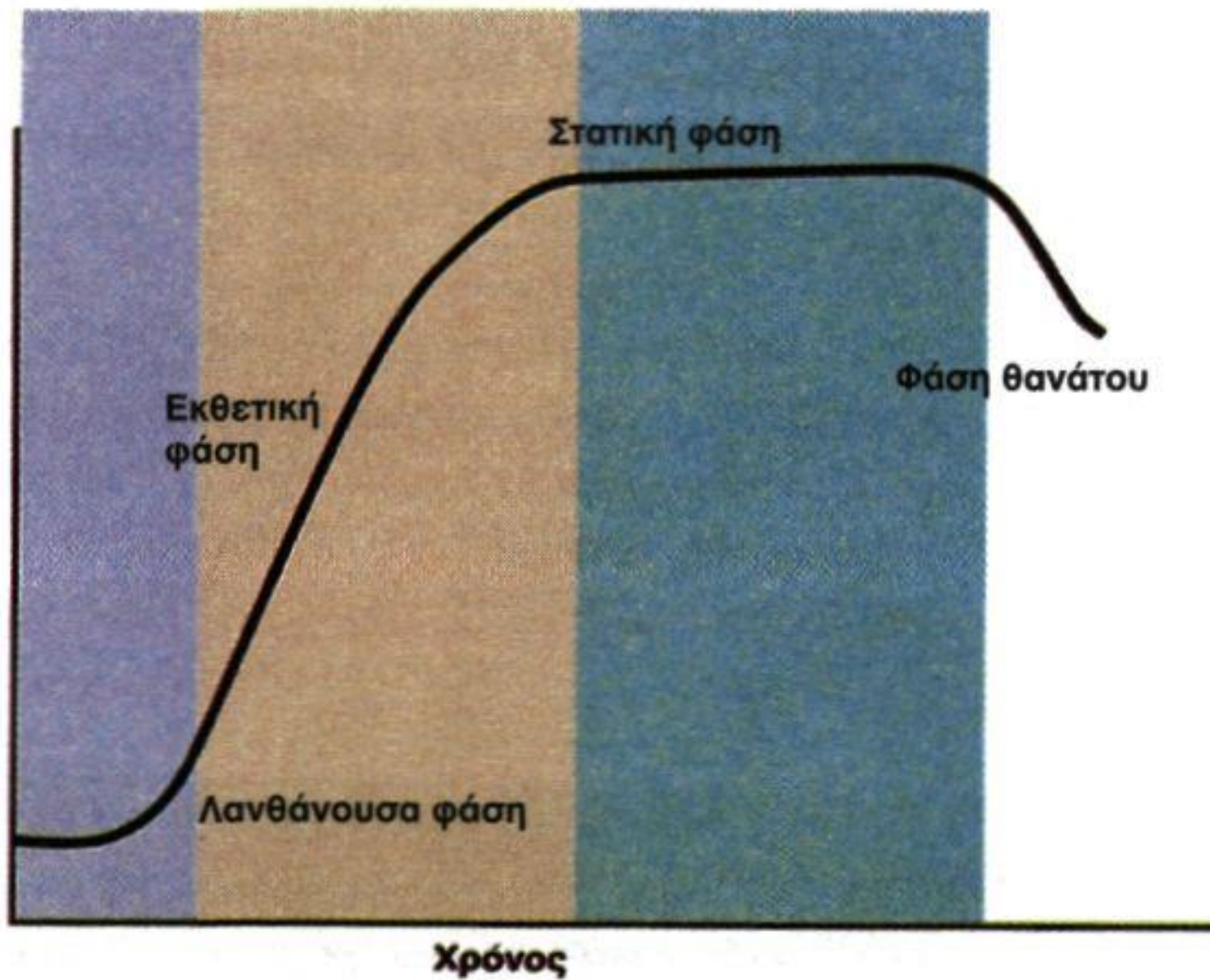
Δύο τρόποι ζύμωσης η κλειστή και η συνεχής καλλιέργεια.

**Κλειστή καλλιέργεια:** εμβολιασμός με αρχική καλλιέργεια μικροοργανισμών σε ορισμένη ποσότητα θρεπτικού υλικού. Η καλλιέργεια συνεχίζεται έως την παραγωγή του επιθυμητού προϊόντος. Οι φάσεις ανάπτυξης είναι η λανθάνουσα, η εκθετική, η στατική και η φάση θανάτου.

Η διαδοχή των φάσεων είναι συγκεκριμένη, η διάρκεια κάθε φάσης διαφέρει ανάλογα με το είδος του μικροοργανισμού. Τα επιθυμητά προϊόντα παράγονται κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης ή της στατικής φάσης ανάπτυξης του μικροοργανισμού.

**Συνεχής καλλιέργεια:** Γίνεται συνεχής τροφοδότηση με θρεπτικά συστατικά, ενώ ταυτόχρονα απομακρύνονται κύτταρα και άχρηστα προϊόντα.

Log<sub>10</sub> αριθμού μικροοργανισμών



# Διαδικασία καθαρισμού και απομόνωσης των μικροβιακών προϊόντων

- ✓ Ο καθαρισμός του προϊόντος που παραλαμβάνεται από το βιοαντιδραστήρα.
- ✓ Αρχικά γίνεται διαχωρισμός των υγρών από τα στερεά συστατικά και τα κύτταρα, συνήθως με **διήθηση ή φυγοκέντρηση**.
- ✓ Το επιθυμητό προϊόν μπορεί να βρίσκεται στα υγρά ή στα στερεά συστατικά, από όπου παραλαμβάνεται με κατάλληλες μεθόδους.

# Εφαρμογές χρήσης μικροοργανισμών

- **Bacillus thuringiensis**: Μικροβιακά εντομοκτόνα
- **Lactobacillus sp**: Αρχικές καλλιέργειες για τη ζύμωση γαλακτοκομικών προϊόντων.
- **Streptococcus cremoris**: βιομηχανοποίηση γαλακτοκομικών προϊόντων
- **Penicillium roqueforti**: Εμβολιάσματα για την παραγωγή τυριών
- **Rhizobium sp.:** Εμβολιάσματα που προάγουν την καθήλωση του αζώτου
- **Pseudomonas syringae**: Δημιουργία τεχνητού χιονιού. Μεταλλαγμένα στελέχη για προστασία των φυτών από τους παγετούς.

# Πρωτογενείς και δευτερογενείς μεταβολίτες (1)

Οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία για να παράγουν μια μεγάλη ποικιλία ενώσεων που διακρίνονται σε:

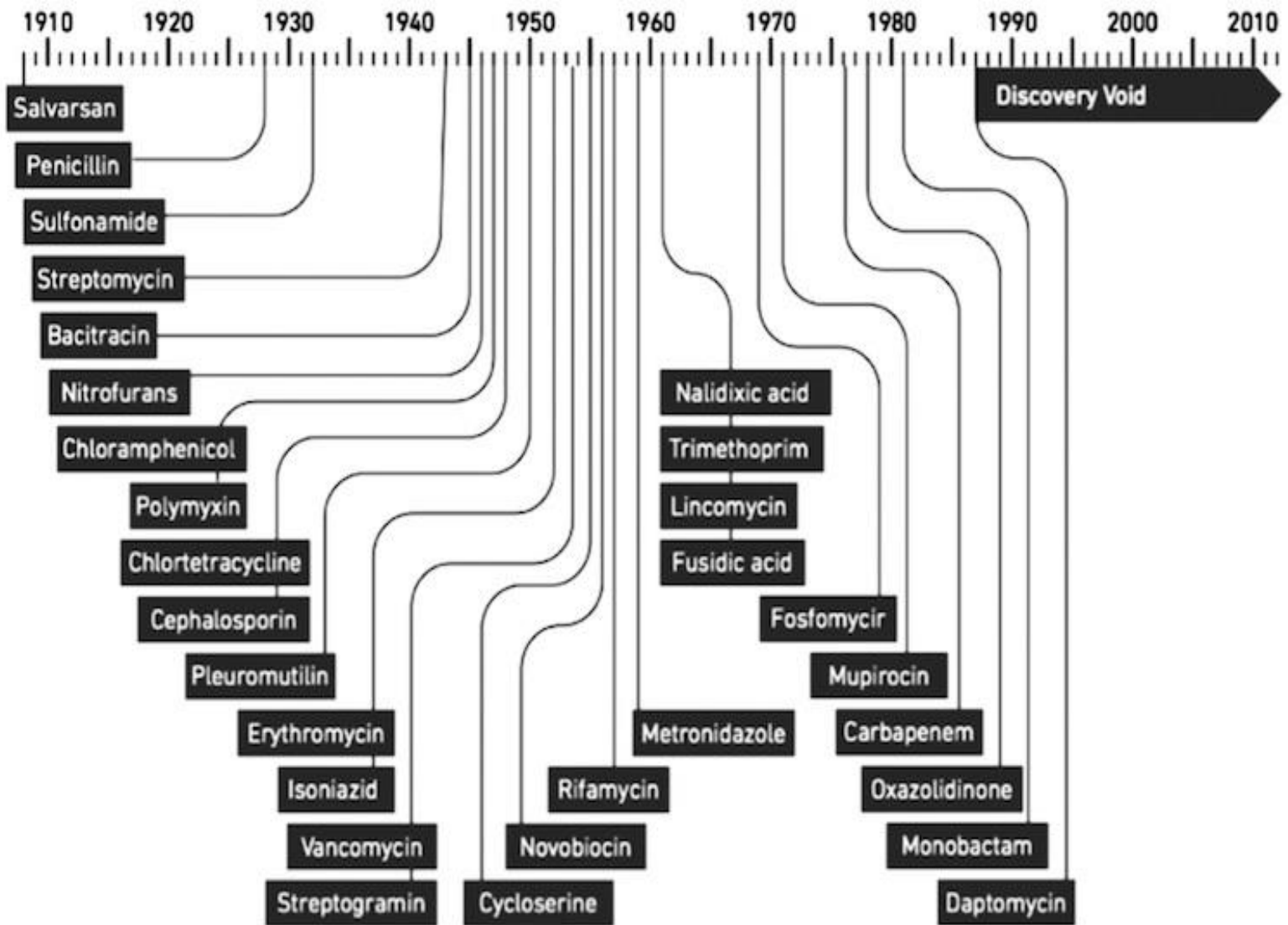
- ◆ Πρωτογενείς μεταβολίτες, οι οποίοι παράγονται κατά τη φάση ανάπτυξης (λογαριθμική φάση ) των μικροοργανισμών
- ◆ Δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται κατά τη στατική ή φάση στασιμότητας των μικροοργανισμών

# Πρωτογενείς και δευτερογενείς μεταβολίτες (2)

- ✓ Οι δευτερογενείς μεταβολίτες είναι μόρια που συνθέτονται από μικροοργανισμούς κατά την τελευταία φάση ανάπτυξής τους, δηλ. στη φάση στασιμότητας.
- ✓ Οι δευτερογενείς μεταβολίτες δεν απαιτούνται για την ανάπτυξη και η πραγματική τους λειτουργία δεν είναι πλήρως γνωστή.
- ✓ Οι πιο γνωστοί δευτερογενείς μεταβολίτες είναι τα αντιβιοτικά που παρεμποδίζουν την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών, προσδίδοντας οικολογικό πλεονέκτημα στους παραγωγούς των.
- ✓ Σήμερα περισσότερα από 2500 αντιβιοτικές ουσίες παράγονται από βακτήρια γνωστά ως Ακτινομύκητες.

# Πρωτογενείς και δευτερογενείς μεταβολίτες (3)

- *Penicillium notatum*: Πενικιλίνη
- *Bacillus licheniformis*: Βακιτρακίνη
- *Streptomyces griseus*: Στρεπτομυκίνη
- *Streptomyces erythraeus*: Ερυθρομυκίνη
- *Streptomyces nodosus*: Αμφοτερισίνη Β



# Μικροβιακά προϊόντα

- ✓ **B12 βιταμίνη** ---- propionobacterium
- ✓ **Βιταμίνη A** ----- Phycomyces blakesleeanus
- ✓ **Αρωματικές ουσίες** είναι τα συστατικά που είναι πτητικές ενώσεις και απαντώνται στις τροφές και στα αρώματα δίνοντας χαρακτηριστική οσμή.
- ✓ **Σήμερα 50-100 αρωματικές ουσίες** παράγονται από μικροοργανισμούς.
- ✓ Κατά την ωρίμανση τυριών χρησιμοποιούνται καθαρές καλλιέργειες βακτηρίων π.χ. **Brevibacterium, Microbacterium** με πλήθος οσμηρών συστατικών, όπως λιπαρά οξέα, αλκοόλες, μεθυλοκετόνες και κυκλικές ενώσεις.

# Βιοαποικοδόμηση (1)

- ✓ Υπάρχουν πολλές αναφορές και χρήσεις σχετικά με την αποικοδόμηση των περιβαλλοντικών ρύπων από διάφορα βακτήρια.
- ✓ Αρκετά βακτήρια είναι ακόμα γνωστό ότι τρέφονται αποκλειστικά με υδρογονάνθρακες.
- ✓ Τα βακτήρια έχουν την ικανότητα να αποικοδομούν υδρογονάνθρακες.
- ✓ Η βιοαποικοδόμηση των υδρογονανθράκων μπορεί να συμβεί υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες,
- ✓ Βακτηριακά στελέχη *Pseudomonas* sp. και *Brevibacillus* sp. απομονώθηκε από έδαφος μολυσμένο με πετρέλαιο.

## Βιοαποικοδόμηση (2)

- ✓ 25 βακτηρικά γένη διάσπασης των υδρογονανθράκων έχουν απομονωθεί από το θαλάσσιο περιβάλλον.
- ✓ Επιπλέον, έχουν απομονωθεί 80 βακτηριακά στελέχη που συμμετέχουν σε διαδικασίες βιοαποικοδόμησης
- ✓ Τέτοιοι είναι οι Bacillus, Corynebacterium, Staphylococcus, Streptococcus, Shigella, Alcaligenes, Acinetobacter, Escherichia, Klebsiella και Enterobacter.
- ✓ Τα βακτήρια του γένους Bacillus φαίνεται να αποικοδομούν τους υδρογονάνθρακες με τον τρόπο.