

Μ. Λιακοπούλου - Κυριακίδου
Καθηγήτρια Α.Π.Θ.

Βιοτεχνολογία

με στοιχεία Βιοχημικής Μηχανικής

2η ΕΚΔΟΣΗ

*Αφιερώνεται στους: Δημήτρη
Θάνια
Κωνσταντίνο*

2η έκδοση, βελτιωμένη και επαυξημένη

ISBN 978-960-456-486-6

© Copyright: Μ. Λιακοπούλου - Κυριακίδου, Εκδόσεις Ζήτη, Ιούλιος 2017

Το παρόν έργο πνευματικής ιδιοκτησίας προστατεύεται κατά τις διατάξεις του Ελληνικού νόμου (Ν.2121/1993 όπως έχει τροποποιηθεί και ισχύει σήμερα) και τις διεθνείς συμβάσεις περί πνευματικής ιδιοκτησίας. Απαγορεύεται απολύτως η άνευ γραπτής άδειας του εκδότη και συγγραφέως κατά οποιοδήποτε τρόπο ή μέσο αντιγραφή, φωτοανατύπωση και εν γένει αναπαραγωγή, εκμίσθωση ή δανεισμός, μετάφραση, διασκευή, αναμετάδοση στο κοινό σε οποιαδήποτε μορφή (ηλεκτρονική, μηχανική ή άλλη) και η εν γένει εκμετάλλευση του συνόλου ή μέρους του έργου.

*Φωτοστοιχειοθεσία
Εκτύπωση
Βιβλιοδεσία*

Π. ΖΗΤΗ & ΣΙΑ Ι.Κ.Ε.
18ο χλμ Θεσσαλονίκης-Περαίας
Τ.Θ. 4171 • Περαία Θεσσαλονίκης • Τ.Κ. 570 19
Τηλ.: 2392.072.222 , Fax: 2392.072.229 • e-mail: info@ziti.gr



**ΕΚΔΟΣΕΙΣ
ΖΗΤΗ**
www.ziti.gr

ΒΙΒΛΙΟΠΩΛΕΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ:
Αρμενοπούλου 27, Τ.Κ. 546 35, Θεσσαλονίκη • Τηλ.: 2310-203.720, Fax: 2310-211.305
e-mail: sales@ziti.gr

ΒΙΒΛΙΟΠΩΛΕΙΟ ΑΘΗΝΩΝ:
Χαγυλάου Τριζούπη 22, Τ.Κ. 106 79, Αθήνα • Τηλ.-Fax: 210-3816.650
e-mail: athina@ziti.gr

ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟ ΒΙΒΛΙΟΠΩΛΕΙΟ: www.ziti.gr

Πρόλογος

Η εξέλιξη της Μοριακής Βιολογίας και της Βιοτεχνολογίας στη συνέχεια, τα τελευταία χρόνια ήταν εντυπωσιακά γρήγορη. Οι νέες κατευθύνσεις, η κλωνοποίηση (αναπαραγωγική και θεραπευτική) πέραν του ανασυνδυασμού του DNA, ο ολοένα αυξανόμενος αριθμός των προϊόντων που παίρνουμε από κυτταροκαλλιέργειες (πρωτογενείς και δευτερογενείς μεταβολίτες), η ρύθμιση των μεταβολικών σταδίων, η ανακάλυψη νέων βιοκαταλυτών (ενζύμων και μικροοργανισμών) κατέστησαν επιτακτική την ανάγκη επανέκδοσης και φυσικά συμπλήρωσης και διεύρυνσης των όσων αναφέρονται στην πρώτη έκδοση.

Όπως δηλώνει και ο τίτλος του, το βιβλίο περιλαμβάνει και στοιχεία Βιοχημικής Μηχανικής. Είναι προφανές, άλλωστε, ότι η παραγωγή ενός βιοτεχνολογικού προϊόντος περνά μέσα από τον βιοαντιδραστήρα, τα είδη του, το σχεδιασμό του, τις διεργασίες παραλαβής του και τη μοντελοποίηση της διεργασίας.

Στη δεύτερη αυτή έκδοση συμπεριλήφθησαν επιπλέον κεφάλαια (με αναφορά στη Βιοοργανική Χημεία), ενώ τα υπάρχοντα εμπλουτίστηκαν και σε ορισμένα προστέθηκαν και ασκήσεις-προβλήματα. Η προσθήκη τους θεωρήθηκε αναγκαία για μια πιο ολοκληρωμένη θεώρηση στο αντικείμενο.

Ευχαριστώ όλους όσους συνειδητά ή μη βοήθησαν ή ενίσχυσαν την ιδέα της επαυξημένης δεύτερης έκδοσης. Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στις Εκδόσεις Ζήτη για την επιμέλεια του βιβλίου.

Κάθε κριτική ή υπόδειξη σχετικά με το περιεχόμενο του βιβλίου είναι ευπρόσδεκτη.

Θεσσαλονίκη, Ιούνιος 2017

*Μ. Λιακοπούλου-Κυριακίδου
Καθηγήτρια ΑΠΘ*

Περιεχόμενα

1° Κεφάλαιο: Γενικά για το Κύτταρο

1.1 Δομή των κυττάρων	11
1.2 Προκαρυωτικά κύτταρα	11
1.3 Ευκαρυωτικά κύτταρα.....	13
1.4 Χημικά συστατικά του κυττάρου	15

2° Κεφάλαιο: Μικροοργανισμοί – Κυτταροκαλλιέργειες

2.1 Μικροοργανισμοί	19
2.1.1 Αναερόβιοι μικροοργανισμοί	21
2.1.2 Αερόβιοι μικροοργανισμοί	22
2.2 Κυτταροκαλλιέργειες	22
2.2.1 Ανάπτυξη μικροοργανισμών	23
2.2.2 Καλλιέργεια ζωικών κυττάρων.....	25
2.2.3 Καλλιέργεια φυτικών κυττάρων	26
2.2.4 Πρωτογενείς και δευτερογενείς μεταβολίτες.....	27
2.3 Μέτρηση της κυτταρικής αύξησης.....	28
2.4 Κινητική κυττάρων	29
2.5 Κλασμάτωση υποκυτταρικών στοιχείων	33

3° Κεφάλαιο: Αμινοξέα – Πρωτεΐνες

3.1 Γενικά	35
3.2 Βιολογία των πρωτεϊνών	39
3.2.1 Φυσιολογικές ιδιότητες των πρωτεϊνών	42
3.2.2 Μετουσίωση των πρωτεϊνών	43

4° Κεφάλαιο: Ένζυμα – Κινητική Ενζυμικών Αντιδράσεων

4.1	Γενικά	45
4.1.1	Ονοματολογία των ενζύμων	47
4.1.2	Ταξινόμηση ενζύμων	47
4.2	Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων	48
4.3	Επίδραση της συγκέντρωσης του υποστρώματος στην ταχύτητα των ενζυμικών αντιδράσεων	49
4.3.1	Υπόθεση Michaelis - Menten	51
4.3.2	Υπόθεση Briggs - Haldane (μόνιμης κατάστασης)	52
4.3.3	Σημασία της σταθεράς Michaelis - Menten (K_m)	54
4.3.4	Γραφική παράσταση των κινητικών δεδομένων	54
4.4	Επίδραση του pH στην ταχύτητα των ενζυμικών αντιδράσεων	56
4.5	Επίδραση της θερμοκρασίας στην ταχύτητα των ενζυμικών αντιδράσεων	57
4.6	Τάξη ενζυμικής αντίδρασης	59
	Ασκήσεις	62

5° Κεφάλαιο: Αναστολή Ενζυμικών Αντιδράσεων

5.1	Εισαγωγή	67
5.2	Αντιστρεπτή αναστολή	68
5.2.1	Συναγωνιστική αναστολή	68
5.2.2	Μη συναγωνιστική αναστολή	71
5.3	Μη αντιστρεπτή αναστολή	73
	Άσκηση	73

6° Κεφάλαιο: Καθηλωμένα Ένζυμα – Τεχνολογία

6.1	Εισαγωγή	77
6.2	Τεχνικές καθήλωσης	78
6.2.1	Ομοιοπολική σύνδεση	78
6.2.2	Ιοντική σύνδεση	82
6.2.3	Προσρόφηση	84
6.2.4	Εγκλωβισμός	84
6.2.5	Συμπολυμερισμός	89
6.3	Καθήλωση κυττάρων	89
6.3.1	Φαινόμενα διάχυσης στα καθηλωμένα ενζυμικά συστήματα	90

7^ο Κεφάλαιο: Εφαρμογές Καθηλωμένων Ενζύμων στη Βιομηχανία

7.1	Εισαγωγή.....	93
7.1.1	Παραγωγή L-αμινοξέων με καθηλωμένη αμινοακυλάση	93
7.1.2	β-Γαλακτοσιδάση	95
7.1.3	Παρασκευή ημισυνθετικών πενικιλινών	96
7.2	Τύποι καθηλωμένων ενζύμων που κυκλοφορούν στο εμπόριο	97

8^ο Κεφάλαιο: Υδρολυτικά Ένζυμα – Εφαρμογές

8.1	Γενικά.....	101
8.1.1	Εστεράσες.....	101
8.1.2	Αμυλολυτικά ένζυμα - Αμυλάσες.....	103
8.1.3	Πρωτεολυτικά ένζυμα - Πρωτεάσες.....	105
8.2	Μη υδρολυτικά ένζυμα - Εφαρμογές	106

9^ο Κεφάλαιο: Νουκλεϊνικά οξέα

9.1	Γενικά.....	107
9.1.1	Πρωτοταγής δομή των νουκλεϊνικών οξέων DNA και RNA.....	107
9.1.2	Δευτεροταγής δομή DNA.....	110
9.1.3	Δευτεροταγής και Τριτοταγής δομή του RNA	111
9.1.4	Κυκλικό DNA.....	112
9.1.5	Μετουσίωση DNA.....	112
9.2	Χημικές αντιδράσεις	115
9.2.1	Χημικές αντιδράσεις των νουκλεϊνικών οξέων που είναι υπεύθυνες για γεγονότα που συμβαίνουν σε ζωντανά κύτταρα ...	115
9.2.2	Χημικές αντιδράσεις των νουκλεϊνικών οξέων που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη της δομής και της λειτουργίας τους.....	116
9.3	Μερικά πολύ γνωστά νουκλεοτίδια και ο ρόλος τους στα βιολογικά συστήματα	118
9.3.1	Τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP).....	119
9.3.2	Κυκλικό AMP και κυκλικό GMP	120
9.4	Βιοσύνθεση DNA - αναδιπλασιασμός	121
9.5	Σύνθεση RNA in vivo	123
9.6	Μηχανισμός επιδιόρθωσης βλαβών DNA	123

10° Κεφάλαιο: Βιοσύνθεση πρωτεϊνών

10.1	Εισαγωγή.....	127
10.2	Βιοσύνθεση πρωτεϊνών	128
10.2.1	Μεταγραφή	131
10.2.2	Μετάφραση.....	132
10.2.3	Εξειδίκευση t-RNA.....	133
10.3	Μετα-μεταφραστική τροποποίηση πρωτεϊνών	135

11° Κεφάλαιο: Γενετική Μηχανική

11.1	Εισαγωγή – Τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA	137
11.1.1	Ένζυμα που χρησιμοποιούνται στον ανασυνδυασμό DNA.....	138
11.1.2	Φορείς γενετικού υλικού, ή φορείς κλωνοποίησης.....	140
11.1.3	Ανασυνδυασμός ξένου DNA με πλασμίδια	144
11.2	Κύτταρα - ξενιστές και κλωνοποίηση	146
11.2.1	Έκφραση ευκαρυωτικών πρωτεϊνών σε κύτταρα <i>E. coli</i>	146
11.2.2	Απομόνωση γονιδίων.....	148
11.3	Άλλοι οργανισμοί ξενιστές για Γενετική Μηχανική	149

12° Κεφάλαιο: Εφαρμογές Γενετικής Μηχανικής

12.1	Εισαγωγή – Εφαρμογές Γενετικής Μηχανικής	151
12.1.1	Παραγωγή ευκαρυωτικών πρωτεϊνών	151
12.1.2	Βελτίωση των κλώνων.....	153
12.1.3	Γενετικά τροποποιημένα φυτά (Transgenic plants).....	153
12.2	Μεταλλαγμένες πρωτεΐνες	154

13° Κεφάλαιο: Κλωνοποίηση

13.1	Εισαγωγή.....	157
13.2	Κλωνοποίηση DNA.....	157
13.3	Αναπαραγωγική κλωνοποίηση	159
13.4	Θεραπευτική κλωνοποίηση	159
13.5	Βλαστικά κύτταρα και προοπτικές.....	160
13.6	Προβλήματα από την κλωνοποίηση.....	162

14° Κεφάλαιο: Βιοαντιδραστήρες

14.1	Ζυμώσεις	163
------	----------------	-----

14.2	Βιοαντιδραστήρες. Ταξινόμηση και είδη	163
14.3	Κινητική μελέτη παραγωγής προϊόντος και κυτταρικής μάζας	174
14.4	Παραγωγικότητα βιοαντιδραστήρα.....	175
14.5	Σχεδιασμός βιοαντιδραστήρα.....	181
14.5.1	Μέθοδοι σχεδιασμού	184
14.6	Παράγοντες που επηρεάζουν τη λειτουργία ενός βιοαντιδραστήρα	185
Άσκηση		190

15° Κεφάλαιο: Αποστείρωση

15.1	Γενικές μέθοδοι αποστείρωσης.....	191
15.1.1	Θέρμανση.....	191
15.1.2	Χημικά αντιδραστήρια.....	192
15.1.3	Ακτινοβολία.....	192
15.1.4	Μηχανικά μέσα	193
15.1.5	Διήθηση.....	193
15.2	Αποστείρωση θρεπτικού μέσου με θέρμανση – Κινητικές θερμικού θανάτου	193
15.2.1	Κριτήριο σχεδιασμού.....	194
15.2.2	Ασυνεχής αποστείρωση	196
15.2.3	Συνεχής αποστείρωση.....	198
15.3	Αποστείρωση αέρα.....	201
15.4	Αποστείρωση του αντιδραστήρα	202

16° Κεφάλαιο: Βιοδιαχωρισμοί

16.1	Γενικά.....	203
16.1.1	Κατεργασία βιολογικού πολτού.....	204
16.2	Διαχωρισμός υγρού - στερεού.....	205
16.2.1	Διήθηση	205
16.2.2	Φυγοκέντρωση	206
16.3	Λύση ή ρήξη κυττάρων.....	207
16.3.1	Φυσικές μέθοδοι	207
16.3.2	Χημικές μέθοδοι	209
16.3.3	Βιολογική μέθοδος.....	210
16.4	Παραλαβή προϊόντων.....	212
16.4.1	Εκχύλιση.....	212

16.4.2	Προσρόφηση.....	214
16.5	Καθαρισμός προϊόντων	215
16.5.1	Καταβύθιση.....	215
16.5.2	Ηλεκτροφόρηση.....	218
16.5.3	Χρωματογραφικές μέθοδοι.....	222
16.5.4	Διήθηση με μεμβράνες	233
16.6	Παραδείγματα παραλαβής και καθαρισμού πρωτεϊνών (κάθετη διεργασία)	235

17^ο Κεφάλαιο: *Βιοτεχνολογικές εφαρμογές*

A. ΒΙΟΜΕΤΑΤΡΟΠΕΣ

17.1	Σύνθεση και τροποποίηση βιοπολυμερών	239
17.1.1	Πρωτεΐνες και Πολυπεπτίδια	239
17.1.2	Ολιγο- και πολυσακχαρίτες	241
17.1.3	Ενζυμική αποικοδόμηση του αμύλου	244

B. ΖΥΜΩΣΕΙΣ

17.2	Πρωτεΐνες μονοκυττάρων (single cell proteins)	246
17.3	Πολυμερή	246
17.3.1	Βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή	246
17.3.2	Ξανθάνη	248
17.4	Παραγωγή βιταμινών	252
17.5	Βιοχημικά ηλεκτρόδια.....	254
17.6	Σταθεροποίηση πρωτεϊνών.....	256

<i>Βιβλιογραφία</i>	<i>259</i>
---------------------------	------------

<i>Πίνακας Αμινοξέων</i>	<i>261</i>
--------------------------------	------------

<i>Ενρετήριο</i>	<i>263</i>
------------------------	------------

1^ο Κεφάλαιο

Γενικά για το Κύτταρο

1.1 Δομή των κυτάρων

Σύμφωνα με την κυτταρική θεωρία των Schleiden και Schwann το κύτταρο είναι η απλούστερη και οργανωμένη ομάδα μορίων που βρίσκονται σε δυναμική αλληλεπίδραση. Έχει μορφολογική και χημική οργάνωση και την ικανότητα να αναπτύσσεται και να αναπαράγεται. Μελέτες με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έχουν δείξει ότι υπάρχουν δύο ειδών κύτταρα. Αν και έχουν πολλά κοινά χαρακτηριστικά μεταξύ τους, υπάρχουν σαφείς διαφορές στην οργάνωση και λειτουργία τους, στις οποίες στηρίζεται και ο διαχωρισμός τους σε δύο κατηγορίες: **τα προκαρυωτικά και τα ευκαρυωτικά κύτταρα**. Γενικά τα κύτταρα και των δύο κατηγοριών παρουσιάζουν ποικιλία μεγεθών και διαστάσεων που αντιπροσωπεύουν την εξελικτική τους προσαρμογή στο εκάστοτε περιβάλλον και τη διαφοροποίησή τους.

1.2 Προκαρυωτικά κύτταρα

Τα προκαρυωτικά κύτταρα δε φέρουν μεμβράνη γύρω από τον πυρήνα. Είναι σχετικά μικρά και απλά στην οργάνωση κύτταρα. Συνήθως απαντούν μόνα τους χωρίς άλλα κύτταρα ενωμένα μεταξύ τους. Τα προκαρυωτικά κύτταρα μοιάζουν με μικρές σφαίρες, ράβδους ή σπιδάλ με διαστάσεις 0.5-5 μm . Για να πάρουμε μια ιδέα του πόσο μεγάλα είναι αυτά τα κύτταρα σε σχέση με τα άλλα συστατικά στοιχεία του σύμπαντος, θα πρέπει να αναφέρουμε ότι το μέγεθος ενός προκαρυωτικού κυττάρου σε σχέση με τον άνθρωπο είναι ίσο με το μέγεθος του ανθρώπου σε σχέση με τη γη.

Ο όγκος των προκαρυωτικών κυττάρων είναι της τάξεως των 10^{-12} mL ανά κύτταρο και απ' αυτό το 50-80% είναι νερό. Η μάζα των προκαρυωτικών

είναι 10^{-12} g. Μικροοργανισμοί αυτού του είδους κυττάρων μεγαλώνουν πολύ γρήγορα και είναι ευρέως διαδεδομένοι στη βιόσφαιρα. Μερικοί, π.χ. μπορούν να διπλασιάζουν τον όγκο, τη μάζα τους και τον αριθμό τους μέσα σε 20 min.

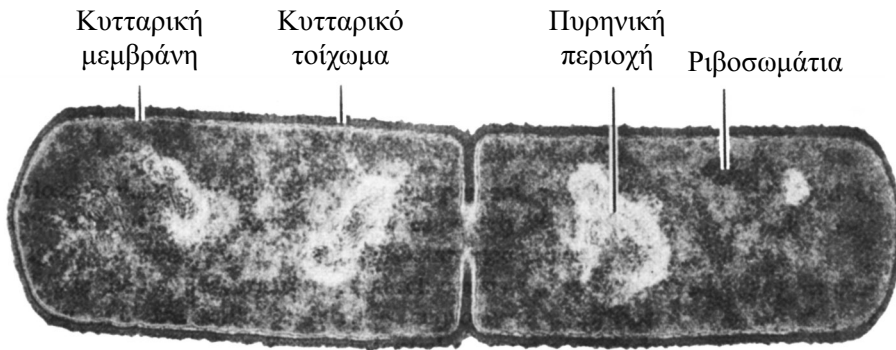
Από βιοχημικής πλευράς, τα προκαρυωτικά κύτταρα, ως οργανισμοί, είναι ευέλικτοι, γιατί μπορούν να επιλέγουν το κατάλληλο θρεπτικό υλικό από μια μεγάλη ποικιλία θρεπτικών συστατικών που διατίθενται στο περιβάλλον τους.

Οι προκαρυωτικοί μικροοργανισμοί περιλαμβάνουν τα **άρχεια** και τα **βακτήρια**. Οι διαφορές ανάμεσά τους είναι πολλές και κυρίως στη δομή του κυτταρικού τοιχώματος και στις περιβαλλοντικές συνθήκες ανάπτυξης. Τα άρχα θεωρούνται προγενέστερα των βακτηρίων και γενικά είναι οι μικροοργανισμοί που επιβιώνουν σε περιβάλλοντα εξαιρετικά δύσκολα συγκριτικά με αυτά των βακτηρίων και των ευκαρυωτικών οργανισμών. Τα άρχα διακρίνονται σε **μεθανογενή**, **αλόφιλα** και **θερμο-όξινα**. Τα **μεθανογενή** ζουν σε περιβάλλοντα χωρίς οξυγόνο και παράγουν μεθάνιο από την αναγωγή του διοξειδίου του άνθρακα. Τα **αλόφιλα** επιβιώνουν σε περιβάλλοντα με μεγάλες συγκεντρώσεις αλάτων και έχουν ανακαλυφθεί σε αντίστοιχες περιοχές, όπως η Νεκρά Θάλασσα. Τέλος, τα **θερμο-όξινα** έχουν βρεθεί σε θεραπευτικές πηγές (ιαματικά λουτρά) όπου κυριαρχεί το θείο και σε θερμοκρασίες πάνω από 80°C, όπου το περιβάλλον είναι ισχυρά όξινο (pH<2).

Επειδή οι προκαρυωτικοί μικροοργανισμοί συνήθως απαντούν σαν απομονωμένοι μονοκύτταροι οργανισμοί, έχουν ελάχιστα μέσα ελέγχου του περιβάλλοντός τους. Επομένως, η ευελιξία, όσον αφορά τα θρεπτικά συστατικά, είναι βασικό χαρακτηριστικό για την επιβίωσή τους. Η γρήγορη αύξηση (πολλαπλασιασμός) των προκαρυωτικών οργανισμών σε συνδυασμό με τη βιοχημική τους ευελιξία τα καθιστούν προφανώς καλούς στόχους για τη βιολογική έρευνα και βιοχημική κατεργασία.

Στο σχήμα 1.1 δίνεται η εικόνα ενός προκαρυωτικού κυττάρου, του *Bacillus subtilis*.

Το κύτταρο περιβάλλεται από ένα σταθερό τοίχωμα πάχους 200 Å που παρέχει στο κύτταρο δομική ισχύ και το κρατά σταθερό από τους ποικίλους παράγοντες που το επηρεάζουν. Αμέσως μετά το **κυτταρικό τοίχωμα** και στο εσωτερικό του υπάρχει η **κυτταρική μεμβράνη**, της οποίας το πάχος είναι 70 Å. Η δομή της είναι παρόμοια με τη δομή της μεμβράνης όλων των κυττάρων. Οι μεμβράνες αυτές παίζουν σημαντικό ρόλο στο κύτταρο, το διαχωρίζουν από το περιβάλλον του αποτελώντας ταυτόχρονα ένα εκλεκτικό φίλτρο για την εί-



Σχ. 1.1. Ηλεκτρονική μικρογραφία του προκαρυωτικού κυττάρου *Bacillus subtilis*.

σοδο και έξοδο μορίων και ιόντων. Η κυτταρική μεμβράνη καθορίζει ποιες από τις χημικές ουσίες θα μεταφερθούν από και προς το εσωτερικό του κυττάρου.

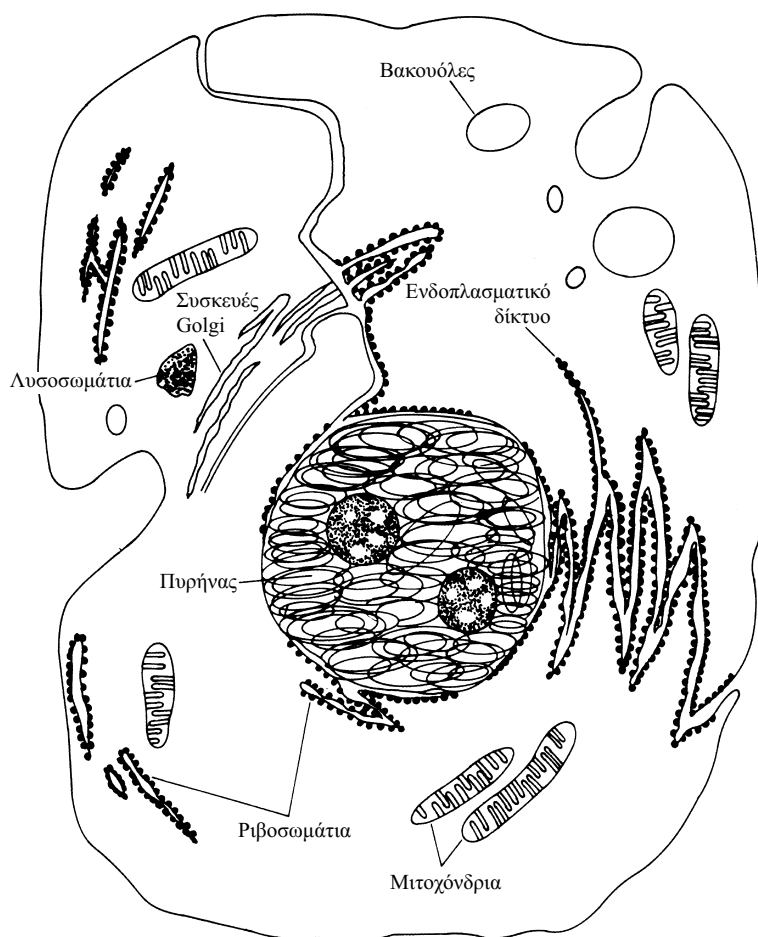
Στο εσωτερικό του κυττάρου υπάρχει μια περιοχή, όχι πλήρως καθορισμένη, και καλείται **πυρηνική ζώνη**. Εδώ γίνεται ο έλεγχος για κάθε κυτταρική λειτουργία. Αποτελείται από ένα μόριο DNA το οποίο αναδιπλώνεται και σχηματίζει μια σχεδόν ομογενή μάζα.

Οι μαύρες κηλίδες μέσα στο κύτταρο είναι τα **ριβοσωμάτια**, τα οποία είναι μικρότερα από τα ριβοσωμάτια των ευκαρυωτικών κυττάρων. Το **κυττόπλασμα** ή **κυτταρόπλασμα** είναι το υγρό υλικό που καταλαμβάνει το υπόλοιπο μέρος του κυττάρου. Σε πολλά κύτταρα υπάρχουν μερικές περιοχές σα φουσαλίδες και χρησιμοποιούνται ως αποθήκες.

Τέλος, θα πρέπει να αναφέρουμε ότι αν και η δομή των προκαρυωτικών κυττάρων είναι σε γενικές γραμμές η παραπάνω, υπάρχουν και διαφορές σε ορισμένους προκαρυωτικούς οργανισμούς. Υπάρχουν π.χ. μερικοί μικροοργανισμοί που περιέχουν μεμβράνες και συγκεντρώνουν την ενέργεια του φωτός για φωτοσύνθεση. Χρησιμοποιούν δηλαδή, την ενέργεια του φωτός και αντιδρώντας με οργανικά μόρια ελευθερώνουν οξυγόνο στην ατμόσφαιρα.

1.3 Ευκαρυωτικά κύτταρα

Τα κύτταρα της κατηγορίας αυτής έχουν έναν πυρήνα σαφώς διαχωρισμένο από το υπόλοιπο μέρος του κυττάρου με την πυρηνική μεμβράνη (σχήμα 1.2) Τα **ευκαρυωτικά κύτταρα** είναι 1000 φορές μεγαλύτερα από τα προκαρυωτικά κύτταρα. Όλα τα κύτταρα των ανωτέρων οργανισμών είναι ευκαρυωτι-



Σχ. 1.2. Δομή ενός ευκαρυωτικού κυττάρου.

κά. Η εσωτερική δομή των ευκαρυωτικών κυττάρων είναι περισσότερο πολύπλοκη από τη δομή των προκαρυωτικών. Υπάρχει ένας βαθμός οργάνωσης και διαφοροποίησης. Το εσωτερικό του κυττάρου διαιρείται σε διάφορα τμήματα.

Το κύτταρο περιβάλλεται από κυτταρική μεμβράνη παρόμοια με εκείνη των προκαρυωτικών κυττάρων. Στην εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης μπορεί να υπάρχει το λεγόμενο κυτταρικό κάλυμμα ή τοίχωμα. Η φύση του τοιχώματος εξαρτάται από το συγκεκριμένο είδος του κυττάρου. **Τα κύτταρα, π.χ. των ανώτερων ζώων έχουν συνήθως ένα λεπτό τοίχωμα.** Αυτό το είδος του

καλύμματος είναι απαραίτητο για τη σύνδεση των κυττάρων μεταξύ τους προς σχηματισμό ιστών και οργάνων, όπως: σπλώμα, κ.λπ.

Τα φυτικά κύτταρα έχουν πιο παχύ κάλυμμα και είναι πιο ανθεκτικά. Επιπλέον, τα ευκαρυωτικά κύτταρα έχουν μονάδες μεμβρανών μέσα στο κύτταρο. Ένα σύμπλεγμα μεμβρανών είναι και το **ενδοπλασματικό δίκτυο**, που ξεκινάει από την κυτταρική μεμβράνη και φτάνει μέσα στο κύτταρο. Ο πυρήνας του κυττάρου περιβάλλεται από μια πορώδη μεμβράνη (πυρηνική μεμβράνη). Τα **ριβοσωμάτια**, τα οποία απαντούν και στα προκαρυωτικά κύτταρα, βρίσκονται επάνω και κατά μήκος του ενδοπλασματικού δικτύου. Μια από τις κύριες λειτουργίες του πυρήνα είναι ο έλεγχος της καταλυτικής δράσης των ριβοσωμάτων. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να τονίσουμε ότι ο πυρήνας όχι μόνο ελέγχει τις ταχύτητες των διαφόρων αντιδράσεων, αλλά και το είδος της κάθε αντίδρασης.

Ο πυρήνας επίσης είναι γεμάτος με μεμβράνες. Τα διάφορα κλειστά συστήματα μεμβρανών είναι γνωστά σαν **οργανίδια**. Τα **μιτοχόνδρια**, π.χ. είναι οργανίδια με πλήρως οργανωμένη και εξειδικευμένη εσωτερική δομή. Τα μιτοχόνδρια απαντούν σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα που χρησιμοποιούν οξυγόνο κατά τη διαδικασία εξεύρεσης ενέργειας. Τα μιτοχόνδρια έχουν δικό τους γενετικό μηχανισμό, με δικό τους DNA, που είναι **κυκλικό δίκλωνο** και πολύ μικρότερο του πυρηνικού DNA. Έχουν επίσης και δικά τους ριβοσωμάτια και γενικά διαθέτουν ολόκληρο το μηχανισμό πρωτεϊνικής σύνθεσης.

Στα κύτταρα που χρησιμοποιούν το φως για εξεύρεση ενέργειας (φωτότροφα κύτταρα, φυτικά κύτταρα), αντί των μιτοχονδρίων έχουμε τους **χλωροπλάστες**, που ανήκουν και αυτοί στα **οργανίδια**.

Τα **μιτοχόνδρια** και οι **χλωροπλάστες** είναι τα τμήματα εκείνα του κυττάρου όπου γίνονται οι πιο πολλές βιοχημικές αντιδράσεις, πέρα από το ρόλο τους στην παραγωγή ενέργειας.

Τέλος, στα οργανίδια ανήκουν οι **συσκευές Golgi**, τα **λυσοσωμάτια** και οι **βακούλες**. Τα λυσοσωμάτια είναι όμοια σε μέγεθος με τα μιτοχόνδρια και μοιάζουν με ασκούς που περιέχουν μεγάλα ποσά υδρολυτικών ενζύμων.

1.4 Χημικά συστατικά του κυττάρου

Τα συστατικά του κυττάρου είναι ανόργανα και οργανικά. Στα ανόργανα συστατικά ανήκουν το H_2O (70-80%) και τα διάφορα μεταλλικά ιόντα. Στα οργανικά συστατικά υπάγονται κυρίως οι πρωτεΐνες, τα νουκλεϊνικά οξέα, τα σάκχαρα, τα λιπίδια κ.λπ.

1. Χημική σύσταση του πυρήνα

Ο πυρήνας αποτελείται κυρίως από DNA, RNA, κάποιες πρωτεΐνες, ορισμένες οργανοφωσφορικές ενώσεις και ανόργανα άλατα. Το DNA είναι το γενετικό υλικό. Έχει βρεθεί ότι ο πυρήνας κάθε κυττάρου περιέχει σταθερό ποσόν DNA. Τα ευκαρυωτικά κύτταρα περιέχουν έναν ή και περισσότερους πυρήνες. Το DNA όλων σχεδόν των οργανισμών συνδέεται στενά με πρωτεΐνες - ένζυμα που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση RNA. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν βασικές πρωτεΐνες γνωστές ως ιστόνες και ουδέτερες ή όξινες πρωτεΐνες. Σε κάθε **χρωμόσωμα** των ευκαρυωτικών κυττάρων αντιστοιχεί ένα δι-κλωνο μόριο DNA με μήκος μεγαλύτερο από τη διάμετρο του πυρήνα.

Τα χρωμοσώματα (ή πυρηνικά νημάτια) παίζουν σημαντικό ρόλο στη μίτωση. Σαν χρωμόσωμα ή χρωματόσωμα ορίζεται το στοιχειώδες σωματίδιο που περιέχει όλες τις **ιστόνες** και **DNA** μήκους ~ 165 ζεύγη βάσεων. Το ινίδιο της χρωματίνης περιέχει πολλά τέτοια χρωμοσώματα τα οποία ενώνονται μεταξύ τους με DNA το λεγόμενο συνδετικό DNA.

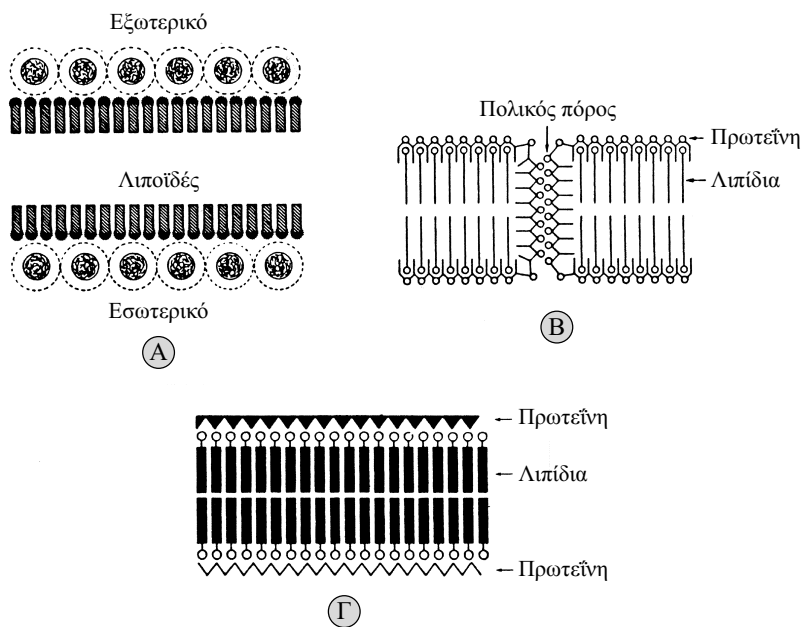
2. Σύσταση της κυτταρικής μεμβράνης

Η κυτταρική ή πλασματική μεμβράνη αποτελείται από λιπίδια, πρωτεΐνες και μερικούς υδατάνθρακες ενωμένους είτε με πρωτεΐνες (γλυκοπρωτεΐνες) είτε με λιπίδια (γλυκολιπίδια).

Η περιεκτικότητα κατά βάρος των παραπάνω συστατικών ποικίλει ανάλογα με το είδος του κυττάρου. Στα κύτταρα μυελίνης π.χ. τα λιπίδια είναι 90% και οι πρωτεΐνες 10% κ.β. Σε άλλα κύτταρα τα λιπίδια είναι 25% και οι πρωτεΐνες 75% κ.β. Οι υδατάνθρακες που βρίσκονται πάντα στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης δεν ξεπερνούν το 10% του συνολικού βάρους της πλασματικής μεμβράνης.

Τα κυριότερα λιπίδια είναι τα φωσφογλυκερίδια και τα σφινγολιπίδια. Ανωμαλίες στο μεταβολισμό των λιπιδίων της μεμβράνης των κυττάρων προκαλούν αρκετές ασθένειες στον άνθρωπο. Η χοληστερίνη αποτελεί την κύρια στερόλη των μεμβρανών στα ζωικά κύτταρα και πολλές φορές φθάνει το 30% κ.β. του συνόλου των λιπιδίων της μεμβράνης και επηρεάζει τόσο την ελαστικότητα όσο και τη μηχανική σταθερότητα της μεμβράνης.

Τα λιπίδια αποτελούν μια διπλοστιβάδα. Γενικά για τη δομή της πλασματικής μεμβράνης έχουν προταθεί διάφορα μοντέλα. Στο σχήμα 1.3 εικονίζεται η δομή της πλασματικής μεμβράνης σύμφωνα με τον Robertson, (σχ. 1.3Γ) και άλλους ερευνητές.



Σχ. 1.3. Μοντέλα για τη δομή της πλασματικής μεμβράνης.

2^ο Κεφάλαιο

Μικροοργανισμοί – Κυτταροκαλλιέργειες

2.1 Μικροοργανισμοί

Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή προϊόντων χρήσιμων στον άνθρωπο είναι μερικές εκατοντάδες. Στη φύση βέβαια υπάρχουν πάνω από 100.000.

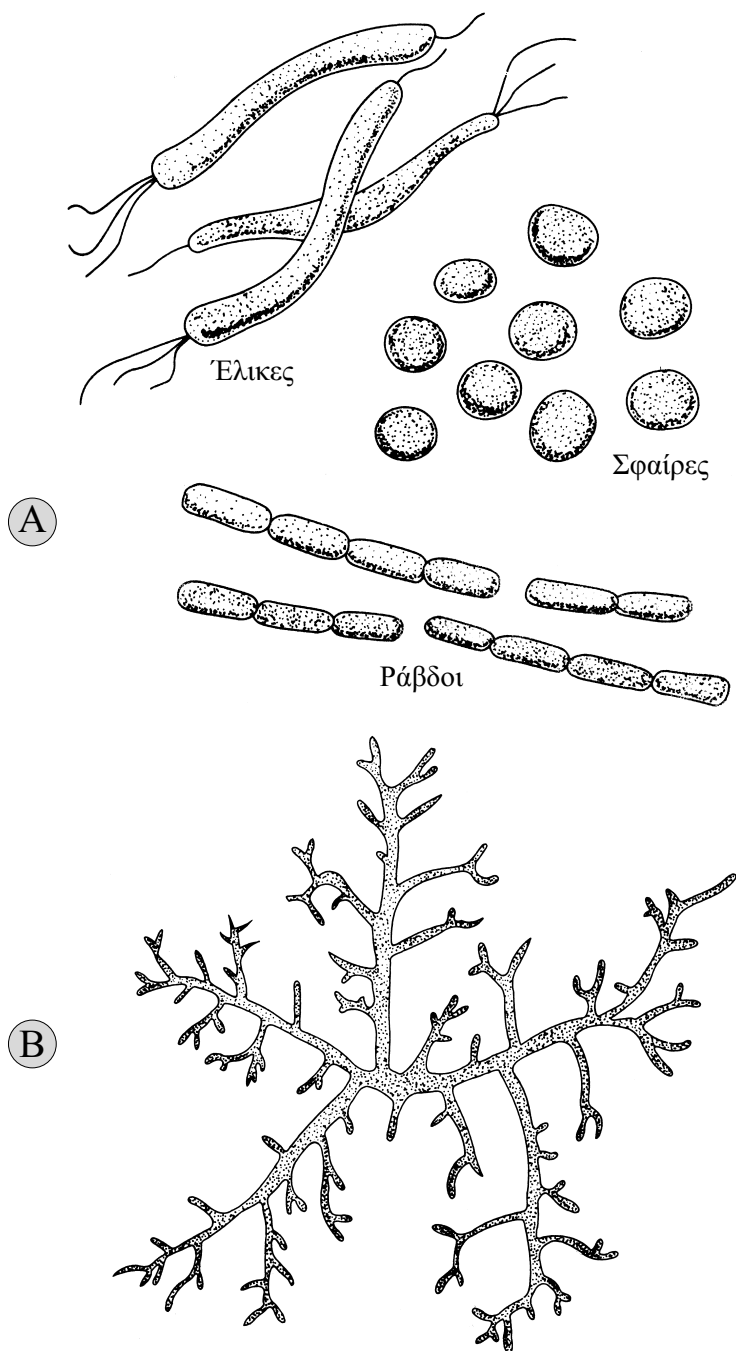
Η χρησιμότητά τους στην παρασκευή του κρασιού, στη ζύμωση του ψωμιού ανακαλύφθηκε εντελώς τυχαία. Οι ζύμες που μετατρέπουν τη βύνη, το χυμό των σταφυλιών σε αλκοόλη είναι μικροοργανισμοί όπως επίσης και τα βακτήρια που κάνουν το γάλα να ξινίζει.

Γενικά οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται για βιομηχανικές συνθέσεις περιλαμβάνουν τις **ζύμες** (yeast), τα **βακτήρια**, τους **ευρωτομύκητες** (molds) και τους **ακτινομύκητες** (νηματοειδή βακτήρια). Τέλος θα πρέπει να αναφέρουμε και τα κύτταρα εκείνα που δεν υπάρχουν ελεύθερα στη φύση αλλά χρησιμοποιούνται για την παρασκευή φαρμακευτικών κυρίως προϊόντων. Αυτά είναι τα κύτταρα θηλαστικών που μεγαλώνουν σε καλλιέργειες.

Αν θέλουμε να ταξινομήσουμε τους μικροοργανισμούς σε χρήσιμους ή μη θα ήταν δύσκολο, αφού όλοι είναι χρήσιμοι με την έννοια ότι βοηθούν στην ανακύκλωση του οργανικού κόσμου. Βέβαια, δε θα πρέπει να ξεχάσουμε πως μερικοί μικροοργανισμοί είναι επιβλαβείς στα φυτά και στα ζώα.

Όσον αφορά στη δομή τους, τα βακτήρια είναι μικροί μονοκύτταροι οργανισμοί (σχήμα 2.1A) με μέγεθος ένα ή μερικά μικρά (μ). Οι ζύμες είναι επίσης μονοκύτταροι οργανισμοί αλλά λίγο μεγαλύτερες από τα βακτήρια (6-12 μ).

Οι ευρωτομύκητες είναι πολυκύτταροι οργανισμοί και αν και το μέγεθός τους δεν ξεπερνά τα 25 μ είναι ορατοί με γυμνό μάτι. Απ' αυτούς οι σεξουαλικά αναπαραγόμενοι έχουν μέγεθος φρουτοκαρπών και είναι αυτοί που ενδιαφέρουν τη βιομηχανία (σχήμα 2.1B).



Σχ. 2.1. (Α) Είδη βακτηρίων. (Β) Ευρωτομύκητες (molds).

Μια άλλη ταξινόμηση των μικροοργανισμών είναι η διάκρισή τους σε προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς. Οι προκαρυωτικοί είναι οι πιο πρωτόγονοι και φέρουν ένα μόνο κυκλικό **χρωμόσωμα δίκλωνου DNA μέσα στο κυτταρόπλασμα**.

Οι ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί είναι πιο μεγάλοι από τους προκαρυωτικούς και φέρουν τουλάχιστον δύο χρωμοσώματα και σε μερικά είδη πάνω από 20. Με βάση αυτή την ταξινόμηση τα βακτήρια είναι προκαρυωτικοί οργανισμοί, ενώ οι ζύμες και οι ευρωτομύκητες ευκαρυωτικοί.

Για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό τους υπάρχει μια ποικιλία μεταβολικών διαδικασιών με τις οποίες παίρνουν ενέργεια και νέο κυτταρικό υλικό. Π.χ. μερικοί μικροοργανισμοί είναι φωτοσυνθετικοί δηλαδή χρησιμοποιούν την ενέργεια του φωτός για να μετατρέψουν το CO_2 από τον αέρα και το H_2 από το νερό σε κυτταρικό οργανικό υλικό. Άλλοι μικροοργανισμοί θέλουν απαραίτητα οργανικό υπόστρωμα για την ανάπτυξή τους. Θα πρέπει εδώ να τονίσουμε ότι κανένας από τους μικροοργανισμούς που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία δεν είναι φωτοσυνθετικός.

Οι μικροοργανισμοί, ανάλογα με τις απαιτήσεις τους σε περιβάλλον, ταξινομούνται σε αερόβιους, αναερόβιους και επαμφοτερίζοντες (facultative).

Οι **αερόβιοι** μεταβολίζουν και μεγαλώνουν μόνο παρουσία ατμοσφαιρικού οξυγόνου.

Οι **αναερόβιοι** δε χρειάζονται οξυγόνο.

Αντίθετα η τρίτη κατηγορία περιλαμβάνει τους μικροοργανισμούς εκείνους που μπορούν να γίνουν από αερόβιοι αναερόβιοι ανάλογα με το περιβάλλον που θα βρεθούν.

2.1.1 Αναερόβιοι μικροοργανισμοί

Αναερόβιοι είναι οι **στρεπτομύκητες** που παράγουν **αντιβιοτικά** και οι πιο πολλοί νηματοειδείς ευκαρυωτικοί **ευρωτομύκητες**. Οι αναερόβιοι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία έχουν σχέση με τα διάφορα τυριά και τις τροφές που προέρχονται από ζύμωση. Οι ζύμες που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία είναι αερόβιοι και αναερόβιοι μικροοργανισμοί ταυτόχρονα.

Οι βιοχημικοί δρόμοι για την παρασκευή προϊόντων αναερόβια, ποικίλλουν. Οι ζύμες π.χ. παράγουν δύο μόρια αιθανόλης και δύο μόρια CO_2 από ένα μόριο γλυκόζης ή φρουκτόζης. Η αναερόβια ζύμωση μπορεί να είναι **ομοζυμωτική** ή **ετεροζυμωτική**. Στην πρώτη περίπτωση το προϊόν της ζύμωσης είναι ένα κύριο προϊόν, στη δεύτερη δύο ή περισσότερα. Π.χ. τα βακτήρια του

γαλακτικού οξέος είναι ομοζυμωτικά γιατί δίνουν μόνο γαλακτικό οξύ από ζύμωση της γλυκόζης.

Μια άλλη ομάδα των ίδιων βακτηρίων είναι ετεροζυμωτικά. Μετατρέπουν τη γλυκόζη π.χ. με διαφορετικό βιοχημικό δρόμο σε γαλακτικό οξύ, αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα.

Το βακτήριο *Clostridium acetobutylicum* είναι ετεροζυμωτικός μικροοργανισμός γιατί μετατρέπει τη γλυκόζη σε μίγμα ακετόνης, αιθανόλης, ισοπροπανόλης και βουτανόλης.

2.1.2 Αερόβιοι μικροοργανισμοί

Οι αερόβιοι μικροοργανισμοί οξειδώνουν πλήρως ένα μέρος του υποστρώματος αρχικά, και επομένως βρίσκουν όλη την απαιτούμενη ενέργεια για τη μετατροπή του υποστρώματος σε κυτταρικό υλικό.

Αν ο σκοπός σε μια βιομηχανία είναι να αυξήσει την κυτταρική μάζα, όπως συμβαίνει στην παραγωγή ζύμης για το ψωμί (μαγιάς) ή μικροβιακής πρωτεΐνης, τότε χρησιμοποιεί απαραίτητα αερόβια αύξηση.

Εδώ μπορεί να ρωτήσει κανείς πώς μια αερόβια αύξηση μπορεί να οδηγήσει σε μια χρήσιμη μικροβιακή παρασκευή, αν όλο το υπόστρωμα δε μετατρέπεται σε κυτταρική μάζα, αλλά οξειδώνεται πλήρως σε διοξείδιο του άνθρακα και νερό;

Η πρώτη απλή απάντηση στην ερώτηση είναι ότι οι αντιδράσεις οξείδωσης που γίνονται από άκρως αερόβιους μικροοργανισμούς δεν είναι 100% πλήρεις. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η μετατροπή της αιθανόλης σε οξεϊκό οξύ από βακτήρια του οξεϊκού οξέος. Το ίδιο βακτήριο μετατρέπει τη γλυκόζη σε γλυκονικό οξύ.

2.2 Κυπαροκαλλιέργειες

Στο κεφάλαιο αυτό δίνονται στοιχεία για την καλλιέργεια **μικροοργανισμών, ζωικών και φυτικών κυττάρων**. Κα τα τρία αυτά είδη μπορούν να χρησιμοποιηθούν για βιο-μετασχηματισμούς.

Γενικά η ανάπτυξη μικροοργανισμών, ζωικών ή φυτικών κυττάρων σε «τεχνητό περιβάλλον» είναι γνωστή ως **κυπαροκαλλιέργεια**.

Απλή καλλιέργεια ονομάζεται εκείνη όπου χρησιμοποιείται ένα είδος κυττάρων (ή μικροοργανισμών) και **μικτή** όταν χρησιμοποιούνται περισσότερα του ενός είδη κυττάρων.

2.2.1 Ανάπτυξη μικροοργανισμών

Οι μικροοργανισμοί μπορούν να πολλαπλασιαστούν, αν τους χορηγηθούν οι απαραίτητες θρεπτικές ουσίες. Αν και οι θρεπτικές απαιτήσεις όλων των μικροοργανισμών δεν είναι πάντα ίδιες, γενικά, τα μέσα ανάπτυξης περιέχουν πεπτόνη, εκχύλισμα μοσχαρίσιου κρέατος και εκχύλισμα ζύμης.

Η καλλιέργεια μπορεί να γίνει σε τριβλίο Petri, σε κωνική φιάλη, ή αντιδραστήρα. Τα στάδια ανάπτυξης περιλαμβάνουν:

- α) παρασκευή του θρεπτικού μέσου,
- β) αποστείρωση για την απομάκρυνση τυχόν ανεπιθύμητων μικροοργανισμών και
- γ) εμβολιασμό του μέσου ανάπτυξης με το μικροοργανισμό.

Γενικά για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών χρησιμοποιούνται δύο τεχνικές: της στερεάς κατάστασης (solid state) και της καταβύθισης (submerge).

Στην πρώτη περίπτωση η ανάπτυξη των μικροοργανισμών γίνεται σε στερεά υλικά χωρίς την παρουσία ελεύθερης υγρής φάσης. Το στερεό υλικό τοποθετείται σε μεγάλους δίσκους που μπορούν να αερίζονται διαβιβάζοντας αέρα. Στην περίπτωση αυτή ο εμβολιασμός και η συλλογή γίνονται αυτόματα.

Στη δεύτερη μέθοδο έχουμε δοχεία (ζυμωτήρες) με ανάδευση και σωλήνες που εισάγουν αποστειρωμένο υγρό αέρα. Στην περίπτωση αυτή ο εμβολιασμός γίνεται από κύτταρα που έχουν αναπτυχθεί αρχικά σε κωνική φιάλη.

Για μεγαλύτερης κλίμακας καλλιέργειες (βιομηχανική κλίμακα) προκειμένου να παραχθούν προϊόντα σε μεγάλες ποσότητες θα πρέπει να σχεδιασθεί ο αντιδραστήρας ζύμωσης σύμφωνα με τη συγκεκριμένη αντίδραση για τη βέλτιστη παραγωγή προϊόντων (βλ. σχεδιασμό βιοαντιδραστήρα)

Τράπεζες μικροοργανισμών

Οι μικροοργανισμοί όσοι υπάρχουν και όσοι συνεχώς ανακαλύπτονται ταξινομούνται με βάση τη φυσιολογία τους και τη γενετική τους και φυλάσσονται σε διάφορες **τράπεζες** μικροοργανισμών από ερευνητικά ιδρύματα και Πανεπιστήμια.

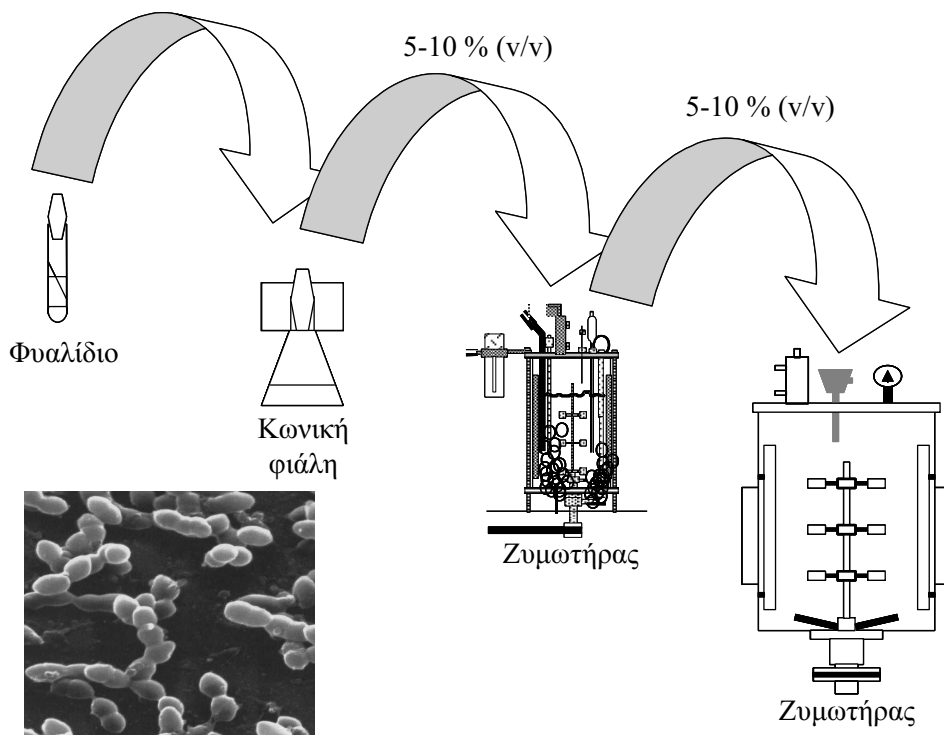
Αυτοί οι μικροοργανισμοί που υπάρχουν στη φύση είναι γνωστοί ως άγρια στελέχη. Υπάρχουν όμως και άλλα βελτιωμένα στελέχη που δημιουργούνται προκειμένου να εξυπηρετήσουν ανάγκες της βιομηχανίας και στην περίπτωση αυτή κυρίως χρησιμοποιούνται τεχνικές γενετικής μηχανικής για την τροποποίηση και βελτίωσή τους.

Συντήρηση και φύλαξη κυττάρων

Για φύλαξη των κυττάρων για μεγάλα χρονικά διαστήματα χρησιμοποιείται η τεχνική της λυοφίλισης (στην περίπτωση αυτή δεν παρατηρείται πολλαπλασιασμός των κυττάρων). Τα λυοφιλιμένα κύτταρα φυλάσσονται στην κατάψυξη σε 10% (όγκο/όγκο) γλυκερίνη. Για φύλαξη των κυττάρων για μικρά χρονικά διαστήματα, τα κύτταρα καλλιεργούνται σε στερεά υποστρώματα (π.χ. άγαρ), σε τριβλία Petri ή φυαλίδια και διατηρούνται στο ψυγείο (4 °C). Για να αποφύγουμε την αποικοδόμηση των κλώνων τα κύτταρα (μικροοργανισμοί) μεταφέρονται κάθε 15-30 ημέρες σε φρέσκο θρεπτικό υλικό. Στην περίπτωση αυτή πολλές φορές παρατηρείται μικρή αύξηση (ανάπτυξη) των κυττάρων

Εμβολιασμός (inoculation)

Τα κύτταρα stock (και από τις δυο παραπάνω περιπτώσεις) καλλιεργούνται σε τριβλία Petri και στη συνέχεια μεταφέρονται σε κωνικές φιάλες (μεγαλύτερη καλλιέργεια) και, τέλος, σε αντιδραστήρες (ζυμωτήρες) για βιομηχανική παραγωγή. Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή ως εμβολιασμός ή ενοφθάλμιση (inoculation).



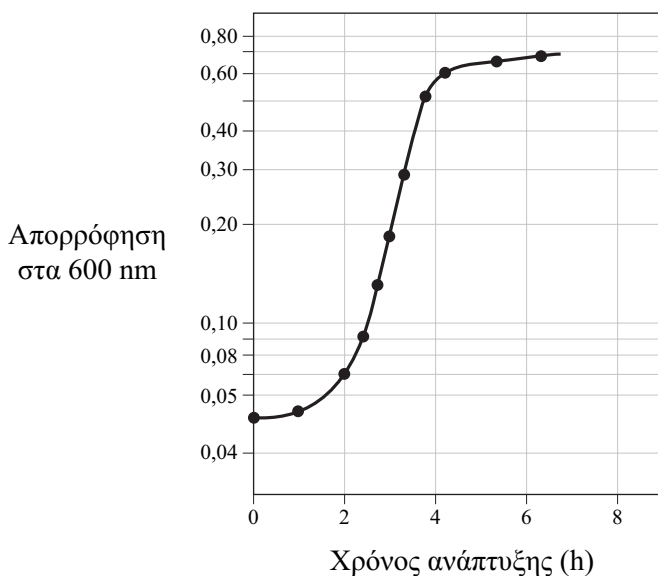
Σχ. 2.2. Εμβολιασμός αντιδραστήρα με κύτταρα

Για μεγάλες καλλιέργειες ο εμβολιασμός του αντιδραστήρα - ζυμωτήρα γίνεται από κύτταρα που έχουν μεγαλώσει σε **κωνική** φιάλη και συνήθως το εμβόλιο αποτελεί το 5-10% του τελικού όγκου του αντιδραστήρα. Στο σχήμα 2.2 φαίνονται τα διάφορα στάδια εμβολιασμού του αντιδραστήρα.

Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών, σε οποιοδήποτε δοχείο και αν γίνεται, σταματάει όταν:

- 1) μερικοί παράγοντες υπεύθυνοι για τον πολλαπλασιασμό τους εξαφανιστούν,
- 2) παραχθούν προϊόντα που παρεμποδίζουν την περαιτέρω ανάπτυξη και
- 3) ο αριθμός των κυττάρων καλύψει όλο το διαθέσιμο χώρο.

Κατά την ανάπτυξη τα κύτταρα αλλάζουν μέγεθος πριν από τη διαίρεσή τους. Στο σχήμα 2.3 φαίνεται διαγραμματικά η ανάπτυξη κυττάρων *E. coli*.



Σχ. 2.3. Καμπύλη ανάπτυξης κυττάρων *E. coli*.

2.2.2 Καλλιέργεια ζωικών κυττάρων

Κύτταρα από ζωικούς ιστούς μπορούν να καλλιεργηθούν σε θρεπτικά μέσα. Τα κύτταρα αυξάνουν σε αριθμό και μέγεθος. Καλλιέργειες κυττάρων θηλαστικών μπορεί να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή βιοχημικών προϊόντων όπως **ιντερφερόνες, εμβόλια κατά ιών, μονοκλωνικά αντισώματα** κ.λπ. Οι αντιδράσεις παραγωγής τους είναι γνωστές ως **βιομετασχηματισμοί**.

Οι θρεπτικές απαιτήσεις των κυττάρων θηλαστικών είναι πιο αυστηρές σε σχέση με τους μικροοργανισμούς. Τυπικά μέσα ανάπτυξης περιέχουν αμινοξέα, βιταμίνες, ορμόνες, αυξητικούς παράγοντες, ορυκτά άλατα και γλυκόζη. Σε κάθε μέσο ανάπτυξης προστίθεται πάντα ορός αίματος σε μια αναλογία 2-2,5% κατ' όγκον. Ο πίνακας 2.1 δίνει τα συστατικά ενός πολύ γνωστού θρεπτικού μέσου, του μέσου Eagle.

2.2.3 Καλλιέργεια φυτικών κυττάρων

Τα φυτά, όπως είναι γνωστόν, αποτελούν την κύρια πηγή για πολλά φαρμακευτικά προϊόντα, **χρωστικές ουσίες**, **αιθέρια έλαια** και **χημικά αγροτικών προϊόντων**. Αυτά τα προϊόντα, γνωστά ως δευτερογενείς μεταβολίτες,

Πίνακας 2.1: Σύσταση του θρεπτικού μέσου του Eagle.

<i>Ενώσεις</i>	<i>mg/L</i>	<i>Ενώσεις</i>	<i>mg/L</i>
L-αμινοξέα		Βιταμίνες	
Αργινίνη	105	Χολίνη	1
Κυστεΐνη	24	Φολικό οξύ	1
Γλουταμίνη	292	Ινοσιτόλη	2
Ιστιδίνη	31	Νικοταμίδιο	1
Ισολευκίνη	52	Πανθοθενικό	1
Λευκίνη	52	Πυριδοξάλη	1
Λυσίνη	58	Ριβοφλαβίνη	0,1
Μεθειονίνη	15	Θειαμίνη	1
Φαινυλαλανίνη	32	Άλατα	
Θρεονίνη	48	NaCl	6-800
Τρυπτοφάνη	10	KCl	400
Τυροσίνη	36	CaCl ₂	200
Βαλίνη	46	MgCl ₂ ·6H ₂ O	200
Σάκχαρα		NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	150
Γλυκόζη	1000	NaHCO ₃	2000
Ορός	5-10%		

παράγονται συνήθως σε ιχνοποσότητες. Παρά τη μεγάλη πρόοδο της συνθετικής χημείας, πολλοί απ' αυτούς τους μεταβολίτες είναι δύσκολο ή οικονομικά ασύμφορο να συντεθούν.

Στην περίπτωση αυτή για την **παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών από ένα φυτό**, χρησιμοποιούνται φυτικά κύτταρα (καλλιέργειες) αντί ολόκληρων φυτών. Τα προϊόντα παράγονται στις επιθυμητές ποσότητες και όταν υπάρχει ανάγκη γι' αυτά. Για την καλλιέργεια χρησιμοποιούνται κατάλληλοι **γενότυποι** και **κλώνοι** κυττάρων που δίνουν μεγάλες αποδόσεις.

Τα φυτικά κύτταρα αναπτύσσονται και αυτά, όπως οι μικροοργανισμοί, σε θρεπτικά μέσα, που κάθε φορά επιλέγονται για τα συγκεκριμένα κύτταρα. Επειδή τα φυτικά κύτταρα είναι πολύ διαφορετικά από τους μικροοργανισμούς, είναι αυτονόητο ότι δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ακριβώς τα ίδια θρεπτικά μέσα που αναφέραμε για τους μικροοργανισμούς.

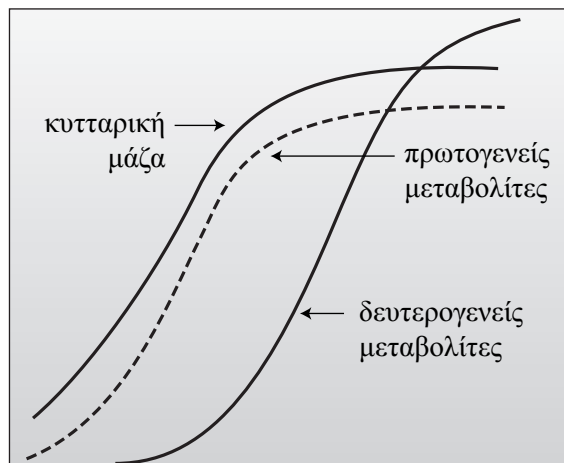
Γενικά τα **μέσα ανάπτυξης φυτικών κυττάρων** περιλαμβάνουν τα ακόλουθα βασικά συστατικά:

- α) **κύρια ανόργανα συστατικά:** άλατα αζώτου, καλίου, ασβεστίου, φωσφόρου, μαγνησίου και θείου που είναι τα έξι απαραίτητα συστατικά για την αύξηση των φυτών,
- β) **δευτερεύοντα ανόργανα συστατικά:** άλατα σιδήρου, μαγγανίου, ψευδαργύρου, χαλκού και κοβαλτίου,
- γ) **οργανικά συστατικά:** βιταμίνες, αμινοξέα, εκχύλισμα από κρέας, ζύμη κ.λπ.
- δ) **ρυθμιστές αύξησης φυτών:** αυξίνες (π.χ. 2,4-διχλωροφαινοξυ-οξεϊκό οξύ) και **κυτοκινίνες** (ή κυτταροκινίνες) που ρυθμίζουν την αύξηση και τη μορφογένεση των φυτικών ιστών,
- ε) **σάκχαρα:** συνήθως σουκρόζη, και
- στ) **άγαρ.**

2.2.4 Πρωτογενείς και δευτερογενείς μεταβολίτες

Πρωτογενείς μεταβολίτες είναι ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους που παράγονται από μικροοργανισμούς, η σύνθεση των οποίων εξαρτάται από την κυτταρική αύξηση (σχήμα 2.4). Στις ενώσεις αυτές περιλαμβάνονται το κιτρικό οξύ, η αιθυλική αλκοόλη και άλλα προϊόντα η παραγωγή των οποίων έχει μελετηθεί εκτεταμένα.

Για την παραγωγή πολλών τέτοιων προϊόντων και ενίσχυση της μεταβολικής ροής (metabolic fluxes) συμβάλλει ουσιαστικά η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA.



Σχ. 2.4. Κινητική σχηματισμού πρωτογενών και δευτερογενών μεταβολιτών σε σχέση με την ανάπτυξη των κυττάρων.

Δευτερογενείς μεταβολίτες είναι ενώσεις επίσης χαμηλού μοριακού βάρους που παράγονται από μικροοργανισμούς και άλλα κύτταρα η σύνθεση των οποίων γίνεται μετά την αύξηση των κυττάρων (σχήμα 2.4).

Τέτοια προϊόντα είναι τα διάφορα αντιβιοτικά: πενικιλίνες, τετρακυκλίνες, κεφαλοσπορίνες κ.λπ.

2.3 Μέτρηση της κυτταρικής αύξησης στις καλλιέργειες κυττάρων

Για να παρακολουθήσουμε την πορεία της κυτταρικής αύξησης όταν κάνουμε καλλιέργειες πρέπει να κάνουμε ποσοτικές μετρήσεις. Αυτές γίνονται με μέτρηση:

- α) του αριθμού των κυττάρων,
- β) της κυτταρικής μάζας και
- γ) της κυτταρικής δραστηρότητας.

Αριθμός κυττάρων

Η μέτρηση του αριθμού κυττάρων μπορεί να γίνει με μικροσκόπιο όπου τα κύτταρα τοποθετούνται σε έναν ειδικό θάλαμο και μετράμε τον αριθμό των κυττάρων που υπάρχουν σε συγκεκριμένη ποσότητα υγρού. Ένας άλλος τρόπος είναι με τη συσκευή **Coulter current** όπου έχουμε τη δυνατότητα να μετρήσουμε τον αριθμό αλλά και το μέγεθος των κυττάρων.

Κυτταρική μάζα

Η μέτρηση της κυτταρικής μάζας μπορεί να γίνει με τη μέθοδο των ξηρών κυττάρων ή με φασματοφωτομετρία. Στην πρώτη μέθοδο παίρνουμε μια ορισμένη ποσότητα από το κυτταρικό αιώρημα, τη φυγοκεντρούμε και πλένουμε τα κύτταρα πολύ καλά με απεσταγμένο νερό για να απομακρυνθούν όλα τα διαλυτά συστατικά. Επαναφυγοκεντρούμε, τα κύτταρα ξηραίνονται σε φούρνο και ζυγίζονται. Αυτή είναι και η απευθείας μέθοδος ποσοστικού προσδιορισμού των κυττάρων και είναι η πιο επαναλήψιμη.

Η δεύτερη μέθοδος είναι φωτομετρική. Η κυτταρική μάζα υπολογίζεται με τον προσδιορισμό της ποσότητας του φωτός που σκεδάζεται όταν περνά μέσα από ένα κυτταρικό αιώρημα. Η μέτρηση γίνεται σε φασματοφωτόμετρο όπου μας δίνει την απορρόφηση (A) σύμφωνα με τον τύπο:

$$A = \log \frac{I_0}{I} \quad (2.1)$$

όπου, I_0 : η ένταση του φωτός που προσπίπτει στο κυτταρικό αιώρημα,

I : η ένταση του φωτός που εξέρχεται.

Οι μετρήσεις γίνονται συνήθως στα 600-700 nm.

Κυτταρική δραστικότητα

Εκτός από τις παραπάνω δύο τεχνικές, για τον προσδιορισμό της κυτταρικής αύξησης χρησιμοποιούνται και άλλες που βασίζονται είτε στα προϊόντα που δίνουν είτε στα θρεπτικά συστατικά που καταναλώνουν τα κύτταρα ή στο ποσό της θερμότητας που εκλύεται κατά την κυτταρική αύξηση ή τέλος στη μέτρηση της βιολογικής δράσης των παραγομένων κυττάρων (π.χ. ενζυμικής δράσης).

2.4 Κινητική κυτάρων

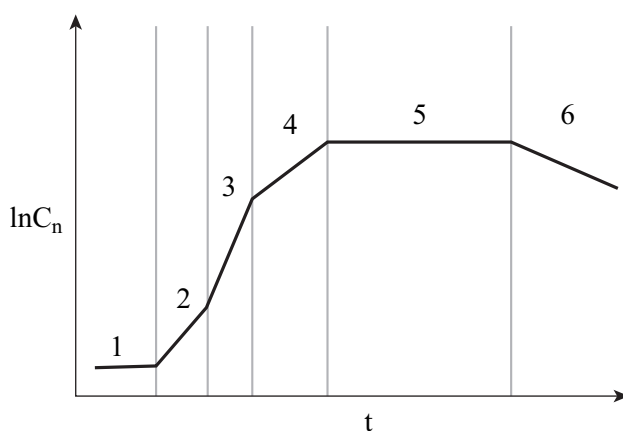
Η κινητική κυττάρων ασχολείται με τη μέτρηση της ταχύτητας αύξησης των κυττάρων και πώς αυτή επηρεάζεται από διάφορους φυσικούς ή χημικούς παράγοντες. Θα πρέπει να τονίσουμε ότι σε αντίθεση με τις ενζυμικές αντιδράσεις, στην περίπτωση των κυττάρων, η κινητική είναι αποτέλεσμα ενός μεγάλου αριθμού πολύπλοκων βιοχημικών και χημικών αντιδράσεων, φαινομένων μεταφοράς με πολλές φάσεις και σύμπλοκα συστήματα.

Βέβαια με κάποιες απαραίτητες παραδοχές μπορούμε και στην περίπτωση των κυττάρων να οδηγηθούμε σε απλά μοντέλα για το σχεδιασμό αντιδρα-

στήρα ανάπτυξης και πρακτικές μετρήσεις. Μερικές από τις παραδοχές αυτές είναι: τα κύτταρα αντιπροσωπεύονται μόνο από την κυτταρική μάζα ή τον αριθμό κυττάρων ή τις περιεχόμενες σ' αυτά πρωτεΐνες, DNA ή RNA.

Όταν έχουμε μια ασυνεχή καλλιέργεια μικοοργανισμών σ' ένα φρέσκο και αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό και καταγράφουμε την κυτταρική πυκνότητα C_n σε σχέση με το χρόνο t η καμπύλη αύξησης που προκύπτει (σχήμα 2.5), χωρίζεται στις παρακάτω έξι φάσεις:

1. Τη λανθάνουσα φάση, όπου για ένα χρονικό διάστημα δεν παρατηρείται καμιά αλλαγή στον αριθμό των κυττάρων.
2. Τη φάση επιταχυνόμενης αύξησης, όπου ο αριθμός των κυττάρων αρχίζει να αυξάνεται γρήγορα.
3. Την εκθετική φάση, όπου ο αριθμός των κυττάρων αυξάνει λογαριθμικά, αφού τα κύτταρα έχουν ήδη αρχίσει να διαιρούνται.
4. Τη φάση μη επιταχυνόμενης αύξησης, όταν η κυτταρική αύξηση έχει φτάσει στο μέγιστο. Ακολουθεί μια μείωση και στην ταχύτητα αύξησης και στη διαίρεση των κυττάρων.
5. Στατική φάση, όπου ο κυτταρικός πληθυσμός έχει φτάσει σε μια μέγιστη τιμή και δεν αυξάνεται περαιτέρω.
6. Φάση θανάτου. Μετά την ελάττωση ή εξαφάνιση των θρεπτικών συστατικών, τα κύτταρα πεθαίνουν και ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων σταδιακά εξαφανίζεται.



Σχ. 2.5. Καμπύλη αύξησης μονοκύτταρων οργανισμών. C_n = κυτταρική πυκνότητα (αριθμός κυττάρων στη μονάδα όγκου).

Για **μονοκύτταρους οργανισμούς** ο σταδιακός διπλασιασμός του αριθμού των κυττάρων συντελεί σε μια συνεχώς αυξανόμενη ταχύτητα πολλαπλασιασμού του κυτταρικού πληθυσμού.

Γενικά μια **καλλιέργεια βακτηρίων** ακολουθεί χημική αντίδραση πρώτης τάξης. Επομένως η ταχύτητα αύξησης του κυτταρικού πληθυσμού v_n σε οποιοδήποτε χρονικό διάστημα είναι ανάλογη της κυτταρικής πυκνότητας C_n των βακτηρίων που υπάρχουν στο διάστημα αυτό.

$$v_n = \frac{dC_n}{dt} = \mu C_n, \quad \mu = \frac{dC_n}{C_n} \frac{1}{dt}, \quad (2.2)$$

όπου, μ : ειδική ταχύτητα αύξησης των κυττάρων σε hr^{-1} .

Η ειδική ταχύτητα αύξησης δεν πρέπει να συγχέεται με την ταχύτητα αύξησης που έχει διαφορετικές μονάδες και διαφορετική σημασία.

Από την παραπάνω σχέση προκύπτει ότι:

$$\mu = \frac{1}{C_n} \frac{dC_n}{dt} = \frac{d \ln C_n}{dt}, \quad (2.3)$$

και με ολοκλήρωση
$$\int_{C_o}^{C_n} \frac{dC_n}{C_n} = \int_0^t dt$$

$$\ln C_n = \mu t, \quad \mu = \frac{\ln C_n}{t}$$

Η πιο γνωστή έκφραση που χρησιμοποιείται για την επίδραση της συγκέντρωσης του υποστρώματος στην ειδική ταχύτητα μ είναι η **εξίσωση Monod**:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} C_s}{K_s + C_s} \quad (2.4)$$

όπου C_s είναι η συγκέντρωση του συνεχώς ελαττούμενου υποστρώματος και K_s η σταθερά του συστήματος.

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να τονιστεί ότι αναφερόμαστε στο καθορίζον την ταχύτητα της αντίδρασης ανάπτυξης υπόστρωμα C_s , π.χ. στη γλυκόζη, χω-

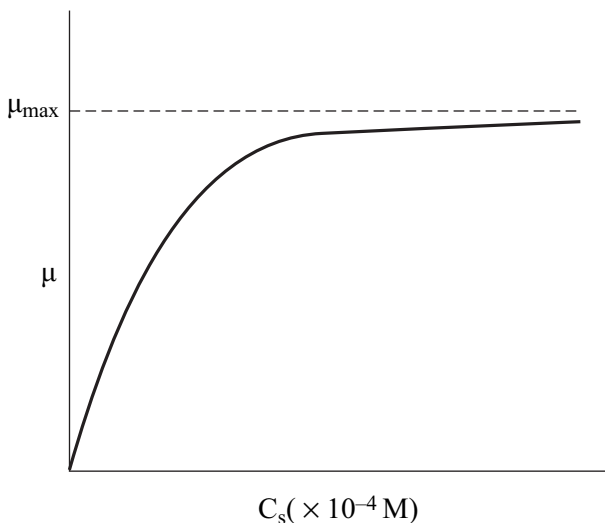
ρίς την παρουσία της οποίας δεν έχουμε ανάπτυξη και όχι στο σύνολο των συστατικών που υπάρχουν σε ένα θρεπτικό μέσο (medium).

Η εξίσωση Monod είναι μια εμπειρική σχέση βασισμένη στην κινητική ενζυμικών αντιδράσεων. Η γραφική παράσταση της εξίσωσης Monod φαίνεται στο σχήμα 2.6.

Η σταθερά K_s είναι ίση με τη συγκέντρωση του θρεπτικού μέσου (υποστρώματος) όταν το μ γίνει ίσο με το μισό της μέγιστης τιμής του μ_{\max} .

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι αν και η εξίσωση Monod είναι υπεραπλουστευμένη έκφραση για έναν πολύπλοκο μηχανισμό, όπως είναι η καλλιέργεια κυττάρων, περιγράφει ικανοποιητικά τις κινητικές ζύμωσης, όταν η συγκέντρωση του **θρεπτικού υλικού που προκαλεί αναστολή της κυτταρικής αύξησης είναι μικρή**.

Σύμφωνα με την εξίσωση Monod, επιπλέον αύξηση της συγκέντρωσης του θρεπτικού υλικού, δηλαδή για $\mu = \mu_{\max}$ δεν επηρεάζει την ειδική ταχύτητα μ όπως φαίνεται στο σχήμα 2.6.

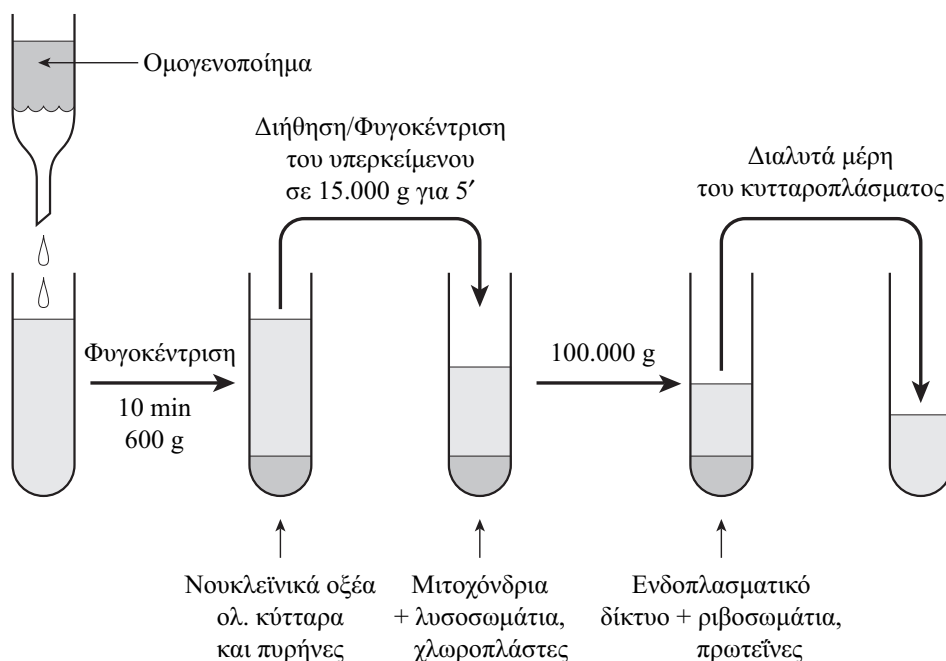


Σχ. 2.6. Γραφική παράσταση της ειδικής ταχύτητας αύξησης μ συναρτήσει της συγκέντρωσης του υποστρώματος.

Τέλος, εκτός από την εξίσωση Monod, έχουν προταθεί και άλλες εξισώσεις, κατά καιρούς, για την περιγραφή της εξάρτησης της ειδικής ταχύτητας κυτταρικής αύξησης από τη συγκέντρωση του θρεπτικού μέσου που θεωρούνται βελτιωμένες μορφές της εξίσωσης Monod.

2.5 Κλασμάτωση υποκυτταρικών στοιχείων

Εάν καταστρέψουμε (λύσουμε) την μεμβράνη των κυττάρων με κάποιον από τους τρόπους που αναφέρονται στο κεφάλαιο 14, δημιουργούμε ένα ομογενοποίημα από το οποίο μπορούμε, με διαφορετικές φυγοκεντρίσεις, να πάρουμε κλάσματα εμπλουτισμένα στα διάφορα υποκυτταρικά στοιχεία ή κυτταρικά οργανίδια. Σε μικρές ταχύτητες φυγοκέντρισης καθιζάνουν οι πυρήνες και τα κύτταρα που η κυτταρική τους μεμβράνη δεν έχει καταστραφεί. Σε μεγαλύτερες ταχύτητες καθιζάνουν τα μιτοχόνδρια και οι χλωροπλάστες και σε ακόμη μεγαλύτερες ταχύτητες τα ριβοσωμάτια, οι πρωτεΐνες και άλλα μακρομόρια (σχήμα 2.7).



Σχ. 2.7. Διαδικασία κλασμάτωσης και παραλαβής υποκυτταρικών στοιχείων.